



Epidemiología de las fases tempranas de la infección por el VIH en pacientes ambulatorios de una zona semi-rural del sur de Mozambique

Cèlia Serna Bolea

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Epidemiología de las fases tempranas de la infección por el VIH en pacientes ambulatorios de una zona semi-rural del sur de Mozambique

Memoria presentada por **Cèlia Serna Bolea** para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona.

Directora de tesis: Dra. **Denise Naniche**
Programa de Doctorado en Medicina
Línea de investigación: Salud Internacional
Facultat de Medicina

Marzo de 2012

Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona
IDIBAPS/Hospital Clínic
Universitat de Barcelona



La Dra. Denise Naniche, investigadora del Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (CRESIB), certifica que la tesis titulada **“Epidemiología de las fases tempranas de la infección por el VIH en pacientes ambulatorios de una zona semi-rural del sur de Mozambique”** presentada por Cèlia Serna Bolea ha sido realizada bajo su dirección, y cumple todos los requisitos que dicta la normativa vigente para la presentación de tesis doctorales como un compendio de artículos en la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Dra. Denise Naniche

Barcelona, Marzo de 2012

PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS

High Prevalence of symptomatic acute HIV infection in an outpatient Ward in southern Mozambique: identification and follow-up.

Celia Serna-Bolea, Jose Muñoz, Jose M. Almeida, Ariel Nhacolo, Emilio Letang, Tacilta Nhampossa, Eliana Ferreira, Pedro Alonso, Denise Naniche.

AIDS, 2010 Feb 20; 24(4):603-8

Factor de Impacto (2010): 6.348

Cuartil: 1 (Infectious Diseases)

Recent HIV-1 infection: identification of individuals with high viral load setpoint in a voluntary counselling and testing centre in rural Mozambique.

Celia Serna-Bolea, Nilsa de Deus, Sozinho Acácio, Jose Muñoz, Delino Nhalungo, Emilio Letang, Pedro Alonso, Denise Naniche.

PLoS ONE, 2012 Feb 21; 7(2): e31859

Factor de Impacto (2010): 4.411

Cuartil: 1 (Biology)

A la meva mare i al meu pare

**Epidemiología de las fases tempranas
de la infección por el VIH
en pacientes ambulatorios
de una zona semi-rural del sur de Mozambique**

ACRÓNIMOS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AHI	infección aguda por el VIH (<i>acute HIV infection</i>)
AI	índice de avidéz (<i>avidity Index</i>)
ANC	clínica antenatal (<i>antenatal clinic</i>)
ARN	ácido ribonucleico
CISM	Centro de Investigación en Salud de Manhiça (Centro de Investigaçã em Saúde da Manhiça)
CRESIB	Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (<i>Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona</i>)
CTL	linfocitos T citotóxicos (<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>)
CV	carga viral del VIH (nº copias ARN/ml)
DC	células dendríticas (<i>dendritic cells</i>)
EIA	ensayos inmunoenzimáticos (<i>Enzyme Immuno Assay</i>)
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ETS	enfermedad de transmisión sexual
GALT	tejido linfoide asociado a intestino (<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
HDM	Hospital Distrital de Manhiça
HSB	hombres que tienen sexo con hombres
Ig	inmunoglobulina
LTNP	progresores lentos (<i>long-term nonprogressors</i>)
MTCT	transmisión madre-hijo (<i>mother to child transmission</i>)
NAAT	test de amplificación de ácidos nucleicos (<i>nucleic acid amplification test</i>)
PNH	primates no humanos
POC	<i>Point of Care</i>
PrEP	profilaxis antes de la exposición (<i>pre-Exposure Prophylaxis</i>)
RDT	tests de diagnóstico rápido (<i>Rapid Diagnostic Test</i>)
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TARGA	terapia antirretroviral de gran actividad
TARV	terapia antirretroviral
VCT	centro de asesoramiento y pruebas voluntarias para el VIH (<i>Voluntary Counselling and Testing for HIV</i>)
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	virus de la inmunodeficiencia en simios

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	15
1.1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Síndrome de la inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)	17
1.2	Epidemiología del VIH	18
1.2.1	Epidemiología del VIH en Mozambique	20
1.3	Historia natural de la infección por el VIH	24
1.3.1	Fisiopatología de la fase aguda y reciente de la infección	26
1.3.2	Transmisión del VIH durante la fase aguda	31
1.4	Detección de la infección por el VIH	33
1.4.1	Marcadores de las etapas aguda y reciente de la infección por el VIH	33
1.4.2	Pruebas diagnósticas para la infección por el VIH	36
1.4.3	Desarrollo de nuevas técnicas para la detección del VIH en las etapas tempranas de la infección	39
1.5	Estrategias de prevención de la infección por el VIH en África Subsahariana	42
2.	HIPÓTESIS y OBJETIVOS	47
3.	CONTEXTO del ESTUDIO	51

4.	RESULTADOS	59
5.	DISCUSIÓN	85
6.	CONCLUSIONES	95
7.	REFERENCIAS	99
8.	ANEXO. Aprobaciones de los comités de ética	113
9.	AGRAÏMENTS	119

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Síndrome de la inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue por primera vez descrito en 1981¹⁻³, pero no fue hasta 1983 cuando se identificó el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como el agente infeccioso causal de esta enfermedad⁴⁻⁶. Inicialmente fue llamado virus T-linfotrópico humano III (HTLV-III “human T-lymphotropic virus”) por su infección preferencial de los linfocitos T o virus asociado a linfadenopatías (LAV “lymphadenopathy-associated virus”) por ser causante de trastornos a nivel de los ganglios linfáticos. Más tarde fue denominado Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)^{7, 8}, nombre con el que se conoce actualmente. El VIH pertenece al género *Lentivirinae*, llamado así por su largo periodo de incubación y lento curso clínico de la enfermedad⁹. Dentro de la familia *Retroviridae*, estos virus se caracterizan por la transcripción reversa de su genoma de ARN a ADNc y la integración de éste en el genoma de la célula huésped infectada, en este caso los linfocitos. La destrucción selectiva y progresiva de los linfocitos T CD4 por parte del VIH causa la inmunosupresión que caracteriza las fases avanzadas de la infección por el VIH-1 o SIDA. El SIDA engloba diversos síntomas, síndromes, infecciones y tipos de cáncer asociados con el deterioro del sistema inmunológico, diana del virus.

El VIH-1 y el VIH-2 tienen su origen en el virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS), que infecta primates no-humanos (PNH), y aparecerían como resultado de transmisiones entre especies por diferentes tipos de VIS. Sin embargo, aunque el VIH-1 y el VIH-2 son patogénicos en humanos, se conoce que el VIS infecta normalmente sus huéspedes naturales sin conllevar una progresión a SIDA. Pese a la variedad de *lentivirus* que infectan naturalmente a PNH, solo se conoce patogénesis en huéspedes naturales, causando una enfermedad similar al SIDA humano, en macacos y chimpancés. El hecho de que la mayoría de infecciones por SIV en sus huéspedes

naturales no cause desarrollo de enfermedad, hace pensar en un control del virus (VIS) por parte del huésped (PNH, en este caso) más que en un virus inofensivo; ya que cuando se presenta una transmisión entre especies se torna extremadamente patogénico (revisado en Pandrea, et al ¹⁰).

1.2 Epidemiología del VIH

En estos 30 años de epidemia, alrededor de 25 millones de personas han muerto a causa del SIDA, llevándola a ser uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En 2009 se produjeron 2.7 millones de nuevas infecciones, y se estima que aproximadamente 33.3 millones de personas en el mundo viven infectados por el VIH, la mayoría de ellas en países de baja renta. África subsahariana sigue siendo la región más afectada, donde se encuentran el 68% (22.5 millones) de las infecciones por el VIH, se producen el 69% (1.8 millones) de las nuevas infecciones, y el 72% (1.3 millones) del total de muertes atribuibles a la epidemia, según estimaciones de 2009. Cabe destacar que en 33 países la incidencia del VIH ha disminuido un 25% en la última década (2001 a 2009), y 22 de ellos se encuentran en África subsahariana. Por otro lado, el creciente acceso al tratamiento antirretroviral en África subsahariana en los últimos años ha hecho disminuir en un 20% la población infectada que muere a causa del VIH, comparado con datos de 2005. Sin embargo, se estima que de los 15 millones de personas VIH positivas en países de baja y media renta que requieren tratamiento, solo el 37% tiene acceso a él. Haciendo un balance de estos datos, el número de nuevas infecciones todavía supera al de muertes asociadas a SIDA en esta región, lo que ha hecho aumentar el número de personas que viven con el VIH de 8.6 a 11.3 millones durante los últimos 10 años ¹¹.

En la figura 1 se puede observar la prevalencia de infección por el VIH en el mundo y su distribución geográfica. Como muestra la figura, el sur de África es la región más afectada donde se concentran las prevalencias más elevadas desde 25.9% en Swaziland, 24.8% en Botswana hasta 17.8% en Sudáfrica, y 11.5% en Mozambique, siguiendo con el este de África con 6.3% en Kenia o 5.6% en la República de Tanzania. En la zona del caribe, la prevalencia del VIH no supera

el 3% en los países más afectados. Mientras que en Europa del este y Asia Central, la Federación Rusa junto con Ucrania, con las prevalencias más elevadas, no superan el 2%.

Los diferentes subtipos circulantes del VIH-1 se distribuyen de forma geográficamente distinta. Los subtipos predominantes son A, B, y C; siendo el subtipo C el responsable de alrededor del 50% de las infecciones por el VIH-1 en todo el mundo. El subtipo A, es predominante en África central y del este (Kenya, Uganda, Tanzania y Ruanda), así como en países de Europa del este. El subtipo B se encuentra mayoritariamente en países de Europa central y occidental, así como América, Australia, algunos países del sudeste asiático y el norte de África. Mientras que el subtipo C es predominante en África subsahariana y la India, países que soportan la mayor carga de infección por el VIH del mundo ¹².

En Asia y este de Europa, la transmisión se produce más frecuentemente entre usuarios de drogas inyectables, mientras que en Norteamérica y el resto de Europa la transmisión es principalmente por relaciones sexuales desprotegidas entre hombres¹¹. En cambio, en África subsahariana, el modo predominante de transmisión del VIH a diferencia de otras regiones, es a través de relaciones heterosexuales sin protección, dónde la población más afectada son mujeres: un 60% de las personas VIH-positivas. Como infección de transmisión sexual el VIH afecta de manera importante a los adolescentes y adultos jóvenes, especialmente a mujeres entre 15 y 24 años que tienen una probabilidad 8 veces más elevada que los hombres de ser VIH positivas. Sin embargo, según datos de ONUSIDA/OMS del 2010 se ha observado una disminución en la incidencia anual de nuevos casos de VIH en este grupo etario de mujeres en algunos países de África subsahariana, lo que sugiere que la epidemia se encuentra en fase de madurez en esta región comparando con países dónde la incidencia sigue subiendo ¹¹.

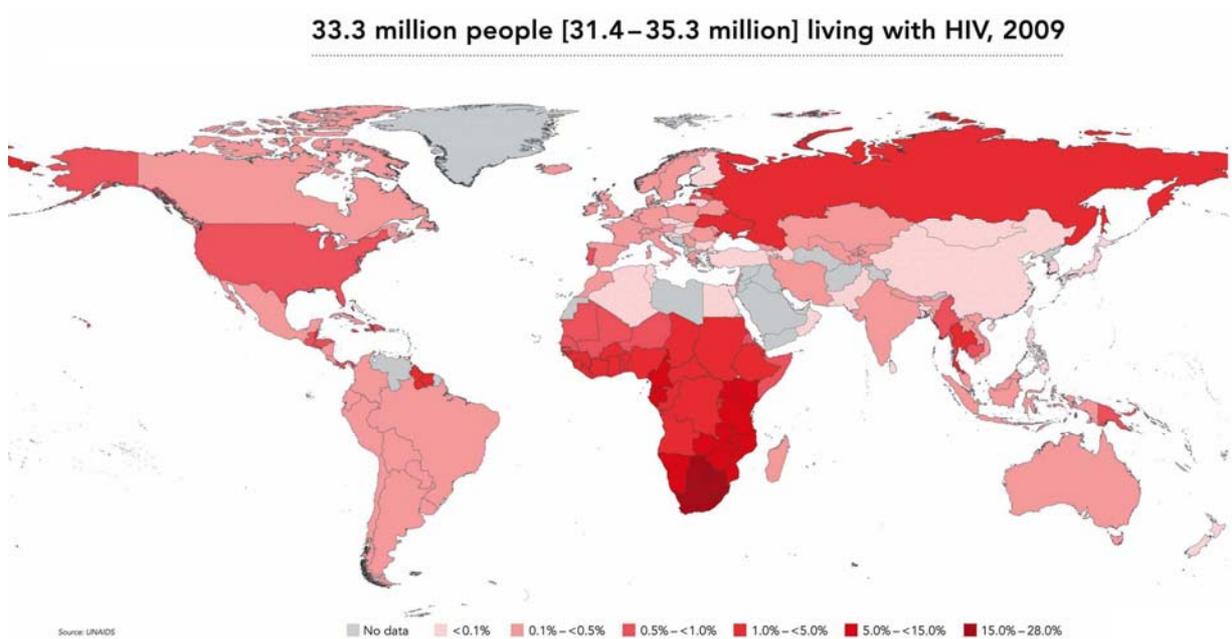


Figura 1. Prevalencia de infección por el VIH en 2009 (UNAIDS report on the Global AIDS epidemic 2010 ¹¹).

De aquí en adelante nos referiremos al VIH-1 como VIH.

1.2.1 Epidemiología del VIH en Mozambique

Mozambique se incluye dentro de los 10 países más afectados por el VIH/SIDA en el mundo con 1.4 millones de personas VIH-positivas, según estimaciones de ONUSIDA/OMS publicadas en 2010 ¹¹. La prevalencia del VIH en adultos de entre 15 y 49 años se estima en un 11.5%, variando según provincia, sexo y franja de edad. Según el informe nacional de 2009 sobre SIDA ¹³, las mujeres entre 15-49 años tienen una mayor prevalencia del VIH que los hombres, 13.1% vs. 9.2%. Además, en la franja de edad más joven, 15-24 años, la de mujeres triplica a la de hombres con un 11.1% respecto a un 3.7%, según estimaciones del informe nacional. Estratificando por provincias, se observa una heterogeneidad geográfica con respecto a la prevalencia; con un 25% de la población infectada por el VIH en Gaza, provincia fronteriza con dos de los países más afectados por el VIH en el mundo: Sudáfrica y Zimbabwe;

contrastando con la de 3.7% en Niassa, provincia más al norte del país colindante con Tanzania y el lago Malawi (ver mapa de Mozambique en figura 2). En el sur del país se encuentra la provincia de Maputo dónde se ubica la capital con el mismo nombre y a la que pertenece Manhica, población dónde se llevó a cabo el estudio en el que se basa esta tesis doctoral. Según datos nacionales se estima que la prevalencia del VIH en esta provincia alcanza el 19.8% de la población¹³ (tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia del VIH en Mujeres y Hombres de 15-49 años según provincia.
(Datos del informe oficial del ministerio de salud de Mozambique (MISAU) 2009¹³)

MOZAMBIQUE	Mujeres	Hombres	Total
Provincia	% VIH+ (N)	% VIH+ (N)	% VIH+ (N)
Niassa	3.3 (291)	4.3 (218)	3.7 (508)
Cabo Delgado	9.5 (425)	9.2 (321)	9.4 (746)
Nampula	5.5 (1022)	3.3 (781)	4.6 (1803)
Zambézia	15.3 (948)	8.9 (704)	12.6 (1652)
Tete	8.0 (433)	5.7 (334)	7 (767)
Manica	15.6 (356)	14.8 (256)	15.3 (612)
Sofala	17.8 (421)	12.6 (319)	15.5 (740)
Inhambane	10.0 (320)	5.8 (166)	8.6 (487)
Gaza	29.9 (333)	16.8 (196)	25.1 (529)
Maputo Provincia	20.0 (344)	19.5 (259)	19.8 (603)
Maputo Ciudad	20.5 (336)	12.3 (279)	16.8 (615)
Total (15-49 años)	13.1 (5229)	9.2 (3832)	11.5 (9061)

No obstante, estudios recientes en Manhica, basados en estimaciones en la comunidad, muestran valores mucho más elevados con tasas del 40% y del 43% de prevalencia comunitaria en adultos y en mujeres en edad reproductiva respectivamente¹⁴. Durante los últimos 11 años se ha observado un incremento significativo en la prevalencia del VIH en mujeres, desde un 12%

Introducción

en 1999 hasta un 29% en 2010 ^{14, 15}, según datos de la clínica antenatal de Manhiça (ANC). Además del 49% observado en mujeres que dan a luz en el mismo hospital ¹⁵.*

Este aumento de la prevalencia podría deberse a un aumento de la incidencia, a una disminución de la mortalidad relacionada con la introducción de terapia antirretroviral de gran alcance (TARGA) o como resultado de un aumento del número de diagnósticos unido al incremento de la cobertura de TARGA. Sin embargo, desde que en 2004 se inició en Mozambique la ampliación a escala nacional del programa nacional de tratamiento del VIH, se ha conseguido que, hasta Octubre de 2010, aproximadamente 210.000 personas estén en tratamiento ¹⁶, un 32% de las personas con criterio para iniciarlo ¹¹. Con esta cobertura de TARGA en el país, no es esperable que en Manhiça sea más elevada; por lo que el aumento de prevalencia del VIH en Manhiça podría atribuirse a un aumento de la incidencia durante este periodo más que a una disminución de la mortalidad vinculada al tratamiento ¹⁵.

Con estas elevadas cifras de prevalencia del VIH y como consecuencia del aumento de mortalidad entre adultos, la esperanza de vida de la población de Manhiça ha disminuido de 53.2 años en 1997 ¹⁷ hasta 49.3 años en 2010 (Sacoor, C. datos no publicados).

*Los datos de prevalencia del VIH derivados de clínicas antenatales se han utilizado tradicionalmente como reflejo de la epidemia del VIH en muchos países, ya que se asume una correlación entre mujeres embarazadas y adultos entre 15-49 años de la población general¹⁸.



Figura 2. Mapa de provincias de Mozambique

Algunos estudios sobre migraciones poblacionales sugieren que la introducción del VIH en el sur de Mozambique puede estar asociado a las frecuentes migraciones laborales de hombres adultos entre el sur de Mozambique y Sudáfrica¹⁷. Esta hipótesis se ve reforzada por la presencia mayoritaria de subtipo C en Mozambique^{19, 20}, el mismo subtipo predominante en Sudáfrica²¹⁻²³. A esto hay que añadir que la amplia variación de secuencias genéticas encontrada dentro del subtipo C al analizar VIH de mujeres de Manhiça, sugieren múltiples

introducciones del subtipo C en Mozambique ²⁴, lo que se podría asociar a múltiples migraciones laborales. Por otro lado, algunas teorías acerca de la elevada prevalencia del VIH en ciertas zonas de África subsahariana y de su variación geográfica, sugieren la existencia de puntos calientes o “hotspots”, zonas geográficas específicas con una prevalencia del VIH muy elevada y que serían fundamentales en la transmisión del VIH y en el mantenimiento de la epidemia ²⁵⁻²⁷.

1.3 Historia natural de la infección por el VIH

El VIH, en una persona infectada, está presente en diferentes tipos de fluidos biológicos: sangre, semen, fluidos vaginales y leche materna, entre otros. La transmisión del virus se produce por contacto directo ya sea a través de la sangre por vía parenteral o por alguna herida, a través de las mucosas genitales por vía sexual, o de madre a hijo durante el embarazo, el parto o la lactancia. Sin embargo, el 80% de los casos de infección por el VIH son debidos a la transmisión por vía sexual ¹¹, a través del tracto genital o la mucosa rectal.

La historia natural de la infección por el VIH en ausencia de tratamiento sigue 4 fases diferenciadas: eclipse, aguda, crónica y SIDA (figura 3). Inmediatamente después de la transmisión y durante un periodo aproximado de 10 días, el VIH se replica en la mucosa y submucosa pero el ARN del virus no puede detectarse todavía en plasma. Esta fase se denomina fase eclipse ^{28, 29}. A ésta le sigue la fase aguda, que se da dentro de las primeras 6 semanas después de la infección, y corresponde a la fase inicial de la infección en la que el virus se está replicando activamente pero aún no se han desarrollado anticuerpos. Sin embargo, ya puede detectarse el ARN viral. Durante la fase aguda, los niveles de carga viral (CV, copias de ARN del VIH presentes por mililitro) son muy elevados en plasma ^{30, 31} llegando a picos de hasta 10^7 copias/ml solo comparables a los niveles en las fases finales de la infección ³². Es durante esta fase que la población de linfocitos T CD4, principal diana del virus, disminuye en gran número coincidiendo con el pico de carga viral (ver figura 3). Después de alcanzar su pico, empieza un declive en los niveles de CV en plasma probablemente debidos a la respuesta del huésped en su lucha para controlar la infección.

La aparición de respuesta celular específica, linfocitos T citotóxicos o CTL (del inglés *Cytotoxic T lymphocytes*) específicos para el VIH, se ha asociado a la disminución de la CV durante esta fase, lo que refleja el esfuerzo del huésped para contener la replicación viral^{33, 34}. Después de esta caída inicial de la viremia, en los meses siguientes se establece un punto de equilibrio en la carga viral, iniciando así la fase crónica o de latencia clínica de la infección. En esta fase, generalmente se producirá una paulatina disminución del número de linfocitos T CD4 (figura 3). A medida que progresa la enfermedad, el sistema inmunitario se va debilitando y ya no puede hacer frente a las nuevas infecciones. La continua activación del sistema inmunológico es aprovechada por el virus para replicarse activamente incrementando la viremia circulante. Finalmente se desarrolla la fase sintomática o fase SIDA, con manifestaciones clínicas de las enfermedades oportunistas asociadas a la inmunodeficiencia causada por el VIH. Sin tratamiento, esta fase finalizará con la muerte del individuo en pocos años³⁵.

En la mayoría de personas infectadas, la fase crónica o asintomática se prolongará aproximadamente unos 8-10 años en ausencia de tratamiento^{36, 37}. Sin embargo, hay varias excepciones. Por un lado se encuentran los progresores rápidos de la enfermedad, aproximadamente un 5% de la población infectada, que desarrollarán SIDA en un período corto de tiempo, alrededor a cuatro años desde la infección. Por otro lado, hay un porcentaje de pacientes en los que no se observa una progresión de la enfermedad y permanecen clínicamente e inmunológicamente estables durante más de 10 años^{38, 39}. Se trata de los progresores lentos de la enfermedad o LTNP (del inglés *long-term nonprogressors*), un 5-15% de la población infectada, que mantienen una estabilidad en el número de sus linfocitos T CD4 (por encima de 500 células por mililitro) durante más de 10 años a pesar de tener CV detectable⁴⁰. Además, recientemente se han descrito, dentro de los LTNP, otro grupo de pacientes a los que se les ha denominado controladores de élite (<1% de los pacientes) y que mantienen niveles de viremia indetectables (<50 copias/ml) durante al menos un año después de la infección y en ausencia de tratamiento⁴¹. Estos pacientes, así como los LTNP son objetivo de muchos estudios con el fin de establecer qué características les confieren protección desde el punto de vista de no progresión de la enfermedad.

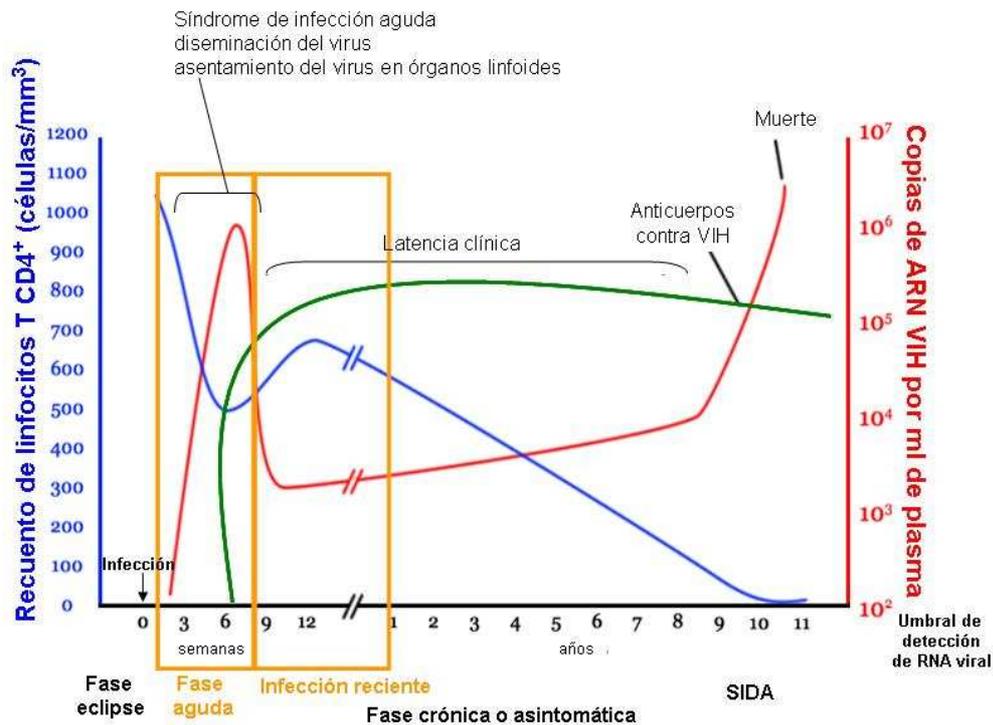


Figura 3. Historia natural de la infección por el VIH. Niveles de ARN viral y linfocitos T CD4 durante las diferentes fases de la infección por el VIH en ausencia de tratamiento (modificado de Berger et al. ⁴²). La línea roja representa los niveles de ARN viral, mientras que la azul el número de linfocitos T CD4 y la verde los anticuerpos específicos contra el VIH.

1.3.1 Fisiopatología de la fase aguda y reciente de la infección

Durante la fase aguda de la infección por el VIH o AHI (del inglés *acute HIV infection*), los pacientes pueden desarrollar síntomas parecidos a una gripe o a mononucleosis, incluyendo en su mayoría fiebre, y dolor de cabeza, seguidos de mialgia, artralgia, fatiga, pérdida de peso, exantema, faringitis o problemas gastrointestinales ^{31, 43-46}. Y durante esta fase se pueden observar patologías como: linfadenopatías, esplenomegalia, úlceras orales, artritis, faringitis exudativa, úlceras genitales o rectales y signos de neuropatías ^{31, 44, 46, 47}. Estos síntomas se pueden presentar desde días hasta 10 semanas después de la infección, aunque normalmente su duración es de alrededor de 2 semanas ⁴⁴. Sin embargo, al tratarse de una sintomatología tan

inespecífica, la mayor parte de las veces estas personas con síntomas de enfermedad pasan por la fase aguda sin ser detectadas. Además, se estima que la mitad de las nuevas infecciones por el VIH son asintomáticas ⁴⁸, de manera que, siendo las infecciones en esta fase difíciles de detectar, la mayoría pasarán inadvertidas.

En África subsahariana, región donde se concentra la mayor prevalencia del VIH del mundo y donde la malaria es una enfermedad endémica, se diagnostican más de 225 millones de casos de malaria al año ⁴⁹. En los centros de asistencia primaria de África subsahariana, aproximadamente el 25-40% de todos los casos de fiebre (adultos y niños) son diagnosticados como malaria ⁵⁰, pero el resto tienen una etiología desconocida. En una zona con alta prevalencia del VIH, una parte de ellos podrían deberse a AHI. Y aunque hay un solapamiento entre los síntomas de AHI y los síntomas de malaria clínica (fiebres, sudoración, mialgia y cefaleas), un síndrome febril en estas latitudes será rutinariamente diagnosticado como malaria por delante de otro tipo de etiología, previo a una confirmación en laboratorio. De modo que las consultas externas de determinadas partes de África donde hay alta prevalencia de malaria podrían ser un punto clave para detectar estas AHI.

La AHI representa un momento de elevada replicación viral, con niveles de hasta 10^6 o 10^7 copias/ml durante los 10 primeros días después de la infección ³². La fase aguda se prolonga aproximadamente de 3 a 6 semanas ^{44, 51}, y la duración, severidad y número de síntomas se han asociado con un pronóstico más rápido de progresión de la enfermedad y a un valor más elevado del punto de equilibrio de la carga viral ⁵²⁻⁵⁵. Según modelos animales, durante la transmisión sexual el virus cruza la barrera de la mucosa epitelial, o entra en contacto con las células de Langerhans de la mucosa, e infecta los linfocitos T CD4. Otras células dendríticas (DC, del inglés Dendritic Cells) también juegan un papel importante durante la transmisión sexual, ya que el virus se une a ellas que a su vez infectan linfocitos T CD4 a través de su función presentadora de antígenos. Todo esto ocurre en pocas horas ⁵⁶⁻⁵⁸. En la figura 4 se esquematiza la transmisión sexual por el VIH a través de la mucosa y submucosa genital o rectal por virus libre o asociado a células dendríticas. Se establece una población de células infectadas que en pocos días llega a los ganglios linfáticos, desde donde se disemina rápidamente por el

Introducción

organismo alcanzando el tejido linfoide asociado a intestino o GALT (del inglés *Gut-associated lymphoid tissue*), donde residen una gran parte de células T del organismo.

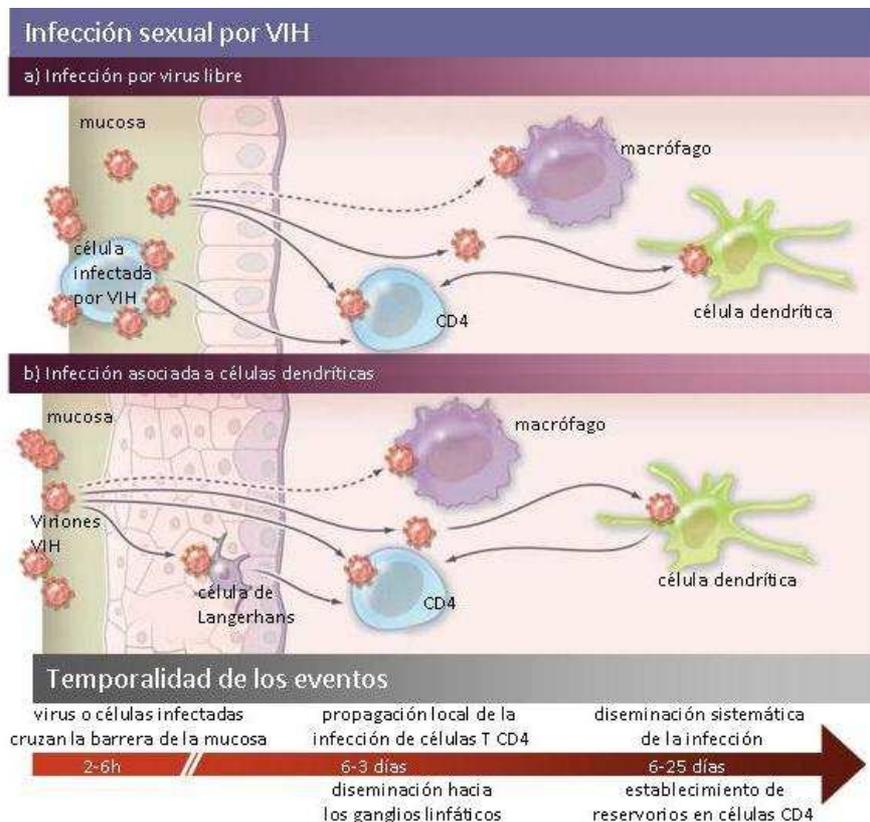


Figura 4. Transmisión sexual del VIH y establecimiento de la infección (adaptado de Cohen et al.⁵⁸)

Durante las 3-6 primeras semanas de infección por el VIH, el GALT sufre una importante e irreversible pérdida de células T CD4 memoria, tanto por efecto citopático directo como por mecanismos apoptóticos indirectos⁵⁹⁻⁶¹. Concretamente un 50% de las células T CD4 del organismo son destruidas en esta fase de la infección^{56, 58, 62}. Durante esta fase de replicación masiva del virus, la CV en plasma alcanza su pico (3-4 semanas después de la infección)^{30, 31}. La rápida expansión del virus, sistémica y hacia los órganos linfáticos⁶³, junto con el subsiguiente incremento de ARN viral en plasma se asocia a la destrucción irreversible de las reservas de células T CD4 y al establecimiento de reservorios de virus en latencia, principalmente en células T CD4 memoria^{56, 64} durante las primeras semanas de la infección. Por otro lado, el daño

producido por el VIH en la barrera de la mucosa intestinal facilita la entrada de productos microbianos del lumen intestinal hacia tejidos estériles y hacia la sangre, lo que contribuye a la activación del sistema inmunológico. La activación se manifiesta con la secreción de citoquinas, sobreexpresión de receptores, proliferación celular y desarrollo de funciones efectoras, facilitando así la replicación viral y la destrucción de linfocitos T CD4⁶⁵. Esta activación crónica del sistema inmunológico se ha asociado a la progresión de la enfermedad⁶⁶. Además, en el modelo no patogénico de infección por VIS no se observa daño en la mucosa intestinal ni una activación crónica del sistema inmunológico, lo que sugiere que la activación tendría un papel importante en la progresión de la enfermedad (cuadro 1).

Durante la fase aguda, poco antes de alcanzar el pico de viremia en plasma, se observa un incremento de linfocitos citotóxicos T CD8 (CTL)³³. Es la primera respuesta inmunológica VIH-específica que se detecta contra el virus y la intensidad de su respuesta se correlaciona con la disminución de los niveles de ARN viral^{67, 68}. De manera, que a medida que evoluciona la respuesta CD8,

Cuadro 1. **Virus de la Inmunodeficiencia de Simios (VIS)**

En la infección por VIS en PNH africanos (huésped natural) se observa, después de una reducción inicial, un restablecimiento de los niveles de CD4+ en GALT, que además se da durante la replicación viral activa. No obstante, la no progresión a SIDA en PNH no se atribuye únicamente a la conservación de los CD4+ de la mucosa, sino a que los niveles de activación inmunológica durante la infección crónica son normales, a diferencia de la hiperactivación observada durante la infección por VIH-1. El mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal impide la translocación bacteriana desde la flora intestinal, evitando la activación continua del sistema inmunológico. De modo que el mantenimiento de la funcionalidad del sistema inmunológico podría estar contribuyendo a la no progresión de la enfermedad en la infección por VIS en su huésped natural. Este es un modelo no patogénico muy estudiado por su enfoque clínico hacia el control de la progresión de la enfermedad, ya que se caracteriza por la no progresión a SIDA (revisado en Pandrea et al¹⁰).

disminuye gradualmente la CV en plasma³³ hasta alcanzar un valor más o menos estable: el punto de equilibrio de la carga viral.

Se ha sugerido que el nivel de CV en el punto de equilibrio estará influenciado tanto por el virus transmitido como por la especificidad de la respuesta celular CD8 contra este virus⁶⁹. La importancia de la respuesta de las CTL en el control de la replicación viral durante la fase aguda se ve reforzada por estudios en simios infectados por VIS en los que se han eliminado los linfocitos T CD8. En este modelo animal se observa un elevado aumento de los niveles de CV y una rápida progresión de la enfermedad en ausencia de células CD8⁷⁰.

Por otro lado, la disminución de la CV durante la fase crónica podría vincularse a la destrucción masiva de células T CD4 durante la fase aguda de la infección, dado que hay menos células disponibles para ser infectadas y servir como maquinaria de producción de nuevos virus⁵⁸.

Mientras la CV desciende después de alcanzar su pico, empiezan a aparecer los primeros anticuerpos contra el VIH (ver figura 3). Esta etapa en la que la CV se está estabilizando y emergen los primeros, todavía pocos, anticuerpos contra el VIH, se ha definido como fase temprana de la infección o infección reciente^{71,72}. No existe un consenso sobre la temporalidad en la que se establece el punto de equilibrio de la CV. Sin embargo, se ha descrito que entre los 6 y los 24 primeros meses de la infección, más comúnmente definido durante el primer año, se alcanza un punto de equilibrio de la CV^{51, 53, 73-75} entrando en la fase crónica de la infección (figura 3).

El punto de equilibrio viral permanece más o menos estable durante años hasta la caída progresiva de los CD4 que conducirá a la fase de SIDA. Este valor del punto de equilibrio de la CV se correlaciona tanto con el pronóstico clínico de la enfermedad como con el riesgo de transmisión durante la fase crónica de la infección^{53, 76}, y pasa a ser algo parecido a un marcador biológico para predecir la progresión de la enfermedad⁷⁷. Además, está fuertemente asociado con la mortalidad: por cada 1 log₁₀ copias/ml VIH-ARN de incremento en el punto de equilibrio de la CV⁵³, hay 2 veces más riesgo de mortalidad del individuo infectado. Por otro lado,

la sintomatología presentada durante la fase aguda se correlaciona con niveles más elevados de carga viral en el punto de equilibrio, así, una mayor sintomatología podría significar un punto de equilibrio más elevado y por lo tanto una progresión más rápida de la enfermedad^{52, 53, 78}.

Todavía hay poca información referente al punto de equilibrio de la CV en países de África subsahariana. La infección por el subtipo C, predominante en estas latitudes, y las coinfecciones con otros patógenos pueden estar influyendo en mantener niveles elevados de la CV en las poblaciones de estas zonas. La caracterización de la AHI y del punto de equilibrio viral en países con elevada prevalencia del VIH, como Mozambique, es importante para la descripción de las dinámicas de transmisión a nivel poblacional y para poder evaluar intervenciones de prevención.

1.3.2 Transmisión del VIH durante la fase aguda

Durante la AHI los niveles de ARN viral son extremadamente elevados, tanto en sangre como en los fluidos genitales, si los comparamos con los niveles en la fase crónica^{30, 76} (figura 3). Además estos niveles de ARN viral aumentan y disminuyen paralelamente en sangre y semen⁷⁹, de manera que es posible hacer estimaciones de la CV en los fluidos genitales a partir de los niveles en sangre. Por cada \log_{10} que incrementa la CV en plasma se le asocia un aumento de más de 2 veces el riesgo de transmisión sexual⁸⁰. Aplicando modelos de probabilidad a estas dinámicas virales en semen de individuos AHI, se calcula que la probabilidad de transmisión heterosexual es de 8 a 10 veces más elevada entre el pico de viremia y el punto de equilibrio viral, comparándolo con la transmisión durante la fase crónica⁷⁹. Y si además se presenta alguna enfermedad de transmisión sexual (ETS), principalmente en el caso de úlceras genitales, la probabilidad de transmisión del VIH es todavía más elevada⁸¹⁻⁸³.

Cabe destacar que se han descrito niveles más elevados de ARN viral durante su fase aguda, de 3 a 4 veces más, en semen de hombres infectados por el subtipo C en África subsahariana que en el de hombres infectados por subtipo B en EEUU y Europa⁸⁴, lo que sugiere una mayor probabilidad de transmisión por subtipo C. Además, en regiones de África

subsahariana dónde la malaria es una enfermedad endémica, se ha demostrado que durante episodios agudos de malaria la carga viral del VIH se ve aumentada hasta 7 veces ⁸⁵. Otros autores sugieren que personas que viven en un área de elevada prevalencia del VIH y elevada transmisión de malaria tendrían 2 veces más probabilidad de infectarse por el VIH comparado con aquellas personas que viven en un área de baja transmisión de malaria ⁸⁶. Todos estos resultados destacan la importancia del nivel de la CV en la transmisión y refuerzan la hipótesis de que la transmisión sexual del virus durante la fase aguda podría tener un papel destacado en la propagación del VIH ^{87, 88}. Efectivamente, se ha demostrado que el 50% de las nuevas infecciones podrían producirse en los 6 primeros meses de la infección ⁸⁹. Hecho que refuerzan varios estudios filogenéticos realizados en Europa dónde se sugiere que entre la mitad y un tercio de las nuevas infecciones entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) se pueden atribuir a AHÍ ^{90,91}. Por otro lado, algunos modelos sugieren que si bien el riesgo de transmisión es mucho más elevado durante la fase aguda comparándolo con la fase crónica o asintomática, la breve duración de la AHÍ contribuiría en menor medida al mantenimiento de la epidemia ^{92,93}.

Sin embargo, el hecho de que alrededor de la mitad de las personas que se encuentran en la fase aguda no experimenten ningún tipo de signo o síntoma, o los que los presentan sean muy inespecíficos ⁹⁴, hace que estas personas no sean diagnosticadas. Si además tenemos en cuenta, que en la fase aguda un test de diagnóstico serológico rápido, comúnmente usados en los centros de asesoramiento voluntario en países de baja renta, tendrá un resultado serológico negativo, habrá un grupo de personas con elevados niveles de ARN viral que, sin tener consciencia de su infección, no adopten ningún tipo de prevención adicional ni modifiquen sus hábitos, contribuyendo en gran medida a la transmisión del VIH.

En una población con alta seroprevalencia del VIH, como lo son muchos países de África subsahariana, es probable que la prevalencia de infecciones agudas sea muy elevada. Sin embargo, fuera de la información recogida sobre población de riesgo en clínicas de ETS ^{95,96}, se desconocen datos de la población general que podrían ser de gran ayuda para ofrecer una visión de la situación de cara a evaluar medidas de prevención.

1.4 Detección de la infección por el VIH

El diagnóstico del VIH es importante, no solamente de cara a la salud del sujeto, sino también de cara a la transmisión por una directa correlación entre la CV del individuo y el riesgo de transmisión sexual del VIH ^{80, 97}. Además, se ha descrito que la transmisión sexual del VIH puede ser 3.5 veces más elevada en pacientes que desconocen estar infectados que en aquellos diagnosticados ⁹⁸, y que una vez conocedores de su estado adquieren cambios en su comportamiento sexual ⁹⁹; lo que tendrá implicaciones para la prevención de la transmisión ¹⁰⁰.

El diagnóstico del VIH se hace a través de la detección de anticuerpos, que indican la seroconversión que ocurre alrededor de las 5-6 semanas después de la infección. La producción de anticuerpos específicos se mantendrá durante el resto del curso de la infección (figura 6). Se ha descrito un patrón evolutivo en la aparición de marcadores virológicos y serológicos durante la infección por el VIH, definidos por los estadios de Fiebig ²⁹, y que han dado lugar al desarrollo de tests que detectan la infección por el VIH en sus distintas fases (figura 6).

1.4.1 Marcadores de las etapas aguda y reciente de la infección por el VIH

El primer signo de respuesta inmune a la infección por el VIH es la aparición en plasma de proteínas reactantes de fase aguda (cuadro 2) durante la fase eclipse, cuando el virus se está replicando en la mucosa local, aproximadamente en los 10 primeros días de la infección ⁵⁷. Seguidamente, se da un rápido aumento de ARN viral en plasma en la fase aguda, ya se puede detectar virus en plasma, hasta llegar a un pico de CV, entre las 3 y 6 primeras semanas de infección. Este aumento exponencial de los niveles de ARN viral está

Cuadro 2. Proteínas reactantes de fase aguda

Proteínas que se sintetizan en el hígado en respuesta a un proceso infeccioso, inflamatorio o de enfermedad. Incluyen proteína C reactiva, proteína amiloide A sérica, componentes del complemento, y fibrinógeno. Estas proteínas son secretadas por los hepatocitos en una respuesta mediada por citoquinas liberadas por macrófagos y monocitos en el foco de la inflamación o infección.

clasificado como estadio I de Fiebig ²⁹ (tabla 2). Junto con los elevados niveles de ARN se observa un incremento de citoquinas inflamatorias en plasma (figura 6), que probablemente habrán inducido la aparición de proteínas reactantes de fase aguda como causa de una intensa respuesta inflamatoria (revisado en Cohen et al ¹⁰¹). Durante este periodo y coincidiendo con el rápido incremento y pico de ARN viral pueden aparecer signos y síntomas asociados con la infección aguda o también llamados “síndrome retroviral agudo”, incluyendo desde fiebre hasta diarrea, faringitis, o artralgias entre otros ⁴⁴.

Aproximadamente una semana después de la detección de ARN viral, es posible detectar el antígeno p24, proteína de la cápside viral, en sangre (figura 5). La aparición de p24 define el estadio II de Fiebig ²⁹ (tabla 2). Entre 5 y 7 días después de la detección de p24 empiezan a emerger anticuerpos específicos contra el VIH (figura 6). Primero contra proteínas de la cápside (p24) y la envuelta (p160, precursora de p120 y p41) y progresivamente aparecen el resto. El último anticuerpo en ser detectado es contra integrasa (p31), de manera que la ausencia de anticuerpo anti-p31 frente a la presencia del resto indicaría una seroconversión reciente (western blot+ p31-, figura 6).

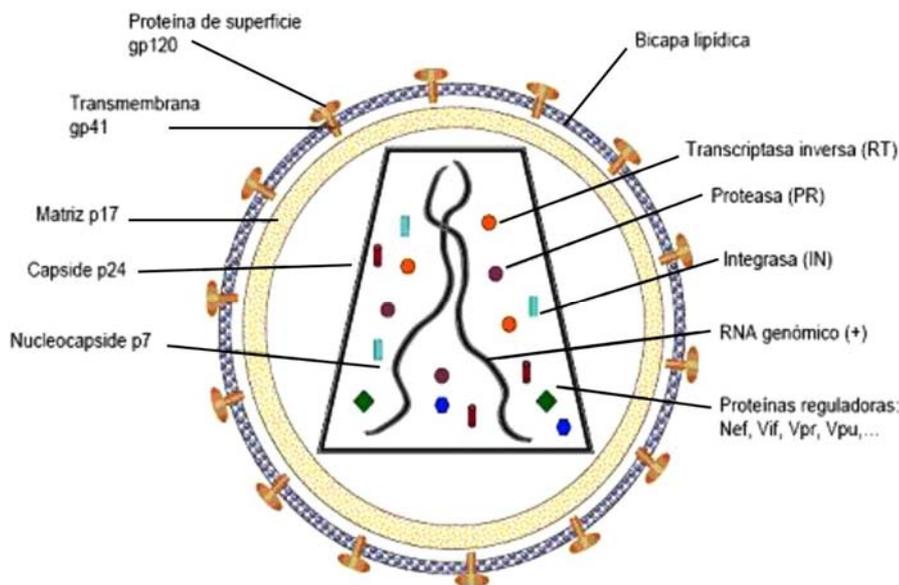


Figura 5. Estructura esquemática de una partícula de VIH ¹⁰². Se puede observar la localización de las proteínas que se detectarán en cada estadio de Fiebig.

La detección de anticuerpos específicos se hace a través de ensayos inmunoenzimáticos (EIA, del inglés Enzyme Immuno Assay; o ELISA en la figura 6). Alrededor de los 50 días después de la infección se pueden detectar inmunoglobulinas G (IgG) específicas contra el VIH mediante EIA (o ELISA). Sin embargo, EIA más sensibles ya son capaces de detectar IgM que aparecen alrededor de la segunda o tercera semana de la infección, estadio III de Fiebig (tabla 2: ELISA positivo). A partir de la aparición de los primeros anticuerpos, es posible detectar mediante la técnica *western immunoblot*, otros anticuerpos que se unen a proteínas del VIH, como la integrasa (p31) ^{29, 101}.

En la figura 6 se muestran los diferentes estadios de la infección por el VIH definidos según la aparición secuencial en la sangre de marcadores virales y de anticuerpos, detectados mediante pruebas estándar de laboratorio: VIH-ARN, proteína p24 de Gag, anticuerpos específicos contra proteínas recombinantes (detectados por ELISA), anticuerpos que se unen a proteínas virales fijadas (detección por Western immunoblot). Resumido en la tabla 2.

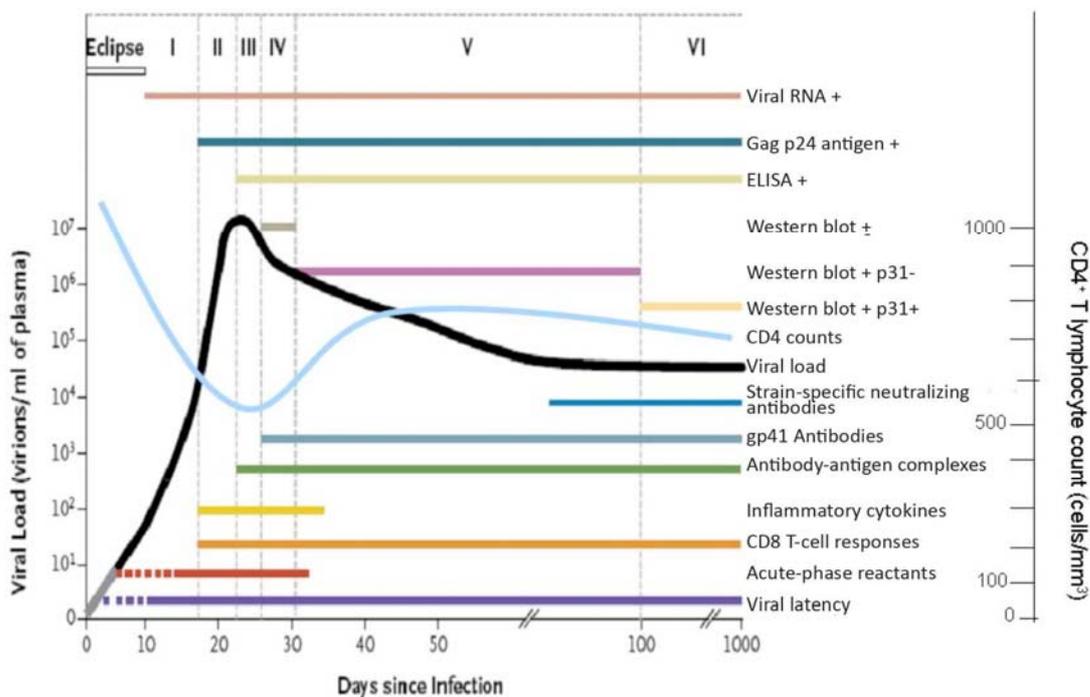


Figura 6. Estadios de la infección por el VIH caracterizados por la aparición secuencial de partículas virales y anticuerpos. Historia Natural e Inmunopatogénesis de la infección por el VIH

(adaptado de Cohen, et al.⁵⁸). Se dibuja la curva de carga viral y la del recuento de linfocitos T CD4 como referencia; los marcadores aparecen como líneas horizontales en el gráfico. Un signo positivo indica un resultado positivo en las pruebas de laboratorio, un signo negativo un resultado negativo, y un signo más-menos un resultado indeterminado. Las líneas horizontales por debajo de la curva de carga viral representan la aparición de eventos clave y de respuestas inmunológicas que no se pueden medir con ensayos clínicos estándar. Las líneas discontinuas indican incertidumbre sobre cuando empiezan a aparecer tales eventos.

Tabla 2. Estadios de Fiebig (adaptado de Cohen, et al.¹⁰¹).

Estadio	Estado definitorio y/o marcador	Duración	
		Media (rango), días	
		Fase Individual	Periodo acumulativo
Eclipse	-----	10 (7-21)	10 (7-21)
I	ARN viral positivo	7 (5-10)	17 (13-28)
II	Antígeno p24 positivo	5 (4-8)	22 (18-34)
III	ELISA positivo	3 (2-5)	25 (22-37)
IV	Western blot positivo o negativo	6 (4-8)	31 (27-43)
V	Western blot positivo, antígeno p31 negativo	70 (40-122)	101 (71-154)
VI	Western blot positivo, antígeno p31 positivo	abierto	-----

1.4.2 Pruebas diagnósticas para la infección por el VIH

La detección de anticuerpos específicos se hace a través de ensayos inmunoenzimáticos (EIA, del inglés *Enzyme Immuno Assay*; o ELISA en la figura 6), western immunoblot, o bien tests

de diagnóstico rápido (RDT, del inglés *Rapid Diagnostic Test*), que identifican las IgG o IgM específicas contra el VIH (tabla 2: ELISA positivo).

En los países más desarrollados, la prueba discriminadora de infección o *screening*, se realiza más comúnmente mediante EIA y se confirma por la técnica western blot, técnicas que requieren de su procesamiento en el laboratorio. Las pruebas EIA han ido evolucionando, así los test de primera y segunda generación detectaban solo IgG con un promedio de 45-60 días después de la infección, los de tercera generación incorporaron la detección de IgM, el primer anticuerpo generado en la respuesta inmune, con un promedio de 20-25 días después de la infección, y los de cuarta generación combinan la detección de anticuerpos con la de antígeno p24, detectando infecciones previas a la seroconversión¹⁰³ (figura 7). De modo que los EIA de cuarta generación ya son capaces de detectar AHI tan solo una semana más tarde que con la determinación de ARN viral¹⁰⁴. Sin embargo la mayoría de estos EIA antígeno-anticuerpo solo dan resultados positivos o negativos y no distinguen entre positivo por la detección de anticuerpo o por la de antígeno. Para tal distinción se requiere de un seguimiento del paciente y más pruebas complementarias, reduciendo su utilidad como prueba rutinaria en lugares con recursos e infraestructuras limitados.

En la mayoría de países en desarrollo el diagnóstico de la infección por el VIH se realiza, normalmente, por pruebas serológicas de diagnóstico rápido (RDT). Los RDT detectan anticuerpos específicos contra el VIH que aparecen aproximadamente hacia la quinta semana de infección¹⁰⁵, cuando el pico de carga viral ha descendido. De manera, que en la fase previa a la seroconversión, se obtendrá un resultado negativo mediante estas pruebas, durante un periodo ventana que se prolongará hasta la aparición de anticuerpos específicos contra el VIH¹⁰⁶. Los RDT se realizan en los propios centros de salud, sin necesidad de infraestructuras especiales y proporcionan un resultado en muy poco tiempo asegurando que el paciente lo recibe^{107, 108}. Si bien, habrá que realizar por lo menos 2 tests diferentes para confirmar un resultado positivo. Aún y tratándose de tests con una elevada especificidad de alrededor del 97%, la sensibilidad de la prueba puede disminuir en determinadas circunstancias, como en la

detección de pacientes en fases avanzadas de la infección en los que los niveles de anticuerpos son muy bajos ¹⁰⁹.

A estas pruebas rápidas también se las llama POC, del inglés *Point of Care*, ya que se realizan en el mismo lugar donde se atiende a los pacientes. Las pruebas POC han tenido un gran impacto por varias razones; por la facilidad de realización de la prueba que permite aumentar el número de individuos testados, y porque estos individuos reciben el resultado en pocos minutos ¹¹⁰. Es decir, que se informa del resultado en la misma visita o el mismo día de consulta, evitando que los pacientes tengan que volver. Esto hace disminuir la pérdida de pacientes en seguimiento ya que muchos no vuelven a buscar el resultado por razones tal como la lejanía al centro de salud o la pérdida de otro día de trabajo. Otra ventaja de las pruebas POC es que requieren menos infraestructura de laboratorio, lo que las hace potencialmente más baratas y sencillas, están pensadas para ser utilizadas en condiciones locales y dan un resultado rápido que el personal sanitario puede valorar fácilmente para tomar decisiones clínicas ¹¹¹. Además, la gran aceptabilidad que han tenido este tipo de tests en los países en desarrollo, donde se están utilizando desde hace más de una década, las ha llevado a ser la prueba estándar para la detección del VIH ^{112, 113} en adultos y niños mayores de 18 meses. Sin embargo, estos RDT, desafortunadamente, no detectan a los individuos durante la AHI, fase previa a la seroconversión.

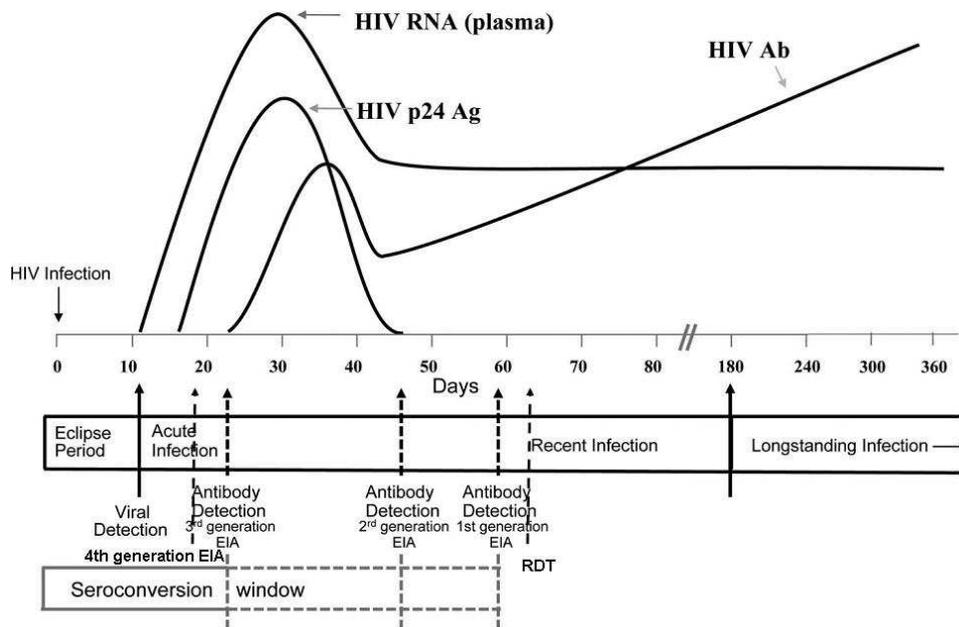


Figura 7. Aparición secuencial de los marcadores de infección por el VIH para su diagnóstico en laboratorio, y límite de detección en el tiempo para cada prueba EIA. También se especifica el inicio y duración de cada fase hasta el primer año después de la infección (adaptado de Branson et al.¹⁰³).

1.4.3 Desarrollo de nuevas técnicas para la detección del VIH en las etapas tempranas de la infección

A pesar de la gran importancia de las fases tempranas de la infección por el VIH en la transmisión sexual, la detección de AHI o de infecciones recientes no es común incluso en zonas de elevada prevalencia del VIH en África subsahariana. La falta de tests adecuados a estas necesidades, que permitan hacer un diagnóstico de las fases tempranas de la infección en el POC, se suman a la dificultad de su identificación.

Sin embargo, y debido a un creciente interés de la comunidad científica, se ha desarrollado un campo de investigación dedicado a facilitar la detección de la infección aguda por el VIH. Por un lado, se detecta el ARN viral en aquellos sujetos seronegativos por el VIH. Para este fin se utilizan técnicas más sensibles, y a su vez costosas económica y técnicamente,

como los test de amplificación de ácidos nucleicos o NAAT (del inglés *Nucleic Acid Amplification Test*) adaptándolos a algoritmos de riesgo para identificar el máximo número de personas infectadas y a la vez reducir el número de pruebas ¹¹⁴. O bien, testando varios individuos a la vez haciendo un *pool* de muestras y desglosando aquellos *pool* positivos hasta la determinación de una sola muestra ¹¹⁵⁻¹¹⁸, o incluso ambos; todo de cara a reducir tiempo y coste. Estos algoritmos están integrados en las recomendaciones del CDC para el manejo de pacientes de alto riesgo para la infección por el VIH. Además, en algunos estados de EEUU, como Carolina del Norte, el departamento de salud pública recomienda y financia las pruebas para la detección de AHI en todos los pacientes VIH seronegativos que se someten a un test voluntario para el VIH ^{117, 119}.

Por otro lado, y en relación a los EIA de cuarta generación comentados anteriormente, se han desarrollado tests que incorporan la detección de antígeno p24. Como ejemplo está el *Architect HIV Ag/Ab Combo assay* que fue aprobado en Junio de 2010 por la FDA (*Food and Drug Administration* de EEUU) y que demuestra una elevada sensibilidad (99.93%) y especificidad (98.79%) para detectar el VIH ¹²⁰. O el *Determine HIV-1/2 Ag/Ab* que, además de ser un RDT, da resultados por separado si la positividad es por antígeno o anticuerpo, permitiendo diferenciar si el individuo se encuentra en la fase aguda de la infección ^{101, 121}. Sin embargo, este último fue evaluado en un estudio reciente llevado a cabo en Malawi y mostró una baja sensibilidad en la detección de antígeno al no identificar ninguno de los 8 casos de infección aguda incluidos en el panel ¹²².

Además, se han desarrollado otro tipo de EIA destinados a diferenciar entre infecciones recientes y crónicas o establecidas ¹²³, basados en la cantidad de anticuerpos VIH-específicos o en la fuerza de unión a antígeno o avidéz. Estos EIA no identifican casos de AHI pero discriminan entre las infecciones recientes estimadas a 6 meses desde la infección por el VIH y las infecciones crónicas. Si los títulos de anticuerpo, o la avidéz, son bajas es muy probable que se trate de una infección reciente. Para la determinación de los títulos de anticuerpos, tests como *BED capture enzyme-immunoassay* (BED-CEIA) o *Vironostika* miden la proporción de anticuerpos VIH-específicos que irá en aumento conforme avanza el tiempo de infección. Por lo

que niveles bajos de anticuerpos VIH-específicos por debajo de un umbral establecido definirán una infección reciente, mientras que niveles por encima del umbral determinarán una infección establecida por un periodo más largo de tiempo ⁷².

El otro método basado en la avididad de los anticuerpos se conoce como AI (de inglés, *Avidity Index*) y se basa en que la fuerza de interacción antígeno-anticuerpo presente durante la infección reciente es débil porque la mayoría de anticuerpos en esta fase son de baja avididad. Ambos métodos se utilizan en individuos que presentan una serología positiva confirmada. Esta estrategia para la identificación de individuos con infecciones recientes es también conocida como STARHS (del inglés, *Serologic Testing Algorithm for Determining Recent HIV Seroconversion*).

Además de su utilidad en la identificación de individuos durante infecciones recientes, estos tests también son utilizados para realizar estimaciones de la incidencia del VIH. El test más ampliamente utilizado para este tipo de mediciones es BED-CEIA ^{71, 72, 123, 124}. Sin embargo, existen algunas limitaciones en el uso de este tipo de pruebas, en particular respecto a su especificidad. El avanzado estado de SIDA así como el tratamiento con TARGA, pueden llevar a bajos niveles de anticuerpos y así enmascarar los resultados llevando a diagnosticar falsas infecciones recientes. Para evitar estas clasificaciones erróneas se sugiere aplicar logaritmos calculados sobre la misma población de estudio, destinados a excluir los falsos recientes ^{125, 126}, o utilizar dos metodologías diferentes para la determinación.

El uso de las tecnologías descritas para la determinación de AHI e infecciones recientes (detección de ARN viral, EIA) es costoso e implica dificultades técnicas, requiriendo tecnologías específicas y formación tanto para su realización como para su interpretación. El desarrollo de RDT para la detección de p24 o, para la detección de un umbral de CV ¹¹¹, sería un gran logro que además permitiría la expansión de la detección de infecciones por el VIH en sus fases tempranas.

1.5 Estrategias de prevención de la infección por el VIH en África subsahariana

A lo largo de estos 30 años de epidemia, y en ausencia de una vacuna preventiva contra el VIH, se han diseñado variadas estrategias dirigidas a prevenir la transmisión del VIH a partir de diferentes enfoques: biomédicos, conductuales y socio-estructurales. Desde un punto de vista biomédico, se han desarrollado diversas estrategias que comprenden desde el uso de fármacos antiretrovirales dirigidos hacia la disminución del nivel de virus libre en plasma y de los fluidos genitales, hasta el diseño de pruebas para la detección del VIH enfocados a la criba de sangre de donantes de los bancos de sangre, reduciendo el riesgo de infección a través de sangre contaminada por el VIH, o intervenciones quirúrgicas como la circuncisión masculina, de la que se evidencia una reducción en la adquisición del VIH en hombres heterosexuales ¹²⁷. También se han puesto en práctica estrategias de tipo conductual, como la creación de centros específicos dirigidos al asesoramiento y pruebas voluntarias para el VIH, campañas de educación sobre modos de transmisión y como evitarla, y promoción del uso correcto del preservativo. Además, en el ámbito socio-estructural se han llevado a cabo intervenciones a nivel de poblaciones de riesgo (HSH, trabajadoras del sexo ^{128, 129}, usuarios de drogas inyectables), o poblaciones vulnerables (mujeres en países en desarrollo sin independencia económica ^{130, 131}) introduciendo cambios en su entorno socio-económico.

En el ámbito biomédico, la utilización de TARV como medida de prevención se ha utilizado para evitar la transmisión madre-hijo (MTCT), la transmisión sexual entre parejas serodiscordantes, como profilaxis después de una exposición accidental, o incluso como profilaxis antes de una exposición (PrEP, del inglés *pre-Exposure Prophylaxis*).

El uso de TARV como estrategia de prevención ha demostrado tener un gran efecto en la disminución de la transmisión en MTCT. Así, en mujeres VIH-positivas el uso de TARGA reduce la transmisión hasta un 1.2% ¹³², o en más del 10% con el uso de monoterapia ¹³³, en comparación con el 25-40% de transmisión en ausencia de tratamiento en países en desarrollo ^{134, 135}. Respecto a la transmisión sexual, más recientemente se ha demostrado una disminución del 96% en la transmisión entre parejas discordantes en que la pareja seropositiva inicia tratamiento antirretroviral temprano ¹³⁶. Por otro lado, el PrEP se está viendo como una

estrategia de creciente interés, y en esta dirección, recientemente se han publicado resultados de 4 estudios que evaluaban la profilaxis pre-exposición. Estudios que han demostrado una reducción en la transmisión del VIH entre el 39% y el 73%^{137,138,139,140}. Sin embargo, existen varias consecuencias a largo plazo derivadas de la estrategia PrEP que deberían tomarse en cuenta. Por un lado, el aumento potencial de resistencias a antirretrovirales, que limitaría las opciones de tratamiento principalmente en países en desarrollo donde los tratamientos de segunda línea son limitados. Y por otro, el aumento de un comportamiento de riesgo en estos pacientes^{141, 142}.

Algunos autores, sin embargo, abogan por el uso de tratamiento antirretroviral e intervenciones conductuales (p.ej. *test & treat*, testar y tratar) dirigidas a individuos en las fases iniciales de la infección de cara a reducir la transmisión del VIH. Sosteniendo la dificultad de eliminar el VIH de una población si no se incluyen los individuos recientemente infectados¹⁴³⁻¹⁴⁵. La estrategia “test & treat”, durante cualquier fase de la infección, está enfocada a la reducción de la transmisión a nivel de la población por la supresión viral en el individuo tratado, y por el uso de medidas de protección en el individuo diagnosticado. Sin embargo, para que esta estrategia sea coste efectiva, se ha sugerido, mediante modelos, que la periodicidad de los test debería ser desde anual y empezando tratamiento inmediato¹⁴⁴, a cada 3-5 años dependiendo del contexto epidemiológico y la cobertura antirretroviral¹⁴⁶.

En esta dirección, se puede observar el impacto del aumento de cobertura por TARV y la reducción de la transmisión a nivel de población. Resultados de un estudio ecológico en Canadá muestran la asociación entre el incremento de cobertura de TARV en una comunidad, la disminución la carga viral de la comunidad y la disminución de nuevos casos anuales del VIH. Se estimó que durante un periodo de 4 años en los que aumentó la cobertura de TARV los nuevos diagnósticos del VIH disminuyeron hasta un 30%¹⁴⁷. Además, otro estudio llevado a cabo en EEUU propone la carga viral de la comunidad como marcador biológico del estado de la epidemia del VIH; como reflejo de la potencial transmisión del VIH en la comunidad, y como herramienta para desarrollar intervenciones de prevención dirigidas a las áreas más afectadas por el VIH, entre otras¹⁴⁸. Otras estrategias defienden dirigir la detección y tratamiento hacia

personas con cargas virales muy elevadas, por encima de un umbral específico, como medida preventiva en la transmisión del VIH ^{149, 150}.

Cabe destacar que las estrategias actuales de prevención del VIH no son lo bastante eficaces en la detección de las infecciones en fases tempranas. Como se ha comentado con anterioridad, en la mayoría de países, tanto industrializados como en fase de desarrollo, se observa que los individuos se presentan a su primer diagnóstico en fases tardías de la infección, dejando a entrever el desconocimiento de su seroestatus durante largo tiempo, y su consecuente contribución a la transmisión y mantenimiento de la epidemia ^{151, 152}. Además, esto tiene implicaciones a nivel clínico, ya que se asocia una mayor mortalidad de estos individuos tras el inicio de tratamiento ¹⁵³ y un mayor coste sanitario ¹⁵⁴.

Para que las actividades de prevención de la infección por el VIH sean eficaces es importante detectar las infecciones cuanto antes en el curso de la infección mejor ⁷⁶. Un estudio multicéntrico realizado en EEUU señala que el conocimiento de un diagnóstico positivo de infección aguda o reciente por el VIH influye considerablemente hacia un cambio de comportamiento a corto plazo en estas personas durante las semanas posteriores al diagnóstico. El estudio muestra más de un 90% de reducción en las conductas sexuales de riesgo en individuos informados sobre su infección aguda por el VIH que mayoritariamente eran HSH ⁹⁹. Estos resultados reflejan que en una etapa de corta duración como la AHI este tipo de estrategias podría tener un gran impacto a nivel de prevención.

En general, existe una amplia evidencia respecto al efecto preventivo de TARV en la transmisión del VIH, empezando por los estudios de MTCT ¹³⁴, y más recientemente los estudios en parejas serodiscordantes ¹³⁶. En esta línea, varios autores han sugerido que en ausencia de una vacuna que pueda prevenir la infección, una vacuna que reduzca los niveles de ARN viral podría ser una estrategia eficaz ^{155, 156}. La disminución de la CV en el punto de equilibrio hasta niveles indetectables reduciría tanto la progresión de la enfermedad como la transmisión, además de evitar a los pacientes los complejos tratamientos antivirales actuales.

Estudios en primates inmunizados con vacunas que inducen respuesta T celular han demostrado una reducción en la viremia y una mejor supervivencia en estos animales ^{157, 158}. En la actualidad varios grupos trabajan en esta dirección con el propósito de diseñar una vacuna que induzca respuesta T celular contra el VIH en humanos y reduzca los niveles de carga viral por un largo periodo de tiempo ¹⁵⁹⁻¹⁶⁴.

2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

- En una población con alta seroprevalencia del VIH, la prevalencia de infecciones agudas y recientes será muy elevada y esta población podría ser una diana para intervenciones de prevención de la transmisión o para preservar el sistema inmunológico.
- En una región con malaria endémica y elevada prevalencia del VIH, algunos síntomas inespecíficos de la infección aguda por el VIH, como fiebre, pueden confundirse con malaria clínica. Por tanto, una población acostumbrada a buscar atención sanitaria por síntomas de malaria, puede suponer una ventaja de cara a focalizar la identificación de personas con AHI.
- Hay poca información sobre el punto de equilibrio de la carga viral del VIH en África subsahariana. Un conocimiento de sus niveles y variaciones es importante para el desarrollo de intervenciones cuyo objetivo es disminuir el punto de equilibrio de la carga viral.

2.2 OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar la infección por el VIH en sus fases tempranas en una población de adultos de una zona semi-rural de África subsahariana con elevada prevalencia del VIH.

Objetivos específicos:

1. Explorar la viabilidad de identificar infecciones agudas e infecciones recientes por el VIH en Manhiça, Mozambique; una región con elevada prevalencia del VIH y endémica para malaria.

Hipótesis y Objetivos

- 1.1. Caracterizar la prevalencia de la infección aguda por el VIH (AHI) en adultos que acuden a las consultas externas con fiebre reportada.
 - 1.2. Describir las características clínicas de los pacientes AHI.
 - 1.3. Caracterizar los parámetros inmunoviroológicos de los pacientes AHI: niveles de carga viral, recuento de células T CD4, T CD8 y activación celular durante el seguimiento.
2. Caracterizar la prevalencia de las infecciones recientes por el VIH en adultos seropositivos que se presentan en el centro de asesoramiento y pruebas voluntarias para el VIH (VCT) en Manhiça, Mozambique.
 - 2.1. Caracterizar los parámetros inmunoviroológicos de las infecciones recientes en esta población: niveles de carga viral, recuento de células T CD4 y T CD8 durante el seguimiento.
 - 2.2. Determinar el punto de equilibrio de la carga viral del VIH en el primer año de la infección.

3. CONTEXTO DEL ESTUDIO

3. CONTEXTO DEL ESTUDIO

3.1 Área y población de estudio

Los estudios que componen esta tesis se llevaron a cabo en el distrito administrativo de Manhiça, en la provincia de Maputo, al sur de Mozambique (ver localización en figura 8). Los datos utilizados en los estudios fueron recogidos a través de una colaboración entre el Centro de Investigación para la Salud de Manhiça (CISM, *Centro Investigaçã em Saúde da Manhiça*) y el Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (CRESIB, *Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona*) en el Hospital Distrital de Manhiça (HDM) (figura 9).

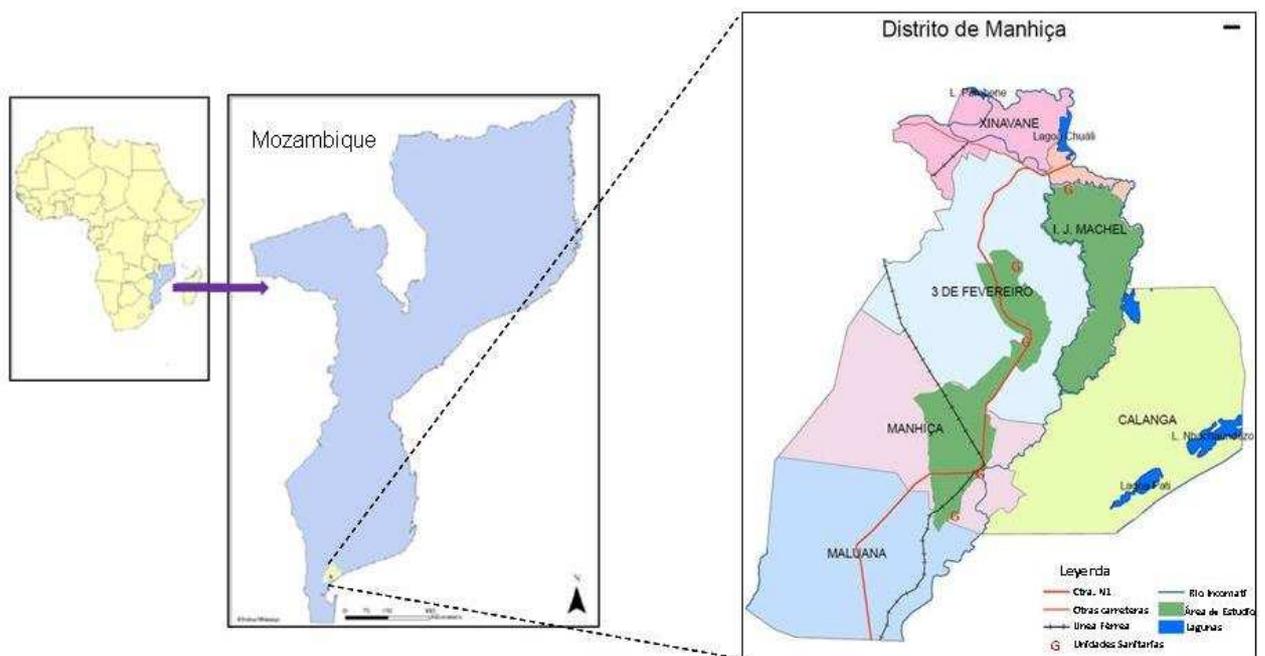


Figura 8. Localización y esquema del distrito de Manhiça y del área de estudio (<http://www.manhica.org>). Las zonas en verde señalan el área de estudio (bajo vigilancia demográfica), y la "G" los centros de salud dentro del área.

Manhiça es una población semi-rural, asentada en la ribera del río Incomati. Las viviendas típicas consisten en chozas de caña con techo de paja o de uralita. La mayor parte de la población se autoabastece de su propio cultivo que consiste principalmente de mijo y tapioca. La fuente más importante de actividad económica son las dos fábricas de azúcar de la zona ¹⁶⁵. Sin embargo, hay un constante flujo migratorio entre el sur de Mozambique y la República de Sudáfrica (RSA) en busca de trabajo en las minas, lo que hace que el 30% de los hogares estén dirigidos por mujeres ¹⁷.

Manhiça se encuentra en una región con elevada prevalencia de malaria y VIH, siendo la malaria una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En el periodo entre 2003-2005, el 30% de las consultas externas y el 49% de las hospitalizaciones en niños se asociaron a malaria ^{166, 167}. En cuanto al VIH, se ha observado un aumento de la prevalencia entre mujeres en edad reproductiva del 12% en 1999 a un 43% en 2010 ¹⁴. Además, la transmisión madre-hijo (MTCT) se encuentra alrededor del 12% en el primer mes de vida desde la introducción de la prevención de la MTCT en 2003 ¹⁶⁸.



Figura 9. Centros de recogida de datos para el estudio: a. Centro de Investigación en Salud de Manhiça (CISM), b. Hospital Distrital de Manhiça (HDM), c. Consultas externas en el HDM.

El HDM, donde se llevó a cabo el reclutamiento y seguimiento de los pacientes incluidos en los estudios que engloban esta tesis, está contiguo al CISM, y es uno de los centros de salud de referencia en la zona (figura 9). El HDM, con 110 camas, consta de clínica de salud materno-infantil, centro de asesoramiento y pruebas voluntarias para el VIH (VCT), consultas externas, y clínica de urgencias ¹⁶⁵. Desde 2003, el CISM colabora con el gobierno de Mozambique en el programa para el control del VIH/SIDA a través del establecimiento y soporte continuado del VCT y hospital de día para pacientes con VIH, contiguo al HDM, con el abastecimiento de fármacos antiretrovirales y tests de diagnóstico rápido, y contribuyendo con la asistencia a los pacientes entre otras cosas. Los servicios del VCT y la profilaxis para la prevención de la transmisión madre-hijo en la clínica antenatal, están disponibles en el CISM desde el año 2003 y el TARGA desde 2005.

En la figura 10 se puede observar la consulta del VCT y una de las pruebas para la determinación de serología contra el VIH utilizadas en el centro.

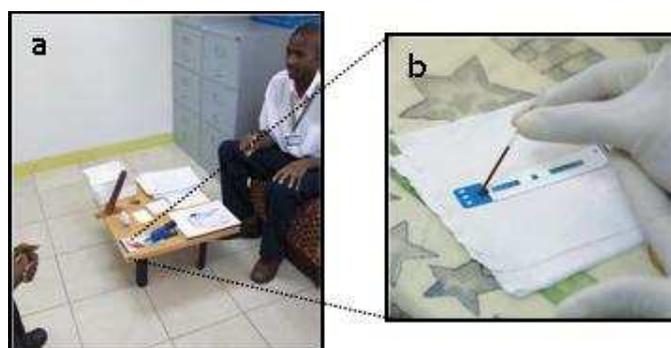


Figura 10. Centro de prueba y asesoramiento voluntario para el VIH: a) consulta de asesoramiento; b) RDT para la determinación serológica de anticuerpos contra el VIH.

3.2 Vigilancia Demográfica

Desde 1996, el Centro de Investigación en Salud de Manhiça (CISM) lleva a cabo un sistema de vigilancia epidemiológica (DSS, del inglés *Demographic Surveillance System*) para eventos vitales y migraciones. Se estima que hay aproximadamente 180.000 habitantes en el distrito y que el DSS cubre un área de aproximadamente 90.000 habitantes bajo una extensión

de 500km² según datos de 2010 (figura 8). A cada persona que vive en el área se le otorga un número de identificación permanente (*perm-id*). Esto permite recoger información demográfica que incluye migraciones, muertes y nacimientos de todos los residentes de la zona a través de visitas periódicas a todas las unidades familiares. Los trabajadores de campo del departamento de demografía del CISM son quienes recogen la información mediante las visitas a los hogares cada 6 meses. La información se recoge en cuestionarios estandarizados que se digitan en el centro de digitación de datos del CISM (figura.11). Los datos son entrados por duplicado en la base de datos usando un programa escrito en FoxPro versión 5.0 (Microsoft Corp., Seattle, WA, USA).

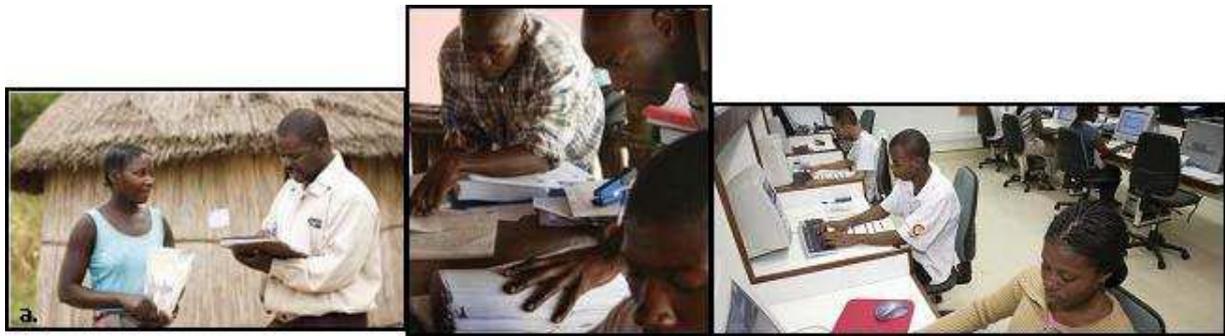


Figura 11. Sistema de vigilancia demográfica. a) trabajador de campo del departamento de demografía durante una visita para la actualización de los datos demográficos. b) trabajadores de demografía preparando sus salidas. c) trabajadores del centro de digitación de datos introduciendo la información en el sistema informático del CISM.

Los datos utilizados en los artículos que componen esta tesis se recogieron a partir de cuestionarios, específicos para el estudio y para cada visita de seguimiento, y se introdujeron en las bases de datos correspondientes a cada estudio, de la misma manera que los datos demográficos. Las bases de datos se mantienen localmente en el CISM. Todos los pacientes se identificaron con un número de estudio asignado el día del reclutamiento. Los cuestionarios y las muestras se identificaron con el número de estudio y un número único o “brady”, además del número de identificación permanente (*perm-id*) de cada paciente. Para el estudio en el que se basa el primer artículo se reclutaron los pacientes en las consultas externas del HDM, mientras que para el segundo artículo los pacientes fueron reclutados en el VCT.

Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento por escrito siendo previamente informados de él.

Se obtuvieron aprobaciones éticas de los siguientes órganos:

Comité Mozambiqueño Nacional de Bioética (Comité Nacional de Bioética para a saúde, ref. 232/CNBS/07); y del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona (ref.2007/3943).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

ARTÍCULO 1

High Prevalence of symptomatic acute HIV infection in an outpatient ward in southern Mozambique: identification and follow-up.

Elevada prevalencia de infecciones agudas sintomáticas en unas consultas externas en el sur de Mozambique: identificación y seguimiento.

Celia Serna-Bolea, Jose Muñoz, Jose M. Almeida, Ariel Nhacolo, Emilio Letang, Tacilta Nhampossa, Eliana Ferreira, Pedro Alonso, Denise Naniche.

AIDS, 2010 Feb 20; 24(4):603-8

ARTÍCULO 2

Recent HIV-1 Infection: Identification of Individuals with High Viral Load Setpoint in a Voluntary Counselling and Testing Centre in Rural Mozambique

Infección reciente por el VIH: Identificación de individuos con elevados niveles de carga viral en el punto de equilibrio en un centro de asesoramiento y pruebas voluntarias para el VIH en una zona rural de Mozambique.

Celia Serna-Bolea, Nilsa de Deus, Sozinho Acácio, Jose Muñoz, Delino Nhalungo, Emilio Letang, Pedro Alonso, Denise Naniche.

PLoS ONE, 2012 Feb 21; 7(2): e31859

ARTÍCULO 1

High Prevalence of symptomatic acute HIV infection in an outpatient ward in southern Mozambique: identification and follow-up.

Elevada prevalencia de infecciones agudas sintomáticas en unas consultas externas en el sur de Mozambique: identificación y seguimiento.

Celia Serna-Bolea, Jose Muñoz, Jose M. Almeida, Ariel Nhacolo, Emilio Letang,

Tacilta Nhampossa, Eliana Ferreira, Pedro Alonso, Denise Naniche.

AIDS, 2010 Feb 20; 24(4):603-8

RESUMEN

OBJETIVO:

Determinar la prevalencia de infecciones agudas por el VIH (AHI) dentro de la población VIH seronegativa que se presenta en un hospital distrital del sur de Mozambique con fiebre o fiebre reportada, y evaluar los parámetros clínicos, inmunológicos y virológicos de la AHI.

MÉTODOS:

Este estudio se diseñó como un estudio prospectivo observacional. Entre Junio y Julio de 2008 se reclutaron 472 adultos que acudieron al hospital distrital de Manhiça (HDM) con historia de fiebre. Los pacientes entraron en la criba de AHI únicamente si su serología para el VIH era negativa por test rápido (RDT) de detección de anticuerpos (*Determine*, Abbott ark Illinois, USA; y *Unigold*, Trinity Biotech CO., Wicklow, Ireland), y se les hizo una determinación con RDT de malaria para descartar fiebre por esta etiología. En el caso de un RDT de malaria positivo se realizaba una gota gruesa para la confirmación de parásitos en sangre. Para la detección de ARN

viral se testaron varios individuos a la vez haciendo un *pool* de los plasmas de pacientes seronegativos para el VIH, cada 5 plasmas en 1 muestra (1:5). Cuando algún *pool* resultaba positivo, se volvían a testar cada plasma individualmente. Los pacientes AHI (serología negativa y ARN de VIH positivo) recibieron su resultado 7 días después del reclutamiento y se les invitó a volver a las visitas de seguimiento a los 4 y 10 meses. Estas visitas incluyeron un examen clínico, determinación serológica del VIH, cuantificación de ARN viral, recuento de células T CD4, T CD8 y porcentaje de activación celular.

RESULTADOS PRINCIPALES:

- De los 472 pacientes que se presentaron en el HDM con fiebre reportada, 346 cumplían los requisitos de inclusión y aceptaron participar en el estudio. Se determinó una prevalencia del VIH por serología positiva de 37.8% (131/346; 95% CI 32.7-43.2%) en pacientes que previamente desconocían su estado serológico.
- La prevalencia de malaria detectada por RDT fue de 16.1% (95% CI 12.5-20.4%) en el total de los pacientes. Mientras que estratificando por serología de VIH, fue significativamente más elevada en el grupo VIH-seropositivo que en el VIH-seronegativo (21.4% vs. 13%, $p=0.041$).
- De los 215 pacientes con serología negativa, 211 fueron analizados para la determinación del ARN-VIH que fue detectado en 7 pacientes, presentando una prevalencia de AHI en la población seronegativa de 3.3% (7/211; 95% CI 1.3-6.7%).
- La sintomatología más común presentada por los pacientes VIH-seronegativos ARN-VIH positivos fueron síntomas consistentes con un síndrome mononucleósido para 4 pacientes de los 6 en seguimiento, y dolor de garganta para los 6.
- La mediana de los niveles de ARN viral al diagnóstico fue de 6.21 \log_{10} copias/ml (IQR 5.92-6.41), significativamente más elevada que a los 4 meses [5.43 \log_{10} copias/ml (IQR 4.72-5.83) $p=0.04$]. En la visita de seguimiento a los 10 meses, los niveles de ARN viral

presentaban valores medianos de 5.02 \log_{10} copias/ml (IQR 4.85-5.34), sin diferencias significativas respecto a los 4 meses.

- EL recuento de células CD4 a día 7 del diagnóstico mostraba valores medianos de 384 células/ μ l (IQR 239-441), con valores muy heterogéneos entre pacientes que se homogeneizaron a los 4 meses con una mediana de 381 células/ μ l (IQR 365-428). A los 10 meses de seguimiento los valores aumentaron hasta una mediana de 519 células/ μ l (IQR 416-582).
- El porcentaje de células T CD8 activadas, a día 7 del diagnóstico, mostraba valores de mediana del 68.4% de las células T CD8 (IQR 59.6-87.8) expresando CD8 y HLA-DR.

High prevalence of symptomatic acute HIV infection in an outpatient ward in southern Mozambique: identification and follow-up

Celia Serna-Bolea^a, Jose Muñoz^{a,b}, Jose M. Almeida^b, Ariel Nhacolo^b, Emilio Letang^a, Tacilta Nhamossa^{b,c}, Eliana Ferreira^{c,d}, Pedro Alonso^{a,b} and Denise Naniche^a

Objectives: To determine the prevalence of acute HIV infection (AHI) within the HIV-seronegative adult population presenting with reported fever in a district hospital in southern Mozambique and evaluate clinical, immunological and virological parameters of AHI.

Design: This is a prospective observational study.

Methods: Three hundred and forty-six adults presenting with reported fever at an outpatient ward at the Manhiça District Hospital in Mozambique were screened for AHI by HIV rapid serology testing, followed by HIV-RNA testing in HIV-seronegative individuals. Plasma from HIV-seronegative patients was pooled in the ratio of 1:5 for HIV-RNA testing. Whole blood was used for *Plasmodium falciparum* rapid test determination at screening visit. Follow-up visits at day 7, 4 and 10 months included clinical examination, HIV serotesting and assessment of HIV-RNA, CD4 cell counts and percentage of activated CD8 T cells.

Results: HIV serotesting revealed that 37.8% (95% confidence interval 32.7–43.2) of the adults had previously undiagnosed established HIV infection. Among the HIV-seronegative patients, 3.3% (95% confidence interval 1.3–6.7) were found to have AHI as demonstrated by positive HIV-1 RNA testing. Median HIV-1 RNA levels at diagnosis of AHI were 6.21 log₁₀ copies/ml (interquartile range 5.92–6.41) and significantly higher than median HIV-RNA load at 4 months. At day 7 after screening, patients showed a median CD4 cell count of 384 cells/μl (interquartile range 239–441) and a median percentage of activated CD8 T cells of 68.4% (interquartile range 59.6–87.8).

Conclusion: Of patients reporting with fever, 3.3% were shown to be potentially due to AHI. High prevalence of AHI in southern African populations may warrant investigation of tools and target populations for AHI screening as a novel way to address HIV prevention.

© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2010, **24**:603–608

^aBarcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ^bManhiça Health Research Centre (CISM), Manhiça, ^cInstituto Nacional de Saude, Ministerio de Saude, Maputo, and ^dCentro de Saude de Manhiça, Manhiça, Mozambique.

Correspondence to Denise Naniche, PhD, MPH, Barcelona Centre for International Health (CRESIB), IDIBAPS/Hospital Clinic, Rossello, 132 4°, Barcelona E-08036, Spain.

Tel: +34 932275706; fax: +34 932279853; e-mail: dsuzanne@clinic.ub.es

Received: 7 October 2009; revised: 17 November 2009; accepted: 20 November 2009.

DOI:10.1097/QAD.0b013e328335cda3

Keywords: acute HIV infection, Africa, fever, HIV, mononucleosis-like syndrome

Introduction

Acute HIV infection (AHI) corresponds to the initial phase of HIV infection in which virus is actively replicating but seroconversion has not yet occurred [1]. During AHI, high levels of plasma HIV-1 RNA are accompanied by high levels of virus in genital secretions, reportedly higher for subtype C viruses present in southern Africa [2,3]. It has thus been suggested that AHI and the early months of HIV infection may contribute disproportionately to the transmission of HIV and constitute a major motor of the HIV pandemic [4–6]. AHI usually lasts for 3–4 weeks [7], and approximately half of the patients develop nonspecific flu-like or mononucleosis-like symptoms, including mainly fever, as well as myalgia, arthralgia, rash and sore throat. As a very nonspecific syndrome, symptomatic AHI is likely to be underreported. Furthermore, the remaining AHIs are asymptomatic and go unnoticed, making AHI very challenging to diagnose.

It has been difficult to identify AHI in Europe and other developed countries, thus it is thought to be even more challenging in Africa. Most studies [4,8–10] seeking to assess AHI have targeted sexually transmitted diseases (STDs) clinics. However, outpatient triage may be a relevant place to screen for AHI in parts of Africa with a high prevalence of malaria, where people with signs of fever are accustomed to presenting at the health post for malaria testing. Although approximately 25–35% of fevers in outpatient consultations are due to malaria [11], most of the remaining fevers have unknown cause, and in a population with high HIV prevalence, a proportion of fevers could be due to symptomatic AHI. The main objective of the study was to assess the prevalence of AHI in patients presenting with reported fever at an outpatient triage in southern Mozambique and to characterize the cases of AHI. Secondarily, clinical presentation and immune activation were assessed in order to shed light on characteristics of AHI subtype C infections.

Methods

Study population and visits

The participants were recruited between June and July 2008 at the Manhiça District Hospital (MDH) in Manhiça, southern Mozambique. The Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) has been conducting continuous demographic surveillance in the district since 1996 that covered a population of 82 000

persons at the time of this study. Adults over 18 years old presenting with reported fever at the MDH outpatient ward were invited to participate if they fulfilled the following criteria: permanent residents of the demographic surveillance study area, acceptance of HIV testing and not in follow-up at the HIV day hospital.

Participants were considered for HIV-1 RNA testing only if HIV-1 serology was negative by antibody rapid test (Determine; Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA and Unigold; Trinity Biotech Co., Wicklow, Ireland). Patients diagnosed with AHI (defined by a negative serology and positive HIV-1 RNA test) received their results 7 days after enrolment and were invited for follow-up visits at 4 and 10 months for CD4 cell count and HIV-1 RNA viral load assessment. Basic clinical and epidemiological data were recorded at the screening visit. For the AHI patients returning for 7-day visit, repeat HIV rapid testing confirmed seronegativity and a more extensive clinical questionnaire was given to describe clinical features.

Subsequent seroconversion of AHI patients was later ascertained by serotesting, and all HIV-positive individuals were referred for clinical management according to national guidelines.

Written informed consent was obtained from patients prior to participation. The study protocol was reviewed and approved by the Mozambican National Bioethics Committee and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committee.

Laboratory procedures

HIV-RNA determinations

HIV-1 RNA levels were determined from cryopreserved plasma samples with the commercial Roche Amplicor Monitor, version 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) technique for amplification and quantification of HIV-1 RNA. Lower limit of detection was 400 copies/ml.

A plasma pooling scheme was adapted from previous studies [12,13]. Briefly, plasma samples were pooled in the ratio of 1 : 5 in a 200- μ l aliquot. If any pool was found to be positive, individual specimens were re-tested.

Malaria determination

Blood finger prick was used for the *Plasmodium falciparum* rapid test determination (ICT Diagnostics, Cape Town, South Africa) at screening according to manufacturer's instructions.

Immunology determinations

CD4 cell counting was performed after staining with labelled antibodies: CD4, CD3, CD8 and CD45 in TruCount tubes (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, California, USA). Activated CD8 cells were identified after staining with CD3, CD8, CD38 and human leucocyte antigen (HLA)-DR antibodies. Samples were assessed by flow cytometry on a FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences).

Statistical analysis

Proportions for categorical variables were compared using the Pearson chi-squared test. The Wilcoxon rank-sum test was used to compare medians of continuous variables with nonnormal distribution and the Wilcoxon signed-rank test to compare paired groups. Statistical analyses were performed using STATA version 9 (STATA Corp., College Station, Texas, USA).

Results

Characteristics of the study population

Of the 472 individuals presenting at an outpatient ward between June and July 2008 with reported fever and fulfilling recruitment criteria, 73.3% (346/472) gave informed consent to participate in the study. HIV seroprevalence based on rapid testing was found to be 37.8% [95% confidence interval (CI) 32.7–43.2] (Table 1).

Ages ranged from 18 to 86 years, with a median age of 33 years [interquartile range (IQR) 27–44 years]. Table 1 provides information about general characteristics of

patients according to HIV serostatus. In the HIV serology-negative group, the median age for men was significantly younger than for women [median 30 years (IQR 24–43) versus median 38 years (IQR 26–51), respectively, $P=0.021$].

The main reasons for consultation accompanying fever in both HIV-seropositive and HIV-seronegative patients were arthralgias and cough followed by diarrhoea and sore throat. Although all patients reported fever in the previous 24 h, only 9.7% of the HIV-seronegative individuals had fever on the day of attendance (Table 1).

The prevalence of *P. falciparum* malaria as detected by rapid testing was 16.1% (95% CI 12.5–20.4) in the overall group ($n=346$). However, after stratifying by HIV serostatus, prevalence of malaria was significantly higher in HIV-seropositive patients than in HIV-seronegative individuals (21.4 and 13%, respectively, $P=0.041$, χ^2 test).

Prevalence of acute HIV infection

Among the 215 HIV-seronegative individuals presenting with reported fever, results for HIV-1 RNA levels were available for 211 individuals. HIV-1 RNA was detected in seven of 211 specimens giving an AHI prevalence of 3.3% (95% CI 1.3–6.7). None of the AHI cases were diagnosed with malaria. HIV-1 RNA level in AHI patients was very high at diagnosis, with a median of 6.21 log₁₀ copies/ml (IQR 5.92–6.41 log₁₀ copies/ml) (Table 2).

Evaluation of clinical, immunological and virological parameters of acute HIV infection

Six of the seven AHI cases identified were followed for 10 months; one was lost to follow-up after screening.

Table 1. General characteristics, stratified by HIV serostatus, of the population presenting to the adult outpatient ward for reported fever.

	HIV-1-positive, <i>n</i> (%)	HIV-1-negative, <i>n</i> (%)
Demographic characteristics		
Overall	131 (37.8)	215 (62.2)
Sex		
Male	54/131 (41.2)	74/215 (34.4)
Female	77/131 (58.8)	141/215 (65.6)
Age (years)		
18–30	51/127 (41.2)	84/209 (40.2)
+31–40	43/127 (33.9)	47/209 (22.5)
41–50	21/127 (16.5)	31/209 (14.8)
50	12/127 (9.5)	47/209 (22.5)
Reported complaint*		
Arthralgias	38/93 (40.9)	79/166 (47.6)
Cough	43/93 (46.2)	61/165 (37.0)
Diarrhoea	14/93 (15.1)	23/170 (13.5)
Sore throat	13/93 (14.0)	18/165 (10.9)
Clinical observations		
Fever present**	ND	21/215 (9.7)
Mononucleosis-like symptoms***	3/93 (3.2)	8/164 (4.9)
Malaria rapid test positive	28/131 (21.4)	28/215 (13.0)

ND, no data.

*All numbers may not sum up to 131 and 215 due to missing data.

**Defined as $>37.5^{\circ}\text{C}$.

***Defined as reported fever and accompanied by arthralgias and sore throat.

Table 2. Clinical, virological and immunological characteristics of acute HIV-infected patients.

Patient	Sex	Age (years)	HIV-RNA (log ₁₀ copies/ml; day 0)	Symptoms (day 7)	CD4 cell count (cells/ μ l; day 7)	CD4:CD8 (day 7)	% activated CD8 cells (day 7)	HIV-RNA (log ₁₀ copies/ml; 4 months)	CD4 cell count (cells/ μ l; 4 months)	CD4:CD8 (4 months)	HIV-RNA (log ₁₀ copies/ml; 10 months)	CD4 cell count (cells/ μ l; 10 months)
0067	F	31	6.09	MN, P, R, S	850	0.30	67.7	4.72	ND	ND	4.85	519
0101	M	34	ND	MN, P, R, GI	239	0.55	59.3	5.55	428	1.24	5.29	582
0148	M	40	6.88	P, R, GI, S	441	0.40	59.6	3.96	532	0.84	4.23	710
0188	M	34	5.92	MN, P, R	413	0.36	69.1	5.32	381	0.52	ND	ND
0197	M	59	6.41	P, U	180	0.10	94.7	5.84	365	0.17	5.37	293
0221	F	57	6.32	MN, P, R, GI, S	355	0.63	87.8	5.83	307	1.96	5.34	416
0212	M	30	3.35	LTFU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Median			6.21		384	0.38	68.4	5.43	381	0.84	5.02	519
(IQR)			(5.92–6.41)		(239–441)	(0.30–0.55)	(59.6–87.8)	(4.72–5.83)	(365–428)	(0.52–1.24)	(4.85–5.34)	(416–582)

GI, gastrointestinal; IQR, interquartile range; LTFU, lost to follow-up; MN, mononucleosis-like symptoms; ND, no data; P, pharyngitis; R, respiratory; S, evidence of sexually transmitted infection (discharge, dysuria) except for ulcer; U, genital ulcer.

At 7-day postscreening visit, a more detailed clinical questionnaire showed that four of six of the AHI patients presented with symptoms compatible with mononucleosis-like symptoms and all six patients complained of sore throat (Table 2). Gastrointestinal symptoms were present in three of six patients, including nausea, diarrhoea or abdominal pain. Signs of sexually transmitted infection (STI) were present in four of six individuals and included vaginal discharge, genital ulcer and dysuria.

Follow-up CD4 cell count measurements at day 7 after screening showed diverse counts among individuals with a median CD4 cell count of 384 cells/ μ l (IQR 239–441 cells/ μ l). At 4 months, median CD4 cell count was 381 cells/ μ l (IQR 365–428 cells/ μ l), with an interpatient heterogeneity reduced as compared with 7 days. At 10 months after screening, CD4 cell counts increased to a median of 519 cells/ μ l (IQR 416–582 cells/ μ l). The median ratio of CD4:CD8 significantly increased from 0.38 to 0.84 between day 7 and 4 months (Table 2, $P=0.043$, Wilcoxon signed-rank), primarily not only due to a significant decrease in percentage of CD8 cells but also to an increase in percentage of CD4 T cells.

The percentage of activated CD8 T cells, at day 7 after screening, showed a median of 68.4% CD8 T cells (IQR 59.6–87.8 cells) expressing CD38 and HLA-DR (Table 2).

Follow-up measures of plasma HIV-1 RNA at 4 and 10 months showed a median viral load at 4 months of 5.43 log₁₀ copies/ml (IQR 4.72–5.83 log₁₀ copies/ml), significantly lower than that observed at baseline (Table 2, $P=0.04$, Wilcoxon signed-rank) At 10 months, median HIV-1 RNA was 5.02 log₁₀ copies/ml (IQR 4.85–5.34 log₁₀ copies/ml). As in the case of CD4 cell counts, HIV-1 RNA level at 10 months was not significantly different from values at 4 months.

Discussion

Our findings show a high prevalence of AHI (3.3%) among patients presenting with reported fever in an outpatient ward from a rural area in southern Mozambique with high HIV burden. These symptomatic AHI patients all had extremely high viral loads, and the percentage of activated CD8⁺ T lymphocytes observed was similar to that reported in chronically HIV-infected African patients [14].

There are studies from the United States assessing prevalence of AHI in STD [15] clinics as well as in clinic-based populations other than STD [16–18]. AHI prevalence in patients reporting undifferentiated viral symptoms in an urgent care facility [16,17] or presenting with mononucleosis-like symptoms [18] was reported to

range between 0.3 and 1%. In the African context, there are studies assessing prevalence of AHI in attendees of STD clinics but not from general outpatient wards. In a Malawi STD clinic, prevalence of AHI was reported to be 2.4% among HIV-seronegative men and women and 4.5% among HIV-seronegative men [9,10]. In the current study, we suggest the relevance of screening for AHI in HIV-seronegative patients with reported fever in outpatient triages in southern Africa after observing 13% of fevers potentially attributable to malaria and 3.3% to AHI. Mononucleosis-like symptoms and sore throat, although nonspecific, could be relevant syndromes to target for identification of AHI, particularly, as with a slightly more detailed questionnaire such as that performed at day 7 in our study, mononucleosis-like symptoms and sore throat were reported in four of six and six of six AHI patients, respectively.

The Manhiça district in southern Mozambique is quite representative of southern Africa, with an observed HIV seroprevalence of 29% in 2005 in pregnant women [19] and HIV infection predominantly of subtype C [20,21]. Our results and the few prospective studies of AHI in southern Africa [10,22,23] prompt expanded studies investigating relationships among AHI symptoms, immune activation, prognosis and transmission during AHI, particularly for HIV-1 subtype C in a population with higher baseline immune activation [24].

HIV-infected individuals are considered hyperinfectious from the onset of AHI up to 6 weeks thereafter. Furthermore, studies in both Uganda [25] and Quebec [26] have suggested that 50% of onward transmissions occur in the first 6 months after infection. AHI screening in the United States, with emphasis on targeting high-risk populations, has been integrated into various public health testing schemes and considered to be cost-effective in ensuring care and slowing transmission [12,15]. Plasma pooling algorithms for HIV-1 RNA testing have shown that the cost can be reduced to 2–3 US\$/specimen [13,15,27]. The main limitation of HIV-1 RNA testing in resource-poor countries is the requirement for equipment, trained technicians and rapid turnaround time. However, the necessity for HIV-1 RNA monitoring is growing as the rollout of antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa expands. Research efforts have thus increasingly been focusing on evaluating simplified methods for HIV quantification through ultrasensitive p24 or HIV-1 RNA detection from dried blood spots [9,28,29]. These tools could render AHI screening economically and technically feasible in some resource-poor settings.

Larger studies comparing AHI in various high-risk populations in sub-Saharan Africa are necessary to identify the most adapted cost-effective portals of entry into the health system. This could lead to focusing a portion of the prevention effort on AHI testing,

counselling and risk modification during the earliest stage of HIV infection. In light of the relatively low impact of current HIV prevention efforts on HIV transmission in sub-Saharan Africa, research into the development of tools, interventions and the identification of target populations for AHI screening may be a novel way to address prevention.

Acknowledgements

The authors are grateful to all the patients for their participation in the study and to the continued dedication of the staff at the MDH as well as field, clinic and data management staff at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Mozambique. The authors are particularly grateful to Alface Boaventura, Apollinario Nzango, Nelito José, Lucas Nhatumbo and Elsa Banze for their contribution to logistics, patient visits, follow-up and laboratory.

Financial support was received from the Spanish Ministry of Health (grant PI071312). The Centro de Investigação em Saúde de Manhiça receives core founding from the Spanish Agency for International Cooperation and the Voluntary Counselling and Testing (VCT) clinic and day hospital from the Generalitat de Catalunya. C.S. was supported by a grant from Spanish Ministry of Health (PI070233) and D.N. was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (Ramon y Cajal).

References

1. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, Blattner WA, Wiesner D, Eyster ME, Goedert JJ. **Natural history of HIV-1 cell-free viraemia.** *JAMA* 1995; **274**:554–558.
2. Dyer JR, Kazembe P, Vernazza PL, Gilliam BL, Maida M, Zimba D, *et al.* **High levels of human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen of seropositive men in sub-Saharan Africa.** *J Infect Dis* 1998; **177**:1742–1746.
3. Pilcher CD, Joaki G, Hoffman IF, Martinson FE, Mapanje C, Stewart PW, *et al.* **Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection.** *AIDS* 2007; **21**:1723–1730.
4. Pilcher CD, Tien HC, Eron JJ Jr, Vernazza PL, Leu SY, Stewart PW, *et al.* **Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV.** *J Infect Dis* 2004; **189**:1785–1792.
5. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, *et al.* **Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group.** *N Engl J Med* 2000; **342**:921–929.
6. Cohen MS, Pilcher CD. **Amplified HIV transmission and new approaches to HIV prevention.** *J Infect Dis* 2005; **191**:1391–1393.
7. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. **Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection.** *Ann Intern Med* 1996; **125**:257–264.
8. Bollinger RC, Brookmeyer RS, Mehendale SM, Paranjape RS, Shepherd ME, Gadkari DA, Quinn TC. **Risk factors and clinical presentation of acute primary HIV infection in India.** *JAMA* 1997; **278**:2085–2089.

9. Fiscus SA, Pilcher CD, Miller WC, Powers KA, Hoffman IF, Price M, *et al.* **Rapid, real-time detection of acute HIV infection in patients in Africa.** *J Infect Dis* 2007; **195**:416–424.
10. Pilcher CD, Price MA, Hoffman IF, Galvin S, Martinson FE, Kazembe PN, *et al.* **Frequent detection of acute primary HIV infection in men in Malawi.** *AIDS* 2004; **18**:517–524.
11. WHO. *World malaria report. Roll back malaria and UNICEF.* Geneva: WHO; 2005.
12. Pilcher CD, McPherson JT, Leone PA, Smurzynski M, Owen-O'Dowd J, Peace-Brewer AL, *et al.* **Real-time, universal screening for acute HIV infection in a routine HIV counseling and testing population.** *JAMA* 2002; **288**:216–221.
13. Quinn TC, Brookmeyer R, Kline R, Shepherd M, Paranjape R, Mehendale S, *et al.* **Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA to diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence.** *AIDS* 2000; **14**:2751–2757.
14. Eggena MP, Barugahare B, Okello M, Mutyala S, Jones N, Ma Y, *et al.* **T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: differential associations with viral load, CD4⁺ T cell depletion, and coinfection.** *J Infect Dis* 2005; **191**:694–701.
15. Sherlock M, Zetola NM, Klausner JD. **Routine detection of acute HIV infection through RNA pooling: survey of current practice in the United States.** *Sex Transm Dis* 2007; **34**:314–316.
16. Clark SJ, Kelen GD, Henrard DR, Daar ES, Craig S, Shaw GM, Quinn TC. **Unsuspected primary human immunodeficiency virus type 1 infection in seronegative emergency department patients.** *J Infect Dis* 1994; **170**:194–197.
17. Pincus JM, Crosby SS, Losina E, King ER, LaBelle C, Freedberg KA. **Acute human immunodeficiency virus infection in patients presenting to an urban urgent care center.** *Clin Infect Dis* 2003; **37**:1699–1704.
18. Rosenberg ES, Caliendo AM, Walker BD. **Acute HIV infection among patients tested for mononucleosis.** *N Engl J Med* 1999; **340**:969.
19. Naniche D, Lahuerta M, Bardaji A, Sigauque B, Romagosa C, Berenguera A, *et al.* **Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria.** *HIV Med* 2008; **9**:757–764.
20. Bellocchi MC, Forbici F, Palombi L, Gori C, Coelho E, Svicher V, *et al.* **Subtype analysis and mutations to antiviral drugs in HIV-1-infected patients from Mozambique before initiation of antiretroviral therapy: results from the DREAM programme.** *J Med Virol* 2005; **76**:452–458.
21. Lahuerta M, Aparicio E, Bardaji A, Marco S, Sacarlal J, Mandomando I, *et al.* **Rapid spread and genetic diversification of HIV type 1 subtype C in a rural area of southern Mozambique.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; **24**:327–335.
22. Mlisana K, Auld SC, Grobler A, van Loggerenberg F, Williamson C, Iriogbe I, *et al.* **Anaemia in acute HIV-1 subtype C infection.** *PLoS One* 2008; **3**:e1626.
23. Novitsky V, Woldegabriel E, Kebaabetswe L, Rossen Khan R, Mlotshwa B, Bonney C, *et al.* **Viral load and CD4⁺ T-cell dynamics in primary HIV-1 subtype C infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **50**:65–76.
24. Kassu A, Tsegaye A, Petros B, Wolday D, Hailu E, Tilahun T, *et al.* **Distribution of lymphocyte subsets in healthy human immunodeficiency virus-negative adult Ethiopians from two geographic locales.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; **8**:1171–1176.
25. Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, *et al.* **Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda.** *J Infect Dis* 2005; **191**:1403–1409.
26. Brenner BG, Roger M, Routy JP, Moisi D, Ntemgwa M, Matte C, *et al.* **High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection.** *J Infect Dis* 2007; **195**:951–959.
27. Westreich DJ, Hudgens MG, Fiscus SA, Pilcher CD. **Optimizing screening for acute human immunodeficiency virus infection with pooled nucleic acid amplification tests.** *J Clin Microbiol* 2008; **46**:1785–1792.
28. Fiscus SA, Cheng B, Crowe SM, Demeter L, Jennings C, Miller V, *et al.* **HIV-1 viral load assays for resource-limited settings.** *PLoS Med* 2006; **3**:e417.
29. Marconi A, Balestrieri M, Comastri G, Pulvirenti FR, Gennari W, Tagliazucchi S, *et al.* **Evaluation of the Abbott real-time HIV-1 quantitative assay with dried blood spot specimens.** *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**:93–97.

ARTÍCULO 2

Recent HIV-1 Infection: Identification of Individuals with High Viral Load Setpoint in a Voluntary Counselling and Testing Centre in Rural Mozambique

Infección reciente por el VIH: Identificación de individuos con elevados niveles de carga viral en el punto de equilibrio en un centro de asesoramiento y pruebas voluntarias para el VIH en una zona rural de Mozambique.

Celia Serna-Bolea, Nilsa de Deus, Sozinho Acácio, Jose Muñoz, Delino Nhalungo, Emilio Letang, Pedro Alonso, Denise Naniche.

PLoS ONE, 2012 Feb 21; 7(2): e31859

RESUMEN**OBJETIVO:**

Determinar la prevalencia de infecciones recientes por el VIH en pacientes VIH-seropositivos que se presentan voluntariamente en el centro de asesoramiento y pruebas del VIH de Manhiça. Caracterizar las infecciones recientes y el punto de equilibrio de la carga viral en estos pacientes.

MÉTODOS:

Este estudio se diseñó como un estudio prospectivo observacional. Entre Abril y Octubre de 2009 se reclutaron todos los pacientes en edad adulta que se presentaron en el VCT si el primer RDT serológico (*Determine*, Abbott ark Illinois, USA) era positivo y el segundo (*Unigold*, Trinity Biotech CO., Wicklow, Ireland) era positivo, negativo o indeterminado, y si pertenecían al área de estudio. Se determinó si los pacientes estaban en una fase reciente de la infección mediante el ensayo BED-CEIA VIH-incidence test (Calypte Biomedical Corporation, Portland, OR 97224); los pacientes con una densidad óptica (D.O) <0.8 se consideraron como potencialmente

infectados en los últimos 6-8 meses. Para tomar en cuenta la clasificación de falsos positivos del ensayo BED, aquellos los individuos con D.O <0.8, recuento de CD4<200 células/ μ l o carga viral de VIH < 400 copias/ml se consideraron como falsas infecciones recientes. En la visita de inclusión en el estudio, así como en las de seguimiento a los 4 y 10 meses del inicio del estudio, se realizó un examen clínico y mediciones de la carga viral del VIH y del recuento de células T CD4 y T CD8. Asumiendo que durante el primer año de infección se establece un equilibrio en la carga viral, se calculó el punto de equilibrio de la CV para cada individuo como la media de dos medidas consecutivas de CV si no presentaban diferencias significativas entre ellas.

RESULTADOS PRINCIPALES:

- De los 492 pacientes incluidos en el estudio, la prevalencia de infecciones recientes definida como D.O<0.8 en BED-CEIA test, recuento de CD4>200 células/ μ l y ARN-VIH>400 copias/ml, fue de 11.58% (57/492; 95% CI 8.89-14.74). Utilizando el recuento de CD4<200 células/ μ l y los niveles de ARN-VIH<400 copias/ml como substitutos de falsa positividad, la tasa de falsos positivos (FPR, o *False Positive Rate*) para las infecciones recientes detectadas por BED-CEIA fue 4.67%.
- Las mujeres mostraron una proporción más elevada de infecciones recientes que los hombres (13% [95%CI 10.30-17.90] vs. 6.62% [95%CI 3.22-11.84] respectivamente, $p=0.022$). Y dentro de la población de infectados recientemente, la mediana de edad en las mujeres fue significativamente más joven que en los hombres (33.3 años [IQR 23.9-41.4] en las mujeres vs. 47.4 años (IQR 30.6-54.5) en los hombres, $p= 0.030$).
- Ningún síntoma específico referido por los pacientes caracterizó o distinguió a los pacientes recientemente infectados de los infectados por un periodo más largo de tiempo.
- Debido a la heterogeneidad en los niveles de ARN viral en los pacientes recientemente infectados, se categorizaron los individuos que tenían una carga viral “elevada” si sus

niveles de ARN-VIH se encontraban por encima de la mediana (4.98 log₁₀ copias ARN-VIH/ml) calculada a día de inclusión. El grupo definido con carga viral “elevada” mantenía valores significativamente más altos de ARN-VIH durante todas las visitas comparado con el resto de pacientes (p=0.0001 para la visita de inclusión, p=0.049 para la visita a 4 meses desde la inclusión, y p=0.002 para la visita a 10 meses).

- El grupo con “elevada” carga viral mostró una mediana de carga viral en el punto de equilibrio de 5.22 log₁₀ copias/ml (IQR 5.18-5.47) en comparación con la mediana de 4.15 log₁₀ copias/ml (IQR 3.37-4.43) para el resto de pacientes (p=0.0001).
- Respecto al recuento de células T CD4 no se observaron diferencias significativas entre el grupo con “elevada” carga viral y el resto de pacientes. En cuanto al recuento de células T CD8, se observó una mediana más elevada para el grupo con “elevada” carga viral durante todas las visitas, sin embargo solo se mostraron diferencias significativas entre los grupos en la visita de inclusión (1152 células/μl (IQR 900-1893) vs. 894 células/μl (IQR 605-1379), p=0.031). Además el ratio CD4:CD8 en la visita de inclusión para el grupo con “elevada” carga viral fue más bajo en comparación con el resto de pacientes (p=0.0027).

Recent HIV-1 Infection: Identification of Individuals with High Viral Load Setpoint in a Voluntary Counselling and Testing Centre in Rural Mozambique

Celia Serna-Bolea^{1*}, Nilsa de Deus^{2,3}, Sozinho Acácio², Jose Muñoz¹, Delino Nhalungo², Emilio Letang¹, Pedro Alonso^{1,2}, Denise Naniche^{1*}

1 Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona), Barcelona, Spain, **2** Manhica Health Research Centre (CISM), Manhica, Mozambique, **3** National Institute of Health, Maputo, Mozambique

Abstract

Background: Identification of recent HIV-infections is important for describing the HIV epidemic and compiling HIV-RNA-setpoint data for future HIV intervention trials. We conducted a study to characterize recent infections, and HIV-RNA-setpoint within the adult population presenting at a voluntary counselling and testing centre (VCT) in southern Mozambique.

Methods: All adults attending the Manhica District-Hospital VCT between April and October 2009 were recruited if they had at least one positive rapid HIV-serology test. Patients were screened for recent HIV-1 infection by BED-CEIA HIV-incidence test. Clinical examination, assessment of HIV-RNA and CD4 cell counts were performed at enrollment, 4 and 10 months.

Results: Of the 492 participants included in this study, the prevalence of recent infections as defined by BED-CEIA test, CD4 counts >200 cells/ μ l and HIV-RNA >400 copies/mL, was 11.58% (57/492; 95% CI 8.89–14.74). Due to heterogeneity in HIV-RNA levels in recently infected patients, individuals were categorized as having “high” HIV-RNA load if their HIV-RNA level was above the median (4.98 \log_{10} copies/mL) at diagnosis. The “high” HIV-RNA group sustained a significantly higher HIV-viral load at all visits with a median HIV-RNA setpoint of 5.22 \log_{10} copies/mL (IQR 5.18–5.47) as compared to the median of 4.15 \log_{10} copies/ml (IQR 3.37–4.43) for the other patients ($p=0.0001$).

Conclusion: The low proportion of recent HIV-infections among HIV-seropositive VCT clients suggests that most of this population attends the VCT at later stages of HIV/AIDS. Characterization of HIV-RNA-setpoint may serve to identify recently infected individuals maintaining HIV viral load $>5 \log_{10}$ copies/mL as candidates for antiretroviral treatment as prevention interventions.

Citation: Serna-Bolea C, de Deus N, Acácio S, Muñoz J, Nhalungo D, et al. (2012) Recent HIV-1 Infection: Identification of Individuals with High Viral Load Setpoint in a Voluntary Counselling and Testing Centre in Rural Mozambique. PLoS ONE 7(2): e31859. doi:10.1371/journal.pone.0031859

Editor: Barbara Ensoli, Istituto Superiore di Sanità, Italy

Received: October 15, 2011; **Accepted:** January 13, 2012; **Published:** February 21, 2012

Copyright: © 2012 Serna-Bolea et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Financial support was received from the Spanish Ministry of Health (grant PI071312) and from the European and Developing Countries Clinical Trial Partnership (EDCTP) as part of the AfrEVacc consortium. The Centro de Investigação em Saúde de Manhica receives core funding from the Spanish Agency for International Cooperation and the VCT clinic and day hospital from the Generalitat de Catalunya. CSB was supported by a grant from Spanish Ministry of Health (PI070233). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: celia.serna@cresib.cat (CSB); dsuzanne@clinic.ub.es (DN)

Introduction

HIV prevention strategies in Sub-Saharan Africa have been mainly focused on voluntary testing and counselling centres (VCT) and condom promotion. However, these efforts have shown limited success in controlling the HIV epidemic and the number of infected people continues to increase, having reached 33.3 million [31.4–35.3 million] people living with HIV in 2009 [1]. Current rapid serology tests employed in most resource-poor countries do not differentiate between acute, recent and longstanding HIV infection which have different risks of transmission.

During the early months of HIV infection, levels of HIV-RNA in plasma and genital secretions are up to 2 \log_{10} higher than during the chronic phase and only comparable to end stage AIDS [2,3]. Indeed, each \log_{10} increase in HIV viral load has been

shown to be associated with a 2.45 increased risk of heterosexual HIV transmission [4,5]. However, initial peak of HIV viremia during acute HIV infection usually decreases within 6–8 weeks and then gradually over six months to a more stable level, often referred to as the viral load setpoint [6]. The level at which the HIV-RNA setpoint is established is predictive of both disease progression and the probability of HIV transmission during chronic HIV infection [3,7]. Studies have suggested that 50% of HIV transmissions take place in the first 6 months after infection when HIV-RNA levels can be up to 2 \log_{10} higher than during chronic HIV infection [5,8]. In this view, some authors suggest that antiretroviral treatment and/or behaviour modification interventions focused in the initial phases of infection when HIV-RNA levels are elevated could help in reducing HIV transmission [9,10]. Recently, it has been proposed that

individuals maintaining high HIV-RNA levels during the initial phases of infection could be targeted for interventions to reduce HIV transmission [10]. In line with this, early initiation of antiretroviral treatment (ART) has recently been shown to reduce sexual transmission of HIV among HIV serodiscordant couples [11]. Moreover, it has been predicted that a vaccine aimed at decreasing viral load setpoint could be an effective strategy to prevent new HIV infections and progression to AIDS [12,13].

In the last ten years many serological assays have been developed to distinguish between recent infections (<6 months since seroconversion) and established HIV infections [14]. These assays have been used to assess HIV-RNA setpoint as well as estimate HIV incidence in a cross-sectional manner [14,15,16,17].

The most widely used assay to determine recent infections is the BED capture enzyme-immunoassay (BED-CEIA), frequently applied in developing countries [18,19,20,21,22,23]. However, the assay may lead to misclassification of advanced AIDS as recent infections [24]. To avoid these misclassifications they are usually validated for the population screened, and the results preferably adjusted for False Positive Rates (FPR) [25].

Characterization of recent HIV infections in African populations can aid in estimating the proportion of the population accessing early diagnosis of HIV, as well as determining HIV viral load setpoint levels. Indeed description of the epidemiology of recent HIV infections may inform programs seeking to improve VCT uptake. Additionally, identifying those individuals more likely to transmit HIV could be useful for positive HIV prevention efforts. Finally, assessing the HIV-RNA setpoint contributes to understanding the dynamics of HIV transmission in a population that is predominantly infected with HIV subtype C [26], which has been reported to have higher levels of HIV-RNA during the acute phase of HIV infection [27]. Little is known about the evolution of infection for this subtype.

The objective of the study was to characterize recent infections and HIV viral load setpoint within the HIV-seropositive adult population presenting at a VCT in southern Mozambique.

Materials and Methods

Study population and visits

All adults attending the VCT of the Manhiça District Hospital (MDH) in Manhiça, southern Mozambique, between April and October 2009 were recruited if the first Determine (Abbott Park Illinois, USA) serological rapid test was positive, and the confirmatory rapid test Unigold (Trinity Biotech Co., Wicklow, Ireland) was positive or negative or indeterminate, and if they were permanent residents of the demographic surveillance study area. During the study, approximately 450 individuals attended the VCT monthly, of which an estimated 39% were residents of the demographic surveillance study area.

The Manhiça Health Research Centre (CISM) has been conducting continuous demographic surveillance in the district since 1996 which covered a population of 82,000 persons at the time of this study.

Participants were screened for recent HIV-1 infection by BED-capture enzyme immunoassay incidence assay (BED-CEIA). CD4 T cell counts were performed for all participants, and plasma was frozen for subsequent determination of HIV-RNA viral load if BED-CEIA identified them as recently infected. Patients identified as recently infected were invited for follow-up visits at 4 and 10 months for CD4 and CD8 T cell counts and HIV-RNA assessment. Clinical examination and epidemiological data were recorded at each visit.

During the study period, six patients became eligible for ART and initiated treatment (three at 4 months and another three at 10

months). Those patients were excluded from the study when they initiated antiretroviral therapy. In accordance with the Mozambican National Antiretroviral Treatment Guidelines, ART initiation criteria were defined as CD4+ cell count ≤ 200 cells/mL irrespective of the clinical stage, WHO stage III with CD4 cell count ≤ 350 cells/mL, or WHO stage IV irrespective of CD4 cell count.

Written informed consent was obtained from patients prior to participation. The study protocol was reviewed and approved by the Mozambican National Bioethics Committee (ref. 232/CNBS/07) and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committee (ref. CEIC/2007/3943).

Laboratory procedures

BED enzyme immunoassay. Recent infections were determined from cryopreserved plasma samples with the commercial BED-capture enzyme immunoassay (BED-CEIA) strictly following the manufacturer's instructions (Calypte Biomedical Corporation, Portland, OR 97224).

The BED-CEIA is a quantitative antibody assay that determines the proportion of HIV-1-specific IgG antibodies in samples with respect to total IgG antibodies; BED-CEIA detects recent seroconversion as samples presenting low levels of HIV-1-specific IgG considered to reflect infection within a window of approximately 6 months [15]. Seropositive samples from individuals testing below the threshold of a normalized optical density (ODn) of less than 0.8 are classified as recently infected, likely to have been infected within the past 6–8 months.

HIV-RNA determinations. HIV-RNA levels were determined from cryopreserved plasma samples with the commercial Roche Amplicor Monitor, version 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) technique for amplification and quantification of HIV-1 RNA. Lower limit of detection was 400 copies/mL. For the purpose of analyses, plasma HIV-1 RNA concentrations below the limit of detection were assigned the value of 200 copies/mL.

CD4 and CD8 counting. CD4 and CD8 counting was performed after staining with labelled antibodies: CD4, CD3, CD8, and CD45 in TruCount tubes (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, California, USA). Samples were assessed by flow cytometry on a FACS_Calibur (Becton Dickinson).

Statistical analysis and definitions

Proportions for categorical variables were compared using the Pearson chi-squared test. The Wilcoxon rank-sum test was used to compare medians of continuous variables with non-normal distribution and the Wilcoxon signed-rank test to compare paired groups. Statistical analyses were performed using STATA version 11 (STATA Corp., College Station, Texas, USA).

Patients were considered HIV-infected when both the first (Determine, Abbott Park Illinois, USA) and the confirmatory (Unigold, Trinity Biotech Co., Wicklow, Ireland) rapid HIV serology tests were positive, and indeterminate when only the first rapid test was reactive.

Recently infected patients were defined as those individuals with HIV-positive or indeterminate serology (as defined above) and a BED-CEIA assay ODn reading of < 0.8 , CD4 counts > 200 cells/ μ L and HIV-RNA levels > 400 copies/mL. All recent-BED-CEIA testing patients with CD4 counts below 200 cells/ μ L or Viral Load < 400 copies/mL were considered long-standing infected patients and those with low CD4 counts (< 200 cells/ μ L) referred for ART initiation. CD4 count < 200 cells/ μ L and viral load (VL) < 400 copies/mL have been associated with misclassification of recent infections by BED-CEIA [28].

Table 1. HIV serological characteristics of the study population (N = 492).

	n	% (95%CI)
HIV RT positive	481	97.7 (95% CI 96.03–98.87)
HIV RT indeterminate	11	2.23 (95% CI 1.12–3.96)
BED-CEIA-recent	80	16.26% (95% CI 13.10–19.82)
BED-CEIA-recent, CD4>200 cell/μl	61	12.39% (95% CI 9.61–15.63)
BED-CEIA-recent, CD4>200 cell/μl, VL>400 copies/mL	57	11.58% (95% CI 8.89–14.74)

RT: rapid testing. BED-CEIA: BED capture enzyme immunoassay. VL: Viral Load. HIV positive and indeterminate serology by RT and BED-CEIA recent infection as defined in methods.

doi:10.1371/journal.pone.0031859.t001

Those patients categorized as having a “high” HIV-RNA load were defined as those individuals with HIV-RNA level at enrollment above the median HIV-RNA level (4.98 log₁₀ copies/mL).

Assuming that the viral load setpoint is established during the first year of infection, we defined that viral load setpoint had been reached in a population when the median HIV-RNA measurements did not show significant differences between visits. The viral load setpoint of each individual was then calculated as the mean of at least two consecutive measurements. The population viral load setpoint was expressed as median and interquartile range (IQR).

Results

Characteristics of the study population

Among 492 individuals enrolled in the study who presented at the Manhica hospital VCT with a positive HIV Determine rapid test, 97.7% (481/492) had a confirmed HIV positive serology and 2.23% (11/492) had an indeterminate HIV serology, as defined in methods (Table 1).

The median age of the study population was 34 years (IQR 28–42) ranging from 18 to 86 and patients were predominantly female (69.30%; 341/492). Women were significantly younger than men [median: 33 years (IQR 27–40) versus 35 years (IQR 29–46), respectively, $p = 0.0012$].

Epidemiology of recent HIV infection

Of the 492 individuals enrolled, 80 (16.26%; 95% CI 13.10–19.82) were classified as having a recent infection by the BED-CEIA assay (Table 1). Of these 80 patients, 19 (23.75%) had CD4 counts below 200 cells/μl and were considered to be advanced HIV infections, according to the definitions applied (see methods). In addition, four individuals (6.55%) with VL<400 copies/mL (6.55%) were also considered long-standing infections and excluded from the recently infected population in order to reduce the rate of misclassification. Thus, using CD4<200 cells/μl as a surrogate of false positivity, the FPR for recent infections was 3.86%, and adding VL<400 copies/mL to the definition, the FPR for recent infections was 4.67%. As a consequence, the prevalence of recent HIV infection was 12.39% (61/492), (95% CI 9.61–15.63) or 11.58% (57/492), (95% CI 8.89–14.74), as defined by the BED-CEIA assay and CD4 counts greater than 200 cells/μl or BED-CEIA and CD4 counts greater than 200 cells/μl and VL greater than 400 copies/mL respectively. The remaining 435 (88.41%) patients were classified as having a long-standing HIV-1 infection. Due to the unknown validated FPR for BED-CEIA in

Table 2. Baseline virological and immunological parameters among individuals diagnosed with recent HIV infections by the BED-CEIA assay.

	n	Median (IQR)
BED, CD4>200 cells/μL		
HIV-RNA log ₁₀ copies/mL	57	4.98 (4.29–5.44)
CD4 cells/μl	52*	516.5 (305–722)
BED, CD4 <200 cells/μL or VL<400 copies/mL		
HIV-RNA log ₁₀ copies/mL	23	5.23 (4.65–5.64)
CD4 cells/μl	23	135 (46–186)

Results are presented according to CD4 counts.

*CD4 counts available for 52/57 patients.

doi:10.1371/journal.pone.0031859.t002

our population, we did a sensitivity analyses to assess the impact of different FPR on the population prevalence of recent infections. We randomly assigned FPR of 1%, 3% and 5% to the BED-CEIA assay in our study population based on values reported in other countries [22,23,24]. These calculations yielded prevalences of recently infected patients of 15.26%, 13.26% and 11.26% respectively. These values fell within close range of the confidence interval of the prevalence of recent infections determined using CD4<200 cells/μl and VL<400 copies/mL as surrogates of FPR [11.58%, (95% CI 8.89–14.74)]. The remaining analysis was performed using the CD4-VL corrected definition of recent HIV infection.

Median HIV-RNA measurements and CD4 counts of BED-CEIA diagnosed recently infected individuals using the CD4-VL corrected definition are shown in table 2. Using the CD4-VL corrected definition of recent HIV infections, among those patients with confirmed HIV positive serology, 10.22% (95% CI 7.66–13.29) had a recent infection whereas among those with an indeterminate HIV serology, 88.88% (95% CI 51.75–99.71) had a recent infection.

Women had a significantly greater proportion of recent HIV infections as compared to men (13.78% [95%CI 10.30–17.90] vs. 6.62% [95%CI 3.22–11.84] respectively, $p = 0.022$).

The median age of the recently HIV infected population was 34.0 years (IQR 24.9–46.9), similar to the age of the long-standing infected population [33.5 years (IQR 27.6–41.5), $p = 0.9$]. Within the recently infected population, the median age for women was 33.3 years (IQR 23.9–41.4), significantly younger than the median age for men [47.4 years (IQR 30.6–54.5), $p = 0.030$].

No patient self-reported specific symptoms characterized the HIV-1 recent infections in the population nor distinguished them from long-standing HIV infections (Table 3).

Immuno-virological parameters in Recent HIV infected patients

Patients considered to be recently infected by HIV were followed up for assessment of their CD4 counts and HIV-RNA load. Median CD4 cell count measures at 4 months (497 cells/μl (IQR 347–597) and at 10 months (582 cells/μl (IQR 533–758) were not significantly different compared with values at HIV diagnosis [(516.5 cells/μl (IQR 305–722), $p = 0.700$ and $p = 0.139$ respectively].

Follow-up measurements of HIV-1-RNA in recently infected individuals showed a median viral load of 4.50 log₁₀ copies/ml (IQR 3.88–5.16) at 4 months post-diagnosis which was slightly

Table 3. Self-reported clinical symptoms according to status of HIV infection.

Reported symptom	Recent HIV infection*(n = 57) n (%)	Long-standing HIV infection (n = 435) n (%)	P-value
Loss of weight	32 (56.14)	277 (63.82)	0.30
Cough	20 (35.09)	176 (40.46)	0.47
Diarrhea	3 (5.26)	43 (9.89)	0.33
Common Cold	15 (26.32)	141 (32.41)	0.45

*Recent HIV infection defined by BED-CEIA, CD4 counts >200 cell/ μ L and VL >400 copies/mL.

doi:10.1371/journal.pone.0031859.t003

lower than that observed at diagnosis [4.98 log₁₀ copies/ml (IQR 4.29–5.44), $p = 0.044$]. At 10 months post-diagnosis, median viral load was 4.88 log₁₀ copies/ml (IQR 4.55–5.16), which was not significantly different from values at baseline or at the 4 month visit ($p = 0.77$, $p = 0.34$ respectively).

Because of great heterogeneity in patterns of HIV-RNA evolution over time, recently infected patients were categorized as having “high” HIV-RNA load if the HIV viral load at diagnosis was above the median (described in methods). The group of patients with high HIV-RNA sustained a significantly higher median HIV viral load at all visits compared with the other patients (Figure 1A). The interquartile ranges showed that those individuals with high HIV-RNA levels had a lower intra-group heterogeneity in HIV-RNA levels than did the other patients. Within the group of patients with high HIV-RNA, a stable viral load was maintained from diagnosis through to the 10 month follow-up with no statistically significant differences in HIV-RNA levels between visits (Figure 1A). Thus, individual HIV viral load setpoint values were determined by pooling HIV-RNA data as described in methods. The median population HIV-RNA setpoint for the high HIV-RNA patients was 5.22 log₁₀ copies/ml (IQR 5.18–5.47) as compared to 4.15 log₁₀ copies/ml (IQR 3.37–4.43) for the other patients ($p = 0.0001$).

Median CD4 counts did not differ significantly between the high HIV-RNA group and the other patients for all follow-up visits. Median CD8 counts were increased in those with high HIV-RNA levels for all follow-up visits, but a significant difference between groups was only observed at diagnosis (high HIV-RNA group 1152 (IQR 900–1893) vs. the other patients 894 cells/ μ L (IQR 605–1379), $p = 0.031$). In addition, the CD4:CD8 ratio at diagnosis was lower in the high HIV-RNA group as compared to the other patients ($p = 0.0027$) (Figure 1B).

Discussion

Our findings show that 11.58% of clients of the Manhica Hospital VCT in southern Mozambique may be considered to have a recent HIV infection. There was a higher prevalence in women than in men. Assessment of HIV viral load setpoint in recently infected individuals revealed great heterogeneity of HIV-RNA viral load from which two patterns emerged. Individuals with HIV viral load above the median at enrollment (>4.98 log₁₀ copies/mL) sustained a high HIV-RNA level and a setpoint of 5.22 log₁₀ copies/mL. This contrasted with individuals with an initial HIV viral load below the median and a viral load setpoint of 4.15 log₁₀ copies/mL.

The prevalence of recently infected HIV patients (11.58%) among HIV-seropositive VCT clients in Manhica was similar to that of other African countries [19] but lower than that observed

in European countries such as Switzerland where a prevalence of 37% of recent HIV infections was reported in VCT clients as determined by the BED-CEIA [29]. A low prevalence of recent infections suggests that a large proportion of the Manhica population attends the VCT at later stages of HIV/AIDS. Thus, recently infected individuals, who are more likely to transmit, may have lower VCT uptake. This does not include pregnant women who undergo HIV testing in the Manhica antenatal clinic (ANC). Clients of the ANC are younger with a median age of 24 years and may have a higher prevalence of recent HIV infections than those attending the general VCT [30,31,32]. Late diagnosis of HIV has been observed in other African countries, and it is likely due to a poor access to health care in these settings [33]. Late presentation is associated with a higher mortality after ART initiation [34] and this has led to piloting new HIV testing approaches to increase uptake, including mobile units, provider-based and home-based counselling and testing [35].

The gender and age distribution of recent HIV infection observed in our study is likely to be a reflection of the HIV epidemic and trends in VCT uptake in the area. We observed that the prevalence of recent HIV infections was significantly higher in women as compared to men, corroborating findings of increased HIV prevalence in women in sub-Saharan Africa [1,36]. In our study, recently infected men were significantly older, almost 10 years when comparing with recently infected women. This may reflect migration trends for young healthy men from Manhica working in South Africa [37]. This would most probably lead to underrepresentation of young men in the recently infected population, and overrepresentation in more advanced stages of disease when HIV progression may impede seeking employment in South Africa. These age and gender distributions suggest that other approaches to HIV testing are needed to increase earlier diagnosis of HIV in all age groups with particular attention to VCT uptake in men.

In terms of clinical signs and symptoms that could potentially differentiate recent from long-standing HIV infections, we did not observe any non-specific self-reported signs associated with either. It has been shown that nonspecific flu-like syndromes may help to identify patients during the acute phase of the infection which lasts up to 6 weeks [38,39,40,41]. However, although patients may have high HIV viral loads over a longer period of time, nonspecific patient-reported symptoms do not appear to distinguish recent from longstanding HIV infected patients in our population. This study did not include clinical exploration for opportunistic infections.

HIV viral load setpoint has been loosely defined as a stable viral load level established within the first year after seroconversion [6]. However, in the literature the establishment time of this HIV viral load setpoint has been defined at various time points ranging from 4 months to 24 months post-infection [7,42,43,44]. We estimated the HIV viral load setpoint over the 1st year of HIV infection. In our study population, HIV-RNA levels of patients classified as recently infected remained elevated throughout the follow up. In addition, those with HIV-RNA levels greater than the median (4.98 log₁₀ copies/mL) at diagnosis maintained HIV-RNA levels above 4.98 log₁₀ copies/mL during the first year after infection with an estimated viral load setpoint of 5.22 log₁₀ copies/mL. These individuals may be more rapid progressors and could have an increased risk of transmitting HIV. There is indeed agreement that higher HIV-RNA setpoints are associated with faster progression to AIDS and increased risk of HIV transmission [7,45,46,47]. Individuals with HIV viral load above 4.91 log₁₀ copies/mL have been suggested to progress to AIDS as quickly as 3 years after infection [48], and those patients with HIV-RNA

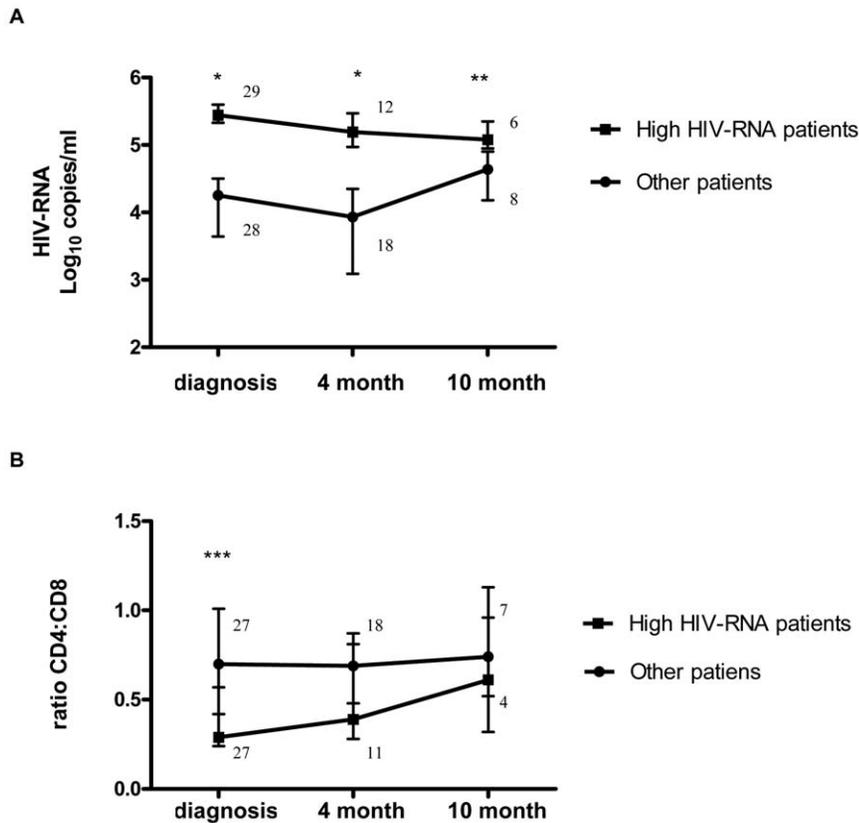


Figure 1. Evolution of median HIV-RNA load and CD4:CD8 ratios in recently infected patients. HIV-RNA load (A) and CD4:CD8 ratios (B) in patients with high HIV-RNA as compared to the other patients. Median and interquartile range are shown. HIV-RNA viral load groups are defined as described in methods. P-values are from Wilcoxon rank sum test between groups as follows: * $p=0.0001$, ** $p=0.038$, *** $p=0.002$. P-values from Wilcoxon Signed Rank between visits did not show significant differences. Numbers denote the n for each group at each time point. doi:10.1371/journal.pone.0031859.g001

levels above $4.7 \log_{10}$ (50000) copies/mL may have the highest HIV transmission rates [4].

It has recently been suggested that individuals maintaining HIV-RNA viral loads greater than $4.7 \log_{10}$ (50000) copies/mL could be a target for antiretroviral treatment for prevention to reduce HIV transmission [10]. The percentage of individuals with HIV viral loads above $4.7 \log_{10}$ copies/mL in Botswana was suggested to be approximately 25%–30% both in the general population and in antenatal clinics tested by rapid serology tests [10]. According to this approach, up to 50% of recently infected individuals in the present study could be candidates for antiretroviral treatment for prevention and suggests that screening for recent HIV infections may identify a greater proportion of individuals with elevated viral load.

Our results showed that patients with elevated viral load had higher CD8 T-cell counts and lower CD4:CD8 T-cell ratios at diagnosis. Other studies have suggested that within HIV-1 subtype C infected patients, those individuals who maintain a higher viral load setpoint display lower levels of CD4 cells [27]. We did not observe these low levels of CD4 counts in the group maintaining higher HIV-RNA viral load, however these patients showed decreased CD4:CD8 ratios over the year of follow-up.

This study had several limitations. Although the BED-CEIA assay is widely used tool, it has not been validated for subtype C. It has been suggested that the BED-CEIA period of recency may be wider for subtype C than for subtype B. The recency window for subtype B is 162 days and could be up to 203 days for subtype C [49]. Nevertheless, several studies have used BED-CEIA for

measuring recent infections and estimating incidence in countries where HIV subtype C is the major subtype [18,19,21,22,25,50]. We considered a broader recency window of up to 8 months. However it is important to emphasize that the present study did not have the aim of measuring incidence but only a prevalence of recent infections in the area.

Another limitation is that BED-CEIA is known to overestimate the proportion of recently infected individuals which may lead to misclassification of advanced AIDS as recent infections [51]. To avoid this misclassifications a false positive rate (FPR) can be calculated for each population studied. However, the calculation requires comparison with longitudinal incidence studies, which were not available for the Manhica population. We thus used CD4 counts and HIV-RNA levels as surrogates of FPR. Hence, our results were based on the assumption that $BED < 0.8n$ O.D., $CD4 > 200$ cells/ μ l and $VL > 400$ copies/mL identifies recent infection. We, as other authors, considered those individuals reading as recent HIV infections by BED-CEIA but with $CD4 < 200$ cells/ μ l or $VL < 400$ copies/mL as false recent infections [18,28,50,52]. This is based on the assumption that the production of HIV-specific IgG decreases when viral replication is suppressed or in the presence of severe immunosuppression. This in turn can lead to a low proportion of specific HIV-IgG relative to total IgG giving a false recent infection by the BED-CEIA [28]. Nevertheless, we cannot exclude that a small number of advanced AIDS patients with $CD4 > 200$ cells/ μ l or $VL > 400$ copies/mL were misclassified as recent infections which could lead to an overestimation of both the prevalence of recent

infected patients and median HIV-RNA levels. On the other hand, the potential exclusion of recently infected patients with $CD4 < 200$ cells/ μ L or $VL < 400$ copies/mL could lead to underestimating the prevalence of recent infected patients. However this is less likely. Finally, the study suffered a large loss to follow-up during the 10 months of the study leading to a low sample size at 10 months of followup. However, the loss was equal in both high HIV-RNA patients and those with lower HIV-RNA levels.

In addition to the use of BED-CEIA and FPR, other approaches such as antibody avidity tests or other detuned ELISA have been used to estimate recent infections alone or in combination [24,25,52]. The use of a second avidity test to identify recent infections diminishes the likelihood of misclassifications [24], however it may require specific technology which can limit its use in a developing country. The approach of using the BED-CEIA assay and $CD4 < 200$ cells/ μ L and $VL < 400$ copies/mL as surrogate markers for FPR may facilitate the identification of recent infections in situ using the HIV monitoring tools already available or being scaled up in many low income countries.

In summary, the present study provides data on recent HIV infections and viral load setpoint from an area with little previous information. Our results suggest that in a rural area of southern Mozambique, a low proportion of individuals seek HIV testing at

early phases of HIV infection and points to a need for new approaches to HIV testing. Our results also identify a group of patients in early phases of HIV infection with an elevated HIV-RNA setpoint greater than $5.0 \log_{10}$ copies/mL which could be target for ART for prevention strategies.

Acknowledgments

The authors are grateful to all the patients for their participation in the study and to the continued dedication of the staff at the Manhiça District Hospital and especially to the VCT, as well as field, clinic and data management staff at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Mozambique. The authors are particularly grateful to Lucas Nhatumbo, Roque Vilanculo, Elsa Banze, Nelito Ernesto José and José Machado Almeida for their contribution to logistics, patient visits, follow-up and laboratory; and to Llorenç Quintó for his helpful advice in statistics.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: D. Nanche EL. Performed the experiments: CSB ND SA. Analyzed the data: D. Nanche CSB. Contributed reagents/materials/analysis tools: D. Nhalungo PA. Wrote the paper: CSB D. Nanche. Coordinated logistics at the Manhiça District Hospital/VCT and performed the fieldwork: SA JM CSB. Provided scientific input at the different phases of the study: JM EL PA.

References

- UNAIDS/WHO (2010) Report on the global AIDS Epidemic 2010. In Geneva: World Health Organization.
- Dyer JR, Kazembe P, Vernazza PL, Gilliam BL, Maida M, et al. (1998) High levels of human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen of seropositive men in sub-Saharan Africa. *J Infect Dis* 177: 1742–1746.
- Pilcher CD, Joaki G, Hoffman IF, Martinson FE, Mamanje C, et al. (2007) Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. *Aids* 21: 1723–1730.
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, et al. (2000) Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 342: 921–929.
- Brenner BG, Roger M, Routy JP, Moisi D, Ntemgwam M, et al. (2007) High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection. *J Infect Dis* 195: 951–959.
- Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L (1998) Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 128: 613–620.
- Lavreys L, Baeten JM, Chohan V, McClelland RS, Hassan WM, et al. (2006) Higher set point plasma viral load and more-severe acute HIV type 1 (HIV-1) illness predict mortality among high-risk HIV-1-infected African women. *Clin Infect Dis* 42: 1333–1339.
- Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, et al. (2005) Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 191: 1403–1409.
- Granich RM, Gilks CF, Dye C, De Cock KM, Williams BG (2009) Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *Lancet* 373: 48–57.
- Novitsky V, Wang R, Bussmann H, Lockman S, Baum M, et al. (2010) HIV-1 subtype C-infected individuals maintaining high viral load as potential targets for the “test-and-treat” approach to reduce HIV transmission. *PLoS One* 5: e10148.
- Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, et al. (2011) Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med* 365: 493–505.
- Davenport MP, Ribeiro RM, Chao DL, Perelson AS (2004) Predicting the impact of a nonsterilizing vaccine against human immunodeficiency virus. *J Virol* 78: 11340–11351.
- Gupta SB, Jacobson LP, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, et al. (2007) Estimating the benefit of an HIV-1 vaccine that reduces viral load set point. *J Infect Dis* 195: 546–550.
- Busch MP, Pilcher CD, Mastro TD, Kaldor J, Vercauteren G, et al. (2010) Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. *AIDS* 24: 2763–2771.
- Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau CP, Byers R, et al. (2002) Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 295–307.
- Guy R, Gold J, Calleja JM, Kim AA, Parekh B, et al. (2009) Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 9: 747–759.
- Barnighausen T, McWalter TA, Rosner Z, Newell ML, Welte A (2010) HIV incidence estimation using the BED capture enzyme immunoassay: systematic review and sensitivity analysis. *Epidemiology* 21: 685–697.
- Marinda ET, Moulton LH, Humphrey JH, Hargrove JW, Ntozini R, et al. (2011) In utero and intra-partum HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection during pregnancy: using the BED capture enzyme immunoassay as a surrogate marker for acute infection. *Int J Epidemiol*. doi: 10.1093/ije/dyr055.
- Truong HH, Fritz K, McFarland W, Hartogensis W, Fiamma A, et al. (2011) Recent HIV Type 1 Infection Among Participants in a Same-Day Mobile Testing Pilot Study in Zimbabwe. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27: 593–595.
- Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, McDougal JS, Parekh BS (2004) Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol* 42: 2623–2628.
- Karita E, Price M, Hunter E, Chomba E, Allen S, et al. (2007) Investigating the utility of the HIV-1 BED capture enzyme immunoassay using cross-sectional and longitudinal seroconverter specimens from Africa. *AIDS* 21: 403–408.
- Hargrove JW, Humphrey JH, Mutasa K, Parekh BS, McDougal JS, et al. (2008) Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay. *AIDS* 22: 511–518.
- Barnighausen T, Tanser F, Gqwedz Z, Mbizana C, Herbst K, et al. (2008) High HIV incidence in a community with high HIV prevalence in rural South Africa: findings from a prospective population-based study. *AIDS* 22: 139–144.
- Braunstein SL, Nash D, Kim AA, Ford K, Mwambarangwe L, et al. (2011) Dual testing algorithm of BED-CEIA and AxSYM Avidity Index assays performs best in identifying recent HIV infection in a sample of Rwandan sex workers. *PLoS One* 6: e18402.
- Barnighausen T, Wallrauch C, Welte A, McWalter TA, Mbizana N, et al. (2008) HIV incidence in rural South Africa: comparison of estimates from longitudinal surveillance and cross-sectional cBED assay testing. *PLoS One* 3: e3640.
- Lahuerta M, Aparicio E, Bardaji A, Marco S, Sacarlal J, et al. (2008) Rapid Spread and Genetic Diversification of HIV Type 1 Subtype C in a Rural Area of Southern Mozambique. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 327–335.
- Novitsky V, Woldegabriel E, Kebaabetswe L, Rossenkan R, Mlotshwa B, et al. (2009) Viral load and CD4+ T-cell dynamics in primary HIV-1 subtype C infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50: 65–76.
- Laceydecker O, Brookmeyer R, Oliver AE, Mullis C, Eaton KP, et al. (2011) Factors associated with incorrect identification of recent HIV infection using the BED capture immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*: In press.
- Schupbach J, Gebhardt MD, Tomasik Z, Niederhauser C, Yerly S, et al. (2007) Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation. *PLoS Med* 4: e343.
- Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, Romagosa C, Sanz S, et al. (2008) A randomized placebo-controlled trial of intermittent preventive treatment in pregnant women in the context of insecticide treated nets delivered through the antenatal clinic. *PLoS ONE* 3: e1934.
- Perez-Hoyos S, Nanche D, Macete E, Aponte JJ, Sacarlal J, et al. (2011) Stabilization of HIV incidence in women of reproductive age in southern Mozambique. *HIV Medicine* doi: 10.1111/j.1468-1293.2010.00908x.

32. Nanche D, Bardaji A, Lahuerta M, Berenguera A, Mandomando I, et al. (2009) Impact of maternal human immunodeficiency virus infection on birth outcomes and infant survival in rural Mozambique. *Am J Trop Med Hyg* 80: 870–876.
33. Wanyenze RK, Kanya MR, Fatch R, Mayanja-Kizza H, Baveewo S, et al. (2011) Missed Opportunities for HIV Testing and Late-Stage Diagnosis among HIV-Infected Patients in Uganda. *PLoS One* 6: e21794.
34. Kigozi IM, Dobkin LM, Martin JN, Geng EH, Muyindike W, et al. (2009) Late-disease stage at presentation to an HIV clinic in the era of free antiretroviral therapy in Sub-Saharan Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 280–289.
35. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization. AIDS epidemic update December 2009.
36. Glynn JR, Carael M, Auvert B, Kahindo M, Chege J, et al. (2001) Why do young women have a much higher prevalence of HIV than young men? A study in Kisumu, Kenya and Ndola, Zambia. *AIDS* 15 Suppl 4: S51–60.
37. Nhacolo AQ, Nhalungo DA, Sacoer CN, Aponte JJ, Thompson R, et al. (2006) Levels and trends of demographic indices in southern rural Mozambique: evidence from demographic surveillance in Manhica district. *BMC Public Health* 6: 291.
38. Rosenberg ES, Caliendo AM, Walker BD (1999) Acute HIV infection among patients tested for mononucleosis. *N Engl J Med* 340: 969.
39. Bollinger RC, Brookmeyer RS, Mehendale SM, Paranjape RS, Shepherd ME, et al. (1997) Risk factors and clinical presentation of acute primary HIV infection in India. *Jama* 278: 2085–2089.
40. Serna-Bolea C, Munoz J, Almeida JM, Nhacolo A, Letang E, et al. (2010) High prevalence of symptomatic acute HIV infection in an outpatient ward in southern Mozambique: identification and follow-up. *AIDS* 24: 603–608.
41. Bebell LM, Pilcher CD, Dorsey G, Havlir D, Kanya MR, et al. (2010) Acute HIV-1 infection is highly prevalent in Ugandan adults with suspected malaria. *AIDS* 24: 1945–1952.
42. Burgers WA, Riou C, Mlotshwa M, Maenetje P, de Assis Rosa D, et al. (2009) Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point. *J Immunol* 182: 4751–4761.
43. Morrison CS, Demers K, Kwok C, Bulime S, Rinaldi A, et al. (2010) Plasma and cervical viral loads among Ugandan and Zimbabwean women during acute and early HIV-1 infection. *AIDS* 24: 573–582.
44. Saathoff E, Pritsch M, Geldmacher C, Hoffmann O, Koehler RN, et al. (2010) Viral and host factors associated with the HIV-1 viral load setpoint in adults from Mbeya Region, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54: 324–330.
45. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Mariotti M, Thauvin M, Lerable J, et al. (1998) The risk of disease progression is determined during the first year of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 177: 1541–1548.
46. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10: 11–23.
47. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, et al. (1996) Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167–1170.
48. Lyles RH, Munoz A, Yamashita TE, Bazmi H, Detels R, et al. (2000) Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 181: 872–880.
49. Parekh BS, Hanson DL, Hargrove J, Branson B, Green T, et al. (2010) Determination of Mean Recency Period for Estimation of HIV Type 1 Incidence with the BED-Capture EIA in Persons Infected with Diverse Subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27: 265–273.
50. Marinda ET, Hargrove J, Preiser W, Slabbert H, van Zyl G, et al. (2010) Significantly diminished long-term specificity of the BED capture enzyme immunoassay among patients with HIV-1 with very low CD4 counts and those on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53: 496–499.
51. CDC (2006) Interim recommendations for the use of the BED capture enzyme immunoassay for incidence estimation and surveillance.
52. Braunstein SL, Ingabire CM, Geubbels E, Vyankandondera J, Umulisa MM, et al. (2011) High Burden of Prevalent and Recently Acquired HIV among Female Sex Workers and Female HIV Voluntary Testing Center Clients in Kigali, Rwanda. *PLoS One* 6: e24321.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los estudios presentados en esta tesis profundizan en la descripción de la epidemiología del VIH en sus fases tempranas en un marco específico como es un país de África subsahariana con predominante circulación del subtipo C. Los resultados aquí presentados se han centrado en las fases iniciales de la infección por el VIH, caracterizando la infección aguda (AHI), que incluye la etapa de infección previa a la seroconversión, y la infección reciente, que abarca un periodo aproximado de 12 meses desde el inicio de la infección.

Las etapas iniciales de la infección se caracterizan por elevados niveles de ARN viral^{30, 32, 51, 52} que podrían contribuir significativamente a la transmisión del virus y al mantenimiento de la epidemia^{76, 79, 87, 91, 169}. Además, una gran parte del daño inmunológico tiene lugar durante el primer mes de la infección. Por tanto, la identificación de infecciones por el VIH en sus fases más recientes es una prioridad de cara a diseñar intervenciones enfocadas hacia la reducción de la transmisión y la preservación del sistema inmunológico.

El primer artículo que se presenta en esta tesis evidencia una elevada prevalencia de infecciones por el VIH en fase aguda (3.3%) así como en fase crónica (37.8%) en una población con síndrome febril que acude al servicio de consultas externas del centro de salud. En un área con malaria endémica, la mayoría de las consultas por fiebre se atribuyen normalmente a malaria⁵⁰, previo a su confirmación en el laboratorio, pasando por alto el diagnóstico de una infección aguda por el VIH. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio muestran que solo el 13% de los síndromes febriles eran debidos a malaria. Además, se comprueba que la identificación de AHI en un área endémica para malaria y de elevada prevalencia del VIH es posible si se dirige la criba hacia pacientes sintomáticos con fiebre o historia de fiebre que se presentan en las consultas externas del hospital.

En el momento de publicación del artículo, todos los estudios referentes a la identificación de AHI llevados a cabo en un contexto africano se habían centrado en pacientes de clínicas ETS^{79, 95, 96} pero no había información sobre la prevalencia de AHI en pacientes que

atienden a las consultas generales de un hospital. Más recientemente Bebell et al.¹⁷⁰ publicó un estudio similar al nuestro llevado a cabo en Uganda, en el que se determinó una elevada prevalencia de AHI, del 1%, en pacientes con síndrome febril referidos para la confirmación de malaria. Esta prevalencia es más baja que la detectada en Manhiça (3.3%), pero también lo es la de infecciones VIH-seropositivas establecidas (8.23%). Además, la prevalencia de malaria confirmada, un 17%, fue similar a la detectada en Manhiça. Por otro lado, Sanders et al.¹⁷¹ reflejan en su estudio en Kenya como adultos AHI con síndrome febril que buscan atención médica son comúnmente tratados para malaria como primer diagnóstico. El conjunto de estudios demuestran el creciente interés por una buena identificación y un diagnóstico temprano de pacientes infectados por el VIH en zonas donde la malaria ha sido históricamente la causa más común de consulta de adultos por fiebre. En poblaciones con elevada prevalencia de malaria y de VIH, la cotidianeidad de buscar atención sanitaria por síntomas de malaria puede suponer una oportunidad para la identificación de personas con AHI. Lo que nos lleva a cuestionarnos qué pacientes serían los ideales para dirigir la búsqueda de AHI en áreas de elevada prevalencia del VIH, únicamente los que se presentan con alguna ETS o también aquellos con un síndrome febril. Varios estudios en África subsahariana se han centrado en la búsqueda de AHI en las clínicas de ETS, consultas donde la seroprevalencia del VIH superaba el 40%, encontrando elevadas prevalencias de AHI de 2.4% y de 4.5%, estas últimas en HSH^{95, 96}. Añadiendo pacientes que buscan atención sanitaria por síndromes febriles, se amplía la población diana para la identificación de casos de AHI. De todos modos, en aquellos pacientes con signos de ETS se recomienda la búsqueda de AHI por la fuerte asociación descrita entre ETS y la adquisición del VIH¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Los individuos AHI de nuestro estudio presentaron una carga viral inicial muy elevada, con una media de 6.21 log₁₀ copias/ml. Estos elevados niveles de ARN viral en plasma están en acuerdo con los previamente descritos durante la fase aguda^{30, 76} que se han correlacionado con elevados niveles de ARN en las secreciones genitales^{74, 76, 175}, y se han descrito más elevados para el subtipo C^{76, 84, 176}. La elevada carga viral descrita en los pacientes de nuestro estudio está en la línea de resultados previos que indican que los pacientes AHI son muy infecciosos^{79, 80, 87, 93, 177}. La transmisión durante los meses siguientes a la infección puede ser hasta 12 veces

más elevada comparada con la fase crónica ¹⁶⁹. Sin embargo, se ha descrito que el comportamiento sexual de riesgo se reduce sustancialmente en aquellas personas una vez conocen su infección por el VIH ^{98, 100}, y que el conocimiento de un diagnóstico AHI positivo puede reducir el riesgo de transmisión del VIH durante su fase más infecciosa ¹⁷⁸. Steward et al ⁹⁹ muestran en su estudio que hasta un 98% de los pacientes modifican su comportamiento de riesgo tras conocer su estado de infección aguda ⁹⁹. Sin embargo, se ha visto que los cambios conductuales son de corta duración y necesitan un cumplimiento constante para ser eficaces ⁹⁹. Dicho tipo de intervenciones orientadas hacia las fases iniciales de la infección, que implican cortos periodos de tiempo, tienen el potencial de inducir un efecto positivo en la reducción de la transmisión ^{144, 150}. Además subrayan la oportunidad que la identificación y el asesoramiento de los casos de AHI pueden tener en la prevención.

La identificación de infecciones agudas y recientes por el VIH es en general un reto ^{95, 116, 117}, y hoy en día resulta imposible implementar este tipo de identificaciones en la rutina asistencial de países con pocos recursos. Aunque pueda ser factible identificar a los pacientes con AHI, ya sea por síndrome febril o por ETS en la consulta, las pruebas diagnósticas de la AHI siguen siendo costosas y técnicamente complejas. El NAAT requiere la compleja determinación de la carga viral y los EIA de cuarta generación requieren tecnología específica y tiempo para dar el resultado. Por tanto, es imprescindible desarrollar técnicas rápidas de POC para la detección de AHI. El diseño de RDT baratos y sencillos dirigido a las etapas iniciales de la infección aumentaría la viabilidad de implementar la detección de la AHI en países de baja renta.

En el segundo artículo presentado en esta tesis se determinó una prevalencia de 11.58% de infecciones recientes, contraídas en los 6-8 meses previos al diagnóstico, en pacientes VIH seropositivos del centro de pruebas y asesoramiento voluntario para el VIH (VCT) de Manhiça. Esta baja prevalencia de infecciones recientes, observada también en otros países Africanos ¹⁵², evidencia que una elevada proporción de individuos se presentan al diagnóstico en fases tardías de la infección. Esto puede tener consecuencias en cuanto a la supervivencia de los pacientes, ya que el inicio de tratamiento en estadios más avanzados de la infección se ha asociado a una mayor mortalidad ¹⁵³. En Manhiça, la prevalencia de infecciones recientes fue todavía menor en

el caso de los hombres (6.62% vs. 13.78% en mujeres), que a su vez, eran significativamente mayores, más de 10 años, en comparación con las mujeres. Además de indicar que utilizan en menor medida este servicio, lo que implicaría un mayor desconocimiento de su serostatus, puede sugerir una menor representación de hombres jóvenes en la población recientemente infectada por motivos de migraciones laborales¹⁷, y una mayor representación de los hombres en fases más avanzadas cuando la enfermedad les impide migrar en busca de empleo. En consecuencia, la observada distribución de infecciones recientes sugiere la necesidad de ampliar el acceso al test del VIH, principalmente en los hombres, para favorecer la detección de infecciones por el VIH en fases tempranas. De modo que se hace necesario evaluar alternativas diferentes para testar a la población, como facilitar el test acercándolo a los lugares más alejados con unidades móviles o, llevándolo a las viviendas (*home-based testing*). Estrategias que tienen el potencial de aumentar la aceptación y utilización de la prueba y la detección de infecciones en fases más cercanas a la transmisión¹⁷⁹. En general, la baja prevalencia de infecciones recientes observada en el VCT sugiere que los casos no detectados, que se encuentran todavía en una fase muy infecciosa, podrían estar contribuyendo en gran medida a la transmisión del VIH y al mantenimiento de la epidemia en esta población.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la mitad de los pacientes infectados en los últimos 6-8 meses presentaban niveles elevados de ARN viral alrededor de 5 \log_{10} copias ARN-VIH/ml (4.98 \log_{10}) en el momento de su diagnóstico y los mantenían elevados durante el seguimiento, estimando el punto de equilibrio de la CV en 5.22 \log_{10} copias/ml. En comparación con otros estudios en África subsahariana donde se determinaron valores del punto de equilibrio de la CV con una mediana de ARN de 4.67 \log_{10} copias/ml en Kenya⁵³, 4.2 \log_{10} copias/ml en Uganda⁷⁴, y 4.1 \log_{10} copias/ml en Botswana¹⁷⁶, los pacientes de nuestro estudio presentaban niveles aparentemente más elevados. El hecho de que variaciones en la carga viral se correlacionen con la probabilidad de transmisión del VIH^{97, 177} y una progresión más rápida de la enfermedad¹⁷⁵, acentúa la importancia de los resultados de este artículo. La caracterización del punto de equilibrio de la carga viral en Manhiça aporta datos importantes estableciendo un valor de referencia para futuras intervenciones de prevención de la transmisión del virus, tal como potenciales ensayos de vacunas terapéuticas destinadas a

reducir el mismo. Recientemente se ha sugerido que datos sobre el punto de equilibrio de la carga viral a nivel de una población podrían ser utilizados como biomarcadores para evaluar la carga de enfermedad en dicha población¹⁴⁸. Además, un valor añadido a la determinación de infecciones recientes en una población es que se podría extrapolar a un cálculo de la incidencia sin tener que recurrir a estudios longitudinales^{124, 125, 180-182}; sin embargo, estas estimaciones no se realizaron en nuestro estudio.

En los pacientes con infección reciente por el VIH que fueron testados para malaria no se determinó relación alguna entre la presencia de infección por malaria y alta CV. Sin embargo, se ha descrito que co-infecciones con otros patógenos pueden reactivar el sistema inmunitario y como consecuencia aumentar los niveles de CV. Estos incrementos en la CV podrían influir en el punto de equilibrio de la CV e incrementar a su vez el riesgo de transmisión¹⁸³. Así, en una zona con malaria endémica, individuos expuestos a episodios repetidos de malaria podrían mantener elevados niveles transitorios de CV, más altos que individuos que viven en zonas de baja transmisión de malaria, lo que podría aumentar el riesgo de transmisión del VIH^{86, 184, 185}. En nuestro estudio no se evaluaron otras co-infecciones para poder valorar tales relaciones con el punto de equilibrio de la CV.

La tradicional medida de salud pública, búsqueda de casos y tratamiento, frente al control de una enfermedad infecciosa, está en creciente interés dentro de la comunidad científica con respecto a la prevención de la transmisión del VIH¹⁰⁸. Recientemente se ha mostrado gran interés en el uso de TARGA en personas infectadas con el objetivo de reducir la carga viral y en consecuencia la transmisión del VIH al nivel poblacional. Sin embargo, actualmente la administración de tratamiento antirretroviral se limita a aquellos pacientes con criterios para iniciarlo. Estrategias de tratamiento precoz así como el “test & treat” abogan por tratar a todos los pacientes VIH-positivos en poblaciones con alta prevalencia por el VIH, independientemente de su CV. Además, se ha sugerido que la tasa de transmisión de una persona en TARGA es aproximadamente de 0.5 por 100 personas-año, mientras que para una persona sin tratamiento sería de 5.6 por 100 personas-año⁹⁷. Por otro lado, se ha demostrado que el inicio inmediato de TARGA en pacientes infectados reduce la transmisión sexual del VIH

en parejas serodiscordantes ¹³⁶. Aunque los modelos “test & treat” en general sugieran una disminución de la incidencia del VIH ¹⁴⁴, conllevan el requerimiento de recursos que no existen en la mayoría de los países de baja renta. Hoy en día la mayoría de los países de África subsahariana no consiguen administrar TARGA a todas las personas con criterios para ser tratadas. El impacto y el coste beneficio de administrar TARGA a todas las personas infectadas por el VIH o tan solo a grupos con alta carga viral es el tema de estudios actuales. Por un lado, Novitsky et al. han sugerido el inicio de TARGA dirigido a pacientes con elevados niveles de ARN viral. Pacientes con una CV por encima de $4.7 \log_{10}$ copias/ml, e independientemente de su estado clínico, serían tratados como medida de reducción de la transmisión del VIH ^{149, 150}. Según este enfoque, más del 50% de nuestros pacientes recientemente infectados serían candidatos para empezar TARGA. Por otro lado, estudios recientes han tratado de evaluar los potenciales beneficios del inicio inmediato de TARGA en pacientes recientemente infectados. Tales estudios han mostrado una breve demora en el tiempo de progresión de la enfermedad en el grupo de pacientes que inician TARGA inmediato en comparación con el grupo no tratado ^{186, 187}. No obstante, los resultados no evidencian si hay un claro beneficio para el paciente; además son necesarios más datos sobre el impacto del tratamiento en el punto de equilibrio de la CV y el potencial desarrollo de resistencias en estos pacientes.

Desde otro enfoque, la identificación de pacientes AHI permitiría, idealmente, empezar TARGA en un momento de la infección en el que se están estableciendo los reservorios del virus, reduciendo este reservorio y preservando potencialmente la función inmunológica ^{58, 188}.

Los estudios incluidos en esta tesis presentan algunas limitaciones. En primer lugar, el reducido número de pacientes en seguimiento en ambos estudios dificulta la generalización de los resultados obtenidos. Igualmente, la disminución del número de pacientes durante los 10 meses de seguimiento en el segundo artículo deja reducido el tamaño de la muestra a los 10 meses. Sin embargo, la pérdida de pacientes en seguimiento fue similar tanto en el grupo con “elevada” carga viral como en el resto de pacientes, lo que permitió hacer las comparaciones entre ambos grupos. En segundo lugar, la identificación de individuos recientemente infectados

mediante BED-CEIA podría llevar a una sobreestimación de infecciones recientes por una mala clasificación de los casos de SIDA como falsos recientes, que ya ha sido descrita con anterioridad¹⁸⁹. Esto se puede corregir mediante una tasa de falsos positivos (FPR) que puede ser calculada de varias maneras: o con una comparación de los datos de BED-CEIA con los de un estudio longitudinal de incidencia para la misma población, o con la eliminación de falsos positivos utilizando criterios clínicos, recuentos de CD4 y niveles de ARN viral. En nuestro estudio, al no disponer de datos longitudinales, consideramos, al igual que en otras publicaciones^{126, 182, 190, 191}, a los individuos identificados como recientes por BED-CEIA, pero sin clínica definitoria de SIDA, con $CD4 < 200$ células/ μ l o $CV < 400$ copias/ml como falsos recientes. Aunque esta definición elimina la mayoría de casos de falsos recientes, una pequeña población de pacientes en fases avanzadas de la infección y con $CD4 > 200$ células/ μ l o $CV > 400$ copias/ml podrían quedar clasificados como recientes y sobreestimar su prevalencia. El uso de CD4 y de CV, herramientas de monitorización cada vez más disponibles en la mayoría de países en desarrollo¹⁹², como sustitutos de FPR, puede facilitar la identificación de infecciones recientes en el lugar de estudio.

Los resultados de esta tesis reúnen información sobre la epidemiología de las fases iniciales de la infección por el VIH en una zona de elevada prevalencia donde no había datos previos. Además de caracterizar las etapas iniciales de la infección y de demostrar la viabilidad de detectar nuevos casos no diagnosticados del VIH, los resultados obtenidos apoyan la necesidad de más desarrollo de test POC para la detección de las fases tempranas de la infección por el VIH. La mejora del conocimiento de las fases iniciales de la infección por el VIH en cada contexto es esencial para optimizar las estrategias de prevención desde un punto de vista local, que en este caso reflejan la importancia de dirigir una parte de los esfuerzos en detectar las infecciones agudas y recientes.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En un área endémica para malaria y de elevada prevalencia de VIH, es posible identificar pacientes con infección aguda al dirigir las pruebas diagnósticas hacia pacientes con síndrome febril que se presentan en el hospital. Síntomas consistentes con malaria clínica o síndrome mononucleósido, aunque inespecíficos, deberían tomarse en consideración para la identificación de infecciones agudas por el VIH en pacientes seronegativos procedentes de áreas con elevada prevalencia de VIH.
2. En adultos con síndrome febril que acuden a las consultas externas del HDM, la prevalencia de infecciones por el VIH en fase aguda es elevada alcanzando un 3.3% en pacientes VIH seronegativos. Los pacientes identificados con una infección aguda presentan, a su vez, una elevada carga viral por encima de $5 \log_{10}$ copias/ml en el momento de su diagnóstico, lo que puede suponer un elevado riesgo de transmisión del VIH.
3. La baja prevalencia de infecciones recientes, 11.58%, observada en personas VIH seropositivas diagnosticadas en el VCT sugiere que una gran proporción de la población busca el diagnóstico de VIH en fases más avanzadas de la infección. Es necesario un cambio en el enfoque de las estrategias para la realización del test voluntario, que logre incrementar su utilización y el número de diagnósticos precoces de VIH.
4. La caracterización del punto de equilibrio de la carga viral permitió identificar un grupo de pacientes recientemente infectados que mantenían niveles de carga viral muy elevados durante el primer año de infección por el VIH con valores de más de $5 \log_{10}$ copias/ml. Este grupo podría presentar un elevado riesgo para la transmisión del VIH.

Conclusiones

5. La identificación de infecciones agudas y de infecciones recientes en zonas de elevada prevalencia del VIH permitiría determinar potenciales candidatos para el inicio de un tratamiento temprano; ya sea como medida terapéutica para los pacientes infectados, así como medida preventiva enfocada a reducir la transmisión. Es necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico rápido que detecten los casos de infecciones por el VIH durante las fases iniciales de la infección para facilitar su identificación en los países de baja renta.

6. El valor del punto de equilibrio de la carga viral descrito en nuestro estudio podría ser utilizado como punto de partida para estudios de intervenciones dirigidos a reducir el nivel del punto de equilibrio de la CV.

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. Dec 10 1981;305(24):1425-1431.
2. Brennan RO, Durack DT. Gay compromise syndrome. *Lancet*. Dec 12 1981;2(8259):1338-1339.
3. Friedman-Kien AE. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol*. Oct 1981;5(4):468-471.
4. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. May 20 1983;220(4599):868-871.
5. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. May 4 1984;224(4648):500-503.
6. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. May 4 1984;224(4648):497-500.
7. McDougal JS, Kennedy MS, Slish JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JKA. Binding of HTLV-III to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*. 1986;231:382-385.
8. McDougal JS, Nicholson JK, Cross GD, Cort SP, Kennedy MS, Mawle AC. Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry. *J Immunol*. Nov 1 1986;137(9):2937-2944.
9. Haase AT. The slow infection caused by visna virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1975;72:101-156.
10. Pandrea I, Sodora DL, Silvestri G, Apetrei C. Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol*. Sep 2008;29(9):419-428.
11. UNAIDS/WHO. Report on the global AIDS Epidemic 2010. In Geneva: World Health Organization.
12. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol*. Oct 2007;81(19):10209-10219.
13. MOÇAMBIQUE IMDS. Inquérito Nacional de Prevalência, Riscos Comportamentais e Informação sobre o HIV e SIDA em Moçambique (INSIDA). 2009.
14. Gonzalez R MK, Aponte J.J, Bavo C, Nhalungo D, Macete E, Alonso P. L, Menéndez C, Nanche D. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a communitybased survey. *HIV Med, in press*. 2012.
15. Perez-Hoyos S, Nanche D, Macete E, et al. Stabilization of HIV incidence in women of reproductive age in southern Mozambique. *HIV Med*. Feb 23 2011.
16. Moçambique MdSd. Boletim de HIV/SIDA. Direção Nacional de asistencia Médica. *Maputo*. 2010.
17. Nhalungo DA, Saco CN, Aponte JJ, Thompson R, Alonso P. Levels and trends of demographic indices in southern rural Mozambique: evidence from demographic surveillance in Manhica district. *BMC Public Health*. 2006;6:291.

18. Boerma JT, Ghys PD, Walker N. Estimates of HIV-1 prevalence from national population-based surveys as a new gold standard. *Lancet*. Dec 6 2003;362(9399):1929-1931.
19. Parreira R, Piedade J, Domingues A, et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 from Beira, Mozambique. *Microbes Infect*. 2006;8(9-10):2442-2451. Epub 2006 Jun 2430.
20. Bellocchi MC, Forbici F, Palombi L, et al. Subtype analysis and mutations to antiviral drugs in HIV-1-infected patients from Mozambique before initiation of antiretroviral therapy: results from the DREAM programme. *J Med Virol*. 2005;76(4):452-458.
21. Travers SA, Clewley JP, Glynn JR, et al. Timing and reconstruction of the most recent common ancestor of the subtype C clade of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. Oct 2004;78(19):10501-10506.
22. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Feb 1 2002;29(2):184-190.
23. Van Harmelen JH, Van der Ryst E, Loubser AS, et al. A predominantly HIV type 1 subtype C-restricted epidemic in South African urban populations. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Mar 1 1999;15(4):395-398.
24. Lahuerta M, Aparicio E, Bardaji A, et al. Rapid Spread and Genetic Diversification of HIV Type 1 Subtype C in a Rural Area of Southern Mozambique. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24(2):327-335.
25. Wand H, Ramjee G. Targeting the hotspots: investigating spatial and demographic variations in HIV infection in small communities in South Africa. *J Int AIDS Soc*. 2010;13:41.
26. Tanser F, Barnighausen T, Cooke GS, Newell ML. Localized spatial clustering of HIV infections in a widely disseminated rural South African epidemic. *Int J Epidemiol*. Aug 2009;38(4):1008-1016.
27. Arroyo MA, Sateren WB, Serwadda D, et al. Higher HIV-1 incidence and genetic complexity along main roads in Rakai District, Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Dec 1 2006;43(4):440-445.
28. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. Jul 2 1998;339(1):33-39.
29. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids*. 2003;17(13):1871-1879.
30. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. Apr 4 1991;324(14):961-964.
31. Bollinger RC, Brookmeyer RS, Mehendale SM, et al. Risk factors and clinical presentation of acute primary HIV infection in India. *Jama*. 1997;278(23):2085-2089.
32. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, et al. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *Jama*. 1995;274(7):554-558.
33. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. Sep 1994;68(9):6103-6110.
34. Borrow P, Lewicki H, Wei X, et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med*. Feb 1997;3(2):205-211.

35. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*. Feb 5 1988;239(4840):617-622.
36. Munoz A, Wang MC, Bass S, et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol*. Sep 1989;130(3):530-539.
37. Lifson AR, Rutherford GW, Jaffe HW. The natural history of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. Dec 1988;158(6):1360-1367.
38. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. Jan 26 1995;332(4):201-208.
39. Munoz A, Kirby AJ, He YD, et al. Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. Apr 15 1995;8(5):496-505.
40. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. Jan 26 1995;332(4):209-216.
41. Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med*. Aug-Sep 2007;15(4):134-136.
42. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:657-700.
43. Tindall B, Barker S, Donovan B, et al. Characterization of the acute clinical illness associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med*. Apr 1988;148(4):945-949.
44. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med*. 1996;125(4):257-264.
45. Vanhems P, Allard R, Cooper DA, et al. Acute human immunodeficiency virus type 1 disease as a mononucleosis-like illness: is the diagnosis too restrictive? *Clin Infect Dis*. May 1997;24(5):965-970.
46. Sued O, Miro JM, Alquezar A, et al. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: clinical, virological and immunological characteristics of 75 patients (1997-2003). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(4):238-244.
47. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*. Apr 1 1996;124(7):654-663.
48. Fox R, Eldred LJ, Fuchs EJ, et al. Clinical manifestations of acute infection with human immunodeficiency virus in a cohort of gay men. *Aids*. 1987;1(1):35-38.
49. WHO. World Malaria Report. *In Switzerland*. 2010.
50. Font F, Alonso Gonzalez M, Nathan R, et al. Diagnostic accuracy and case management of clinical malaria in the primary health services of a rural area in south-eastern Tanzania. *Trop Med Int Health*. Jun 2001;6(6):423-428.
51. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med*. 1998;128(8):613-620.
52. Henrard DR, Daar E, Farzadegan H, et al. Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995;9(3):305-310.
53. Lavreys L, Baeten JM, Chohan V, et al. Higher set point plasma viral load and more-severe acute HIV type 1 (HIV-1) illness predict mortality among high-risk HIV-1-infected African women. *Clin Infect Dis*. 2006;42(9):1333-1339.

54. Kelley CF, Barbour JD, Hecht FM. The Relation Between Symptoms, Viral Load, and Viral Load Set Point in Primary HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;17:17.
55. Daar ES, Pilcher CD, Hecht FM. Clinical presentation and diagnosis of primary HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS.* Jan 2008;3(1):10-15.
56. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature.* Mar 11 2010;464(7286):217-223.
57. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol.* Jul 2000;74(13):6087-6095.
58. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* May 19 2011;364(20):1943-1954.
59. Kotler DP, Reka S, Borcich A, Cronin WJ. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *Am J Pathol.* 1991;139(4):823-830.
60. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;77(21):11708-11717.
61. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749-759.
62. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science.* Nov 12 1999;286(5443):1353-1357.
63. Schacker T, Little S, Connick E, et al. Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* Feb 15 2001;183(4):555-562.
64. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 21 1998;95(15):8869-8873.
65. Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS.* 2008;3(3):356-361.
66. Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev.* Oct 2001;14(4):753-777.
67. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature.* Apr 19 2001;410(6831):980-987.
68. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* Mar 27 1998;279(5359):2103-2106.
69. Streeck H, Jolin JS, Qi Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. *J Virol.* Aug 2009;83(15):7641-7648.
70. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999;283(5403):857-860.
71. Guy R, Gold J, Calleja JM, et al. Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* Dec 2009;9(12):747-759.

72. Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Mar 1 2002;18(4):295-307.
73. Burgers WA, Riou C, Mlotshwa M, et al. Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point. *J Immunol*. 2009;182(8):4751-4761.
74. Morrison CS, Demers K, Kwok C, et al. Plasma and cervical viral loads among Ugandan and Zimbabwean women during acute and early HIV-1 infection. *AIDS*. Feb 20 2010;24(4):573-582.
75. Saathoff E, Pritsch M, Geldmacher C, et al. Viral and host factors associated with the HIV-1 viral load setpoint in adults from Mbeya Region, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Jul 1 2010;54(3):324-330.
76. Pilcher CD, Joaki G, Hoffman IF, et al. Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. *Aids*. 2007;21(13):1723-1730.
77. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272(5265):1167-1170.
78. Vanhems P, Lambert J, Cooper DA, et al. Severity and prognosis of acute human immunodeficiency virus type 1 illness: a dose-response relationship. *Clin Infect Dis*. Feb 1998;26(2):323-329.
79. Pilcher CD, Tien HC, Eron JJ, Jr., et al. Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV. *J Infect Dis*. 2004;189(10):1785-1792.
80. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(13):921-929.
81. Royce RA, Sena A, Cates W, Jr., Cohen MS. Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med*. Apr 10 1997;336(15):1072-1078.
82. Mastro TD, Satten GA, Nopkesorn T, Sangkharomya S, Longini IM, Jr. Probability of female-to-male transmission of HIV-1 in Thailand. *Lancet*. Jan 22 1994;343(8891):204-207.
83. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. Apr 14 2001;357(9263):1149-1153.
84. Dyer JR, Kazembe P, Vernazza PL, et al. High levels of human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen of seropositive men in sub-Saharan Africa. *J Infect Dis*. 1998;177(6):1742-1746.
85. Barnabas RV, Webb EL, Weiss HA, Wasserheit JN. The role of coinfections in HIV epidemic trajectory and positive prevention: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*. Aug 24 2011;25(13):1559-1573.
86. Cuadros DF, Branscum AJ, Crowley PH. HIV-malaria co-infection: effects of malaria on the prevalence of HIV in East sub-Saharan Africa. *Int J Epidemiol*. Aug 2011;40(4):931-939.
87. Powers KA, Ghani AC, Miller WC, et al. The role of acute and early HIV infection in the spread of HIV and implications for transmission prevention strategies in Lilongwe, Malawi: a modelling study. *Lancet*. Jul 16 2011;378(9787):256-268.
88. Miller WC, Rosenberg NE, Rutstein SE, Powers KA. Role of acute and early HIV infection in the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. Jul 2010;5(4):277-282.
89. Brenner BG, Roger M, Routy JP, et al. High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2007;195(7):951-959.

90. Yerly S, Vora S, Rizzardì P, et al. Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. *AIDS*. Nov 23 2001;15(17):2287-2292.
91. Pao D, Fisher M, Hue S, et al. Transmission of HIV-1 during primary infection: relationship to sexual risk and sexually transmitted infections. *AIDS*. Jan 3 2005;19(1):85-90.
92. Pinkerton SD. How many sexually-acquired HIV infections in the USA are due to acute-phase HIV transmission? *AIDS*. Jul 31 2007;21(12):1625-1629.
93. Hollingsworth TD, Anderson RM, Fraser C. HIV-1 transmission, by stage of infection. *J Infect Dis*. Sep 1 2008;198(5):687-693.
94. Daar ES, Little S, Pitt J, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. *Ann Intern Med*. 2001;134(1):25-29.
95. Pilcher CD, Price MA, Hoffman IF, et al. Frequent detection of acute primary HIV infection in men in Malawi. *Aids*. 2004;18(3):517-524.
96. Fiscus SA, Pilcher CD, Miller WC, et al. Rapid, real-time detection of acute HIV infection in patients in Africa. *J Infect Dis*. 2007;195(3):416-424.
97. Attia S, Egger M, Muller M, Zwahlen M, Low N. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *AIDS*. Jul 17 2009;23(11):1397-1404.
98. Marks G, Crepaz N, Janssen RS. Estimating sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA. *AIDS*. Jun 26 2006;20(10):1447-1450.
99. Steward WT, Remien RH, Higgins JA, et al. Behavior change following diagnosis with acute/early HIV infection—a move to serosorting with other HIV-infected individuals. The NIMH Multisite Acute HIV Infection Study: III. *AIDS Behav*. Dec 2009;13(6):1054-1060.
100. Marks G, Crepaz N, Senterfitt JW, Janssen RS. Meta-analysis of high-risk sexual behavior in persons aware and unaware they are infected with HIV in the United States: implications for HIV prevention programs. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Aug 1 2005;39(4):446-453.
101. Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM. The detection of acute HIV infection. *J Infect Dis*. Oct 15 2010;202 Suppl 2:S270-277.
102. Salgado Bernal MR. Tesis Doctoral. Análisis de la progresión de SIDA en la infección por VIH-1: factores virales y del huésped. *Universidad Complutense de Madrid*. 2010.
103. Branson BM. The future of HIV testing. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Dec 2010;55 Suppl 2:S102-105.
104. Pandori MW, Hackett J, Jr., Louie B, et al. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. *J Clin Microbiol*. Aug 2009;47(8):2639-2642.
105. White DA, Scribner AN, Schulden JD, Branson BM, Heffelfinger JD. Results of a rapid HIV screening and diagnostic testing program in an urban emergency department. *Ann Emerg Med*. Jul 2009;54(1):56-64.
106. Stekler J, Maenza J, Stevens CE, et al. Screening for acute HIV infection: lessons learned. *Clin Infect Dis*. Feb 1 2007;44(3):459-461.
107. Stevens WS, Marshall TM. Challenges in implementing HIV load testing in South Africa. *J Infect Dis*. Apr 15 2010;201 Suppl 1:S78-84.
108. Pilcher CD, Christopoulos KA, Golden M. Public health rationale for rapid nucleic acid or p24 antigen tests for HIV. *J Infect Dis*. Apr 15 2010;201 Suppl 1:S7-15.
109. Brown P, Merline JR, Levine D, Minces LR. Repeatedly false-negative rapid HIV test results in a patient with undiagnosed advanced AIDS. *Ann Intern Med*. Jul 1 2008;149(1):71-72.

110. Schito ML, D'Souza MP, Owen SM, Busch MP. Challenges for rapid molecular HIV diagnostics. *J Infect Dis*. Apr 15 2010;201 Suppl 1:S1-6.
111. Usdin M, Guillermin M, Calmy A. Patient needs and point-of-care requirements for HIV load testing in resource-limited settings. *J Infect Dis*. Apr 15 2010;201 Suppl 1:S73-77.
112. Appiah LT, Havers F, Gibson J, Kay M, Sarfo F, Chadwick D. Efficacy and acceptability of rapid, point-of-care HIV testing in two clinical settings in Ghana. *AIDS Patient Care STDS*. May 2009;23(5):365-369.
113. Obare F, Fleming P, Anglewicz P, et al. Acceptance of repeat population-based voluntary counselling and testing for HIV in rural Malawi. *Sex Transm Infect*. Apr 2009;85(2):139-144.
114. Powers KA, Miller WC, Pilcher CD, et al. Improved detection of acute HIV-1 infection in sub-Saharan Africa: development of a risk score algorithm. *Aids*. 2007;21(16):2237-2242.
115. Quinn TC, Brookmeyer R, Kline R, et al. Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA to diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence. *Aids*. 2000;14(17):2751-2757.
116. Pilcher CD, McPherson JT, Leone PA, et al. Real-time, universal screening for acute HIV infection in a routine HIV counseling and testing population. *Jama*. 2002;288(2):216-221.
117. Pilcher CD, Fiscus SA, Nguyen TQ, et al. Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. *N Engl J Med*. 2005;352(18):1873-1883.
118. Patel P, Mackellar D, Simmons P, et al. Detecting acute human immunodeficiency virus infection using 3 different screening immunoassays and nucleic acid amplification testing for human immunodeficiency virus RNA, 2006-2008. *Arch Intern Med*. Jan 11 2010;170(1):66-74.
119. Hightow-Weidman LB, Golin CE, Green K, Shaw EN, MacDonald PD, Leone PA. Identifying people with acute HIV infection: demographic features, risk factors, and use of health care among individuals with AHI in North Carolina. *AIDS Behav*. Dec 2009;13(6):1075-1083.
120. Chavez P, Wesolowski L, Patel P, Delaney K, Owen SM. Evaluation of the performance of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo Assay. *J Clin Virol*. Oct 7 2011.
121. Beelaert G, Franssen K. Evaluation of a rapid and simple fourth-generation HIV screening assay for qualitative detection of HIV p24 antigen and/or antibodies to HIV-1 and HIV-2. *J Virol Methods*. Sep 2010;168(1-2):218-222.
122. Rosenberg NE, Kamanga G, Phiri S, et al. Detection of Acute HIV Infection: A Field Evaluation of the Determine(R) HIV-1/2 Ag/Ab Combo Test. *J Infect Dis*. Feb 2011;205(4):528-534.
123. Busch MP, Pilcher CD, Mastro TD, et al. Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. *AIDS*. Nov 27 2010;24(18):2763-2771.
124. Barnighausen T, McWalter TA, Rosner Z, Newell ML, Welte A. HIV incidence estimation using the BED capture enzyme immunoassay: systematic review and sensitivity analysis. *Epidemiology*. Sep 2010;21(5):685-697.
125. Barnighausen T, Wallrauch C, Welte A, et al. HIV incidence in rural South Africa: comparison of estimates from longitudinal surveillance and cross-sectional cBED assay testing. *PLoS One*. 2008;3(11):e3640.
126. Marinda ET, Hargrove J, Preiser W, et al. Significantly diminished long-term specificity of the BED capture enzyme immunoassay among patients with HIV-1 with very low CD4 counts and those on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Apr 1 2010;53(4):496-499.
127. Siegfried N, Muller M, Deeks JJ, Volmink J. Male circumcision for prevention of heterosexual acquisition of HIV in men. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(2):CD003362.

128. Hanenberg RS, Rojanapithayakorn W, Kunasol P, Sokal DC. Impact of Thailand's HIV-control programme as indicated by the decline of sexually transmitted diseases. *Lancet*. Jul 23 1994;344(8917):243-245.
129. Sabido M, Giardina F, Hernandez G, et al. The UALE Project: decline in the incidence of HIV and sexually transmitted infections and increase in the use of condoms among sex workers in Guatemala. *J Acquir Immune Defic Syndr*. May 1 2009;51 Suppl 1:S35-41.
130. Pronyk PM, Hargreaves JR, Kim JC, et al. Effect of a structural intervention for the prevention of intimate-partner violence and HIV in rural South Africa: a cluster randomised trial. *Lancet*. Dec 2 2006;368(9551):1973-1983.
131. Kim JC, Watts CH, Hargreaves JR, et al. Understanding the impact of a microfinance-based intervention on women's empowerment and the reduction of intimate partner violence in South Africa. *Am J Public Health*. Oct 2007;97(10):1794-1802.
132. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, et al. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Apr 15 2002;29(5):484-494.
133. Nanche D, Lahuerta M, Bardaji A, et al. Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria. *HIV Med*. 2008;19:19.
134. De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, et al. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *Jama*. 2000;283(9):1175-1182.
135. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis*. Nov 2006;6(11):726-732.
136. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med*. Jul 18 2011.
137. Karim QA, Kharsany AB, Frohlich JA, et al. Stabilizing HIV prevalence masks high HIV incidence rates amongst rural and urban women in KwaZulu-Natal, South Africa. *Int J Epidemiol*. Aug 2010;40(4):922-930.
138. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med*. Dec 30 2010;363(27):2587-2599.
139. Thigpen M.C. KPM, Smith D.K., Segolodi T.M., Soud F.A., Chillag K., Chirwa L.I., Kasonde M., Mutanhaurwa R., Henderson F.L., Pathak S., Gvetadze R. , Rose C.E. , Paxton L.A. . Daily oral antiretroviral use for the prevention of HIV infection in heterosexually active young adults in Botswana: results from the TDF2 study [abstract WELBC01]. In: *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment, and Prevention*. Rome, Italy: International AIDS Society. 2011.
140. Baeten JM. Antiretroviral pre-exposure prophylaxis for HIV-1 prevention among heterosexual African men and women: the Partners PrEP study [abstract MOAX0106]. In: *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment, and Prevention*. Rome, Italy: International AIDS Society. 2011.
141. Hurt CB, Eron JJ, Jr., Cohen MS. Pre-exposure prophylaxis and antiretroviral resistance: HIV prevention at a cost? *Clin Infect Dis*. Dec 2011;53(12):1265-1270.
142. Fernandez-Montero JV, Barreiro P, Del Romero J, Soriano V. Antiretroviral Drugs for Pre-Exposure Prophylaxis of HIV Infection. *AIDS Rev*. Jan 2012;14(1):54-61.
143. Powers KA, Hoffman IF, Ghani AC, et al. Sexual partnership patterns in malawi: implications for HIV/STI transmission. *Sex Transm Dis*. Jul 2011;38(7):657-666.
144. Granich RM, Gilks CF, Dye C, De Cock KM, Williams BG. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model. *Lancet*. Jan 3 2009;373(9657):48-57.

145. Cohen MS, Mastro TD, Cates W, Jr. Universal voluntary HIV testing and immediate antiretroviral therapy. *Lancet*. Mar 28 2009;373(9669):1077; author reply 1080-1071.
146. Dodd PJ, Garnett GP, Hallett TB. Examining the promise of HIV elimination by 'test and treat' in hyperendemic settings. *AIDS*. Mar 13 2010;24(5):729-735.
147. Montaner JS, Lima VD, Barrios R, et al. Association of highly active antiretroviral therapy coverage, population viral load, and yearly new HIV diagnoses in British Columbia, Canada: a population-based study. *Lancet*. Aug 14 2010;376(9740):532-539.
148. Castel AD, Befus M, Willis S, et al. Use of the Community Viral Load as a Population-Based Biomarker of HIV Burden, Washington, DC. *AIDS*. Oct 15 2011.
149. Novitsky V, Ndung'u T, Wang R, et al. Extended high viremics: a substantial fraction of individuals maintain high plasma viral RNA levels after acute HIV-1 subtype C infection. *AIDS*. Apr 18 2011.
150. Novitsky V, Wang R, Bussmann H, et al. HIV-1 subtype C-infected individuals maintaining high viral load as potential targets for the "test-and-treat" approach to reduce HIV transmission. *PLoS One*. 2010;5(4):e10148.
151. de Olalla PG, Mazardo C, Sambeat MA, et al. Epidemiological characteristics and predictors of late presentation of HIV infection in Barcelona (Spain) during the period 2001-2009. *AIDS Res Ther*. 2011;8(1):22.
152. Wanyenze RK, Kanya MR, Fatch R, et al. Missed Opportunities for HIV Testing and Late-Stage Diagnosis among HIV-Infected Patients in Uganda. *PLoS One*. 2011;6(7):e21794.
153. Kigozi IM, Dobkin LM, Martin JN, et al. Late-disease stage at presentation to an HIV clinic in the era of free antiretroviral therapy in Sub-Saharan Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. Oct 1 2009;52(2):280-289.
154. Krentz HB, Auld MC, Gill MJ. The high cost of medical care for patients who present late (CD4 <200 cells/microL) with HIV infection. *HIV Med*. Mar 2004;5(2):93-98.
155. Davenport MP, Ribeiro RM, Chao DL, Perelson AS. Predicting the impact of a nonsterilizing vaccine against human immunodeficiency virus. *J Virol*. 2004;78(20):11340-11351.
156. Gupta SB, Jacobson LP, Margolick JB, et al. Estimating the benefit of an HIV-1 vaccine that reduces viral load set point. *J Infect Dis*. 2007;195(4):546-550.
157. Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science*. Jun 9 2006;312(5779):1530-1533.
158. Demberg T, Ettinger AC, Aladi S, et al. Strong viremia control in vaccinated macaques does not prevent gradual Th17 cell loss from central memory. *Vaccine*. Aug 11 2011;29(35):6017-6028.
159. Garcia F, Climent N, Assoumou L, et al. A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J Infect Dis*. Feb 15 2010;203(4):473-478.
160. Kundu SK, Engleman E, Benike C, et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. May 1 1998;14(7):551-560.
161. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med*. Dec 2004;10(12):1359-1365.
162. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol*. Feb 2008;15(2):284-292.

163. Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, et al. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial. *J Med Virol.* Jun 2006;78(6):711-718.
164. Klooverpris H, Karlsson I, Bonde J, et al. Induction of novel CD8+ T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *AIDS.* Jul 17 2009;23(11):1329-1340.
165. Loscertales MP, Roca A, Ventura PJ, et al. Epidemiology and clinical presentation of respiratory syncytial virus infection in a rural area of southern Mozambique. *Pediatr Infect Dis J.* Feb 2002;21(2):148-155.
166. Guinovart C, Bassat Q, Sigauque B, et al. Malaria in rural Mozambique. Part I: children attending the outpatient clinic. *Malar J.* 2008;7:36.
167. Bassat Q, Guinovart C, Sigauque B, et al. Malaria in rural Mozambique. Part II: children admitted to hospital. *Malar J.* 2008;7:37.
168. Nanche D, Bardaji A, Lahuerta M, et al. Impact of maternal human immunodeficiency virus infection on birth outcomes and infant survival in rural Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(5):870-876.
169. Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, et al. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis.* 2005;191(9):1403-1409.
170. Bebell LM, Pilcher CD, Dorsey G, et al. Acute HIV-1 infection is highly prevalent in Ugandan adults with suspected malaria. *AIDS.* Jul 31 2010;24(12):1945-1952.
171. Sanders EJ, Wahome E, Mwangome M, et al. Most adults seek urgent healthcare when acquiring HIV-1 and are frequently treated for malaria in coastal Kenya. *AIDS.* Jun 1 2011;25(9):1219-1224.
172. Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect.* Feb 1999;75(1):3-17.
173. Zetola A, Ferreira FM, Larson R, Shibli JA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in the treatment of mandibular sequelae after tumor resection. *Oral Maxillofac Surg.* Sep 2011;15(3):169-174.
174. Mayer KH, Venkatesh KK. Interactions of HIV, other sexually transmitted diseases, and genital tract inflammation facilitating local pathogen transmission and acquisition. *Am J Reprod Immunol.* Mar 2011;65(3):308-316.
175. Stekler J, Sycks BJ, Holte S, et al. HIV dynamics in seminal plasma during primary HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Oct 2008;24(10):1269-1274.
176. Novitsky V, Woldegabriel E, Kebaabetswe L, et al. Viral load and CD4+ T-cell dynamics in primary HIV-1 subtype C infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;50(1):65-76.
177. Cohen MS, Pilcher CD. Amplified HIV transmission and new approaches to HIV prevention. *J Infect Dis.* 2005;191(9):1391-1393.
178. Remien RH, Higgins JA, Correale J, et al. Lack of understanding of acute HIV infection among newly-infected persons-implications for prevention and public health: The NIMH Multisite Acute HIV Infection Study: II. *AIDS Behav.* Dec 2009;13(6):1046-1053.
179. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization. AIDS epidemic update December 2009.
180. Hargrove JW, Humphrey JH, Mutasa K, et al. Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay. *AIDS.* Feb 19 2008;22(4):511-518.

181. Karita E, Price M, Hunter E, et al. Investigating the utility of the HIV-1 BED capture enzyme immunoassay using cross-sectional and longitudinal seroconverter specimens from Africa. *AIDS*. Feb 19 2007;21(4):403-408.
182. Laeyendecker O, Brookmeyer R, Oliver AE, et al. Factors associated with incorrect identification of recent HIV infection using the BED capture immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Oct 20 2011.
183. Bentwich Z, Kalinkovich A, Weisman Z. Immune activation is a dominant factor in the pathogenesis of African AIDS. *Immunol Today*. Apr 1995;16(4):187-191.
184. Abu-Raddad LJ, Patnaik P, Kublin JG. Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Science*. Dec 8 2006;314(5805):1603-1606.
185. Gonzalez R, Ataide R, Nanche D, Menendez C, Mayor A. HIV and malaria interactions: where do we stand? *Expert Rev Anti Infect Ther*. Feb 2012;10(2):153-165.
186. Hogan CM, Degruittola V, Sun X, et al. The setpoint study (ACTG A5217): effect of immediate versus deferred antiretroviral therapy on virologic set point in recently HIV-1-infected individuals. *J Infect Dis*. Jan 2012;205(1):87-96.
187. Fidler S Sti. The effect of short-course antiretroviral therapy in primary HIV infection: final results from an international randomized controlled trial; SPARTAC [abstract WELBX06]. In: *Program and abstract of the Sixth International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment & Prevention (Rome)*. Geneva: IAS. 2011.
188. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. Jan 2010;10(1):11-23.
189. CDC. Interim recommendations for the use of the BED capture enzyme immunoassay for incidence estimation and surveillance. 2006.
190. Marinda ET, Moulton LH, Humphrey JH, et al. In utero and intra-partum HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection during pregnancy: using the BED capture enzyme-immunoassay as a surrogate marker for acute infection. *Int J Epidemiol*. Apr 5 2011.
191. Braunstein SL, Ingabire CM, Geubbels E, et al. High Burden of Prevalent and Recently Acquired HIV among Female Sex Workers and Female HIV Voluntary Testing Center Clients in Kigali, Rwanda. *PLoS One*. 2011;6(9):e24321.
192. Stevens WS, Scott LE, Crowe SM. Quantifying HIV for monitoring antiretroviral therapy in resource-poor settings. *J Infect Dis*. Apr 15 2010;201 Suppl 1:S16-26.

8. ANEXO



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE

IRB 00002657

**Exma Senhora
Denise Naniche
Centro de Investigação em Saúde da Manhiça**

Ref: 232/CNBS/07

Data 30 de Novembro 2007

Assunto: Aprovação sobre estudo caracterização da infecção aguda pelo HIV.

Reunido no dia 29 de Novembro de 2007, o Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as respostas relativas ao protocolo com seguinte título: **"Caracterização da infecção aguda pelo HIV e o equilíbrio viral em adultos em Manhiça, Moçambique."**, sobre o mesmo a seguinte conclusão:

O CNBS não vê nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo pelo que, dá a sua devida aprovação.

Contudo, recomenda-se aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.

Faz notar que a aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Sem mais assunto, as nossas cordiais saudações.

O Vice-Presidente

Dr. João S. Welbach


D. Ramon Gomis de Barbarà, Director de Investigación del
Hospital Clínic de Barcelona, y Presidente del CEIC

CERTIFICA:

Que el Comité de Investigación del Hospital Clínic, en la sesión
celebrada en el día de hoy, ha analizado el proyecto de investigación
titulado:

*Characterization of acute HIV infection and viral load setpoint in adults in
Manhiça Mozambique*

cuyo investigador principal es la Dra. **Naniche, Denise**
del Servicio de **Salud Internacional**
entendiendo que dicho estudio se incluye en una de las líneas de
investigación biomédica acreditadas en este centro, cumpliendo
los requisitos metodológicos necesarios, y que es viable en todos
sus términos, por lo que lo ha considerado adecuado y ha decidido
su aprobación.

Lo que firmo en Barcelona, a 20/12/2007

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari
**DIRECCIÓ DE
RECERCA**



Registro: 2007 / 3943

9. AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

I ara que ja he arribat fins aquí, em queda el més important, agrair a tothom qui d'una manera o una altre ha fet possible tota aquesta feina i m'ha acompanyat durant tot aquest temps.

Voldria començar donant les gràcies a totes les persones de Manhiça que voluntàriament participen en els estudis, per confiar en nosaltres i donar sentit a la feina de cada dia.

A Denise, por confiar en mí y darme la oportunidad de participar en este proyecto. Por todo lo que me has enseñado profesional y personalmente, por guiarme en todo este aprendizaje y sobretodo por tu optimismo, que ha hecho posible que llegue hasta aquí. Gracias.

A tots els meus companys del laboratori, per cada dia, per tenir sempre temps d'escoltar qualsevol dubte, crec que ningú s'ha estalviat una de les meves preguntes...però sobretot per les ganes de riure! En especial al racó del 311, Mari, Laura, Cris, Alfons, on em vaig sentir tan acollida després de voltar per totes les plantes del CRESIB. Aquell racó que semblava tenir un magnetisme especial per atraure a tothom! Al Pau, per la seva insuperable ajuda amb les tecnologies, a la Diana, l'Edu, la Gemma, la Pili, la Núria, la Ruth, i a les "noves" incorporacions, l'Ariel, la Clàudia, la Laura, i l'Alejandro...a tots, per ajudar-me en tantes coses, però sobretot per les aventures compartides, per ser els millors companys que es poden tenir, i per fer que m'ho hagi passat tan bé durant aquests anys amb vosaltres!

A l'Alba, per ajudar-me amb els experiments d'ENIC que aviat veuran la llum!
Gràcies, perquè sense tú, no hagués pogut fer-ho.

A la meva família de Manhiça. A la Mariajo i el Rober, que em van obrir la porta de casa seva des del primer moment en que vaig posar els peus a l'hemisferi sud. Per ensenyar-me a gaudir de les petites coses en qualsevol moment i per la seva amistat

incondicional, 83 milions de gràcies. Al Jose, per encomanar-me el seu optimisme i estar sempre disposat a escoltar i a riure, gràcies brother. A tots els que veu fer que el meu pas per Manhiça fos inoblidable, Cinta, Charly, Xènia, Isma. A la Nayra, per la seva amistat i per tenir la sort d'haver-te conegut. Mauricio, por los interminables mails filosóficos. Gràcies per totes les aventures i anècdotes viscudes, per tot el compartit, perquè forma part de tot aquest treball però sobretot forma part de mi.

A Eva, porque la felicidad requiere de un futuro incierto...y esto no hubiera pasado si no hubiese aterrizado un día en tu casa de Amsterdam. I a la Diana E., per ensenyar-me amb tota la paciència del món i confiar en mi.

To Hanneke Schuitemaker, thank you for your trust. You gave me the first opportunity to work in science and it was the first step for being here today.

A Mattin por el diseño de la portada. I a la Monika i al Kristian per la seva ajuda gráfika.

A la Mariel, la Marta L., el David, la Rut, la Cris, l'Eva, la Iria , la Marta C. i la Pato per acompanyar-me des de fa tan temps i animar-me sempre, tot i que moltes vegades suposés perdre'm tantes coses al vostre costat.

A tota la meva família, a les meves germanes Berta i Carla per trobar sempre temps de fer-me una visita allà on estigués; però especialment als meus pares, per donar-me suport en tot allò que he volgut fer i per animar-me sempre a tirar endavant les meves il·lusions. I a la meva àvia, a qui hagués agradat veure'm defensar la tesi.

A Iban, por estar a mi lado; y a esta tesis por haber hecho que nuestros caminos se encontraran.

