



**CLUB  
BIBLIOGRÁFICO**

GeSIDA

## Diverse Large HIV-1 Non-subtype B Clusters Are Spreading Among Men Who Have Sex With Men in Spain

Elena Delgado, Sonia Benito, Vanessa Montero, María Teresa Cuevas,  
Aurora Fernández-García, Mónica Sánchez-Martínez, Elena García-Bodas,  
Francisco Díez-Fuertes, Horacio Gil, Javier Cañada, Cristina Carrera,  
Jesús Martínez-López, Marcos Sintes, Lucía Pérez-Álvarez, Michael M.  
Thomson and the Spanish Group for the Study of New HIV Diagnoses

Frontiers in Microbiology April 2019 | Volume 10

**Dra ISABEL VICIANA RAMOS**

SERVICIO MICROBIOLOGÍA

UGC INFECCIOSOS

HOSPITAL VIRGEN DE LA VICTORIA MÁLAGA



# INTRODUCCIÓN

El **VIH-1** exhibe una alta variabilidad genética característica, derivada de la alta tasa de mutación y recombinación

El **subtipo C** de VIH-1 es el más prevalente y representa el 47% de las infecciones a nivel mundial

En Europa occidental: **subtipo B**, inicialmente entre los hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y usuarios de drogas inyectables (UDI).

**Subtipos no B**: inmigrantes infectados por vía heterosexual de África subsahariana e individuos europeos relacionados con esas zonas

El grupo **Main (M)** de VIH-1: 9 subtipos, 93 formas circulares recombinantes (CRFs) y formas únicas recombinantes (URFs).

Seguido por subtipo B, subtipo A, CRF02\_AG, CRF01\_AE, subtipo G, subtipo D

Europa occidental:  
un aumento en la prevalencia de infecciones por subtipos no B

Hemelaar et al., 2018

Thomson, M. M., and Nájera, R. 2001

Paraskevis 2019

# INTRODUCCIÓN

En Europa occidental, el modo fundamental de propagación es a través del contacto sexual entre HSH  
WHO 2017

La emergencia de cluster de transmisión identificables por estudios de filogenia: impulsada por individuos con infección reciente que no son conscientes de su estatus de VIH

Clusters de subtipos no B entre HSH europeos:  
Subtipo A1, C y F1, CRF01\_AE, CRF02\_AG, CRF17\_BF, CRF19\_cpx, CRF50\_A1D, CRF56\_cpx, CRF60\_BC.

En este artículo los autores describen 4 grandes clusters en expansión en España entre HSH de los subtipos CRF02\_AG, A1, F1 y C, cada uno circulando en varias regiones españolas y relacionados con virus de otros países.

## MATERIAL y MÉTODOS

- Se recogieron muestras de plasma o sangre completa desde 1999 a 2018 de pacientes VIH-1 positivos atendidos en hospitales de 15 provincias pertenecientes a 9 regiones españolas
- País Vasco, Galicia, Navarra, Castilla León, La Rioja, Madrid, Castilla la Mancha, Aragón y Comunidad Valenciana
- La amplificación de fragmentos de VIH se realizó tanto a partir de RNA de plasma como de DNA extraído de sangre completa
- Para la secuenciación directa de los productos de amplificación se utilizó un secuenciador de capilares automático

# Análisis filogenético de las secuencias

- Las secuencias fueron alineadas con MAFFT v.7.  
(Multiple sequence alignment program)
- Un árbol inicial con todas las secuencias fue construido con el método de aproximación ML (Máxima verosimilitud) implementado en Fast Tree v2.1.10 (Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments)

Katoh and Standley, 2013

- La prueba de Shimodaira-Hasegawa (SH), ajusta el sesgo de selección
- Los clusters de transmisión se definieron como aquellos con valores de SH-like  $\geq 0.95$  comprendiendo 4 o más individuos, siendo la mayoría de ellos nativos españoles.

Price et al., 2010

## **Análisis filogenético de las secuencias**

Los análisis se repitieron incluyendo secuencias de la misma forma genética disponibles en la base de Los Álamos (HIV Sequence Database, 2019)

## **Estimación temporal y geográfica del origen de los clusters**

Para estimar el origen temporal de los ancestros comunes más recientes (tMRCA) y la localización geográfica más probable de los clusters y subclusters se realizaron análisis coalescentes con el método bayesiano con las secuencias de PR-RT (Drummond et al., 2012)

## **Determinación de la resistencia antirretroviral**

La resistencia antirretroviral fue analizada con Calibrated Population Resistance Tool (Gifford et al., 2009).

## **Análisis estadístico**

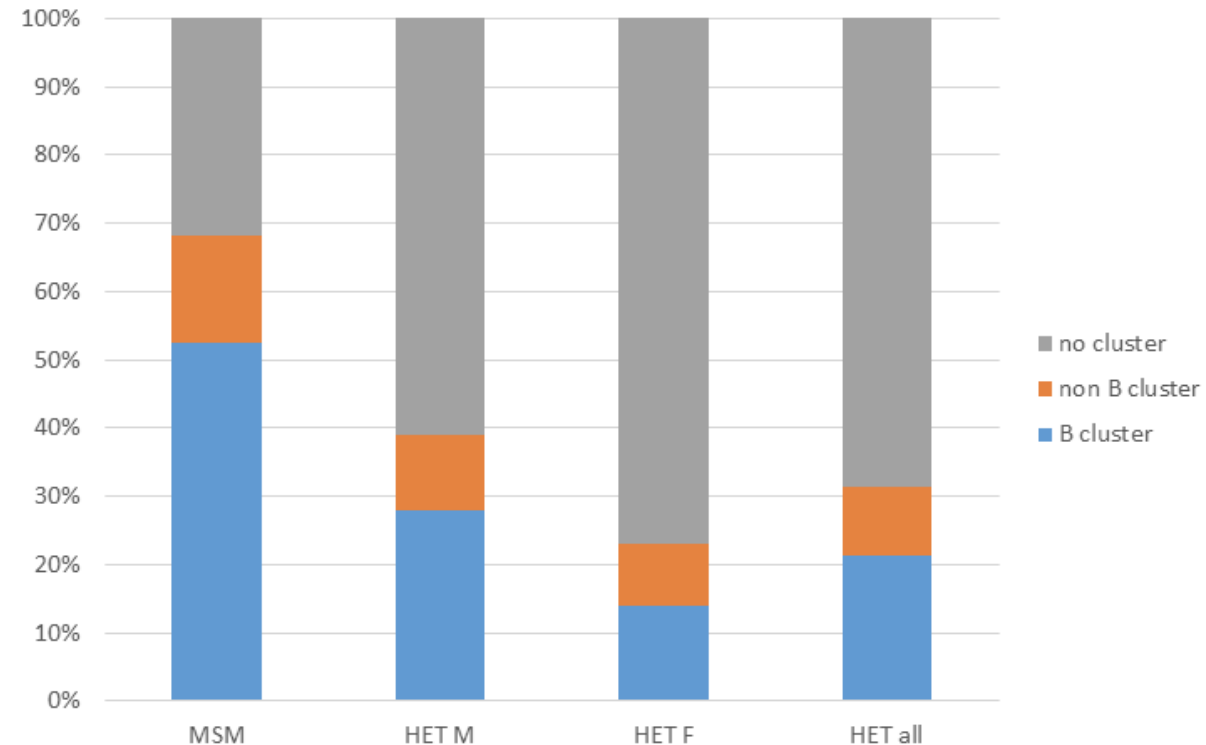
Se analizaron con la prueba exacta de Fisher las diferencias en la frecuencia de agrupamiento entre HSH e individuos infectados heterosexuales y los cambios en las proporciones de infecciones de subtipo no B a lo largo del tiempo

# RESULTADOS

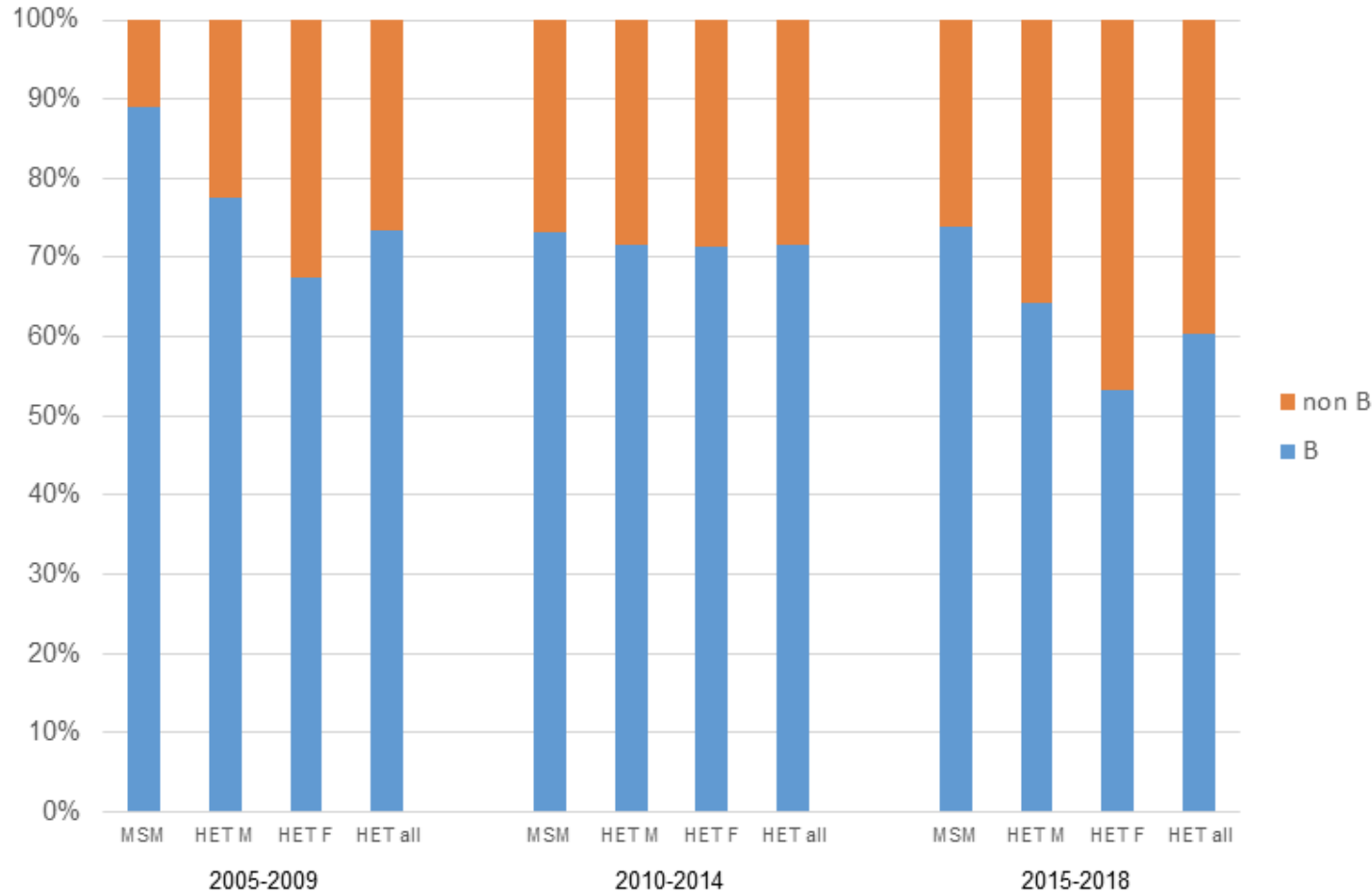


Pertenecer a un grupo era más frecuente entre los HSH españoles que entre individuos españoles infectados por vía heterosexual (68% vs. 31%;  $p < 0,005$ )

**Supplementary Figure 1.** Proportions of HIV-1-infected Spanish individuals belonging to subtype B and non-subtype B transmission clusters among MSM, heterosexually-infected male (HET M) and female (HET F) individuals, and all heterosexually-infected individuals (HET all).



## RESULTADOS



Se observaron incrementos de subtipos no B en HSH españoles  
2005-2009 hasta 2010-2014  
(10.9% a 26.7%;  $p = 1.4 \cdot 10^{-6}$ )

Entre individuos españoles heterosexuales  
2010-2014 hasta 2015-2018  
(28.5% a 39.7%;  $p = 0.0097$ )

**Supplementary Figure 2.** Changes along time in proportions of HIV-1 subtype B and non-subtype B infections among newly diagnosed sexually-infected Spanish individuals, according to transmission routes. Individuals newly diagnosed in 1999-2004 were not included in the analysis, due to the low numbers of available samples.



RESULTADOS

CRF02\_1



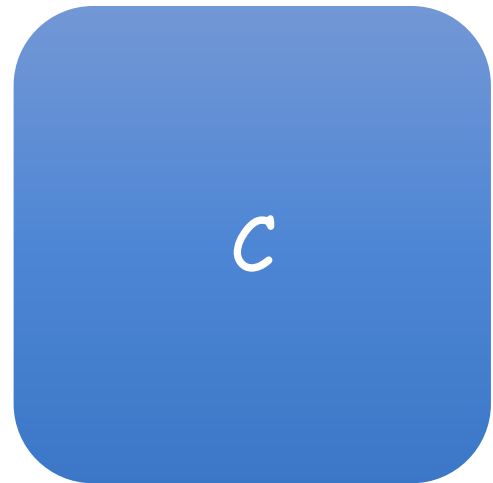
A1\_1



4 grandes clusters  
10 ó más individuos  
HSH



Clusters de  
Subtipo no B



C\_7



F1\_3



## CLUSTER CRF02\_1

CRF02\_AG: forma genética predominante en África occidental y común en África central y está presente en varios países de Europa, Túnez y Brasil

Uno de los mayores clusters de subtipos no B circulantes entre HSH comunicados en Europa

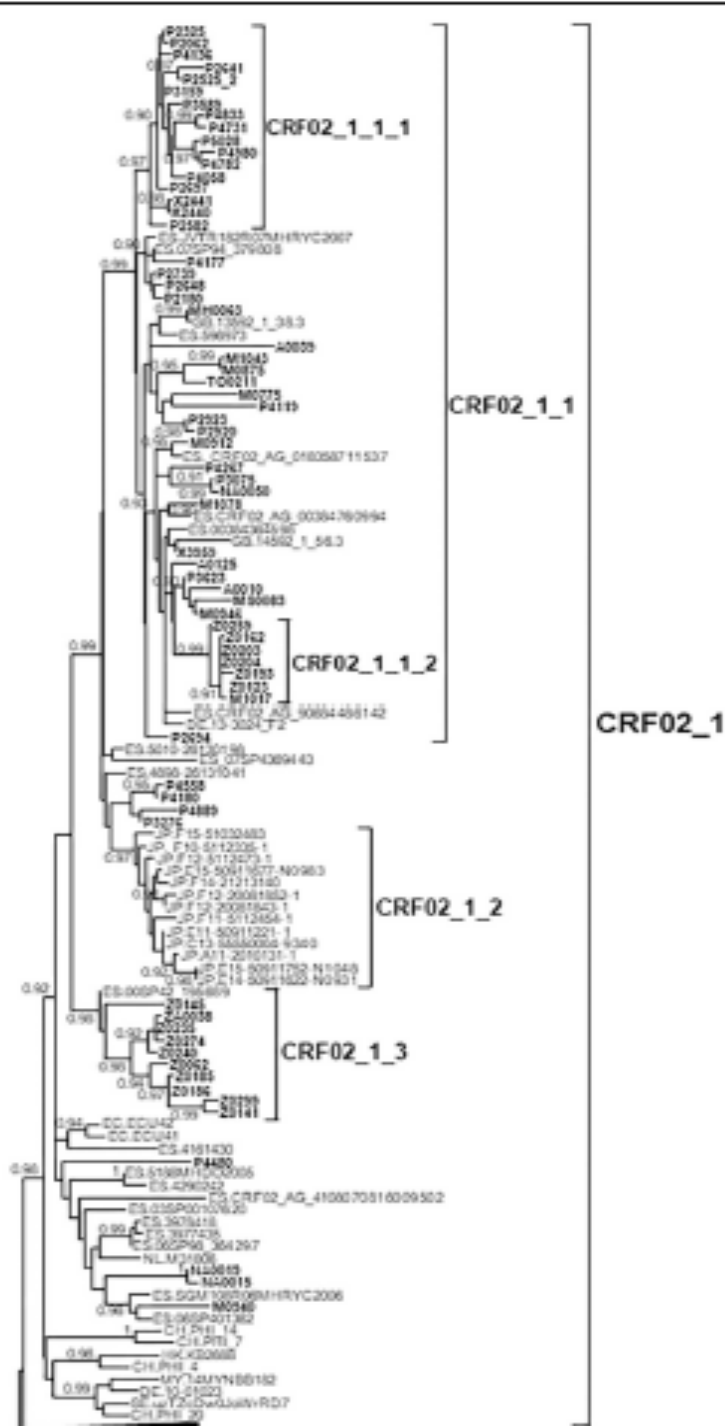
115 individuos, 67 estudio y 48 secuencias recuperadas de las bases de datos

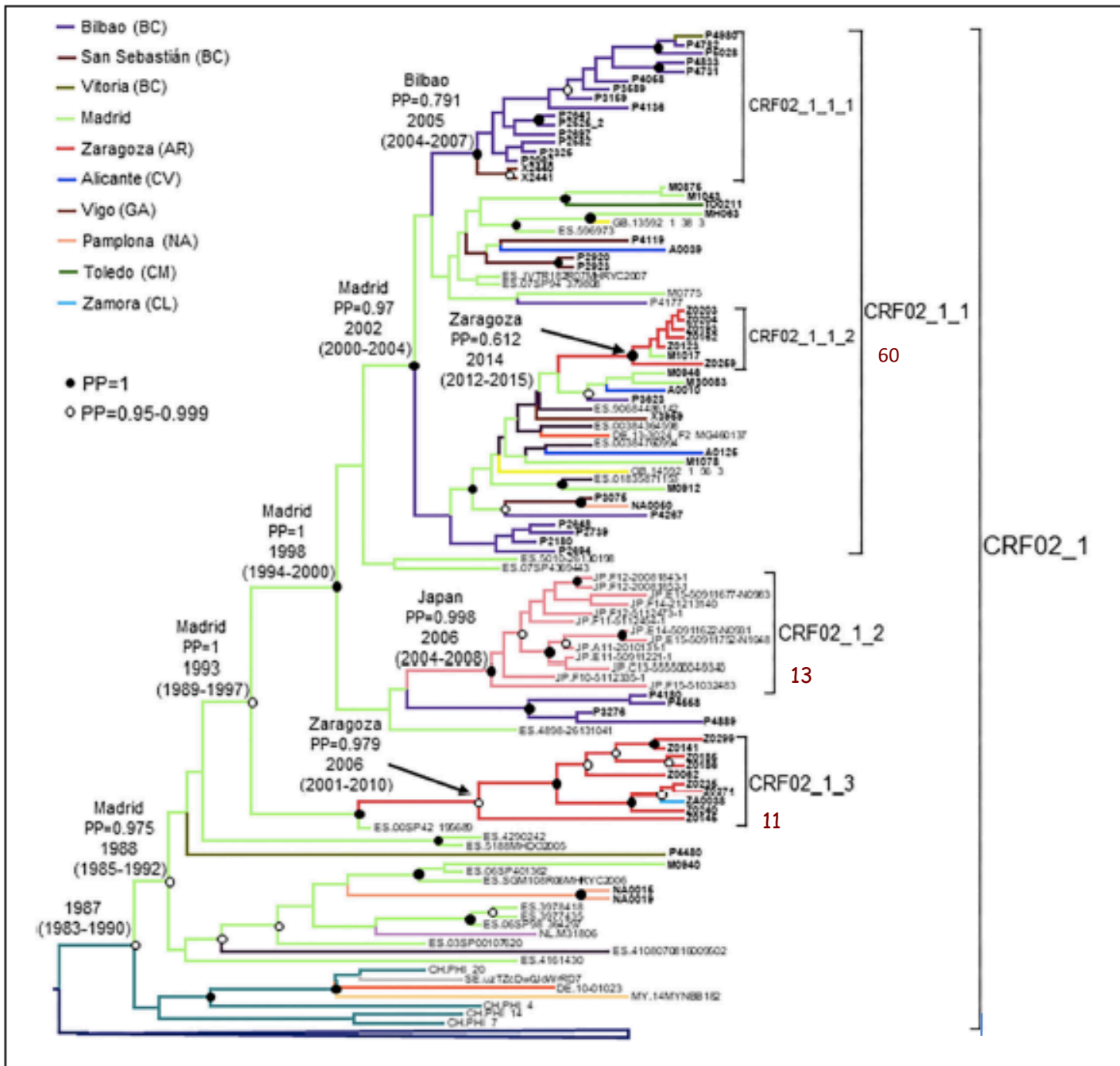
Las muestras de España provenían de 8 regiones, principalmente País Vasco, Madrid y Aragón

Otros 9 países de Europa occidental, Asia y Sudamérica, con 13 virus japoneses agrupándose en un subcluster monofilogenético, indicando la circulación en ese país

Años de diagnóstico de VIH-1 2008-2018  
88% eran de hombres  
51% se declararon HSH

Giulianiet al., 2013; Brand et al., 2014; Tamalet et al., 2015; Beloukas et al 2016, Chaillon et al., 2017; Verhofstede et al., 2018





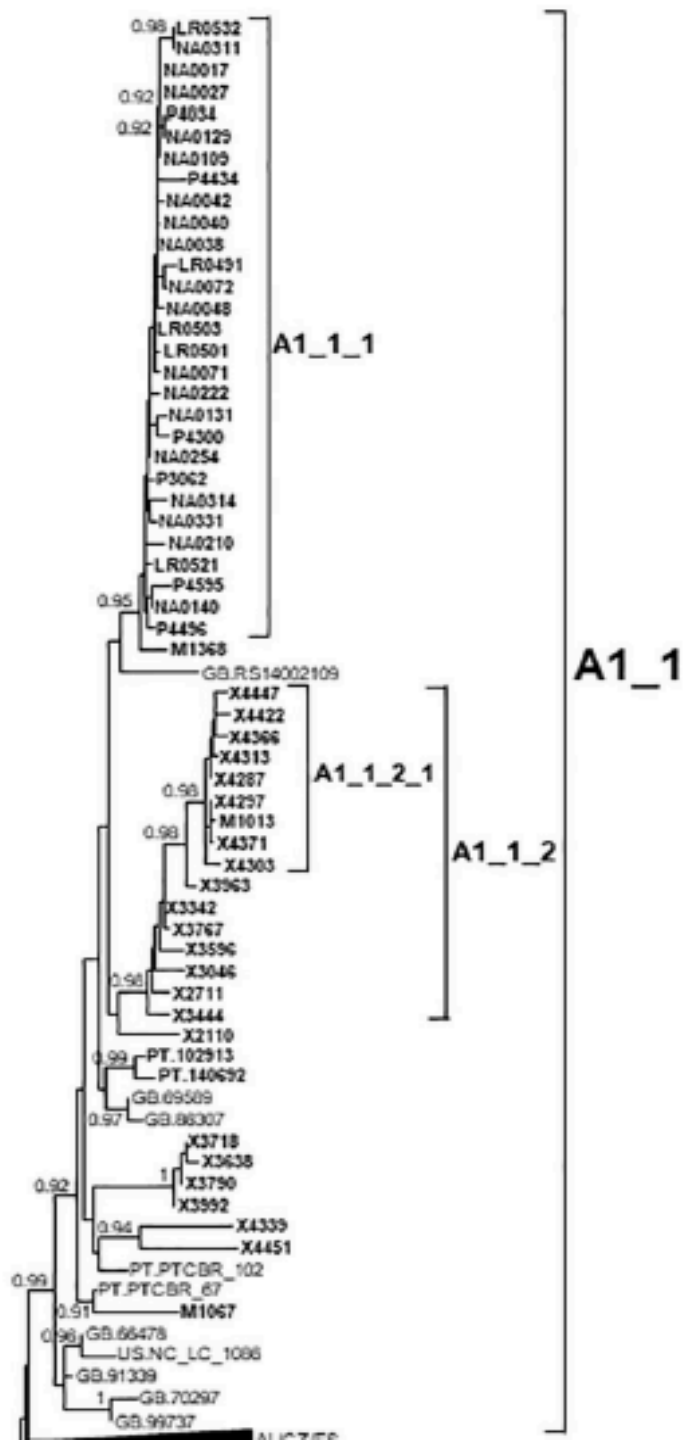
## CLUSTER CRF02\_1

**CRF02\_1\_1** comprendió 60 individuos de 7 Regiones españolas, dos de Reino Unido y uno de Alemania. Dos subgrupos, asociado con el País Vasco y la ciudad de Zaragoza.

**CRF02\_1\_2** comprendió 13 individuos de Japón.

**CRF02\_1\_3** comprendió 11 individuos, 10 de ellos de Zaragoza. 5 mujeres y 5 hombres fueron infectados por contacto heterosexual.

tMRCA sobre 1986, con una localización incierta para todo el cluster. 1988 en Madrid para el subcluster. Tres clusters mayores emergieron en años recientes, con tMRCAs en los 2000s.



## Cluster A1\_1

66 individuos, 54 estudiados por el grupo y 12 secuencias en bases de datos (7 de Reino Unido, 4 de Portugal y 1 de Estados Unidos)

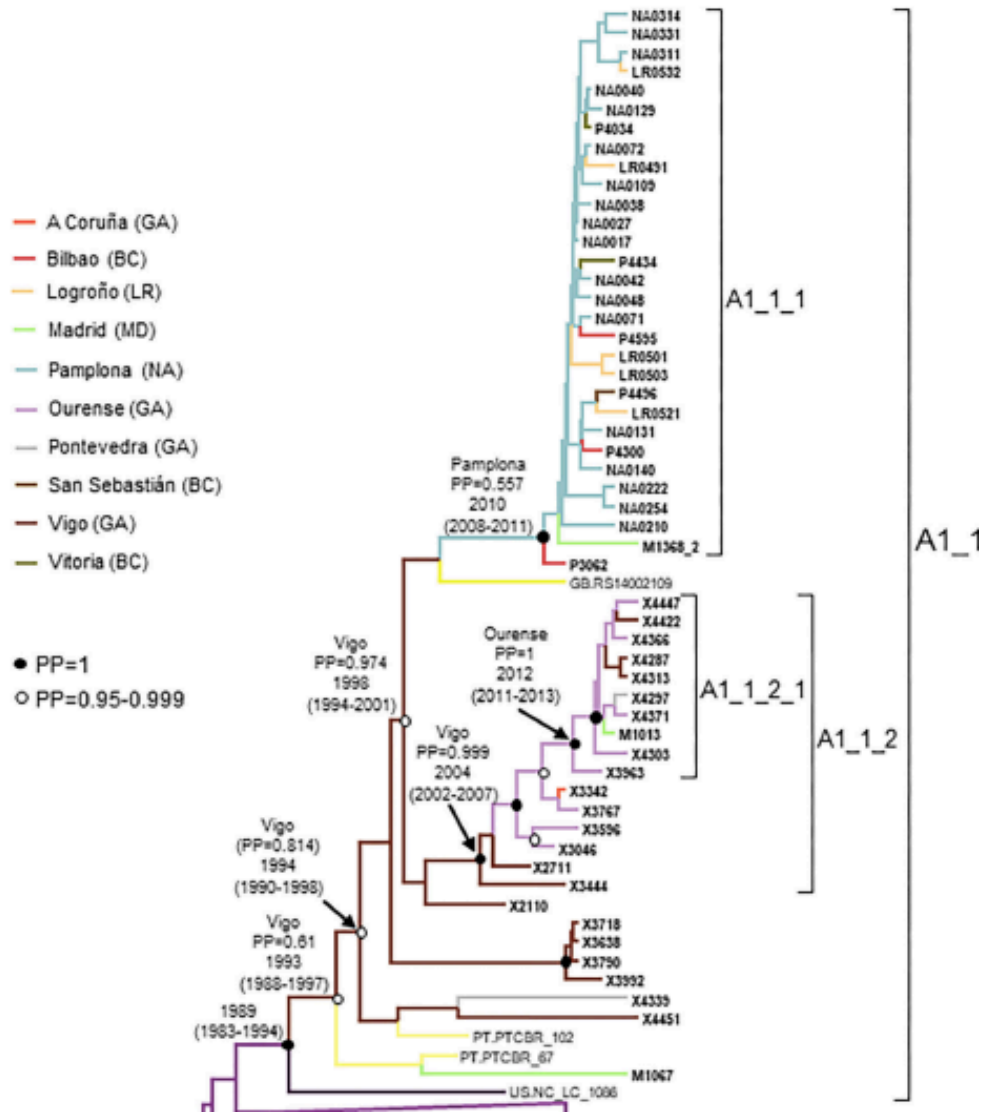
Las muestras de España fueron recogidas en 5 regiones, principalmente Galicia y Navarra

A1\_1\_1, formado por personas de Navarra, País Vasco, La Rioja y Madrid

A1\_1\_2 comprende individuos de Galicia

93% en el grupo eran hombres, con predominio de HSH

Individuos diagnosticados en 2012-2018.



## Cluster A1\_1

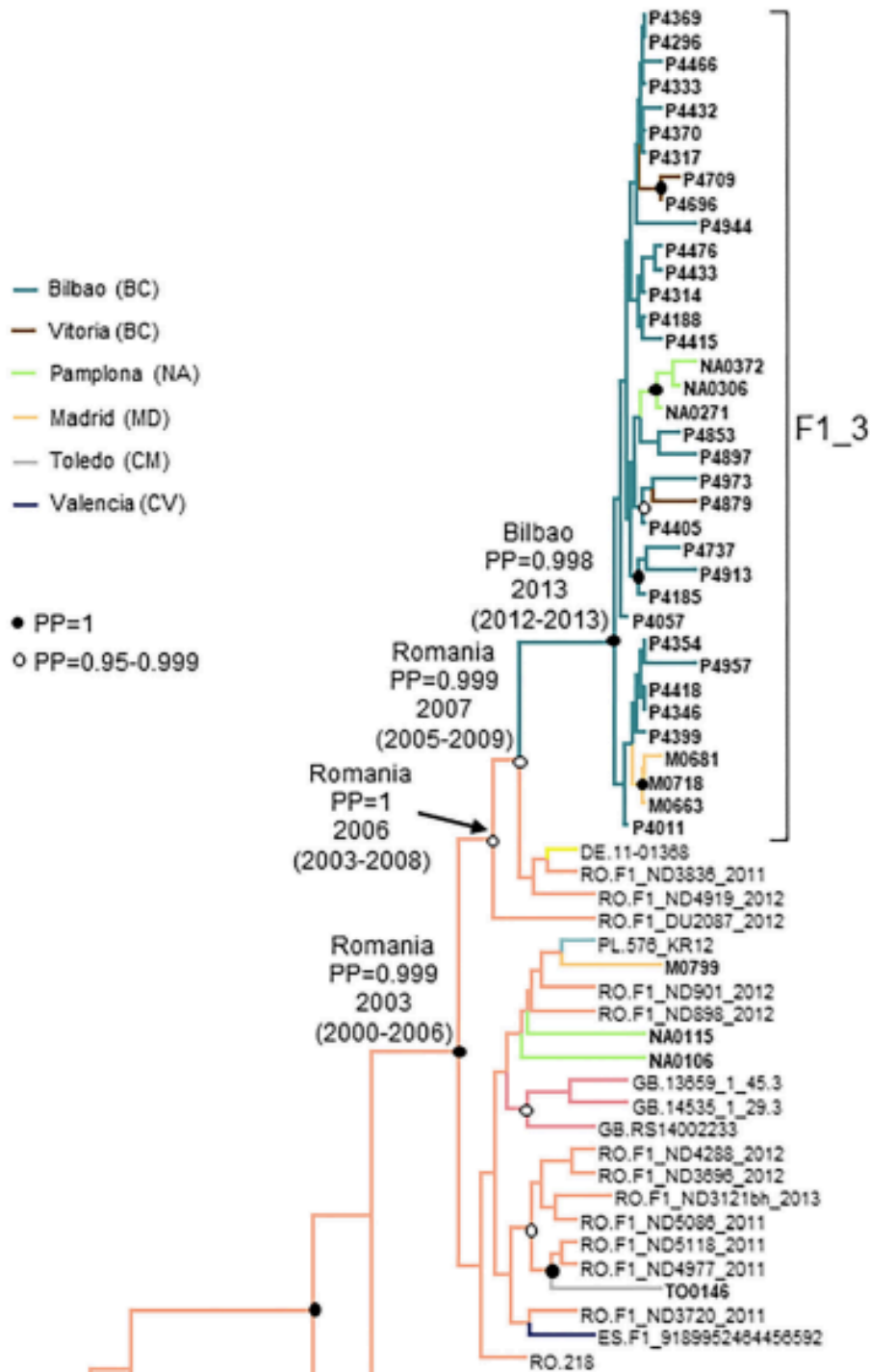
El cluster de subtipo A1 es el segundo cluster más grande descrito en el estudio y es el mayor reportado hasta la fecha en Europa occidental

Subtipo A1: el centro y oeste de África, los países de la antigua Unión Soviética, Grecia, Albania y Chipre y como una forma menor en India

Su origen no es reciente, con un tMRCA alrededor de 1989, con una localización incierta para todo el cluster, y alrededor de 1994 en Vigo, Galicia

Los dos subclusters mayores son de origen reciente, con tMRCAs alrededor de 2004 y 2010 respectivamente

El linaje circulante en Grecia y Albania, y Chipre, es de origen monofilogenético con un tMRCA estimado alrededor de 1978



**CLUSTER F1\_3**

El subtipo F1 está circulando en África central, Brasil y Rumania y también se han identificado en España, Bélgica, Suiza, Italia y Portugal

Comprendió 36 individuos todos residentes en España, Bilbao

Hombres, mayoría HSH Diagnosticadas a partir de 2014

Relacionó con virus de pacientes procedentes de Rumania

Thomson et al., 2012; Delgado et al., 2015, Vinken et al., 2017

## CLUSTER F1\_3

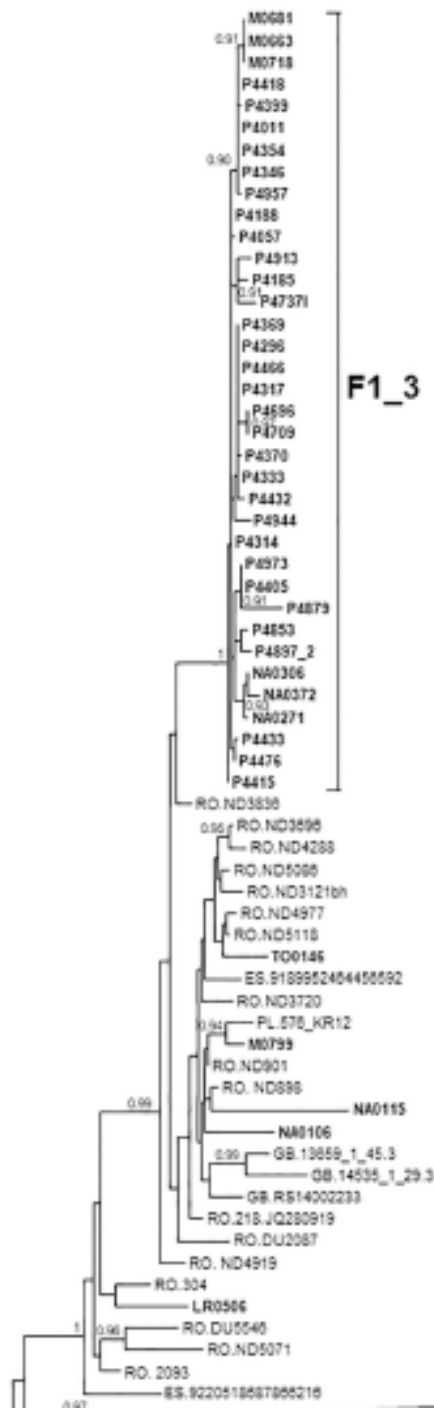
Es el que tiene el origen más reciente con un estimado tMRCA alrededor de 2013 en Bilbao, y está en expansión con 6 diagnósticos nuevos en 2018

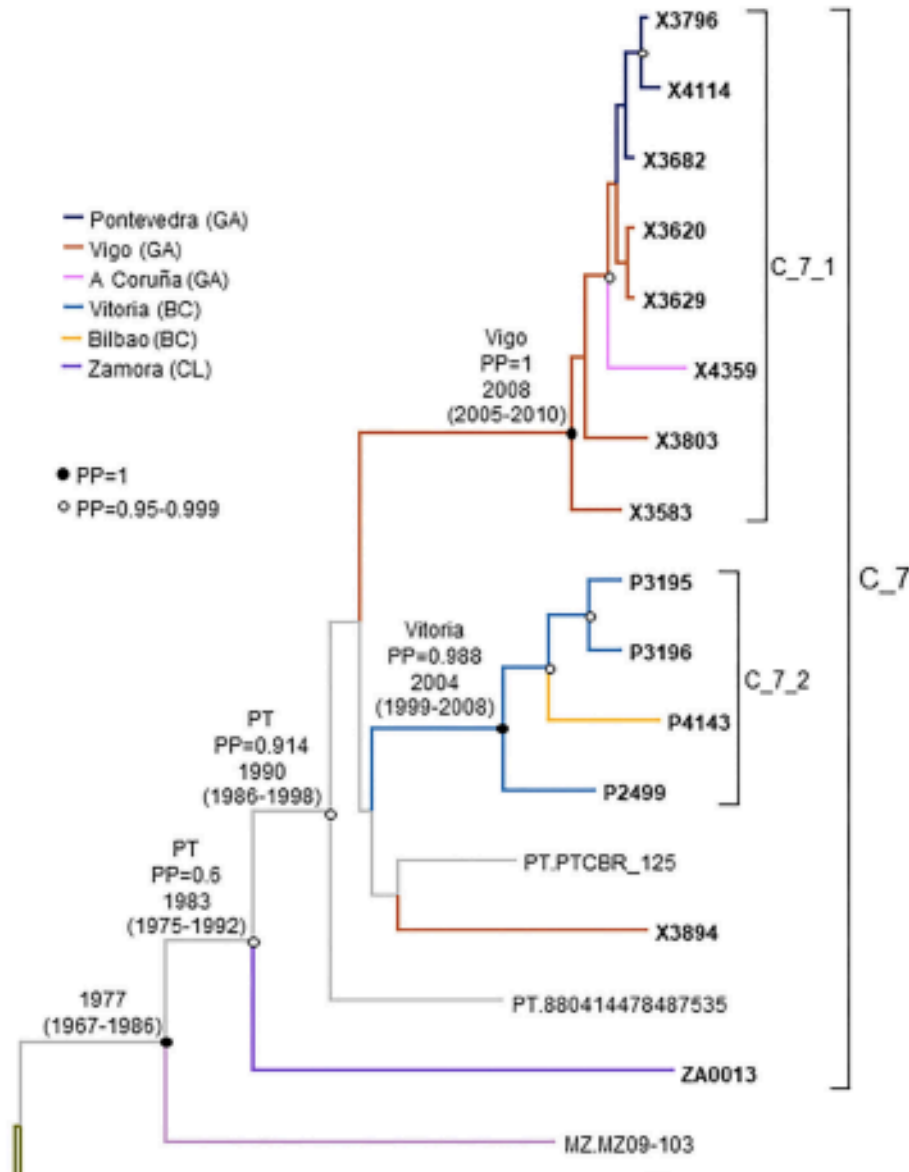
F1\_3 está relacionado con virus F1 de Rumania que están relacionados con virus circulantes en Angola, propagados

1. Inicialmente entre adultos por contacto sexual
2. Una posterior propagación entre niños institucionalizados a través de material de inyección contaminado
3. Más recientemente entre UDIs

Intercambio de formas genéticas entre Rumania y España: presencia de una importante población inmigrante Rumana en España, viajando con frecuencia entre ambos países.

Guimarães et al., 2009  
Bello et al., 2012  
Niculescu et al. 2015





## CLUSTER C\_7

Comprendió 17 individuos, 14 estudiados por el grupo, 3 de Portugal y una secuencia de Mozambique

C\_7 dos subgrupos

C\_7\_1, comprende 8 muestras de Galicia

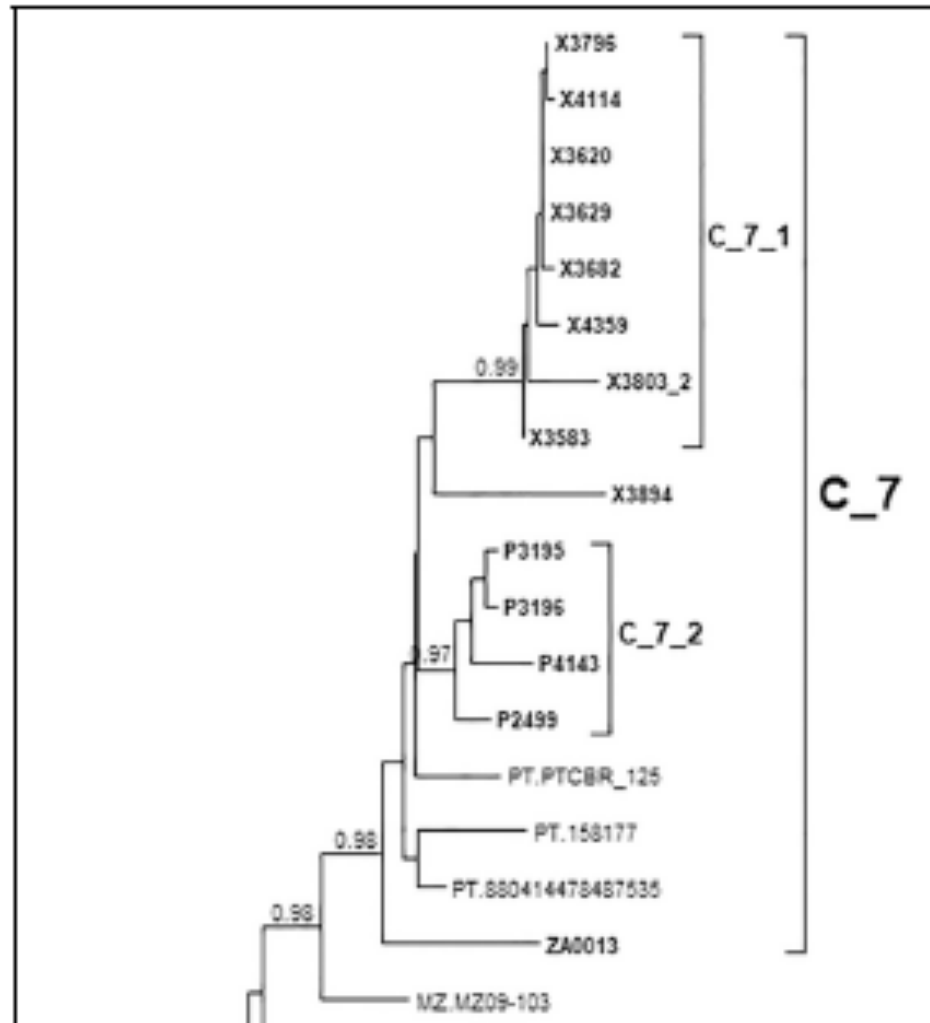
C\_7\_2 comprende 4 muestras del País Vasco

Diagnóstico en 2012-2017

Todos los individuos en C\_7 eran hombres con infección sexual, con 5 autodeclarados HSH



## CLUSTER C\_7



El subtipo C es el clado más prevalente en la pandemia de VIH-1, circulando principalmente en el Sur y Este de África, el sur de Brasil y Sur de Asia

En Europa occidental, los clusters del subtipo C se han reportado en Reino Unido, Italia y Portugal.

tMRCA alrededor de 1983, con probable origen en Portugal

Subclusters son relativamente recientes, en 2008 (Vigo) y 2004 (Vitoria)

C\_7 está relacionado con un virus de Mozambique, una colonia Portuguesa donde el subtipo C es la forma predominante.

Hughes et al., 2009; de Oliveira et al., 2010;  
Ragonnet-Cronin et al., 2016

## Mutaciones de resistencia a los Antirretrovirales (ARV)

En el cluster **CRF02\_1**, cinco secuencias (4 de España y una de Alemania) tenían mutaciones de resistencia a los fármacos ARV:

- Un paciente en fracaso terapéutico con múltiples mutaciones de resistencia
- Dos pacientes naive, con K101E y K103N
- Dos pacientes con K101E y K103N sin datos sobre tratamiento farmacológico

En el cluster **A1\_1**, una secuencia de base de datos de Reino Unido tenía mutaciones de resistencia a los NNRTI: Y188C y G190A

En el cluster **C\_7**, todas las secuencias excepto 2 tenían la mutación L90M asociada con la resistencia a los fármacos inhibidores de la proteasa. Las 13 secuencias españolas con esta mutación fueron de individuos sin tratamiento previo.

## DISCUSIÓN

En este estudio, basado en un gran conjunto de datos de España, encontramos un aumento en la proporción de infecciones por subtipo no B entre HSH en años recientes

**La descripción de los 4 clusters** analizados están en línea con las de otros clusters de subtipo no B comunicados entre HSH en Europa occidental

### **Características destacadas de los grupos aquí descritos**

1. El tamaño relativamente grande de CRF02\_1 y A1\_1, en relación a la mayoría de los clusters de subtipo no B informados entre HSH en Europa occidental
2. Su amplia distribución geográfica entre diferentes países
3. La rápida expansión de F1\_3, con 36 diagnósticos en sólo 4 años

## DISCUSIÓN

3 individuos en cada uno de los clusters F1\_3 y C\_7, compuesto en su totalidad por hombres, declararon ser heterosexuales

En el Cluster CRF02\_1 (excluyendo el subcluster heterosexual CRF02\_1\_3) y A1\_1, entre los individuos infectados vía sexual el número de hombres auto declarados heterosexuales excedieron el número de mujeres

Esto sugiere que al menos alguno de los hombres autodeclarados heterosexuales dentro del cluster, podrían ser de hecho HSH,

# CONCLUSIONES

La expansión de grandes cluster entre HSH en los últimos años, refleja la existencia de comportamientos sexuales de riesgo

Las autoridades de salud pública deberían implementar medidas destinadas a prevenir la transmisión de VIH-1 en esta población, incluyendo

1. Consejos en el comportamiento para reducir prácticas de riesgo
2. Profilaxis previa a la exposición
3. Diagnóstico temprano
4. Tratamiento precoz de las infecciones confirmadas

La prevención de la transmisión del VIH-1 entre HSH también podría resultar en una reducción de la transmisión heterosexual de las infecciones que pueden tener su origen en redes HSH

Grant et al., 2010;

Volk et al., 2015;

McCormack et al., 2016

Oster et al., 2015;

Esbjörnsson et al., 2016

## CONCLUSIONES

La **vigilancia molecular** continua del VIH-1: información en tiempo real sobre la dinámica de expansión de redes de transmisión.

Enfocar los esfuerzos en poblaciones con el mayor riesgo de adquirir VIH

Monitorear la eficacia de las intervenciones de salud pública

La vigilancia molecular de VIH también puede proporcionar información importante para

1. El diseño de inmunógenos vacunales adaptados a los principales variantes que se propagan activamente en diferentes áreas,
2. Considerar la correlación de los clados del VIH-1 con la susceptibilidad a la respuesta inmune protectora con potencial para inducir amplia respuesta de anticuerpos neutralizantes
3. Permitirá obtener agentes derivados de estas variantes para su uso en investigaciones relacionadas con vacunas

Estos agentes también serán útiles para estudiar las bases biológicas de mayor patogenicidad, transmisibilidad y respuesta disminuida a los fármacos ARV exhibidas por algunas variantes de VIH-1

Baeten et al., 2007; Kiwanuka et al.

Pernas et al., 2014; Cid-Silva et al., 2018



Muchas gracias por su atención