



Contribución de la anemia y de la exposición al virus de la inmunodeficiencia humana a la morbi-mortalidad infantil en África

Cinta Moraleda Redecilla

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

Contribución de la anemia y de la exposición al virus de la inmunodeficiencia humana a la morbi-mortalidad infantil en África

Memoria presentada por **Cinta Moraleda Redecilla** para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona

Directora de tesis: Dra. **Clara Menéndez**
Co-directora de tesis: Dra. **Ruth Aguilar**

Programa de Doctorado en Medicina
Línea de investigación: Salud Internacional
Facultad de Medicina

Febrero de 2015
ISGlobal-Hospital Clínic-Universitat de Barcelona

A Mozambique y a sus habitantes por todo lo que me han enseñado

A Charly por estar siempre ahí

La Dra. Clara Menéndez y la Dra. Ruth Aguilar del Instituto de Salud Global de Barcelona, certifican que la tesis titulada ***“Contribución de la anemia y de la exposición al virus de la inmunodeficiencia humana a la morbi-mortalidad infantil en África”*** presentada por Cinta Moraleda Redecilla 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 Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Dra. Clara Menéndez

Dra. Ruth Aguilar

Barcelona, febrero de 2015

Publicaciones que componen la tesis

Etiology of anemia in children from a rural area in Mozambique

Cinta Moraleda, Ruth Aguilar, Llorenç Quintó, Tacilta Nhampossa, Montse Renom, Augusto Nhabomba, Sozinho Acácio, John J. Aponte, Delino Nhalungo, Ariel H. Achtman, Louis Schofield, Helder Martins, Eusebio Macete, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez

En revisión en *Pediatrics*

Factor de impacto (2013): 5.297

Challenges in the Diagnosis of Iron Deficiency in Children Exposed to High Prevalence of Infections

Ruth Aguilar, Cinta Moraleda, Llorenç Quintó, Montse Renom, Lázaro Mussacate, Eusebio Macete, Josep L. Aguilar, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez

PLoS ONE; 2012 Nov, 7 (11)

Factor de impacto (2012): 3.730

Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to *Plasmodium falciparum*

Ruth Aguilar, Cinta Moraleda, Ariel H. Achtman, Alfredo Mayor, Llorenç Quintó, Pau Cisteró, Augusto Nhabomba, Eusebio Macete, Louis Schofield, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez

British Journal of Haematology; 2014 Mar, 164 (6)

Factor de impacto (2013): 4.959

Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow

Ruth Aguilar, Ariel Magallon-Tejada, Ariel H. Achtman, Cinta Moraleda, Regina Joice, Pau Cisteró, Connie S. N. Li Wai Suen, Augusto Nhabomba, Eusebio Macete, Ivo Mueller, Matthias Marti, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez, Louis Schofield, Alfredo Mayor

Blood; 2014 Feb 13;123(7):959-66

Factor de impacto (2013): 9.775

Impact of HIV-exposure on health outcomes in HIV-negative infants born to HIV-positive mothers in Sub-Saharan Africa

Cinta Moraleda, Nilsa de Deus, Celia Serna-Bolea, Montse Renom, Llorenç Quintó, Eusebio Macete, Clara Menéndez*, Denise Naniche*

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes; 2014 Feb, 1; 65(2)

Factor de impacto (2013): 4.394

* Ambos autores contribuyeron por igual

Impact of elevated maternal HIV viral load at delivery on T-cell populations in HIV non-infected infants in Mozambique

Nilsa de Deus*, [Cinta Moraleda](#)*, Celia Serna-Bolea, Montse Renom, Clara Menéndez, Denise Nanche

BMC Infectious Diseases; 2015 Feb 3;15(1):37

Factor de impacto (2013): 2.5618

* Ambos autores contribuyeron por igual

Índice

Acrónimos	11
Resumen	13
Summary	16
I. Introducción	19
1. Situación actual de la morbi-mortalidad infantil en países de renta baja	19
2. La anemia como causa de morbi-mortalidad infantil	22
2.1 Definición de anemia	22
2.2 Prevalencia de anemia	24
2.3 Clasificación de las causas de anemia según la capacidad de la médula ósea para producir reticulocitos	27
2.3.1 Anemia debida a producción insuficiente de hematíes	27
A) Anemia hiporregenerativa (alteración de la maduración del eritrocito)	
A1) Alteración de la maduración del citoplasma	27
A1.1) Deficiencia de hierro	27
A1.2) Talasemias (ver sección 2.3.2, A1)	33
A2) Alteración de la maduración del núcleo	33
A2.1) Deficiencia de vitamina B12 (cobalamina)	33
A2.2) Deficiencia de ácido fólico	34
A2.3) Dificultades en la medición de la vitamina B12 y del ácido fólico	34
B) Anemia no regenerativa (aplasia medular)	
B1) Insuficiencia de la médula ósea	35
B2) Alteración en la producción de EPO	35
B2.1) Inflamación crónica	35
B2.2) Desnutrición proteica	36
B2.3) Otras	36
2.3.2 Anemia por pérdida acelerada de hematíes	36
A) Anemia hemolítica	
A1) Defectos de la hemoglobina (alfa y beta talasemia y hemoglobinopatía S)	36
A2) Defectos de la membrana del hematíe	40
A3) Defectos del metabolismo del hematíe (deficiencia de G6PD)	40
A4) Otras	41
B) Anemia hemorrágica	
2.4 Anemia asociada a infecciones frecuentes en África subsahariana	41
2.4.1 Malaria	41
2.4.2 Parásitos intestinales	44
2.4.3 Esquistosomiasis	45
2.4.4 Parvovirus B19	45
2.4.5 Virus Epstein-Barr	45

2.4.6 Virus de la inmunodeficiencia humana	45
2.5 Influencia de la anemia materna en el recién nacido	49
2.6 Impacto de la anemia en la salud infantil	49
2.7 Tratamiento y prevención de la anemia	50
3. Exposición perinatal al VIH/SIDA como causa de morbi-mortalidad infantil	54
3.1 Perspectiva histórica	54
3.2 Incidencia y prevalencia del VIH	54
3.3 Transmisión vertical del VIH en niños	55
3.4 Estrategias actuales para la prevención de la transmisión vertical del VIH	56
3.5 Impacto de la exposición al VIH en los hijos de madres VIH positivas	57
3.5.1 Alteraciones hematológicas e inmunológicas asociadas a la exposición del VIH materno	57
3.5.2 Morbi-mortalidad en los niños expuestos al VIH no infectados	59
3.5.3 Factores de riesgo para un peor pronóstico en los niños ENI	60
II. Hipótesis y objetivos	63
III. Materiales y métodos	65
IV. Resultados	67
1. Artículo 1: Etiología de la anemia en niños de un área semi-rural de Mozambique	67
2. Artículo 2: Retos en el diagnóstico de la deficiencia de hierro en niños expuestos a una alta prevalencia de infecciones	97
3. Artículo 3: La gravedad de la anemia se asocia con la presencia de hemozoína en la médula ósea en niños expuestos a <i>Plasmodium falciparum</i>	107
4. Artículo 4: Evidencia molecular de la presencia de gametocitos inmaduros de <i>Plasmodium falciparum</i> en la médula ósea	121
5. Artículo 5: Impacto de la exposición al VIH en los indicadores de salud de los niños VIH negativos nacidos de madres VIH positivas en África subsahariana	131
6. Artículo 6: Impacto de la carga viral materna elevada en el parto sobre las poblaciones de células T en lactantes no infectados por el VIH en Mozambique	141
V. Revisión de los principales resultados y discusión	151
1. Etiología de la anemia	151
2. Impacto de la exposición perinatal al VIH en la salud infantil	158
VI. Conclusiones	161
VII. Referencias	163
VIII. Agradecimientos	189
IX. Anexos (Aceptación comités de ética)	193

Acrónimos

3TC	Lamivudina
AAF	Fracciones atribuibles ajustadas (siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFASS	Aceptable, factible, asequible, sostenible y seguro
AMM	Ácido metilmalónico
AOR	Odds ratio ajustado (siglas en inglés)
ARN	Ácido ribonucleico
AZT	Zidovudina
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CISM	Centro de Investigación en Salud de Manhiça
CMV	Citomegalovirus
CTCH	Capacidad total fijadora del hierro o de captación del hierro
DALY	Años con discapacidad (siglas en inglés)
DE	Desviaciones estándar
EFV	Efavirenz
ENI	Expuestos al VIH no infectados
EPO	Eritropoyetina
FNT	Factor de necrosis tumoral
FTC	Emtricitabina
G6PD	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
Hb	Hemoglobina
HDM	Hospital Distrital de Manhiça
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
IFN-γ	Interferón-γ
IL-6	Interleuquina 6
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
PRB	Países de renta baja
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
RsTF	Receptor soluble de transferrina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SP	Sulfadoxina-pirimetamina
TDF	Tenofovir
TMH-VIH	Transmisión madre-hijo del VIH
VCM	Volumen corpuscular medio
VEB	Virus Epstein-Barr
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

Cada año mueren en el mundo más de 6 millones de niños menores de 5 años. Casi el 50% de ellos se encuentra en África subsahariana. Cerca del 90% de estas muertes son debidas a infecciones, principalmente neumonía, diarrea, malaria, sarampión, VIH/SIDA, a patologías del periodo neonatal y a desnutrición. El aumento de la cobertura de herramientas sanitarias que han demostrado ser costo-efectivas podría prevenir casi la mitad de estas muertes. Mejorar el conocimiento de otras patologías que tienen un peso relevante, pero poco reconocido, en la mortalidad infantil podría ser otra vía para reducir el número de muertes y avanzar en el cuarto objetivo del milenio. La anemia y la exposición perinatal al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son ejemplos de estas patologías subyacentes.

La anemia es una disminución en la concentración de hemoglobina por debajo de los valores observados en personas sanas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la anemia afecta al 28,4% de la población mundial. Los niños en edad preescolar son los más afectados (47,4%). Se han realizado numerosas intervenciones para prevenir y tratar la anemia, pero ésta continúa siendo un grave problema de salud pública mundial. Ello se debe en parte a su etiología multifactorial y a la variabilidad de las principales etiologías en diferentes lugares. Además, la prevención de la deficiencia de hierro, una de las principales etiologías de la anemia a nivel global, no cuenta con unas políticas eficientes en los países endémicos de malaria, debido a la controversia existente sobre la posibilidad de que la administración de los suplementos de hierro pudiera aumentar el riesgo de malaria. Con el objetivo de reducir la prevalencia de la anemia, la OMS resaltó la necesidad de mejorar el conocimiento de la etiología de la anemia en diferentes poblaciones. Siguiendo esta recomendación se realizó un estudio de casos y controles sobre la etiología de la anemia en niños preescolares en una región semi-rural del sur de Mozambique. Los casos fueron niños ingresados con cualquier grado de anemia, y los controles niños sin anemia seleccionados aleatoriamente en la comunidad.

Con el objetivo de determinar la presencia de deficiencia de hierro en estos niños de una forma fiable, se analizaron los depósitos de hierro en la médula ósea de los niños anémicos (*gold standard* para el diagnóstico de ferropenia). Cerca del 80% de estos niños presentaron algún grado de ferropenia medido por este método. Además, los resultados de los análisis de médula ósea se compararon con diferentes marcadores séricos para identificar el mejor marcador de ferropenia disponible. El índice de receptor de transferrina-ferritina ajustado por la proteína C reactiva fue el mejor de entre los analizados en la población de estudio. A pesar de ello, este marcador no pudo diagnosticar a un 25% de los niños ferropénicos, confirmándose la necesidad de nuevos marcadores séricos de ferropenia más precisos, especialmente en poblaciones con alta prevalencia de infecciones donde son más necesarios.

Del estudio sobre la etiología de la anemia se concluyó que la desnutrición, la malaria, la infección por VIH y la deficiencia de hierro fueron los principales factores asociados a la anemia en esta población y a los que deberían ir dirigidos las políticas de prevención de la anemia. La deficiencia de hierro fue una causa muy prevalente, por lo que su prevención podría tener un importante impacto en la disminución de la prevalencia de anemia. Además no se observó una relación entre la deficiencia de hierro y la infección por malaria. Ambos resultados sugieren que se debería impulsar estudios de intervención que evalúen de manera inequívoca la eficacia y seguridad de los suplementos de hierro en niños en lugares endémicos de malaria.

Se observó que la hemozoína en la médula ósea puede tener un papel en la patogénesis de la anemia asociada a la malaria causando una eritropoyesis ineficaz. Esto podría tener implicaciones en el desarrollo de fármacos para prevenir y tratar la anemia asociada a malaria. Por otro lado, la anemia grave y la diseritropoyesis se asociaron con una mayor presencia de gametocitos en la médula ósea. Asimismo, los niños anémicos infectados por *P. falciparum* presentaron una alta prevalencia de gametocitos inmaduros, lo que sugiere que las estrategias de prevención de la malaria basadas en la erradicación de portadores de gametocitos deberían de tener en cuenta estos hallazgos.

Junto con la anemia, el VIH es otro de los grandes problemas de la salud global. En el año 2012, 3,3 millones niños vivían con este virus. África subsahariana es la región del planeta más afectada por esta pandemia con un 91% de los nuevos casos infantiles que ocurren en el mundo. La mayoría de los niños que adquieren esta enfermedad lo hacen mediante transmisión vertical, pero aun sin ninguna medida de prevención de este tipo de transmisión, una proporción no despreciable de hijos de madres infectadas por el VIH no se infecta. El número de estos niños expuestos al VIH no infectados (ENI) está creciendo debido a la elevada prevalencia de infección por VIH, al aumento de la supervivencia de las mujeres infectadas, así como a la mejora en la prevención de la transmisión vertical. Los niños ENI, aunque tienen mejor pronóstico que los niños VIH positivos, presentan mayor riesgo de sufrir alteraciones hematológicas y clínicas comparados con los niños no expuestos al VIH. A pesar de ello, la información disponible sobre estos niños continúa siendo escasa, y en ocasiones contradictoria, por lo que las políticas de salud pública relacionadas con ellos son prácticamente inexistentes.

Con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre el impacto del VIH materno en los niños ENI, se realizó un estudio observacional de cohortes prospectivo en el que se reclutó en el momento del nacimiento 158 niños ENI y 160 niños no expuestos en un área rural del sur de Mozambique. Ambas cohortes fueron seguidas desde el nacimiento hasta el primer año de vida, registrándose de forma pasiva todas las visitas a las consultas externas y los ingresos. Los niños fueron evaluados a los 1, 3, 9 y 12 meses de edad. En cada visita se recogió información clínico-epidemiológica en un cuestionario, se tomó sangre para análisis de ADN-

RCP para VIH y para análisis hematológicos e inmunológicos. Los niños con dos resultados positivos de ADN-RCP para VIH fueron excluidos del estudio.

Los niños ENI presentaron anemia más frecuentemente en los primeros 9 meses de vida y un peor estado nutricional durante el primer año de vida comparados con los niños no expuestos. El porcentaje de células T CD4 fue menor y el de células T CD8 mayor en los niños ENI comparado con los niños no expuestos. Al mes de edad ambos grupos presentaron medias similares de los niveles de células T CD8 y CD4 naive, memoria y activadas. Los niños ENI nacidos de madres con cargas virales mayores de $5 \log_{10}$ copias/ml tuvieron menores niveles de células T CD8 naive y mayores niveles de células T CD8 memoria. Esto sugiere que la exposición a una alta carga viral materna aumenta el riesgo de los niños de tener alteraciones precoces en las poblaciones de las células T. La mejora de los programas de profilaxis de la transmisión vertical del VIH para que más mujeres tengan una carga viral indetectable es crucial para disminuir la transmisión madre-hijo, pero también lo es para reducir las consecuencias del VIH en los niños ENI.

En contra de lo esperado los niños ENI presentaron una menor incidencia de consultas externas, en general y también por diarrea y por afecciones respiratorias. Esta reducción en la morbilidad leve podría deberse al uso rutinario de estos niños de cotrimoxazol profiláctico. Estos hallazgos apoyan la continuación de la profilaxis con cotrimoxazol en los niños ENI, una población vulnerable.

Tanto la anemia como la exposición perinatal al VIH en niños pequeños son patologías relevantes en un país como Mozambique. La prevención de las principales etiologías de la anemia identificadas en esta tesis podría disminuir la anemia y la morbi-mortalidad asociada a la misma. Por otro lado, la mejora en las políticas de prevención de la transmisión vertical del VIH podría disminuir las consecuencias del VIH materno en los niños ENI, así como el uso del cotrimoxazol profiláctico en estos niños.

Summary

More than 6 million of children under 5 years die worldwide each year. Almost 50% are in sub-Saharan Africa. Near 90% of these deaths are due to pneumonia, malaria, measles, HIV/AIDS, neonatal pathology and undernutrition. Increased coverage of health tools, that have demonstrated cost-effectiveness, could prevent almost half of these deaths. Improve the knowledge of other pathologies which are important, but neglected, in the children mortality could be another way to reduce the number of deaths and progress in the Fourth Million Development Goal. Anemia and perinatal HIV exposure are two of these underlying pathologies.

Anemia is a reduced hemoglobin concentration compared with the levels of health population. According to the World Health Organization (WHO), anemia affects to 28.4% of the world population. Preschool children are the most affected (47.4%). Many interventions have been performed in order to prevent and treat anemia, but it remains a severe public health problem. This is due to the multifactorial etiology of anemia and to the variability of the etiology in different sites. In addition, prevention of iron deficiency, one of the main etiologies of anemia, does not have efficient policies in malaria endemic areas, due to the controversy about the association between iron supplementation and the increased number of malaria episodes. In order to reduce the anemia prevalence, WHO recommends improving the knowledge of the etiology of anemia in different populations. Following this recommendation a case-control study about the etiology of anemia in preschool children in a semirural area of southern Mozambique was performed. Cases were children admitted to the hospital with any degree of anemia and controls were children without anemia randomly selected from the community.

In order to determine a reliable iron status of these children, bone marrow iron stores of anemic children were assessed (iron deficiency gold standard). Near 80% of these children had iron deficiency detected by this method. In addition, in order to define the best iron deficiency serological biomarker the bone marrow analysis were compared to different biomarkers. Transferrin-ferritin index ratio adjusted by C-reactive protein was the best serological iron deficiency biomarker in this study. However 25% of iron deficiency children could not have been diagnosed using this biomarker. This confirms the need of more accurate iron deficiency biomarkers, mainly in high infectious pressure areas, where are more needed.

From the anemia etiology study it was also conclude that undernutrition, malaria, HIV infection and iron deficiency were the main etiologies of anemia in this population and that the health policies to reduce anemia prevalence could prevent these conditions. Iron deficiency was very prevalent, suggesting that its prevention would have a considerable impact in reducing anemia. In addition, it was not observed an association between iron deficiency and malaria.

Both results serve to pursue intervention studies to evaluate the efficacy and safety of iron supplements in children in malaria endemic areas.

It was observed that the bone marrow hemozoin have a role in the pathogenesis of malarial-anemia through ineffective erythropoiesis. This finding might have clinical implications for the development of drugs targeted to prevent and treat malarial-anemia. As well as, severe anemia and dyserythropoiesis were associated with a higher prevalence of gametocytes in bone marrow. In *P falciparum*-infected anemic children, immature gametocytes were prevalent; suggesting that preventive strategies based on the eradication of gametocytes carriers should take into account these findings.

Together with anemia, HIV is another important global health problem. In 2012, 3.3 millions of children live with HIV. Sub-Saharan Africa is the most affected region by this pandemic, with the 91% of the new cases in infants. Most cases are secondary to mother to child transmission, however, even with any HIV-prevention of mother to child transmission (HIV-PMTCT) an important number of children do not get infected. The number of these HIV exposed-uninfected (HEU) children is increasing due to the high prevalences of HIV, the increased survival of infected women and the improvements in HIV-PMTCT. HEU children, although with better prognostic than HIV infected children, have higher risk of clinic and hematological disorders, compared to unexposed children. Nevertheless, available information about these children remains scarce, in occasions contradictory, so that public health policies related to this problem do not exist.

In order to improve the knowledge of the maternal HIV infection on HEU children's health a prospective observational cohort study was carried out. One hundred and fifty-eight HEU children and 160 unexposed children were recruited after birth in a rural area of southern Mozambique. Both cohorts were followed since birth to the first year of life and all outpatient visits and admissions were registered passively. Children were evaluated at 1, 3, 9 and 12 months of age. At each visit, a clinical and epidemiological questionnaire was administered, and HIV DNA polymerase chain reaction and hematologic and immunologic determinations were performed on blood samples. Children with two positive HIV DNA-PCR results were withdrawn from further study procedures.

HEU infants were more frequently anemic in the first 9 months and had poorer nutritional status during infancy compared to unexposed infants. Percentage of CD4 T cells was lower and percentage of CD8 T cells was higher in HEU compared to unexposed infants. At one month of age both groups had similar levels of naïve, memory and activated CD8 and CD4 T cells. HEU infants born to women with HIV-RNA loads above $5 \log_{10}$ copies/mL had lower levels of naïve CD8 T cells and higher levels of memory CD8 T cells. This suggests that exposure to elevated maternal HIV-RNA may be associated with an increased risk of having early T cell

abnormalities in these infants. Improving HIV-PMTCT programs such that more women have undetectable viral load is crucial to decrease vertical transmission of HIV, but may also be important to reduce the consequences of HIV exposure in HEU infants.

Unexpectedly, HEU infants had reduced incidence of outpatient visits, overall, diarrhea and respiratory conditions. Prophylactic cotrimoxazol used in a routine way in HEU infants may explain their reduced mild morbidity. These findings may reinforce continuation of cotrimoxazol prophylaxis in HEU children, a vulnerable population.

Anemia and perinatal HIV exposure are two important pathologies in preschool children in rural Mozambique. Prevention of the main causes of anemia identified in this thesis should reduce the anemia and the morbidity and mortality related to it. Similarly, improvement of HIV-PMTCT would reduce the negative health impact of HIV exposure in HEU children and the prophylaxis with cotrimoxazol could improve these children's health.

I. Introducción

1. Situación actual de la morbi-mortalidad infantil en países de renta baja

Cada año en el mundo mueren más de 6 millones de niños menores de 5 años, la mayoría en países de renta baja (PRB) [1]. El cuarto objetivo del milenio es disminuir la mortalidad en este grupo de edad. La meta marcada preveía reducirla en dos terceras partes antes de 2015, con respecto a la cifra de 1990 [1]. En los años 80 se observó un marcado descenso en la tasa de mortalidad infantil, seguido por una deceleración en la misma en los años 90. Esta deceleración ocurrió no sólo en los países con baja mortalidad, como era esperado, sino también en las áreas con alta mortalidad [2]. Por ello, en el año 2002, las naciones se comprometieron a impulsar la reducción de la mortalidad infantil para alcanzar el propósito marcado.

Según el informe de Naciones Unidas publicado en 2014, la mortalidad infantil pasó de 12 millones en 1990 a 6,3 millones en 2013 y la tasa media estimada de 88 muertes por cada 1.000 nacidos vivos en 1990 a 48 muertes por cada 1.000 nacidos vivos en 2012. Este avance supone una disminución de casi el 50% de la mortalidad infantil y una nueva aceleración, pero insuficiente para llegar al objetivo fijado de 30 muertes cada 1.000 nacidos vivos [1].

Actualmente cerca del 50% de los niños menores de cinco años que mueren cada año se encuentran en África subsahariana (98 muertes por cada 1.000 nacidos vivos) [1]. Dentro de los países más desfavorecidos, las muertes se producen principalmente en las zonas rurales y en los hogares más pobres, aunque las zonas periurbanas de las grandes ciudades tienen una mortalidad muy alta [2]. La probabilidad de morir de los niños en estas zonas es mayor que la de aquellos con la misma enfermedad que hayan nacido en un país desarrollado [3].

Los mayores avances respecto al cuarto objetivo del milenio se han producido en el norte de África, Asia, América latina y el Caribe. Europa, América y la Región del Pacífico Occidental han logrado disminuir las tasas de mortalidad en más de un 50% entre 1990 y 2010. Sin embargo, África subsahariana destaca por continuar siendo la región más desfavorecida y, aunque ha experimentado una reducción en la mortalidad infantil del 45%, ésta es insuficiente para alcanzar el objetivo previsto. Además, la desigualdad entre África subsahariana y las otras regiones ha aumentado. En 1990, un niño nacido en África subsahariana tenía una probabilidad de morir antes de los 5 años 1,5 veces mayor que en el sur de Asia, 3,2 veces mayor que en América Latina y el Caribe, 3,6 veces mayor que en el Este de Asia y 11,6 veces mayor que en las regiones desarrolladas. En el año 2010 la probabilidad era 1,8 veces mayor que en el sur de Asia, 5,3 veces más alta que en América Latina y el Caribe, 6,7 veces más alta que en Asia Oriental y 17,3 veces mayor que en las regiones desarrolladas. A pesar de estos desesperanzadores datos, la meta no debe considerarse inalcanzable, ya que algunos países de África subsahariana como Malawi, Níger o Liberia durante este periodo han logrado reducir sus tasas de mortalidad infantil hasta 100 muertes por cada 1.000 nacidos vivos, lo que indica que una mejoría sustancial en estas regiones es posible [1, 4].

Cerca del 90% de estas muertes son debidas a una lista limitada de causas: neumonía, diarrea, malaria, sarampión, y el VIH/SIDA especialmente en África [5]. Junto a éstas se encuentran las patologías del periodo neonatal (asfixia, prematuridad, sepsis y tétanos) [1, 2] y la desnutrición, que es responsable de un tercio de las muertes y supone el primer factor de riesgo de morbi-mortalidad en muchas regiones de África [5]. El bajo peso para la edad, así como la deficiencia de micronutrientes se asocian a alteraciones en la inmunidad de los niños favoreciendo el desarrollo de infecciones [2].

La prevalencia de las diferentes causas de muerte varía entre regiones, por lo que las intervenciones de salud pública deben adaptarse a las necesidades de cada país, sin dejar de tener en cuenta que los perfiles epidemiológicos en muchos de ellos son comunes, y que muchas políticas de salud pública son de utilidad global [2]. A este respecto, en 2003 se propusieron 5 perfiles epidemiológicos en base a que la diarrea y la neumonía estaban presentes en todos los países, y a que la proporción de malaria, VIH/SIDA y de muertes neonatales variaban entre países. Los perfiles propuestos son los siguientes:

- 1) Malaria y VIH/SIDA representan menos del 10% cada uno y las muertes neonatales menos del 40%
- 2) Malaria representa al menos el 10%, y VIH/SIDA menos del 10%.
- 3) Malaria y VIH/SIDA representan menos del 10% cada uno y las muertes neonatales al menos el 40%
- 4) Malaria y VIH/SIDA representan al menos el 10% de las muertes cada uno.
- 5) Malaria representa menos del 10% y el VIH/SIDA al menos el 10% [2].

Junto a las causas directas de muerte, existen numerosos factores de riesgo que predisponen a las muertes infantiles. Se estima que el consumo de agua no potable, la falta de agua para una correcta higiene y el acceso insuficiente a la atención sanitaria contribuyen a 1,5 millones de muertes anuales y al 88% de las muertes por diarrea [2]. Otros factores que aumentan el riesgo de morir en la infancia son la alimentación diferente a la lactancia materna exclusiva [2], la exposición doméstica a combustibles sólidos y la polución ambiental [5]. Dentro de las deficiencias de micronutrientes, las que se asocian a un mayor riesgo de muerte son las de vitamina A, zinc y hierro. En 1990 se encontraban entre los primeros 20 factores de riesgo de muerte a nivel global [5]. Actualmente tanto la deficiencia de vitamina A, como la deficiencia de zinc han descendido a nivel global hasta las posiciones 29ª y 31ª, mientras que la deficiencia de hierro continúa estando entre los 13 más frecuentes [5]. En África subsahariana la importancia de estos factores es mucho mayor, especialmente la deficiencia de hierro que ocupa el cuarto puesto, aunque otros autores consideran que dichas deficiencias podrían tener incluso mayor importancia [6].

La mayoría de las causas de muerte en los menores de 5 años son consideradas evitables. Casi la mitad de ellas se podrían prevenir mediante el uso de herramientas sanitarias no excesivamente complicadas y que han demostrado ser altamente costo-efectivas [7]. El

mejor ejemplo de ello son las vacunas, que han disminuido la mortalidad infantil desde la erradicación de la viruela en 1979 hasta la actualidad [3]. Otras herramientas de prevención con un importante impacto sobre la mortalidad infantil son los suplementos de micronutrientes [8-10], el uso de redes mosquiteras impregnadas con insecticida [9, 11], el favorecimiento de la lactancia materna y su exclusividad en los 6 primeros meses de vida [9], el uso de antirretrovirales como profilaxis de la transmisión vertical del VIH [12] o el tratamiento antimalárico preventivo intermitente durante el embarazo [13]. A nivel de tratamiento, destacan el acceso a antibióticos frente a la neumonía, disentería y la sepsis, el acceso a antimaláricos y la terapia de rehidratación oral [9]. Aunque todas estas herramientas están en uso, la cobertura de algunas de ellas es limitada, y mucha población subsidiaria no tiene acceso adecuado a ellas [9, 14]. El aumento de la cobertura de estas intervenciones podría reducir la mortalidad infantil, lo que demuestra que el conocimiento y los instrumentos necesarios existen, pero que es imprescindible que lleguen a donde se necesitan [9].

Otra vía de acción para reducir la mortalidad infantil es mejorar el conocimiento de patologías subyacentes que tienen un peso relevante en la mortalidad infantil, pero que no está bien reconocido. Un ejemplo de estas patologías subyacentes es la anemia, cuyo papel en la mortalidad infantil es conocido [15], pero poco reconocido [9, 15], en parte por la dificultad para diseñar una única política de salud que disminuya la prevalencia de esta enfermedad debido a su etiología multifactorial [9, 16].

Otro factor determinante de mortalidad infantil es la exposición al VIH [17]. Existen muchos estudios que describen la morbi-mortalidad de los niños VIH positivos [18-20], pero hay poca información sobre la morbi-mortalidad de los niños expuestos al VIH no infectados (ENI), principalmente en África. En las últimas décadas se han dedicado importantes esfuerzos para prevenir la transmisión de la infección del VIH de la madre al niño, y así disminuir la mortalidad asociada al VIH en niños [21]. Por el contrario, los niños ENI, al presentar unos indicadores de salud mejores que los niños VIH positivos [22-25], no han sido un foco importante de atención a pesar de que varios estudios en África demuestran que estos niños tienen mayor mortalidad [18, 25-27] y morbilidad [22, 27, 28] que los niños no expuestos al VIH.

Mejorar el conocimiento de estos factores frecuentes [17, 29], pero parcialmente olvidados, debería servir para guiar el desarrollo de nuevas políticas de salud pública para disminuir la mortalidad infantil allí donde más se necesita.

2. La anemia como causa de morbi-mortalidad infantil

2.1 Definición de anemia

La anemia se define como una reducción en la cantidad de eritrocitos o en la concentración de hemoglobina (Hb) por debajo de los valores registrados en personas sanas [30]. El límite para diferenciar lo que se considera valor normal se establece generalmente en 2 desviaciones estándar por debajo de la media y por lo tanto depende de la población utilizada como referencia. A pesar de que ésta es la definición habitual, con ella un 2,5% de la población sana sería anémica [31]. La anemia podría definirse también como la pérdida del equilibrio entre la producción de hematíes y la necesidad de éstos basándose en el consumo de oxígeno en los tejidos [32]. En la práctica clínica, este cálculo resulta complicado o imposible, por lo que la definición se basa únicamente en los valores de Hb según la población estudiada, aunque puede ajustarse por otros factores que afectan la Hb como la edad, el sexo, la etnia, la altitud, el embarazo y el consumo de tabaco [33].

Edad

Durante la vida intrauterina, debido a la presencia de una hipoxia relativa, la producción de células eritroides es muy elevada, y por ello también los niveles de Hb en el recién nacido [34]. Tras el nacimiento, con el inicio de la respiración, se facilita la llegada de oxígeno a los tejidos, lo que origina una disminución de la producción de glóbulos rojos y un descenso de los niveles de Hb [34], que son máximos hacia el tercer mes de vida, originando la “anemia fisiológica del lactante”. A partir de ese momento y hasta la adolescencia la producción de hematíes va aumentando, permaneciendo posteriormente estable durante toda la edad adulta [34]. Este cambio en los valores de Hb durante la edad pediátrica, hace necesaria una definición específica para la población infantil, ya que la población de referencia debe ser de la misma edad. Así, se considera que un niño tiene anemia cuando su concentración de Hb se encuentra por debajo de dos desviaciones estándar respecto a la media de la población sana de su misma edad [30].

Sexo

El sexo es un factor determinante en las cifras de Hb, ya que a partir de la pubertad, principalmente debido a las pérdidas menstruales, las mujeres presentan valores de Hb más bajos que los hombres. En la infancia el sexo no influye en los valores hematológicos [30].

Etnia

Los valores de Hb, hematocrito y volumen corpuscular medio (VCM) varían según la etnia [30]. En la mayoría de los estudios, en la raza blanca se observan unas cifras de Hb de entre 0,5 y 1 gr/dl mayores que en la raza negra. Esta diferencia se mantiene en las diferentes edades (salvo en el periodo neonatal) y en los dos sexos [35]. Entre las posibles hipótesis que

se han barajado para esta diferencia, se encuentran el nivel socio-económico, el estado nutricional, los rasgos talasémicos o la presencia de deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) [35]. La incorporación de análisis y datos que pudieran eliminar estos factores de confusión no han conseguido descifrar la causa de estas diferencias [30].

Altitud

La cantidad de oxígeno ambiental disminuye gradualmente con la altitud, reduciendo la saturación de oxígeno en la sangre y provocando un aumento en la producción de hematíes. Por ello las poblaciones que viven a mayor altitud presentan concentraciones de Hb más elevadas, especialmente a partir de 1000 metros sobre el nivel del mar [33]. Para valorar la presencia de anemia en estos individuos, se debe corregir el valor de Hb obtenido utilizando un factor de corrección según la siguiente fórmula: *Factor de corrección de la Hb* = $-0,032 \times (\text{altitud} \times 0.0032808)$ [33].

En el año 2004, con el objetivo de establecer unos valores de referencia universales de Hb, se realizó en Estados Unidos la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición III y se presentó una propuesta para niños, especificando que sólo serían válidos para niños de raza blanca no hispana, negra no hispana y mejicanos americanos [31, 36], demostrando la dificultad y la poca utilidad de dicha iniciativa. En África subsahariana, la problemática es aún mayor, ya que a falta de valores de referencia locales, se utilizan parámetros hematológicos de países industrializados. Esto ha sido cuestionado, ya que los valores de Hb en estas regiones son inferiores a los considerados normales en los países usados como referencia [37, 38], por lo que se propone usar datos de poblaciones africanas aparentemente sanas. Sin embargo la mayor parte de estas poblaciones están expuestas a una alta carga de enfermedad, sobre todo infecciones [39] por lo que es esperable que las diferencias no sólo sean debidas a diferencias fisiológicas, sino también a que una elevada proporción de esta población aparentemente sana tenga anemia por causas patológicas. La dificultad de definir valores normales de Hb en los PRB ha sido objeto de controversia. Se ha propuesto redefinir “sano” como “razonablemente sano”. *“El concepto de óptimo, normal y sano en los PRB se ha considerado filosófico pero puede ser definido como sin enfermedad importante o razonablemente sano”* [40]. Si se usaran como valores de referencia los valores “normales” de la población “aparentemente sana”, se dejarían de diagnosticar muchos niños anémicos, ya que la población aparentemente sana en muchas ocasiones tiene anemia causada por infecciones o enfermedades crónicas levemente sintomáticas.

La OMS propone usar una definición general de anemia en la que establece para niños entre 6 meses y 5 años de edad, y para las mujeres embarazadas un valor límite de Hb de 11 gr/dl, para niños entre 5 y 11 años de edad un valor de 11,5 gr/dl, para niños entre 12 y 13 años de edad y para las mujeres adultas no embarazadas un valor límite de 12 gr/dl, y para los adultos de sexo masculino de 13 gr/dl [41, 42]. Estas cifras de corte se propusieron por primera vez en 1968 [43], y se mantuvieron en siguientes publicaciones de la OMS [41, 42], ya que

concordaban con otros valores de referencia determinados en base a datos obtenidos en una gran encuesta poblacional donde se excluyeron todos los individuos con parámetros hematológicos y bioquímicos indicativos de una posible deficiencia de hierro o inflamación [44]. Estos valores son válidos para poblaciones que viven a nivel del mar, y deben adaptarse a la altitud a la que se encuentra cada población. Además la Hb por debajo de 11 gr/dl se asocia a peores puntuaciones en test psicomotores en niños menores de 2 años [45, 46], lo que avala que este punto de corte es una buena definición de anemia, si lo que se busca es prevenir la morbilidad asociada a ésta. Por otro lado, estos valores de referencia generales no incluyen un valor límite de Hb para los menores de 6 meses. El uso del valor de 11 gr/dl en los menores de 6 meses podría llevar a una infraestimación de la anemia en los menores de 2 meses, y por el contrario a una sobreestimación en los niños de 3 a 5 meses. En cualquier caso, aunque los puntos de corte propuestos por la OMS, como ya se ha expuesto, pueden no ser representativos de todas las poblaciones, parecen la opción más práctica para definir anemia, al menos en los PRB, y hasta que sea posible realizar estadísticas nacionales con individuos verdaderamente sanos.

2.2. Prevalencia de anemia

La anemia es una enfermedad que afecta tanto a las poblaciones de los PRB como a las de los países ricos [29]. Según los datos publicados por la OMS sobre la prevalencia mundial de anemia, ésta afecta a 1.620 millones de personas (95% IC 1.500-1.740 millones), lo que corresponde al 28,4% de la población mundial (95% IC 22,9%-26,7%) [29]. Los sujetos más afectados son los niños en edad preescolar (47,4%) [29]. Debido a su alta prevalencia, desde hace años se están llevando a cabo numerosos esfuerzos para reducir la anemia, principalmente en los grupos más desfavorecidos (niños y mujeres embarazadas). Conocer los datos de prevalencia es importante para poder constatar el impacto de las intervenciones puestas en marcha.

Para definir si la anemia supone un problema de salud pública en los diferentes países, la OMS propone la siguiente clasificación (tabla 1) [29]:

Tabla 1: Categorías del impacto en la salud pública según la prevalencia de anemia

Prevalencia de anemia (%)	Categoría
≤ 4,9	No es un problema
5,0-19,9	Problema leve
20,0-39,9	Problema moderado
≥40,0	Problema grave

Estos datos facilitados por la OMS se centran en la anemia asociada a la deficiencia de hierro sin profundizar en la severidad de la misma ni en otras etiologías [47]. Para complementar estos datos, en el año 2014 se publicó la prevalencia global de anemia basada

en datos recogidos entre 1990 y 2010 que incluían 17 causas de anemia y 187 países. Según esta publicación la prevalencia global de anemia en 2010 alcanzaba un 32,9%, mostrando un descenso respecto a la prevalencia en 1990 (40,2%). Además se le otorgaban 68,36 millones de años con discapacidad (DALY), lo que supondría un 8,8% del total de todas las condiciones causantes de discapacidad. Según estos resultados, las áreas más afectadas eran África subsahariana y el sudeste asiático, aunque esta última región ha tenido la reducción de prevalencia más marcada durante este periodo de tiempo. Las causas con mayor prevalencia en ambos sexos fueron: la deficiencia de hierro, la helmintiasis, la hemoglobinopatía S, las talasemias, la esquistosomiasis y la malaria, siendo la deficiencia de hierro la más importante. La malaria, la esquistosomiasis y la enfermedad renal crónica son las únicas causas que han aumentado su prevalencia en este periodo de tiempo, mientras que no se han observado importantes variaciones en la prevalencia de las hemoglobinopatías. La mayor prevalencia de la anemia se observó en los niños menores de 5 años, que son el único grupo de edad en el que ha aumentado su frecuencia en los 20 años que recoge el informe. Además, este rango de edad fue el que presentó mayor gravedad en los PRB, poniendo de manifiesto que la anemia en los niños más pequeños continúa siendo un importante problema de salud pública mundial [47].

Prevalencia de anemia en África subsahariana y en Mozambique

La mayor parte de población con anemia vive en África subsahariana. Específicamente, el 74,6% de los niños menores de 5 años con anemia se encuentran en el continente africano [29], donde la gran mayoría de los países presentan cifras que los incluyen dentro de la categoría de problema grave de salud pública (Tabla 1).

En Mozambique, según datos del Ministerio de Salud, todos los estudios nutricionales realizados en el país desde 1996 muestran que la anemia es la enfermedad nutricional más frecuente (en dicho estudios no se diferenciaba la etiología de la anemia) [48]. También muestran que la anemia está entre las 4 primeras causas de ingreso en hospitales y centros de salud de primer y segundo nivel, así como entre las 4 primeras causas de muerte en esas unidades sanitarias en todos los grupos de edad entre 1 mes y 59 años. Los propios autores de estas últimas estadísticas sugieren que estos datos puedan infravalorar los casos de anemia, ya que ésta suele presentarse junto a otra patología y puede existir una tendencia a la infranotificación [48]. Por el momento no hay datos oficiales disponibles que confirmen la disminución en la prevalencia de la anemia en Mozambique a pesar de la existencia de diferentes recomendaciones para su prevención y tratamiento, como es la administración de suplementos de hierro y ácido fólico en las mujeres embarazadas, medida preventiva que se implementó en Mozambique en 1977 [48], o más recientemente la recomendación de los suplementos de vitamina A en niños y embarazadas, o la profilaxis con mebendazol también en ambos grupos.

Según datos publicados por la OMS, la anemia en Mozambique es un problema grave de salud pública, en todos los grupos de edad [29]. La prevalencia de anemia en niños entre 6

meses y 5 años de edad asciende a un 74,7% [29], siendo en un 23% de estos casos leve, en un 44% moderada y en un 7% grave, y más frecuente y de mayor gravedad en los menores de 24 meses [49]. Otros datos disponibles a nivel nacional son los publicados en un estudio sobre indicadores malariométricos realizado entre febrero de 2002 y abril de 2003, en el que se midieron los niveles de Hb mediante el sistema de Hemocue® (Ångelom, Sweden) en 8.816 niños menores de 11 años, en 24 distritos seleccionados aleatoriamente a lo largo de todo el país. La prevalencia de anemia encontrada en este estudio fue de media 69,8% (6.257/8.816) y entre los anémicos, 11,5% presentaban anemia grave (Hb ≤ 5 gr/dl). Los valores de Hb que se encontraron oscilaban entre 1,5 y 19,7 gr/dl. La media de Hb estimada fue de 9,9 gr/dl (95% CI 9,5-10,2). La concentración más baja de Hb se observó en los niños durante su segundo año de vida. No se observaron diferencias en la media de Hb entre sexos (p=0,554), ni entre las diferentes regiones del país. Según los datos obtenidos en este estudio y utilizando el censo nacional de 1997, se estimó que 3,8 millones de niños menores de 10 años tenían anemia en Mozambique [50].

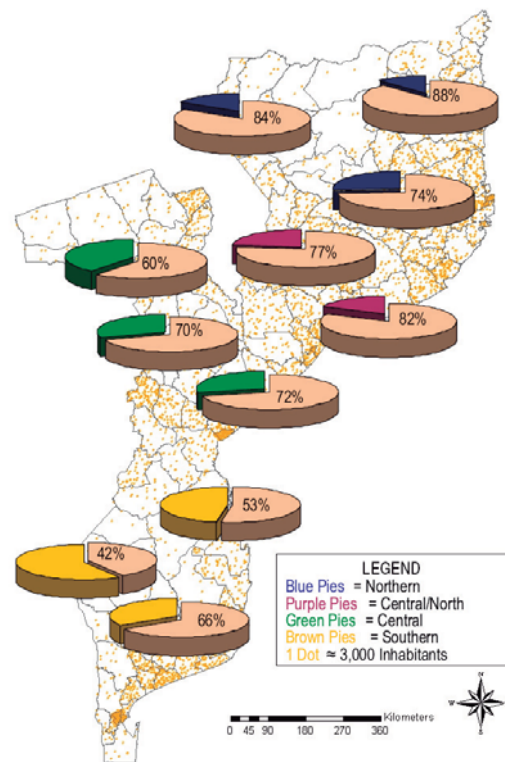


Figura 1: Estimación de la prevalencia media de anemia en niños menores de 10 años, en diferentes lugares de Mozambique [50].

2.3 Clasificación de las causas de anemia según la capacidad de la médula ósea para producir reticulocitos

La anemia se puede clasificar según su morfología o su pato-fisiología. Morfológicamente según el VCM de los hematíes, la anemia puede ser macrocítica, normocítica o microcítica, y en base a la concentración de Hb corpuscular media (CHCM) normocrómica o hipocrómica [30, 31]. La clasificación de la anemia en dos categorías funcionales (pato-fisiológicas), según se deba a una producción insuficiente de hematíes o a una destrucción acelerada de éstos, es la manera más práctica de tener en cuenta las múltiples etiologías de la anemia [31, 32]. Ambas categorías funcionales no son excluyentes entre sí y una única patología como por ejemplo la malaria, puede producir anemia mediante ambos mecanismos [51]. Lo que sí se afirma en los textos de hematología, es que suele haber una única causa como principal responsable de la anemia [31]. Esta afirmación se refiere principalmente a los países desarrollados, ya que en los PRB la anemia sólo excepcionalmente es debida a una única etiología [16, 52].

2.3.1 Anemia debida a producción insuficiente de hematíes

A) Anemia hiporregenerativa (alteración de la maduración del eritrocito)

A1) Alteración de la maduración del citoplasma

A1.1) Deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más frecuente en el mundo y afecta a un importante porcentaje de la población en todos los países [42]. La anemia por deficiencia de hierro, cuando aparece, es el resultado de una deficiencia de hierro de larga duración, que tiene 3 fases:

- 1) Pre-latente, cuando las reservas de hierro tisular se han agotado, pero no se afectan el hematocrito ni el hierro sérico. La ferritina sérica en esta fase es baja.
- 2) Latente, cuando se agotan las reservas de hierro de los macrófagos del sistema retículo-endotelial. En esta fase los niveles de hierro sérico disminuyen y la capacidad total de fijar hierro se ve aumentada, sin que se altere el hematocrito. La cantidad de Hb en los nuevos eritrocitos, empieza a descender, pero es normal en la gran mayoría de hematíes circulantes.
- 3) Marcada, cuando se asocia a una anemia microcítica e hipocroma. La deficiencia de hierro ha permanecido durante el tiempo suficiente para que la mayoría de los hematíes presenten menores concentraciones de Hb [53].

Etiología de la deficiencia de hierro

1) Ingesta inadecuada de hierro

a) Dieta pobre en hierro

La mejor manera de absorber hierro a través de la dieta, es en forma del grupo hemo. El grupo hemo es un componente de diversas proteínas y principalmente de la Hb, presente en los tejidos animales, que permite la absorción del hierro independientemente del pH gástrico. Las dietas pobres en carne son frecuentes a nivel mundial, y principalmente en los PRB. En estas regiones, la principal fuente de hierro se encuentra en cereales como el arroz, que son pobres en este mineral. En los países desarrollados, el consumo de leche de vaca contribuye de manera importante a la deficiencia de hierro, ya que sustituye a otros productos animales durante los primeros meses o años de la vida, y además presenta una menor disponibilidad de hierro que la leche materna [54]. Además el consumo de leche de vaca, principalmente en menores de 12 meses conlleva frecuentemente micro-sangrados intestinales que aumentan las pérdidas de hierro, aumentando la probabilidad de presentar deficiencia de este micronutriente [55]. El uso extendido de leche maternizada durante el primer año de vida y de fórmulas fortificadas han disminuido este problema [53].

b) Pobre disponibilidad

El hierro de la dieta debe pasar a su forma soluble a nivel gástrico para ser absorbido, pero la eficiencia de este proceso es limitada. Además es frecuente la existencia en la dieta de productos quelantes del hierro como los fitatos (presentes en las harinas y las legumbres), el orégano, el té, el café y otras infusiones, así como el calcio que limitan la biodisponibilidad del hierro [42, 53].

c) Malabsorción

Las enfermedades que afectan a la superficie mucosa del intestino pueden interferir en la absorción del hierro, dando lugar a anemia ferropénica, que en muchas ocasiones se asocia a anemia por malnutrición de otros nutrientes y/o a anemia de trastornos crónicos asociada a la enfermedad de base [53].

2) Pérdida sistémica de hierro

a) Gastrointestinal

La causa más frecuente de pérdida de hierro a nivel gastrointestinal es la infección por parásitos intestinales. La infección por helmintos, principalmente *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* da lugar a micro-pérdidas sanguíneas crónicas que derivan en ferropenia. La infección por *Trichuris trichiura*, principalmente en niños pequeños y en casos de hiperparasitemia también se asocia a deficiencia de hierro [53].

b) Urinaria

La deficiencia de hierro por pérdidas sanguíneas urinarias, es menos frecuente que las pérdidas gastrointestinales [54], aunque en algunos PRB las pérdidas sanguíneas urinarias asociadas a esquistosomiasis son una causa importante de anemia. Los esquistosomas son un grupo de parásitos trematodos que afectan a millones de personas en el mundo, principalmente

niños en edad escolar y adultos jóvenes en África subsahariana. Los principales esquistosomas que producen patología en los humanos son *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* [56]. De ellos *S. haematobium* es el que infecta el sistema urinario, en el transcurso de su ciclo vital, originando disuria y hematuria y junto a éstas, anemia ferropénica. En lugares endémicos es frecuente que los niños infectados tengan además anemia por trastornos crónicos [57].

c) Otras

Las pérdidas sanguíneas pulmonares por enfermedades como la hemosiderosis o la tuberculosis pulmonar son infrecuentes. A partir de la menarquia las pérdidas menstruales son una causa frecuente de deficiencia de hierro en las mujeres [53].

Consecuencias de la deficiencia de hierro

La manifestación más importante de la deficiencia de hierro es la anemia, pero incluso en ausencia de ésta, la deficiencia de hierro tiene importantes consecuencias en la salud. Existen datos que confirman que la deficiencia de hierro en animales puede afectar los neurotransmisores y alterar el comportamiento [42, 46, 58]. En el caso de los humanos, los datos disponibles son más escasos ya que la mayoría de los estudios se centran en las secuelas cognitivas secundarias a la anemia por deficiencia de hierro [58], y menos frecuentemente a las secuelas de la deficiencia latente de hierro. La deficiencia de hierro se relaciona con retraso psicomotor y cognitivo en niños y adolescentes [58-62] de forma independiente a variables socio-económicas [42]. Estas alteraciones podrían ser temporales, ya que en algunos estudios se ha observado que mejoran después del tratamiento con hierro [60, 61, 63, 64]. Por el contrario, otros estudios no han podido confirmar esos hallazgos [45, 65, 66], posiblemente porque el efecto de la deficiencia de hierro sobre el desarrollo cognitivo puede ser pequeño, y estudios con tamaños de muestra insuficientes podrían no detectar estos cambios [58]. Otra muestra de que la falta de hierro puede producir alteraciones del comportamiento es la pica, o el consumo compulsivo de sustancias no nutritivas como la tierra, que probablemente es secundario a la falta de hierro en el sistema nervioso central [31]. La deficiencia de hierro además dificulta el uso de las fuentes de energía de los músculos, limitando la capacidad física y de trabajo [31, 42]. En mujeres jóvenes se ha demostrado que la deficiencia latente de hierro perjudica el rendimiento en el ejercicio físico, y que los aportes de hierro en dichas mujeres lo mejora en un periodo corto de tiempo [67, 68].

Hierro e inmunidad

La deficiencia de hierro afecta al sistema inmune de los individuos de todas las edades, aumentando la morbilidad secundaria a infecciones [31, 42]. Esto es debido al papel que tiene el hierro en determinados mecanismos inmunes como la proliferación celular y la actividad de algunas citoquinas [69]. Los suplementos de hierro y el consumo de alimentos fortificados han demostrado tener un efecto beneficioso sobre la morbilidad secundaria a infecciones, principalmente respiratorias, en los niños deficientes en hierro en países no endémicos de

malaria [42, 70]. Además varios estudios han demostrado que infecciones recurrentes como la forunculosis por *Staphylococcus aureus*, o crónicas como la candidiasis muco-cutánea se observan en pacientes con deficiencia de hierro y que el tratamiento con este micronutriente produce una mejoría clínica [70]. Por otro lado un exceso de hierro podría afectar la activación y la actividad de los macrófagos, causando también un efecto perjudicial [69]. Además los microorganismos que causan infecciones, como bacterias o *Plasmodium*, necesitan hierro para su desarrollo. Ante estas infecciones la respuesta innata del organismo limita la absorción del hierro a nivel intestinal así como su movilización desde las reservas, disminuyendo su disponibilidad en plasma para el microorganismo patógeno, lo que sugiere que la ausencia de hierro podría ser un factor protector para el desarrollo de determinadas infecciones [71].

Deficiencia de hierro y malaria

La relación entre la presencia o no de ferropenia en un individuo y la susceptibilidad a determinadas infecciones, principalmente la malaria, es un tema controvertido. Desde hace décadas se ha observado una asociación entre los suplementos de hierro y un mayor número de episodios de malaria clínica y/o parasitemia [72-74]. De especial importancia en este tema es un estudio randomizado realizado en Pemba, Tanzania, en el que niños entre 1 y 35 meses de edad (24.076) recibieron hierro y ácido fólico, hierro, ácido fólico, zinc o placebo. Los niños que recibieron hierro y ácido fólico presentaron un mayor riesgo de hospitalizarse y de morir, a diferencia de lo observado en un estudio similar realizado en Nepal [75], por lo que se concluyó que los suplementos de hierro y ácido fólico en niños preescolares en una población con alto riesgo de malaria aumentaba la morbi-mortalidad por todas las causas [76]. Un sub-análisis de este estudio determinó que los niños que presentaban un mayor riesgo de tener malaria asociada a los suplementos de hierro y ácido fólico eran aquellos que no presentaban previamente deficiencia de hierro [76].

Se ha postulado que dado que los parásitos necesitan hierro para su desarrollo, la deficiencia de hierro podría actuar como factor protector para el desarrollo de la infección por malaria, como se ha observado en algunos estudios [77, 78]. Por otro lado el origen del hierro usado por los parásitos no es del todo conocido, por lo que si el estado del hierro del portador puede o no influir en el metabolismo del parásito no está del todo claro. Se postula que el hierro proviene: a) de la Hb de los hematíes parasitados, b) del hierro unido a la transferrina que circula en plasma (esta opción parece poco probable ya que los eritrocitos parasitados no presentan receptores para transferrina en su membrana), c) de la ferritina que contienen los eritrocitos o d) del hierro libre existente en el citosol de los hematíes. Diferentes estudios avalan que esta última opción parece la más probable, por lo que el estado de deficiencia de hierro del portador sí influiría en la cantidad de hierro intra-eritrocitario disponible para el parásito, aunque la evidencia experimental de este hecho es escasa [79]. Además la fase hepática de la malaria parece necesitar presencia de hierro libre, por lo que en ausencia de éste, la entrada del *Plasmodium* a los hepatocitos podría limitarse. Por otro lado, la formación de protoporfirina Zn (un grupo hemo con un átomo de Zn sustituyendo al átomo de hierro) que se sintetiza en los

individuos con deficiencia de hierro podría ser otro mecanismo por el que la ferropenia actuara como factor protector en los casos de malaria. La protoporfirina Zn limita la capacidad de los parásitos para formar hemozoina (ver apartado 2.4.1), exponiendo al parásito a la toxicidad del grupo hemo y limitando su desarrollo [79]. Por otro lado, la administración de bolos de hierro, principalmente sin comida, ocasiona un aumento del hierro libre que forma radicales libres con efecto tóxico que podrían afectar la respuesta inmunitaria. Otros microorganismos como bacterias y micobacterias también se ven favorecidos por la presencia de hierro libre plasmático, aumentándose las sobreinfecciones, que frecuentemente se observan en los casos de malaria [79].

Por el contrario, en otros estudios los suplementos de hierro no se asociaron con un mayor número de episodios de malaria y/o morbilidad [80-85]. En un estudio realizado en Tanzania en el que se administraron suplementos de hierro a dosis profilácticas (2 mgr/kg/día) a niños desde las 8 hasta las 24 semanas de edad, se observó una menor incidencia de anemia grave (definida como un hematocrito menor del 25%) comparados con el grupo placebo, con una eficacia protectora del 29%, sin que se observaran diferencias en el riesgo de visitas a las consultas externas, admisiones en el hospital, ni en el número de episodios de malaria [80]. Las discordancias observadas entre estudios pueden deberse a diferencias en la edad de los participantes. La exposición a malaria va generando inmunidad con los años, por lo que niños mayores y adolescentes, así como lactantes que conservan la inmunidad materna y que aún no han presentado ningún episodio de malaria, no son comparables a otros grupos de edad. De acuerdo con esto, incluir en la cohorte de estudio sujetos de edades muy diferentes podría ser un factor de confusión. Las hemoglobinopatías causantes de anemia, pero protectoras frente a la malaria podrían influir en los resultados obtenidos, así como la vía de administración del hierro o la estacionalidad de la malaria [70]. También podría tener un impacto en el efecto de los suplementos de hierro el uso de dosis terapéuticas o preventivas [70]. En el estudio realizado en Pemba, la dosis de hierro que se administró fue de 12.5 mgr/día para todos los sujetos menores de 5 años pudiendo oscilar entre terapéuticas y profilácticas [76], mientras que la dosis en el estudio de Tanzania fue calculada para ser una dosis profiláctica [80]. Por otro lado, la inflamación podría afectar la definición de ferropenia (ver diagnóstico de la anemia ferropénica) y hacer que se diagnostique como no deficientes de hierro a niños que sí lo son y que presentan inflamación. Según los resultados del estudio de Pemba son los niños no deficientes de hierro los más afectados por los efectos adversos de los suplementos de hierro en las zonas con alta prevalencia de malaria, pero estos niños realmente podrían ser ferropénicos con algún grado de inflamación, lo que invalidaría los resultados [76, 86].

Por último, recientes revisiones de la Cochrane concluyeron que los suplementos de hierro acompañados o no de tratamiento antimalárico no aumentan el riesgo de malaria clínica o de muerte en áreas donde están disponibles medidas de diagnóstico y tratamiento de malaria [87, 88]. Además está todavía por determinar el papel del ácido fólico recibido junto al hierro que fue administrado al grupo afectado en el estudio de Pemba [76]. Los propios autores

postularon que los suplementos de ácido fólico podrían disminuir la eficacia de los antifolatos usados como antimaláricos durante el estudio, sulfadoxina-pirimetamina (SP), pero en un sub-análisis en el que se comparó la eficacia de SP más placebo frente SP más ácido fólico, no se observaron diferencias, por lo que los autores consideran que el ácido fólico no fue responsable de los efectos adversos observados en el primer estudio [89].

Diagnóstico de la anemia ferropénica

La anemia ferropénica puede diagnosticarse mediante un hemograma completo al observar la característica anemia microcítica e hipocroma con anisocitosis que define este tipo de anemia [54]. Sin embargo, el diagnóstico de esta patología únicamente mediante el hemograma es poco específico, ya que otras patologías como la talasemia o la inflamación pueden alterar el volumen corpuscular medio sin que necesariamente exista deficiencia de hierro [90]. Por otro lado, la deficiencia de hierro puede presentarse sin que exista anemia, por lo que es importante poder determinar esta patología precozmente y evitar de ese modo sus consecuencias [54]. El “*gold standard*” para el diagnóstico de la deficiencia de hierro es la demostración de la ausencia de depósitos de hierro en la médula ósea usando la tinción de Perls [91]. En la clínica habitual, esta técnica es demasiado complicada, por lo que habitualmente se usan marcadores séricos para medir el estado del hierro, que son más baratos y más accesibles [54].

La ferritina sérica baja es un marcador muy específico y precoz de la deficiencia de hierro, pero se eleva en presencia de inflamación, aún en casos de deficiencia de hierro, por lo que es de poca utilidad en poblaciones altamente expuestas a infecciones [90]. El hierro plasmático disminuye en casos de deficiencia, pero varía con la ingesta y es también un reactante de fase aguda [54]. Otros marcadores séricos son la transferrina (proteína transportadora del hierro) que aumenta en la deficiencia de hierro, la capacidad total de captación de hierro (CTCH), que aumenta al disminuir el hierro, y la saturación de transferrina (el hierro sérico dividido entre CTCH), que disminuye en la deficiencia, pero que también se alteran con la inflamación limitando su utilidad [92]. Para solventar las deficiencias de estos marcadores, a lo largo de las últimas décadas se han propuestos nuevos métodos diagnósticos. El receptor soluble de transferrina (RsTF), es una forma truncada del receptor celular existente en los precursores eritroides, que en plasma circula unido a la transferrina [54]. Su concentración aumenta en la deficiencia de hierro, pero también en otras circunstancias como en las anemias hemolíticas y en la talasemia [90]. Por otro lado el RsTF se ve menos afectado por la inflamación que otros marcadores séricos [93]. Junto al RsTF, el índice de receptor de transferrina-ferritina (RsTF/logaritmo de ferritina) también se ha propuesto como un mejor marcador del estado del hierro [94]. En los PRB, donde la deficiencia de hierro es más frecuente, la infección, la inflamación y la desnutrición actúan como factores de confusión, limitando el uso de los marcadores anteriormente descritos [77, 95-97]. La hepcidina, proteína que aumenta en la inflamación, pero que disminuye en la anemia ferropénica, ha sido propuesta como posible marcador de deficiencia de hierro. La hepcidina es

una hormona peptídica reguladora del metabolismo del hierro que se produce en el hígado y en las células del sistema inmune (macrófagos y neutrófilos). Se une a la ferroportina que es la proteína encargada de transportar el hierro desde los hepatocitos y las células del sistema retículo endotelial hasta el compartimento vascular. Este flujo de hierro puede llegar a ser de hasta 20 mgr por día, de mayor relevancia que la absorción intestinal de hierro que asciende a 2 mgr por día. La unión de la hepcidina a la ferroportina induce la degradación de esta última limitando el flujo de hierro al espacio vascular. En situaciones de inflamación, la interleuquina 6 (IL-6) aumenta los niveles de hepcidina provocando una disminución de la absorción de hierro en el intestino y limitando la disponibilidad de las reservas existentes [97]. Un estudio reciente ha demostrado que la hepcidina tampoco es un buen predictor de la cantidad de hierro medular [98]. Recientemente también se ha propuesto la amplitud de distribución eritrocitaria como un marcador de anemia ferropénica con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 90%. Este marcador sería de gran utilidad debido a su bajo coste, pero sería necesario confirmar los datos obtenidos ya que para el cálculo de estos valores se utilizó como “*gold standard*” marcadores bioquímicos que se alteran con la inflamación [99].

A1.2) Talasemias (ver sección 2.3.2, A1)

A.2) Alteración de la maduración del núcleo

La anemia megaloblástica es un tipo de anemia macrocítica que se origina como consecuencia de una maduración anormal de las células hematopoyéticas debido a la síntesis deficiente de ADN. Las dos principales causas de anemia megaloblástica son la deficiencia de vitamina B12 y la deficiencia de ácido fólico, dos sustancias imprescindibles en la síntesis de ADN. La médula ósea en pacientes con deficiencia de vitamina B12 y/o ácido fólico es hiperplásica debido a la sobre-estimulación de una eritropoyetina (EPO) aumentada, que genera precursores eritroides megaloblásticos y una eritropoyesis ineficaz. Los hallazgos hematológicos de la deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico son comparables [100].

A2.1) Deficiencia de vitamina B12 (cobalamina)

La deficiencia de vitamina B12 es una causa conocida de anemia megaloblástica desde el siglo XIX [100]. Su prevalencia mundial no está bien establecida, pero los datos disponibles apuntan a que podría ser un importante problema de salud pública que afecte a varios millones de personas [101]. Por el contrario, la anemia secundaria a esta deficiencia es relativamente infrecuente, ya que una alta prevalencia de deficiencia de vitamina B12 no se traduce en una comparable prevalencia de anemia [101, 102]. La deficiencia de cobalamina se puede asociar también, incluso en ausencia de anemia, a retraso del crecimiento, retraso en el desarrollo psicomotor y trastornos neuro-psiquiátricos [103]. Estas alteraciones neurológicas son más graves en la infancia ya que pueden ser irreversibles [104]. Las principales causas de la deficiencia de vitamina B12 en los países desarrollados son la malabsorción intestinal asociada al déficit del factor intrínseco (proteína de síntesis gástrica necesaria para la absorción de la

vitamina B12) y las enfermedades o resecciones del intestino delgado que limitan la absorción de la unión cobalamina-factor intrínseco. La falta de ingesta de vitamina B12 es también una causa de deficiencia en vegetarianos estrictos (veganos) [100]. Esta deficiencia es poco frecuente en la infancia dónde prácticamente sólo se observa en los lactantes hijos de madres veganas, en los niños consumidores de esas dietas, y en los raros casos congénitos de errores del metabolismo de la cobalamina [105]. Por el contrario, en los PRB la deficiencia de cobalamina en niños, adolescentes y madres lactantes se debe a la falta de ingesta de una dieta adecuada [100]. Los recién nacidos de madres con deficiencia grave de cobalamina nacen con los depósitos de cobalamina agotados, y durante la lactancia, debido a los bajos niveles de esta vitamina en la leche materna, no pueden reponer el déficit [100]. Junto a la desnutrición, la malabsorción asociada a la infección por *Giardia lamblia* [106], al sobrecrecimiento bacteriano [107] o la infección por *Helicobacter pylori* [100], son otros factores asociados a la deficiencia de vitamina B12.

A2.2) Deficiencia de ácido fólico

La deficiencia de ácido fólico, es una de las deficiencias de micronutrientes más frecuentes después del hierro y sus consecuencias hematológicas son indiferenciables de las secundarias a la deficiencia de vitamina B12 [100]. El ácido fólico se encuentra principalmente en vegetales verdes de hoja grande y en productos de origen animal y su deficiencia se debe generalmente a una dieta inadecuada [108], por un escaso aporte o por su pérdida por la manera y temperatura en la que la comida es preparada. Algunos estudios realizados en África sugieren también como causa de la deficiencia de ácido fólico la anorexia asociada a infecciones como la tuberculosis [57]. Además puede exacerbarse por la hiperplasia eritroide asociada a la infección crónica por malaria o las hemoglobinopatías [57]. Algunos fármacos como el metotrexato, la pirimetamina y el trimetoprim producen anomalías en el metabolismo de los folatos y pueden ser también causas de esta deficiencia [30].

A2.3) Dificultades en la medición de la vitamina B12 y del ácido fólico

El ácido fólico y la vitamina B12 son dos sustancias metabólicamente muy relacionadas, cuyas deficiencias son difíciles de establecer con los tests laboratoriales existentes. Un ejemplo de ello es que los pacientes con anemia secundaria a deficiencia de ácido fólico pueden presentar niveles bajos de cobalamina sérica a pesar de no presentar una deficiencia real [100].

La deficiencia de vitamina B12 generalmente se realiza mediante la determinación de ésta en plasma [100]. Es la medida más económica y práctica [101], su sensibilidad es buena, aunque su especificidad menor [108]. Se ha observado que pacientes con clínica de deficiencia de vitamina B12 presentan niveles en plasma normales [103, 109, 110], lo que sugiere la existencia de variaciones en la sensibilidad del ligando de la cobalamina que usan los diferentes test comerciales, haciendo necesarios otros mecanismos diagnósticos [100]. Como alternativa, se ha generalizado el uso de la determinación del ácido metilmalónico (AMM) en

suero o en orina, que aumenta precozmente ante la deficiencia de vitamina B12 [100]. Este test presenta una mejor sensibilidad y especificidad y combinado con la detección sérica de cobalamina aumenta el valor predictivo de ésta [108]. El aumento de homocisteína se usa también como marcador de deficiencia de vitamina B12 y de ácido fólico ya que se altera en ambas deficiencias [100]. Estas técnicas indirectas son más caras y pueden afectarse por la función renal, o en el caso de la homocisteína por la deficiencia de otras vitaminas como la B6 y la B2 o el hipotiroidismo [101], y además aunque se alteran en la mayoría de los pacientes con deficiencia de vitamina B12 y/o ácido fólico, no lo hacen en todos ellos, dejando sin resolver el problema de la baja especificidad [110]. Más recientemente se ha propuesto la holotranscobalamina II sérica como marcador de deficiencia de vitamina B12, que aunque se altera más precozmente no mejora el valor predictivo respecto a la cobalamina plasmática [108]. Su uso, todavía limitado, continua siendo estudiado [101, 109].

El ácido fólico plasmático es la medida más usada para la determinación de la deficiencia de esta vitamina. Se altera rápidamente tras la disminución del folato en la dieta, alcanzando niveles de deficiencia a las 2 semanas del cese de su ingesta. Sus valores se alteran con la ingesta reciente, el embarazo, medicamentos antifolatos, el consumo de alcohol y la talasemia entre otros [108]. Además en situaciones de hemólisis se libera ácido fólico intracelular pudiendo dar falsos negativos [111]. Por el contrario la determinación de folato intracelular no se ve afectada por la hemólisis ni por la dieta reciente [100], aunque los mismos factores que alteran el folato plasmático (embarazo, talasemia...) alteran el folato intra-celular [108]. Además el folato intracelular se observa en presencia de deficiencia de vitamina B12 aún en presencia de niveles normales de ácido fólico en suero [100].

B) Anemias no regenerativas (aplasia medular)

B.1) Insuficiencia de la médula ósea: Anemia aplásica (congénita o adquirida) y ocupación de la médula ósea (tumores, mielofibrosis...)

B.2) Alteración en la producción de EPO

B2.1) Inflamación crónica

La anemia asociada a la inflamación crónica o también llamada anemia de los trastornos crónicos, es una entidad descrita inicialmente por Cartwright en los años 60, que se asocia con una amplia variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas. Se caracteriza por ser una anemia normocítica y normocrómica con leve anisocitosis. El origen de esta anemia es una eritropoyesis ineficaz secundaria a una deficiencia funcional de hierro. En las células retículo-endoteliales de la médula ósea se observan depósitos de hierro que no se moviliza para atender las necesidades [112]. La celularidad de la médula ósea es normal, aunque la hemosiderina medular puede estar aumentada. Los niveles de hierro y transferrina sérica están disminuidos, mientras que los valores de ferritina se encuentran elevados. La presencia de inflamación es un requisito indispensable. La EPO sérica generalmente presenta

niveles disminuidos para el grado de anemia, lo que parece estar asociado a una elevada producción de hepcidina en respuesta a la inflamación [113].

B2.2) Desnutrición proteica

La desnutrición proteica o protein-calórica es una patología frecuentemente asociada a la anemia. Como fisiopatología de esta anemia se han propuesto la deficiencia de hierro, ácido fólico, otras vitaminas y micronutrientes, así como las frecuentes infecciones que se asocian a la desnutrición [114]. Otros autores consideran que la anemia por desnutrición proteica se debe a una deficiencia en la producción de EPO [31]. En cambio, estudios realizados en pacientes desnutridos en África subsahariana muestran que la mayoría de estos pacientes presentan valores normales e incluso altos de EPO sérica, y responsabilizan de la anemia a un fallo medular [114, 115]. Estudios más recientes en ratones muestran que la desnutrición proteica induce a que las células madre mesenquimales de la médula se diferencien hacia adipocitos comprometiendo la producción de citoquinas encargadas del estímulo medular [116, 117].

B2.3) Otras (enfermedad renal crónica, hipotiroidismo e hipopituitarismo)

2.3.2 Anemias por pérdida acelerada de hematíes

A) Anemia hemolítica

A.1) Defectos de la hemoglobina

Los defectos de la Hb incluyen dos grandes grupos. Las variantes estructurales y las talasemias.

Las *talasemias* son un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias causadas por mutaciones que afectan a la síntesis de la Hb. Las formas mejor caracterizadas y más prevalentes de talasemia son la α -talasemia y la β -talasemia [118]. Las formas leves se encuentran dentro de las enfermedades congénitas más prevalentes. Las formas graves, aunque mucho más infrecuentes, conllevan una importante carga de morbi-mortalidad [118].

La Hb normal adulta, denominada Hb A ($\alpha_2\beta_2$), es una proteína formada por 2 cadenas α y dos cadenas β . Existe además una pequeña proporción (3-4%) de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). La Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), que predomina durante la vida fetal, también está presente en un 1% en la vida adulta. Las talasemias se denominan α -talasemia o β -talasemia, según se encuentre alterada la síntesis de una u otra cadena. Según el tipo de talasemia, con el objetivo de compensar el déficit de la cadena afectada existe un exceso de producción de las restantes cadenas de globina [118].

La α -talasemia es consecuencia de un gran número de diferentes alteraciones genéticas. Algunas de ellas eliminan la producción de la cadena (α^0) y otras sólo disminuyen su producción (α^+). Los defectos más frecuentes observados son las deleciones de 3,7 kb ($-\alpha^{3,7}$) y 4,2 kb ($-\alpha^{4,2}$). Las deleciones de la α^0 -talasemia son menos frecuentes [118]. Según el número

que se afecte de los 4 genes responsables de la producción de las cadenas α , el individuo afectado presentará una clínica diferente. Los **portadores asintomáticos o silentes** ($-\alpha/\alpha$), sólo tienen afectado uno de los genes y presentan una leve alteración en la producción de la cadena α . Sus niveles de síntesis y sus parámetros hematológicos se pueden solapar tanto con los de los individuos normales como con los que presentan rasgo talasémico, por lo que su diagnóstico usando los valores habituales del hemograma es difícil. El **rasgo talasémico** ($--/\alpha$ ó $\alpha/\alpha-$) se caracteriza por la alteración de 2 genes [118]. Los individuos afectados presentan anemia leve microcítica e hipocrómica desde el periodo neonatal. Esta patología frecuentemente se confunde con la anemia por deficiencia de hierro [119], y en muchas ocasiones sólo se diagnostica ante la no mejoría con el tratamiento con suplementos férricos. La **enfermedad de la Hb H** ($--/\alpha$) aparece cuando se encuentran 3 genes afectados. Los individuos afectados tienen entre un 5% y un 30% Hb H, formada por 4 cadenas β , que puede precipitar induciendo la hemólisis de los hematíes. Esta enfermedad se presenta de manera más frecuente en el sudeste asiático y en la cuenca mediterránea. Se caracteriza por la presencia de una concentración de Hb de entre 7 y 10 gr/dl asociada a la clínica de una anemia hemolítica crónica (ictericia y hepatoesplenomegalia). Además los individuos con esta enfermedad suelen presentar una mayor predisposición a infecciones y deficiencia de ácido fólico [118]. Determinados fármacos e infecciones pueden desencadenar los episodios de hemólisis, haciendo descender los niveles de Hb a valores en torno a 3 ó 4 gr/dl. El tratamiento habitual es sintomático [118]. El **hidrops fetalis**, se presenta en los casos de homocigosis para el haplotipo α^0 ($--/--$), que es cuando se ven afectados los 4 genes. Es una patología relativamente frecuente en el sudeste asiático. Es incompatible con la vida, y suele generar abortos entre las 30 y las 40 semanas de gestación o la muerte poco después del nacimiento. Actualmente se contempla el tratamiento de estos casos mediante transfusiones intraútero y trasplantes de médula ósea si el feto sobrevive [118].

Las β -talasemias, se producen cuando existe una alteración en la síntesis de la β -globina. Debido a que solo hay 2 loci para el gen beta, la gravedad clínica no se explica por el número de genes afectados, sino por las diferentes mutaciones que afectan a dichos genes [118]. Determinadas mutaciones eliminan la producción de la cadena β^0 y otras sólo disminuyen su producción (β^+). Aquellos individuos que presentan una afectación escasa de la producción de cadenas β^+ asociada a una leve microcitososis son los llamados **portadores asintomáticos**, que generalmente son diagnosticados en el contexto de un estudio genético familiar. Se denomina **rasgo talasémico** a la enfermedad que presentan los individuos heterocigotos para la mutación β^0 . En la mayoría de los casos presentan niveles de Hb A₂ y Hb F elevados. Aunque existen diferentes fenotipos dentro del rasgo talasémico, en general, estos pacientes clínicamente presentan microcitososis, hipocromía, eliptocitososis y moderada hiperplasia eritroide en la médula ósea. La anemia es leve, debida a la presencia de hematíes con una vida media algo acortada y a una eritropoyesis ineficaz leve, aunque puede agravarse en presencia de deficiencia de hierro o ácido fólico, o infecciones intercurrentes. No precisan

tratamiento, pero el consejo genético es imprescindible para evitar los nacimientos de individuos homocigotos. Además tiene relevancia clínica la frecuencia con la que el rasgo talasémico se confunde con la anemia por deficiencia de hierro [118]. La ***β-talasemia mayor o anemia de Cooley***, se caracteriza por la presencia de una anemia grave de aparición a los 6 meses de vida, cuando la anemia fisiológica del lactante no se recupera. Clínicamente los pacientes presentan una importante palidez, hepatoesplenomegalia y retraso del crecimiento. Los hematíes son inusualmente microcíticos, con bajo contenido de Hb y el recuento de reticulocitos es menor de 1%. Los sujetos enfermos presentan además las consecuencias de una hematopoyesis extra-medular (principalmente hepatoesplenomegalia y deformidades óseas), así como de infecciones y de depósitos de hierro tisulares asociados a las transfusiones. El tratamiento incluye transfusiones frecuentes y quelantes del hierro [118].

Las *variantes estructurales* que afectan a la Hb son el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro en la formación de alguna de las cadenas de la Hb. En la mayoría de los casos esta alteración no tiene consecuencias, pero en otros, las características estructurales de la Hb se modifican de tal manera que se ve afectada su función [120]. Dentro de las variantes estructurales por frecuencia destacan la Hb S, la Hb C y la Hb E. La Hb S y su consecuencia, la ***enfermedad de células falciformes*** es la patología de mayor relevancia clínica y epidemiológica. Resulta del cambio del aminoácido valina por ácido glutámico en la β-globina que genera que la Hb resultante (Hb S) tenga tendencia a formar polímeros en medios desoxigenados, alterando la forma de los hematíes (forma de hoz), lo que los hace rígidos e incapaces de circular por la microcirculación. Los individuos heterocigotos para este gen (***rasgo falciforme***) no asocian anemia ni alteraciones en la supervivencia o la morfología de las células rojas. Son asintomáticos, aunque diferentes estudios sugieren que puedan asociar un mayor riesgo de muerte súbita asociado a ejercicio extenuante [120]. Los individuos homocigotos (***enfermedad de células falciformes***) presentan una importante morbi-mortalidad asociada a hemólisis y a micro-oclusión vascular. En estos pacientes son características la aparición de: a) crisis vaso-oclusivas o infárticas, que son crisis dolorosas que pueden afectar a cualquier órgano o víscera, generalmente desencadenadas por factores como el frío, las infecciones, la deshidratación o el estrés, b) infecciones, que son la principal causa de muerte en estos niños. Los principales gérmenes implicados son *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella*. Este mayor riesgo infeccioso se debe a la asplenia funcional ocasionada por los micro-infartos esplénicos y por el bloqueo del sistema mononuclear fagocítico por la hiper-hemólisis [120].

La mayoría de las variaciones genéticas relacionadas con los defectos de la Hb son raras, pero debido a que algunas de ellas suponen un factor de protección frente a la malaria, en las poblaciones en las que la infección por *P. falciparum* es o fue endémica, la prevalencia de estas alteraciones oscila entre 0.3 y 25 por cada 1000 nacidos vivos [121]. En 1948 Haldane, basándose en que la β-talasemia se distribuía casi exclusivamente en las zonas

tropicales y subtropicales, desarrolló la teoría de que los portadores heterocigotos presentaban una ventaja selectiva en aquellos lugares donde la malaria era endémica [118, 122]. Varias décadas después la hipótesis original de Haldane se ha demostrado cierta [122], pero los mecanismos mediante los cuales se desarrolla esta protección no se conocen completamente [118]. La protección varía según el tipo de alteración, pero en la mayoría de los casos existe sólo frente a malaria grave, a niveles comparables a políticas de salud pública como el tratamiento preventivo intermitente o el uso de redes mosquiteras impregnadas [123]. Por el contrario, la protección frente a la malaria no complicada es leve o ausente [123]. En el caso de las mutaciones asociadas a la Hb S, el beneficio se observa sólo para los individuos que presentan rasgo falciforme, que aunque si pueden ser infectados por el parásito presentan cierta protección a morir de malaria [124]. El mecanismo de protección fue sugerido por primera vez por Beet [125], que teorizó que los hematíes de los individuos con rasgo falciforme al ser infectados por el *P. falciparum* podrían sufrir un proceso de falciformación (seguramente secundario a la desoxigenación y a un cambio de pH producido por el parásito) aumentando así su probabilidad de ser destruidos por los macrófagos, lo que impediría la finalización del ciclo del parásito y frenaría el aumento de la parasitemia en sangre [124]. Por el contrario, en los individuos con enfermedad de células falciformes que presenten malaria, la anemia secundaria a la infección empeora la anemia crónica desencadenando situaciones clínicamente graves. En estos individuos otro factor que agrava la situación es la asplenia funcional que dificulta la eliminación de los hematíes infectados [124].

En la actualidad estas patologías se observan también en poblaciones no expuestas a malaria, pero seguramente debido a la migración y a los movimientos poblacionales que han tenido lugar en los últimos 10.000 años [118]. La tabla 2 recoge las prevalencias estimadas en las diferentes regiones de la OMS [126]. Al menos el 5,2% de la población mundial es portadora de alguna variante asociada a alteraciones de la Hb con relevancia clínica. La mayoría de los niños afectados por estas patologías nacen en PRB y suelen morir antes de los 5 años de edad contribuyendo en un 3,4% a la mortalidad infantil global, y en un 6,4% a la mortalidad infantil en África [126]. Con el objetivo de disminuir la prevalencia de estas enfermedades, la OMS recomienda la instauración de programas para la detección de portadores y la implantación de consejo genético. La diversidad y la heterogeneidad de la distribución de estas alteraciones hace necesario que los programas se realicen a nivel nacional [126].

Tabla 2: Prevalencias estimadas de portadores de variantes genéticas de alteración de la Hb y concepciones afectadas.

WHO region	Demography 2003				% of the population carrying			Affected conceptions (per 1000)			Affected births (% of under-5 mortality)
	Population (millions)	Crude birth rate	Annual births (1000s)	Under-5 mortality rate	Sig-nificant variant ^a	α^+ thalas-saemia ^b	Any variant ^c	Sickle-cell disorders ^d	Thalas-saemias ^e	Total	
African	586	39.0	22 895	168	18.2	41.2	44.4	10.68	0.07	10.74	6.4
American	853	19.5	16 609	27	3.0	4.8	7.5	0.49	0.06	0.54	2.0
Eastern Mediterranean	573	29.3	16 798	108	4.4	19.0	21.7	0.84	0.70	1.54	1.4
European	879	11.9	10 459	25	1.1	2.3	3.3	0.07	0.13	0.20	0.8
South-east Asian	1 564	24.4	38 139	83	6.6	44.6	45.5	0.68	0.66	1.34	1.6
Western Pacific	1 761	13.6	23 914	38	3.2	10.3	13.2	0.00	0.76	0.76	2.0
World	6 217	20.7	128 814	81	5.2	20.7	24.0	2.28	0.46	2.73	3.4

a: Hb S, Hb C, Hb E, Hb D, α^0 -talasemia y β -talasemia; b: Heterocigotos y homocigotos de α^+ -talasemia; c: Coincidencia de variantes α y β o combinaciones de β variantes inocuas; d: SS, SC, S/ β -talasemia; e: Homocigotos de β -talasemia, Hb E/ β -talasemia, homocigotos de α^0 -talasemia y enfermedad de la Hb H [126].

A.2) Defectos de la membrana del hematíe (esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, ovalocitosis del sudeste asiático, estomatocitosis entre otras).

A.3) Defectos del metabolismo del hematíe

La deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía humana más común [127]. Se estima que 500 millones de personas pueden estar afectadas [128]. El gen de la G6PD (Gd) se encuentra en el cromosoma X, por lo que los hombres pueden ser hemocigotos normales (Gd⁺) o deficientes (Gd⁻) y las mujeres homocigotas normales (Gd⁺/Gd⁺), homocigotas deficientes (Gd⁻/Gd⁻) o heterocigotas (Gd⁺/Gd⁻). Este último fenotipo suele definirse como intermedio, ya que la actividad enzimática se encuentra entre el fenotipo normal y el deficiente [128]. El Gd presenta más de 400 variantes. En África subsahariana las variantes más frecuentes son G6PD*B (la variante salvaje), G6PD*A (90% de actividad enzimática) y G6PD*A- (8-20% de actividad enzimática) [129]. Los individuos con G6PD*A- suelen ser asintomáticos, aunque si el eritrocito se expone a un estrés oxidativo, la Hb se desnatura originando la hemólisis del hematíe. La hemólisis se puede desencadenar por la ingesta de habas (fabismo), en presencia de infecciones, o por otros agentes oxidantes generalmente fármacos (primaquina, dapsona, cotrimoxazol, ciprofloxacino entre otros) [128]. Ante situaciones de estrés oxidativo los eritrocitos deficientes de G6PD no tienen capacidad reductora suficiente y se precipita la Hb cambiando la estructura del hematíe y generando hemólisis intravascular y la eliminación de los hematíes afectados por el bazo [128]. A las 24-48 horas de la exposición al agente aparece fiebre, náuseas, dolor abdominal y diarrea junto con hemoglobinuria. La anemia puede ser de moderada a grave. En el frotis sanguíneo suele observarse una marcada anisocitosis con reticulocitos aumentados y presencia temporal de

cuerpos de *Heinz* (Hb desnaturalizada intraeritrocitaria). En la mayoría de los casos, los ataques de hemólisis agudos, se resuelven espontáneamente en 3-6 semanas [128].

Al igual que otras alteraciones que afectan a los hematíes, debido a la protección que esta patología proporciona frente a la malaria, es más prevalente en las zonas donde esta infección es endémica [128-130]. Varios estudios muestran que tanto los hemocigotos/homocigotos como los heterocigotos están protegidos frente a la malaria, mientras que otros sugieren que sólo las mujeres heterocigotas presentan dicha protección [130]. La prevalencia de la deficiencia de G6PD varía mucho según las áreas, pero suele ser cercana al 10% de la población en las áreas en las que esta deficiencia está presente [129].

A.4) Otras (hemólisis mediada por anticuerpos, daño mecánico o térmico del hematíe, daño del hematíe inducido por estrés oxidativo, daño del hematíe inducido por un agente infeccioso (ver punto 2.4), hemoglobinuria paroxística nocturna)

B) Anemias hemorrágicas (sangrados copiosos generalmente agudos por traumatismos o rotura de vasos secundarios a otras patologías generalmente digestivas o pulmonares entre otros).

2.4 Anemia asociada a infecciones frecuentes en África subsahariana

2.4.1 Malaria

Dentro de las múltiples infecciones que se asocian con la anemia en PRB, la malaria es la más importante sobre todo en gran parte de África subsahariana donde la intensidad de transmisión es alta. A pesar de los importantes avances realizados a nivel mundial para reducir los casos de malaria, se estima que todavía hubo 207 millones de casos y 627.000 muertes por malaria en el 2012, de las que la mayoría tuvieron lugar en África subsahariana (90%) y en niños menores de 5 años (77%) [131]. En las regiones endémicas de África subsahariana más del 90% de las muertes relacionadas con malaria están asociadas a la infección por *P. falciparum* y la mayoría de ellas se deben a complicaciones como la anemia grave, la malaria cerebral, la hipoglucemia, la acidosis láctica y las convulsiones [132]. La anemia asociada a malaria es una complicación particularmente frecuente, que con asiduidad necesita tratamiento adyuvante. Se calcula que, en los niños admitidos en hospitales de áreas endémicas de malaria, entre un 12 y un 29% presentan anemia grave con necesidad de transfusión [133]. En estas regiones, la anemia alcanza una tasa de letalidad que oscila entre el 6 y el 18%, incluso en áreas donde las transfusiones están disponibles [134]. La patogénesis de la anemia asociada a malaria es compleja, y la contribución de los diferentes mecanismos fisiopatológicos depende de la edad, la inmunidad y la genética del huésped, del estado de embarazo y de la intensidad de transmisión [51, 135]. Durante el episodio agudo de malaria por *P. falciparum*, el hematocrito empieza a disminuir a las 48 horas del inicio de la fiebre y puede continuar

disminuyendo entre 1 y 2 semanas, aún después de acabado el tratamiento [57, 136]. La fisiopatología de la anemia asociada a la infección por *P. falciparum* continúa siendo no del todo conocida [137], pero se sabe que se debe a varios mecanismos: 1) un aumento de la destrucción de los hematíes (mediante hemólisis, hiperesplenismo, fagocitosis por los macrófagos y mecanismos autoinmunes) y 2) una disminución de la producción de eritrocitos (mediante hipoplasia eritroide, disminución de la síntesis de EPO y diseritropoyesis) [51].

Destrucción de hematíes

La hemólisis asociada a la infección por *P. falciparum* tiene lugar en los eritrocitos parasitados, pero también en los no parasitados. El *P. falciparum* en el desarrollo de su ciclo vital, penetra en los eritrocitos en forma de merozoíto donde se multiplica. Para liberar la progenie los hematíes se hemolizan, soltando nuevos merozoítos que infectarán otros hematíes. Una proporción de eritrocitos parasitados puede ser eliminada por la acción de un bazo aumentado de tamaño [51, 57]. La destrucción de los hematíes parasitados explica la correlación observada entre la parasitemia y la severidad de la anemia [136]. Por otro lado, la parasitemia no siempre se correlaciona con la anemia grave [51]. Los eritrocitos infectados por *P. falciparum*, principalmente en sus formas más maduras, expresan en su superficie proteínas del parásito (como la proteína de membrana eritrocitaria 1) que les permite unirse a receptores del epitelio vascular evitando su eliminación por el bazo. El secuestro parasitario secundario a este proceso de adhesión a los vasos sanguíneos produce una disminución del flujo capilar e hipoxia, y está directamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad grave, principalmente en el caso de la malaria cerebral y la malaria placentaria, pero no parece jugar un papel importante en la producción de la anemia asociada a malaria [138]. Por otro lado, junto a los hematíes infectados (1% en la mayoría de los pacientes) se estima que se eliminan hasta 10 veces más hematíes no parasitados [57]. Los mecanismos relacionados con ello son: el envejecimiento precoz, la disminución de la elasticidad, el incremento de la actividad de los macrófagos, mecanismos autoinmunes relacionados con IgG y complemento (C3) ligados a la superficie de la membrana del hematíe, una peroxidación lipídica y la adsorción de los antígenos parasitarios [139].

Los hematíes de los enfermos con malaria presentan una menor elasticidad, principalmente después de la primera semana tras el tratamiento, que es secundaria a la acción de citoquinas y productos de degradación del propio parásito [140]. El grupo hemo, proveniente de la Hb libre, liberado en el proceso hemolítico produce una alteración en la relación de la membrana del hematíe y su citoesqueleto, lo que favorece el envejecimiento precoz y la menor elasticidad [140]. En el huésped se observa un aumento de la producción del factor de necrosis tumoral (FNT) y de interferón- γ (IFN- γ), lo que estimula la capacidad fagocítica de los macrófagos del sistema retículo-endotelial [51, 141]. La existencia de un componente autoinmune relacionado con la anemia asociada a malaria fue sugerido hace varias décadas al constatarse que un porcentaje importante de los niños con malaria presentaban un test de Coombs directo positivo [135, 142]. Más recientemente se ha

demostrado que la proteína de superficie del merozoíto-2 depositada sobre el hematíe no infectado origina el ataque a los eritrocitos marcados mediante anticuerpos específicos, induciendo su eliminación. Los merozoítos además, también pueden marcar con esta proteína precursores eritroides *in vitro*, lo que podría ser causa de disminución de la eritropoyesis *in vivo* [143]. Existen diversos casos en la literatura que presentan pacientes con anemia grave de origen autoinmune [144], pero no todos los pacientes con malaria y anemia muestran signos de hemólisis autoinmune y ésta no siempre se correlaciona con la gravedad de la anemia [51, 57]. El papel de este tipo de hemólisis en la etiología de la anemia asociada a malaria está aún por definir.

En algunos pacientes, además puede observarse la llamada *fiebre de aguas negras* que se trata de una anemia aguda secundaria a hemólisis intravascular, asociada a una hemoglobinemia capaz de teñir la orina de color oscuro. Fue descrita inicialmente en individuos no inmunes asentados en lugares endémicos de malaria que tomaban quinina profiláctica de forma irregular y que en el transcurso de un nuevo episodio de malaria, al tomar el tratamiento aún de manera correcta, desarrollaban hemoglobinuria. La quinina actúa como un hapteno que al unirse a alguna proteína del hematíe forma una estructura antigénica [51]. Más recientemente se ha descrito esta patología asociada a otros antimaláricos como la artemisina [145], mefloquina y halofantrina [51].

Disminución de la producción de hematíes

Junto a la hemólisis de los hematíes, la presencia de una eritropoyesis alterada es el otro pilar responsable de la anemia en los individuos infectados por malaria. En las primeras descripciones de la médula ósea de niños con malaria, se observó una diseritropoyesis (producción anómala de las células rojas) definida por la presencia de eritroblastos bi y trinucleados, puentes internucleares de cromatina, picnosis nuclear y otras alteraciones de la cromatina [146], que se observaron más frecuentemente en los niños con malaria crónica, que en aquellos con episodios agudos [135, 147]. El origen de estas alteraciones está relacionado con el aumento de producción de FNT y otras citoquinas estimulantes de las células T *helper* tipo 1 (IFN- γ) presentes en la infección por malaria [51]. Estos mismos factores estimulan la actividad de los macrófagos de la médula ósea provocando una eritrofagocitosis medular que aumenta la eritropoyesis ineficaz [57], y desplaza el hierro contenido en las células eritroides de la médula ósea a los macrófagos de ésta. Por el contrario, la presencia de niveles bajos de las citoquinas que estimulan las células T *helper* tipo 2, y que contrarrestan la actividad del FNT, parece tener también un papel en la diseritropoyesis medular [51]. Como desencadenante de este proceso se responsabiliza a la hemozoína o pigmento malárico, que es un producto cristalino insoluble derivado de la digestión del grupo hemo por parte del parásito. La hemozoína es resistente a la degradación de la enzima hemo-oxigenasa por lo que se acumula en forma de cristales en macrófagos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares en los que puede persistir durante meses. La hemozoína induce un aumento de la producción de FNT, de IL-2 [148, 149] y de IL-10 [150], lo que afecta el desarrollo de las células eritroides [151, 152].

Recientes estudios *in vitro* han demostrado que la hemozoína afecta directamente a la expresión de marcadores eritroides en los precursores de la línea roja, induciendo en ellos apoptosis [153, 154]. Además en un estudio histológico *post-mortem* de médulas óseas de niños que fallecieron por malaria se observó que la presencia de hemozoína en plasma o en médula ósea se asociaba a anemia y diseritropoyesis [155]. También *in vitro* se ha demostrado que la presencia de glicofosfatidilinositol en el plasma de los sujetos con malaria induce la liberación de FNT por parte de los macrófagos, lo que parece relacionarse con la diseritropoyesis [156].

El papel de la EPO en la disminución de la eritropoyesis asociada a malaria parece más controvertido. La anemia y la consecuente disminución de la oxigenación parecen no desencadenar una respuesta adecuada de la EPO en algunos individuos con malaria, según observaciones en adultos africanos y asiáticos [157]. Por el contrario en los niños africanos en presencia de anemia y malaria, la EPO se encuentra muy elevada, incluso por encima de los valores que se observarían en niños con el mismo grado de anemia y sin infección por *Plasmodium* [157]. En los niños africanos se postula que la fisiopatología de la baja producción de eritrocitos se debe no a una menor producción de EPO, sino a una respuesta disminuida a ésta [157]. Un reciente estudio realizado en ratones muestra que la proliferación de los precursores eritroides inducida por la EPO está suprimida por la acción de los residuos de parásitos entre los que se incluye la hemozoína [158].

Alteración del metabolismo del hierro

Los pacientes con malaria presentan además las características alteraciones en la disponibilidad del hierro asociada a infecciones. La ferritina se encuentra aumentada y el hierro que permanece secuestrado en la médula ósea disminuye en suero, lo que contribuye a la severidad de la anemia [136]. El aumento de la hepcidina asociado a la infección por malaria limita la absorción del hierro intestinal disminuyendo los depósitos de éste, aunque la absorción vuelve a la normalidad cerca de 2 semanas después del tratamiento antimalárico [159]. La producción de hemozoína, anteriormente descrita, supone también un secuestro del hierro existente en el grupo hemo que es transformado por el parásito en cristales dificultando que sea reciclado por el organismo [79].

Infecciones concomitantes favorecidas por la alteración de la inmunidad que sufren los pacientes con malaria, como las producidas por *Salmonella* no tifoidea, neumococo, *Staphylococcus aureus* o por el Parvovirus B-19 pueden aumentar aún más la gravedad de la anemia [51].

2.4.2 Parásitos intestinales (ver punto 2.3.1, A1.1, pérdida sistémica de hierro de origen gastrointestinal).

2.4.3 Esquistosomiasis (ver punto 2.3.1, A1.1, pérdida sistémica de hierro de origen urinario).

2.4.4 Parvovirus B19

El parvovirus B19 es un *Erythrovirus* de distribución mundial que origina un cuadro caracterizado por la presencia de exantema y crisis aplásicas transitorias principalmente en menores de 15 años. Este virus induce la lisis de los precursores eritroides, por los que tiene tropismo, provocando una pausa transitoria de la eritropoyesis. A los 7-11 días de la exposición al virus, los individuos suelen presentar reticulocitos indetectables, acompañados de un descenso leve casi indetectable de la Hb. En situaciones de inmunidad normal, la producción de IgM y posteriormente de IgG controlan la enfermedad, restaurando la reticulopoyesis antes de que el descenso de hematíes que siguen su ciclo vital produzca anemia. Individuos con importante renovación eritroide, como los pacientes con anemia de células falciformes, anemia hemolítica autoinmune o talasemia, así como aquellos inmunodeprimidos que no consiguen controlar la infección, son los subsidiarios de presentar crisis aplásicas [30, 160]. También se han descrito crisis aplásicas en situaciones de “estrés eritroide” como hemorragias o deficiencia de hierro [161]. En los pacientes sanos, por el contrario, la clínica queda reducida a la aparición de exantema y/o artropatía.

2.4.5 Virus Epstein-Barr (VEB)

El VEB, es un γ -herpes virus que infecta a más del 95% de la población mundial. Se excreta en las secreciones orales durante aproximadamente 6 meses después de pasada la infección, y de forma intermitente toda la vida. La presencia de inmunosupresión permite la reactivación del virus latente. En los PRB la infección por el VEB suele ocurrir en la etapa preescolar y se manifiesta como un síndrome febril indistinguible de otras infecciones infantiles, pero es raro observarlo en adolescentes y adultos como síndrome mononucleósico, más frecuente en países desarrollados [30]. La anemia asociada a esta infección es rara. Cuando existe suele ser leve, ocasionalmente grave, y secundaria a una hemólisis de origen inmune. Se inicia entre la primera y segunda semana de la enfermedad y suele durar menos de un mes [162]. La infección por VEB también se ha visto asociada a la anemia aplásica, pero principalmente en el contexto de trasplantes de médula ósea, o en el transcurso de enfermedades proliferativas [163], como la enfermedad de Hodgkin o el linfoma de Burkitt, que son procesos cancerosos relacionados con el VEB [30, 164].

2.4.6 Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

La anemia es uno de los signos clínicos más frecuentes en los niños infectados por el VIH, siendo además un factor predictor de mal pronóstico [165, 166]. Existen escasos estudios sobre la incidencia de anemia en niños VIH positivos con un grupo control VIH negativo, pero estudios no controlados realizados en África muestran que la anemia tiene lugar en casi todos los niños VIH positivos, incluso en lugares donde el tratamiento antirretroviral está disponible [167]. La prevalencia de anemia leve en estos niños varía entre 24 y 94%, y la moderada entre

3 y 82%, pero pocos estudios reportan presencia de anemia moderada-grave (Hb 6-7,9 gr/dl) o grave (Hb \leq 5 gr/dl) [167].

Son escasos los estudios realizados sobre la etiopatogenia de la anemia en niños VIH positivos con muestras de médula ósea, siendo la mayoría retrospectivos, con pocos sujetos y sin grupo control. Los hallazgos encontrados en la médula ósea indican que las alteraciones medulares son frecuentes, pero que generalmente son inespecíficas [168]. La diseritropoyesis es un hallazgo habitual, pero no se correlaciona con el tratamiento, edad, estado de la enfermedad o presencia de enfermedades oportunistas [168]. La presencia de megaloblastos es también frecuente, pero no se asocia a los niveles de vitamina B12 o ácido fólico [168, 169]. En estudios medulares realizados para diagnosticar pancitopenias en estos pacientes se ha observado que la médula ósea también puede ser normal o presentar hiper celularidad, sugiriendo que la etiología en estos casos puede relacionarse con una hematopoyesis ineficiente o con un aumento de la destrucción periférica. En ocasiones la presencia de enfermedades oportunistas o neoplasias infiltrando la médula ósea dificultan el diagnóstico etiológico de la anemia [170]. La fisiopatología de la anemia relacionada con el VIH continua por tanto siendo no del todo conocida, especialmente en la infancia, aunque es posiblemente multifactorial. Las principales causas que se postulan asociadas a ella son:

a) Anemia de enfermedades crónicas

Es la principal causa de anemia en los pacientes con VIH/SIDA [171] y su fisiopatología prácticamente no difiere de la descrita para otros procesos inflamatorios crónicos (ver sección 2.3.1.2.). Citoquinas como FNT- α , IL-1, y el IFN- γ parecen jugar un papel en la inhibición de la eritropoyesis, la disminución de la respuesta de la médula ósea a la EPO, la reducción en la supervivencia de las células de la línea roja y el deterioro del proceso de liberación del hierro del sistema reticulo-endotelial [172, 173]. Otros estudios sin embargo no han podido confirmar la relación entre los niveles de IFN- γ y la alteración del metabolismo del hierro en pacientes con VIH y anemia de enfermedades crónicas [171].

b) Deficiencia de hierro y otros micronutrientes

La deficiencia de hierro es la principal causa de anemia en la población general, y es esperable que también lo sea en los individuos VIH positivos o incluso, que debido a la malabsorción intestinal, sea más frecuente en estos pacientes [174]. En contra de lo esperado se ha observado que la prevalencia de la deficiencia de hierro en niños VIH positivos es menor comparado con los niños VIH negativos [175]. Estas afirmaciones derivan de los resultados de varios estudios que utilizan una definición de deficiencia de hierro basada en una ferritina baja, que es una proteína que se altera con la inflamación [90], y que frecuentemente se encuentra elevada en los pacientes VIH [171], resaltando la necesidad de realizar más estudios en este campo. Además, las recomendaciones para el tratamiento y la prevención de la deficiencia de hierro en los niños infectados por VIH en lugares con una prevalencia alta de infecciones no están claras. Un estudio reciente realizado en Malawi mostró que los niños infectados por VIH que recibieron tratamiento con hierro y multivitaminas presentaron una mejoría en los niveles de Hb y de CD4 comparados con los niños que sólo recibieron multivitaminas, aunque

presentaron un mayor número de episodios de malaria durante el periodo en el que se suministraron los suplementos [176].

c) Efecto directo del VIH sobre la eritropoyesis

El VIH parece tener un efecto directo sobre la eritropoyesis, pero el estudio de esta etiopatogenia ha sido y continúa siendo una tarea complicada debido a la multifactorialidad de la anemia asociada a VIH. El hecho de que la anemia parece mejorar en aquellos pacientes que inician tratamiento antirretroviral, e incluso que ésta pueda ser un marcador de fallo terapéutico en niños, apoya la importancia del efecto directo del virus sobre la eritropoyesis [177]. Un estudio reciente realizado en Malawi muestra que los niños VIH positivos tienen menos precursores de células rojas (CD34+) en médula ósea que otros niños anémicos VIH negativos [178]. Esto parece ser debido a que las células auxiliares de la médula ósea son infectadas por el VIH, lo que produce un desequilibrio en la producción de IL-12, IFN- γ e IL-1, reduciéndose la secreción de factores de crecimiento que estimulan la serie roja. En estadios menos avanzados de la enfermedad la disminución de la producción de IL-1 está relacionada con la infección precoz de las células del endotelio microvascular medular, que se infectan rápidamente e influyen sobre otras células del estroma de la médula ósea originando el fallo en el apoyo de éstas a la hematopoyesis y disminuyendo la producción de células rojas [179]. Estudios *in vitro* sugieren que la apoptosis de precursores eritroides es otro mecanismo de disminución de la eritropoyesis en los pacientes VIH positivos [180]. Otros estudios indican que las células progenitoras y la progenie que se encuentran en la médula ósea pueden ser infectadas por el VIH y expresar antígenos virales en su superficie que son reconocidos por los anticuerpos específicos [162]. En contra de lo esperado, en el estudio realizado en Malawi también se observó que la diseritropoyesis fue similar en el grupo de los niños VIH positivos y el grupo control, así como que el número de reticulocitos y de precursores más maduros de la línea roja era equivalente en ambos grupos, sugiriendo, esto último, que en los niños VIH positivos las fases más tardías de la eritropoyesis eran más eficientes que en los niños VIH negativos [178].

d) Anticuerpos anti-EPO circulantes y anemia hemolítica autoinmune

El papel de la EPO en la fisiopatología de la anemia asociada a VIH tampoco está del todo claro. Se ha observado que tanto la producción de EPO como su función, están alteradas en los individuos VIH positivos [173]. Los valores de EPO en pacientes adultos con VIH no se correlacionan con la gravedad de la anemia [180-182], e incluso pueden presentar valores comparables a los de los pacientes no anémicos [171]. Por el contrario, sólo existen dos estudios realizados en niños africanos y en ninguno de ellos se encontraron diferencias en los valores de EPO entre los niños VIH positivos y negativos a los 12 meses de edad [183], o incluso éstos fueron mayores entre los VIH positivos a los 6 meses de edad [184], aunque sí se observó una tendencia a presentar una menor respuesta a la EPO en los 3 primeros meses de vida [184]. En un estudio reciente se ha observado la existencia de similitud molecular ("*molecular mimicry*") entre la EPO y la proteína VIH-1 p17, lo que podría originar la síntesis de

autoanticuerpos frente a EPO en algunos pacientes con VIH, alterando así la respuesta de la EPO frente a la anemia [185].

La anemia hemolítica autoinmune en los pacientes con VIH parece estar relacionada con los iso-anticuerpos, principalmente anti-i y anti-I, que aparecen entre un 30 y un 60% de los pacientes VIH positivos. Los anticuerpos anti-i se asocian a las infecciones por el VEB y el citomegalovirus (CMV), frecuentes en estos pacientes, lo que podría explicar la presencia de auto-anticuerpos frente a las células de la serie roja [162].

- e) Infecciones relacionadas con el VIH como parvovirus, CMV, virus de las hepatitis y micobacterias.

La inmunodeficiencia asociada a la infección por VIH predispone a sufrir anemia asociada a la infección por el parvovirus B19. En varios estudios se ha demostrado que la presencia de signos de infección de este virus se asocian a menores niveles de Hb [186-188]. Por otro lado, se ha observado que tanto en adultos [189] como en niños VIH positivos [190] la prevalencia de anticuerpos IgM e IgG frente a parvovirus es mayor que en la población VIH negativa [189], lo que lleva a pensar que los pacientes VIH positivos tienen mayor riesgo de padecer anemia asociada a la infección por parvovirus. Aunque este aumento de la prevalencia de anticuerpos frente a parvovirus entre los VIH positivos no se ha confirmado en otros estudios [186, 187], es importante tenerlo en consideración ya que la infección por parvovirus B19 puede hacerse crónica asociándose a anemia de larga duración en pacientes con SIDA (generalmente en pacientes con recuento de CD4 menor de 100), así como en otros individuos menos inmunosuprimidos e incluso inmunocompetentes [187]. El diagnóstico de la infección por parvovirus en los casos de sospecha de anemia crónica debe realizarse mediante la demostración de DNA viral en el suero por RCP [188] o por hibridación “*dot blot*” [187], ya que en los pacientes con enfermedad avanzada puede no detectarse anticuerpos anti VP1 IgM e IgG. El tratamiento incluye la administración de inmunoglobulina específica [191], y en el caso de los pacientes VIH positivos el inicio del tratamiento antirretroviral, que revierte este tipo de anemia con la mejora de la inmunidad [192]. En la población pediátrica infectada por el VIH, dado que el parvovirus es una infección predominantemente infantil, es esperable que la prevalencia sea mayor que en adultos, pero los datos disponibles son escasos [187]. Un estudio realizado en población americana mostró que la infección por parvovirus B19 en estos niños sí parece asociar una disminución transitoria de los valores de Hb, pero que el desarrollo de anemia crónica asociado a la persistencia del virus es infrecuente [187].

- f) Medicaciones frecuentemente utilizadas en estos pacientes como zidovudina, cotrimoxazol o ganciclovir.

La zidovudina (AZT) es un antirretroviral usado habitualmente en la población pediátrica infectada por el VIH, que asocia el desarrollo de macrocitosis hasta en un 74% de los casos, pudiéndose acompañar o no de anemia. Cuando la anemia aparece suele ser leve y dosis dependiente. Menos frecuentemente, el uso de este fármaco se asocia a supresión en la médula ósea con disminución del número de reticulocitos y niveles altos de folato y vitamina B12 séricos [162].

El tratamiento con cotrimoxazol, frecuentemente utilizado en los pacientes VIH positivos puede asociar ocasionalmente la aparición de anemia, que es característicamente megaloblástica [100, 193]. Por otro lado, el uso de profilaxis con cotrimoxazol en niños VIH positivos se asocia a un incremento en los niveles de hemoglobina comparado con placebo [194].

g) Neoplasias que infiltran la médula ósea.

2.5 Influencia de la anemia materna en el recién nacido

La anemia neonatal secundaria a la deficiencia de hierro materna es rara, ya que durante la gestación la placenta se encarga de obtener el hierro necesario para el desarrollo del feto, aunque esto suponga un empeoramiento en los depósitos de hierro de la madre [34]. Sin embargo, es muy frecuente que los niños nacidos de madres que sufrieron anemia durante el embarazo presenten anemia durante el primer año de vida [195-197], ya que durante la gestación el feto debe acumular el hierro necesario para los seis primeros meses de vida, y esto se afecta por la deficiencia de hierro materna [34]. Otros estudios sin embargo, demuestran que los niveles de Hb y los indicadores férricos de los hijos de madres con anemia ferropénica se ven afectados por la cantidad de hierro que tienen sus madres al nacimiento [196, 198-200]. El uso de suplementos férricos durante el embarazo previene el desarrollo de anemia ligada a esta causa [195]. También se recomienda aportar suplementos de hierro a los niños con lactancia materna exclusiva a partir de los 6 meses, ya que aunque la leche materna tiene cantidades adecuadas de hierro en los primeros meses, estas disminuyen a partir del quinto mes independientemente del estado de los depósitos de hierro de la madre [53].

2.6. Impacto de la anemia en la salud infantil

El impacto que tiene la anemia en la salud infantil se puede agrupar en el asociado a la anemia grave, y el relacionado con la anemia moderada o leve. La consecuencia más directa de la anemia grave en la infancia es el desarrollo de insuficiencia cardíaca que puede asociar un final fatal [15, 201]. La anemia es una conocida causa de muerte hospitalaria, principalmente en los PRB y más específicamente en aquellos en los que la malaria es endémica. Incluso en las áreas donde las transfusiones están disponibles, la tasa de letalidad puede alcanzar el 18%, siendo mayor allí donde no lo están [134]. La proporción de muertes por esta causa tendría incluso más peso si se incluyeran los casos de muerte no hospitalaria, que parecen infravalorados debido a que el diagnóstico de anemia en las autopsias verbales es inusual [15]. Diferentes estudios han mostrado también que el hecho de sufrir anemia grave no sólo aumenta el riesgo de morir durante el ingreso, sino que este riesgo es aún más elevado después del alta hospitalaria [133, 201], y que se asocia además a nuevos episodios de anemia grave [133]. La anemia moderada también es una importante causa de muerte, ya que presentar anemia moderada (<8gr/dl) en el momento de ingresar, independientemente de la causa de admisión, también supone un factor de riesgo de mortalidad [202-204]. Además los individuos con anemia presentan alteraciones en la respuesta bactericida de los leucocitos y la

inmunidad celular, favoreciendo el desarrollo de infecciones [205]. La anemia de cualquier grado, principalmente secundaria a deficiencia de hierro, asocia un amplio abanico de alteraciones, como son la disminución de la capacidad cognitiva [46, 206, 207], alteraciones en el desarrollo psicomotor [45], limitación en la capacidad de trabajo y el esfuerzo físico [208] y empeoramiento de la calidad de vida [209]. Las alteraciones neurológicas (motoras, cognitivas y de comportamiento) asociadas a la deficiencia de hierro pre-latente [54] parecen ser reversibles, pero en lactantes en los que la deficiencia de hierro se asocia a anemia parecen ser irreversibles [210], ya que se pueden mantener hasta 10 [211] y 19 años después [212] de haberse resuelto la deficiencia de hierro que originó la anemia.

La presencia de anemia en la madre durante el embarazo es un factor de riesgo de parto pre-término y de nacimiento de niños con bajo peso, con las consecuencias que conllevan dichas patologías [213].

2.7 Tratamiento y prevención de la anemia

En las últimas décadas, con intención de disminuir las consecuencias asociadas a la anemia, se han realizado varias intervenciones para su prevención y tratamiento; a pesar de ello la anemia continúa siendo un grave problema de salud pública mundial [29, 90]. Dado que la deficiencia de hierro es la principal causa de anemia, inicialmente las políticas de prevención se centraron en esta deficiencia [41], recomendándose la modificación en la dieta, la fortificación alimentaria y los suplementos de hierro en los grupos de riesgo, entre ellos las embarazadas, los niños menores de 5 años y las niñas adolescentes, en aquellos lugares donde la prevalencia de anemia es un problema grave de salud pública [42]. En los últimos años se ha impulsado la idea de que estas políticas deben combinarse con otras intervenciones en aquellos lugares donde la deficiencia de hierro no es la única causa de anemia [16]. La OMS y UNICEF, en 2004 publicaron un documento donde destacaban la importancia de la multifactorialidad y de la variabilidad regional de la etiología de la anemia e impulsaban el desarrollo de estrategias de salud pública basadas en la evidencia y enfocadas a las necesidades de cada población [16].

En el año 2006, tras la publicación de los resultados del estudio de Pemba mencionado anteriormente (ver sección "*Deficiencia de hierro y malaria*") [76], la OMS convocó una consulta de expertos para aclarar el uso de los suplementos de hierro en las áreas con alta prevalencia de malaria. Del resultado de esa consulta en el año 2007 se publicaron las siguientes recomendaciones:

- Las políticas de tratamiento y prevención de la deficiencia de hierro en las áreas no endémicas de malaria no presentan ningún cambio respecto a las recomendaciones previas.
- Los lactantes y niños con malaria y deficiencia de hierro o anemia grave deben ser tratados con antimaláricos y antibióticos si procediera, y hierro administrado siempre con comida.

- En las áreas endémicas de malaria los suplementos de hierro no deben ser administrados sin un cribado previo para determinar la presencia de deficiencia de hierro.
- Los suplementos de ácido fólico o las comidas fortificadas con ácido fólico no deben ser administradas a lactantes y niños en lugares donde se usen antifolatos como antimaláricos [86].
- Las estrategias de control de la deficiencia de hierro se resumen en la tabla 3.

En el año 2011, resultados sobre la eficacia y la seguridad de los suplementos intermitentes de hierro llevaron a la OMS a publicar un nuevo documento sobre la prevención de anemia y deficiencia de hierro. Según este documento los suplementos intermitentes de hierro (una vez a la semana) se recomiendan en preescolares y escolares como prevención de la ferropenia para disminuir el riesgo de anemia en aquellos lugares donde la prevalencia de ésta sea superior al 20%. En las áreas endémicas de malaria los suplementos de hierro deben darse con “adecuadas medidas de prevención, diagnóstico y tratamiento” de la malaria. Se recomienda añadir ácido fólico una vez a la semana a dosis de 0.3 mgr en niños entre 24 y 59 meses y de 0.4 mgr para los mayores, aunque estimar la dosis adecuada para los suplementos intermitentes con este micronutriente está por determinar. En lugares donde la prevalencia de helmintos es endémica (más del 20%), se recomienda combinar los suplementos de hierro con el tratamiento para la helmintiasis en mayores de 5 años al menos una vez al año [214]. Los niños diagnosticados de anemia deberán ser tratados con hierro diariamente hasta la recuperación de las cifras de hemoglobina. Posteriormente pueden iniciar los suplementos intermitentes de hierro para evitar la reaparición de la anemia [214]. En los lugares donde la prevalencia de anemia sea más del 20%, también se recomienda el uso de múltiples micronutrientes para fortificar las comidas semisólidas en los niños entre 6 y 59 meses a partir de la introducción de la alimentación complementaria. Se recomienda administrarlos una vez al día, durante 2 meses, con 4 meses de descanso, iniciando posteriormente un nuevo ciclo. Los micronutrientes que se recomienda incluir son: 12.5 mgr de hierro elemental, 300 µgr de retinol y 5 mgr de zinc elemental. En las zonas endémicas de malaria estas medidas deben implementarse junto con medidas de prevención, diagnóstico y tratamiento de malaria [215].

Tabla 3: Estrategias de prevención de la deficiencia de hierro en lactantes y niños en áreas endémicas de malaria [86]

Lugares donde estén disponibles medidas de detección de ferropenia	Lugares donde NO estén disponibles medidas de detección ferropenia
<i>Prevención de la deficiencia de hierro en menores de 6 meses con bajo peso o pre-término</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Retraso en el pinzamiento del cordón umbilical • Suplementos de hierro durante 3 meses empezando a los 2 meses de edad • Los suplementos de hierro sólo deben darse junto con medidas de prevención y control de malaria (ver abajo) 	
<i>Prevención de la deficiencia de hierro en menores de 6 meses término y con peso adecuado</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Retraso en el pinzamiento del cordón umbilical • Suplementos de hierro durante 3 meses empezando a los 2 meses de edad sólo en los niños en los que se detecte deficiencia de hierro. Los suplementos de hierro sólo deben darse junto con medidas de prevención y control de malaria 	<ul style="list-style-type: none"> • Retraso en el pinzamiento del cordón umbilical • Suplementos de hierro durante 3 meses empezando a los 2 meses de edad sólo en los niños con síntomas de anemia grave. Los suplementos de hierro sólo deben darse junto con medidas de prevención y control de malaria
<i>Prevención de la deficiencia de hierro en los niños de 6 a 24 meses</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Procesar alimentos complementarios fortificados con hierro, y si no están disponibles tratamiento con hierro durante 3 meses sólo en lactantes y niños con deficiencia de hierro demostrada. • El hierro debe ser administrado siempre con comida y junto con medidas de prevención y tratamiento de malaria. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procesar alimentos complementarios fortificados con hierro, y si no están disponibles tratamiento con hierro durante 3 meses sólo en lactantes y niños con síntomas de anemia grave. • El hierro debe ser administrado siempre con comida y junto con medidas de prevención y tratamiento de malaria.
<i>Prevención y control de la malaria en todos los casos</i>	
Suministro de redes mosquiteras impregnadas y control de vectores para la prevención y tratamiento de malaria con antimaláricos efectivos	

Estas recomendaciones resultan ambiguas y de difícil aplicación. Como se ha descrito, en los lugares con alta prevalencia de infecciones las herramientas adecuadas para demostrar la deficiencia de hierro no están disponibles, por lo que los suplementos de hierro se deberían dar sólo en los individuos con síntomas de anemia grave (ver sección *Diagnóstico de la anemia ferropénica*). Por otro lado, se podría interpretar que la anemia podría usarse como herramienta para el diagnóstico de la deficiencia de hierro. Igualar anemia a deficiencia de hierro no es correcto, pero permitiría el tratamiento de los niños anémicos y/o deficientes de hierro antes de presentar síntomas de anemia grave. En ambos casos no se realizaría prevención de la deficiencia de hierro y de la anemia asociada a ésta, sino tratamiento de la anemia, lo que impediría evitar la morbilidad asociada a la deficiencia de hierro y a la anemia moderada y leve. Por otro lado, la descripción de las “adecuadas medidas de prevención, diagnóstico y

tratamiento” de la malaria también resultan ambiguas con un amplio margen de interpretación, lo que podría limitar aún más la administración de los suplementos de hierro en las zonas endémicas de malaria.

Por último, la OMS recomienda además la administración de suplementos de vitamina A, lo que se ha visto que puede disminuir la anemia en la mayoría, aunque no en todos los estudios publicados [216]. Los mecanismos para este efecto no son del todo conocidos, pero parece que la vitamina A estimula la eritropoyesis incrementando la producción de EPO, y la facilita movilizándolo los depósitos de hierro. El objetivo de esta política de salud pública no es disminuir la anemia, sino disminuir la prevalencia de ceguera secundaria a la deficiencia de vitamina A y disminuir la morbi-mortalidad infantil debida principalmente a infecciones como el sarampión y la diarrea, por lo que se recomienda en niños de 6 a 59 meses de edad en entornos en los que la carencia infantil de vitamina A supere el 20%, o la ceguera nocturna supere el 1% en niños de 24 a 59 meses [8]. Todo ello se resume en el último documento publicado por la OMS en materia de nutrición [217].

3. Exposición perinatal al VIH/SIDA como causa de morbi-mortalidad infantil

3.1 Perspectiva histórica

La infección por el VIH es una enfermedad de reciente aparición. Se describió inicialmente en 1981, cuando se diagnosticaron los primeros casos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* y sarcoma de Kaposi en hombres jóvenes homosexuales que posteriormente se demostró que eran inmunodeprimidos. Esta patología se identificó entonces como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pero el virus causante y su fisiopatología no empezó a vislumbrarse hasta 1983 [218]. Los factores de riesgo para padecer VIH/SIDA inicialmente identificados en la población americana fueron la homosexualidad masculina, el tratamiento previo con derivados sanguíneos, el origen haitiano, y el uso de drogas parenterales. Estudios realizados en África encontraron que en estas poblaciones los factores de riesgo (promiscuidad heterosexual y residencia urbana) diferían respecto a los descritos en Europa y EEUU [219, 220].

El primer caso de SIDA infantil, adquirido mediante una transfusión sanguínea, se publica en 1983 [221]. Un mes después se sugiere la posibilidad de la transmisión vertical, al diagnosticarse la infección por VIH en un niño sin antecedentes de transfusión nacido en el seno de una familia con factores de riesgo para la enfermedad [222]. Esta teoría se confirma al poco tiempo al aparecer otros casos similares [223]. En 1985 se constata la lactancia materna como nueva posible vía de transmisión madre-hijo [224]. En ese año ya se tiene constancia de 50 casos de SIDA pediátrico en EEUU [225] y de la existencia de más casos en Europa. La primera descripción de casos de SIDA en niños africanos se realiza en pacientes de origen centroafricano ingresados en hospitales de Bélgica entre 1979 y 1983 [226]. Unos años después, un estudio realizado en el Zaire mostró que hasta un 11% de los niños hospitalizados en un área de la capital eran VIH positivos y que presentaban una mayor mortalidad que los niños seronegativos [227]. Ya para entonces era un problema de salud pública que se extendía por otros países africanos.

3.2. Incidencia y prevalencia del VIH

La infección por VIH es una pandemia con importantes consecuencias a nivel mundial. En el año 2012, 35,3 millones de personas vivían con VIH, siendo 3,3 millones niños. El número total de personas infectadas en los últimos años ha aumentado debido a un mayor acceso al tratamiento antirretroviral (9,7 millones de personas, 40 veces más respecto a 2002). Desde el año 2001, la mortalidad ha descendido en niños y adultos un 29%, y el número de nuevos casos infantiles ha decrecido un 51%. A pesar de ello, en el año 2012 aún fueron registradas 210.000 muertes y 260.000 nuevos casos en la edad pediátrica [228].

África subsahariana es la región del mundo más afectada por el VIH con un 68% de la población infectada, y con el 91% de los nuevos casos infantiles [228]. Dentro del continente africano, el sur es la zona más afectada por esta pandemia. El 40% de todas las mujeres con

VIH residen en 10 países en el sur de África y esta enfermedad llega a ser responsable del 35% de las muertes infantiles [229].

Mozambique, con 1,4 millones de individuos infectados, es uno de los 10 países más afectados por el VIH/SIDA en el mundo [229]. Según la primera encuesta poblacional nacional realizada en Mozambique en 2009, la prevalencia general en individuos entre 15 y 49 años fue del 15%, siendo del 19% en el sur del país. Sin embargo, un estudio comunitario transversal llevado a cabo para determinar la prevalencia de VIH de los individuos entre 18 y 47 años en Manhiça (una zona semi-rural del sur de Mozambique), mostró una prevalencia total del 40%, siendo del 24% en individuos de 18 a 27 años, del 43% en el grupo de 28 a 37 años y del 45% en los individuos de 38 a 47 años. La prevalencia fue mayor en mujeres que en hombres en todos los grupos [230]. En esa misma región, la incidencia estimada mediante datos obtenidos entre los años 1999 y 2008 aumentó de 3,5 casos cada 100.000 personas-año en 2001, hasta 14 casos cada 100.000 personas-año en 2004, con estabilización posterior de 12 casos cada 100.000 personas-año en 2008 [231].

Datos nacionales publicados en el año 2010 por el Ministerio de Salud del país mostraron que la prevalencia en niños hasta 11 años de edad era de 1,4%, sin presentar diferencias entre sexos. La prevalencia mayor (2,3%) se observó en los niños menores de un año ya que la principal vía de transmisión es la vertical. En el grupo de entre 1 y 5 años la prevalencia descendió a un 1%, debido a la alta mortalidad durante el primer año de vida de los niños infectados. A partir de los 5 años se observó un leve ascenso debido a la aparición de casos nuevos adquiridos por otras vías de transmisión (abuso sexual, transfusiones sanguíneas, escarificaciones rituales...) [232].

3.3 Transmisión vertical de VIH en niños

La transmisión madre-hijo de VIH (TMH-VIH) es el término que se utiliza para definir la transmisión vertical del virus de una madre infectada a su hijo durante el embarazo, el parto o la lactancia materna. La mayoría de los niños que adquieren esta enfermedad lo hacen mediante esta vía de transmisión. El riesgo de TMH-VIH sin ninguna medida profiláctica durante el embarazo y el parto es de entre un 15% y un 30%. Si además se amamanta al recién nacido, el riesgo aumenta entre un 5% y un 20%, con una tasa total de transmisión de un 20-45% [233]. Sin embargo el uso de profilaxis antirretroviral en la madre y en el niño, el parto por cesárea (previo al inicio del trabajo del parto y la ruptura de membranas) y el uso de fórmula artificial pueden reducir la TMH-VIH a menos del 1-2% en países desarrollados [234, 235].

En 1994 se demostró que el uso de AZT precozmente durante el embarazo, administrado intravenoso a la madre durante el parto y oral durante 6 semanas en el recién nacido podía disminuir la TMH-VIH de un 25% a un 8% [236]. Desde entonces se han realizados múltiples estudios para evaluar la eficacia de terapias con diferentes fármacos antirretrovirales, así como combinaciones de ellos cuyos resultados han guiado las recomendaciones de la profilaxis de TMH-VIH hasta la actualidad.

En los PRB, dado que el parto por cesárea electiva antes del inicio de la ruptura de membranas es poco factible [237] y el acceso a los antirretrovirales continúa siendo una ardua tarea (sólo el 62% de las mujeres embarazadas tuvieron acceso a la profilaxis con terapias combinadas de antirretrovirales en 2012), las diferentes recomendaciones han tenido que adaptarse a la situación de cada país e incluso de cada región [228]. En estos lugares los esfuerzos para prevenir la TMH-VIH se centraron inicialmente en disminuir el tiempo de exposición de los niños al virus, reduciendo el trabajo de parto. Posteriormente, se inició el uso de los antirretrovirales como profilaxis de transmisión vertical, inicialmente en regímenes más sencillos como la dosis única de nevirapina y posteriormente más amplios, reduciendo así la transmisión durante el embarazo y parto a un 2-4% [238, 239].

Por otro lado, en estos países la recomendación de realizar lactancia artificial exclusiva en los hijos de madres VIH positivas es una opción en ocasiones no factible y poco segura. Las enfermedades infecciosas asociadas a la lactancia artificial ocasionan más muertes que los nuevos casos de infección por VIH secundarios a la lactancia materna [240]. Para evitar este riesgo, la OMS recomienda el uso de la lactancia artificial sólo cuando es AFASS (aceptable, factible, asequible, sostenible y segura). Cuando esto no es posible, se recomienda continuar amamantando al bebé hasta que la discontinuación de la lactancia materna sea factible. Siguiendo estas recomendaciones generales, la OMS ha realizado varias guías para orientar la alimentación de los hijos nacidos de madres VIH positivas en los últimos años [12, 21, 229, 241, 242].

3.4 Estrategias actuales para la prevención de la transmisión vertical del VIH

Las estrategias para la prevención de la transmisión vertical han variado mucho desde su inicio y, aunque responden a una base común, la recomendación para los países de renta alta no siempre ha sido aplicable en los PRB. En 2013 la OMS publicó un documento donde se resume el uso de antirretrovirales para la prevención de la TMH-VIH basándose en la evidencia disponible. En esa guía se recomiendan dos opciones:

- a) Suministrar tratamiento antirretroviral a todas las mujeres embarazadas a partir de las 14 semanas de edad gestacional y madres lactantes durante el periodo de riesgo de TMH-VIH (todo el tiempo que dure la lactancia), y posteriormente continuarlo en aquellas elegibles para ser tratadas ($CD4 \leq 500 \text{ cel/mm}^3$ o estadio clínico de la OMS 3 ó 4 en el momento de iniciar el tratamiento) para su propia salud (opción B).
- b) Suministrar tratamiento antirretroviral para toda la vida a todas las mujeres embarazadas a partir de las 14 semanas de edad gestacional y madres lactantes con VIH independientemente de su estatus inmunológico y de sus niveles de CD4, para prevenir la TMH-VIH y para tratar la salud de la mujer (opción B+) [242].

En aquellos países en los que no se recomiende la lactancia artificial para los hijos de las madres infectadas por VIH, se recomendará la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida. A partir de esa edad se introducirá la alimentación complementaria

continuando con la leche materna hasta que se cumpla el año de edad y esté asegurada la nutrición mediante una dieta sin lactancia materna [242].

La combinación fija de tenofovir (TDF) con lamivudina (3TC) o emtricitabina (FTC) y efavirenz (EFV) administrada una vez al día, es la primera línea de tratamiento antirretroviral recomendada para mujeres embarazadas (incluyendo el primer trimestre) y madres lactantes. Los hijos de las madres que reciben tratamiento antirretroviral y que están siendo amamantados deben recibir profilaxis con nevirapina diaria durante 6 semanas. Los niños que son alimentados con fórmula artificial deben recibir profilaxis de 4 a 6 semanas con nevirapina en una dosis diaria o AZT dos veces al día [242].

3.5 Impacto de la exposición al VIH en los hijos de madres VIH positivas

El número de niños infectados por el VIH en el mundo, aunque todavía elevado, está descendiendo debido a la mejora en la prevención de la transmisión vertical. Por el contrario, los hijos de madres infectadas por el VIH que a pesar de exponerse al virus no se infectan, van en aumento debido a las elevadas prevalencias de VIH, principalmente en el sur de África, al aumento de la supervivencia de las madres infectadas, así como a la mejora en la prevención de la TMH-VIH. Los niños expuestos pero no infectados (ENI), aunque con mejor pronóstico que los VIH positivos, presentan un mayor riesgo de sufrir alteraciones hematológicas y clínicas, comparados con los niños no expuestos. A pesar de ello, la información disponible sobre este grupo continúa siendo escasa, en ocasiones contradictoria, y por ello las políticas de salud pública relacionadas con ellos son prácticamente inexistentes [17]. La mayoría de los estudios sobre los niños ENI se han realizado en Europa y EEUU, con poblaciones que no son comparables a las africanas, ya que en esos países la población infantil expuesta al VIH generalmente pertenece a una clase social marginal y sus madres son frecuentemente consumidoras de drogas por vía parenteral. Por otro lado, en África estos niños están expuestos a una mayor carga de enfermedades como la malaria y la desnutrición entre otras, suelen ser amamantados, y no tienen acceso a la profilaxis con antirretrovirales equivalente a la de los países de mayor renta. Entre los estudios realizados en África subsahariana, muchos se han realizado sin un grupo control de madres VIH negativas, o no han sido diseñados para estudiar los niños ENI [22, 24, 26, 243].

3.5.1 Alteraciones hematológicas e inmunológicas asociadas a la exposición del VIH materno

La presencia de anemia en los niños ENI se ha descrito en varios estudios, pero la mayoría de ellos se realizaron en sujetos expuestos a antirretrovirales, por lo que se responsabiliza a estos fármacos de las alteraciones hematológicas encontradas [236, 244, 245]. Los niveles disminuidos de Hb se asocian principalmente al uso de AZT y se relacionan inversamente con la duración del tratamiento de la madre y del niño [236, 246]. El uso de triple-terapia en la madre, principalmente si incluye un inhibidor de la proteasa, también es un factor de riesgo de anemia en los niños ENI [247-249]. La anemia asociada a la exposición a

antirretrovirales es macroscópica y suele resolverse en los 3 primeros meses de vida [245, 247, 250, 251].

El VIH parece afectar también directamente a la formación de células sanguíneas en los hijos de madres infectadas, como se deduce de las alteraciones en la hematopoyesis observadas en los fetos de estas mujeres [252], así como de la presencia de menores cifras de Hb en niños ENI respecto a niños no expuestos en cohortes que no recibieron antirretrovirales [253].

Otros cambios observados en los niños ENI, la mayoría de ellos expuestos a antirretrovirales, son menores cifras de leucocitos, neutrófilos y linfocitos [245, 247, 248]. En algunas cohortes europeas se ha observado neutropenia en más de un 40% de los casos. Ésta se resuelve generalmente en los primeros 3 meses, aunque en ocasiones se alarga hasta los 18 meses [245, 247, 248]. Otras cohortes africanas no han podido confirmar estos hallazgos [254, 255].

En los niños ENI también se ha descrito un aumento de las células CD8 y una disminución de las células CD4 [256-259], así como un incremento de células memoria junto a un descenso de las células naive (CD4 y CD8) [260]. La duración de estos hallazgos no está claramente definida ya que, aunque parece que las poblaciones celulares se normalizan antes del primer año de edad, algunos estudios han observado que se mantienen alteradas hasta la adolescencia incluso en cohortes no expuestas a antirretrovirales [261, 262]. Los niños ENI presentan además una menor producción tímica y una mayor activación inmune comparado con los niños no expuestos al VIH [263-265]. Del mismo modo la inmunidad humoral también está afectada en estas poblaciones. Los niños ENI presentan menores niveles de anticuerpos frente a patógenos habituales como *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Bordetella pertussis*, neumococo y tétanos [266].

Las consecuencias clínicas de estas alteraciones inmunológicas no se conocen, pero podrían ser las responsables del aumento de la morbi-mortalidad de estos niños [17]. El menor tamaño del timo observado en los niños ENI se asocia a una mayor mortalidad a los 6 meses de edad [263, 267-269]. Sin embargo la neutropenia descrita en cohortes europeas no se asocia con infecciones bacterianas graves [247]. La respuesta a vacunas sí parece estar alterada en los niños ENI, ya que presentan una menor respuesta a vacuna BCG [270], aunque no se ha confirmado en todos los estudios [271]. La proporción de niños que no responden a la vacuna frente al virus de la hepatitis B es mayor en el grupo de ENI comparado con los niños no expuestos al VIH. Estos niños también presentaron concentraciones menores de anticuerpos post-vacunales frente al tétanos y la difteria, aunque en valores normales de protección [272]. Estas respuestas vacunales alteradas no parecen estar relacionadas con los niveles de CD4, sino con cambios funcionales de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos [272]. Por otro lado, diferentes estudios han encontrado respuestas a vacunas frente a Hib, tétanos [266] y sarampión [273] similares entre los niños ENI y los niños no expuestos al VIH e incluso respuestas más robustas entre los ENI a las vacunas frente a neumococo y *Bordetella pertussis* [266]. Se ha sugerido que esto último podría ser debido a la

presencia de una menor concentración de anticuerpos específicos transferidos por la madre, que conllevaría una menor interacción de éstos con los antígenos vacunales induciendo una mayor respuesta [274].

El origen de las alteraciones inmunológicas observadas en estos niños tampoco está del todo claro. Aparte de que puedan ser secundarios a la exposición a antirretrovirales, la exposición directa al VIH también podría ser la causa. Un porcentaje elevado de los recién nacidos hijos de madres VIH positivas que permanecen negativos presentan respuestas específicas al VIH, lo que demuestra un contacto del sistema inmunológico del niño con el virus durante el embarazo, a pesar de que no haya habido infección [275-279]. Las respuestas específicas de la placenta de las madres infectadas y la alteración de su sistema inmune, también podrían jugar un papel en el desarrollo de las alteraciones inmunitarias de sus hijos [256]. Asimismo, una menor transferencia de anticuerpos placentarios [266, 280], o de factores inmunitarios a través de la lactancia materna también se han propuesto como posibles causas [17]. Las madres VIH positivas presentan menores niveles de determinados anticuerpos (Hib y neumococo), pero no de otros (*Bordetella pertussis* o tétanos), por lo que esto podría explicar sólo parcialmente los hallazgos encontrados [266]. Por otro lado, otros autores no hallaron diferencias en las concentraciones de factores inmunitarios en la leche materna entre las madres VIH positivas y las negativas [281].

3.5.2 Morbi-mortalidad en los niños expuestos al VIH no infectados

Según numerosos estudios, los niños ENI en África, tienen mayor riesgo de morir [18, 25-27, 282] y de enfermar que los niños no expuestos al VIH [22, 27, 28, 283, 284]. Sin embargo, en otros estudios también en África se ha observado que los indicadores de salud de estos niños comparados con los de los niños no expuestos son similares [23, 243, 285], al igual que en series europeas y americanas [286]. Una posible explicación para las diferencias entre estudios es que la mayor morbi-mortalidad no se deba a la exposición al VIH en sí misma, sino a otros factores de riesgo inespecíficos como la enfermedad y muerte materna, la anemia materna, el bajo nivel socioeconómico, el tipo de alimentación, el bajo peso al nacimiento, la prematuridad o la carga de enfermedad a la que están expuestos [17, 18, 283, 287].

Por otro lado, en los niños ENI se han descrito casos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, un patógeno oportunista asociado a la infección por VIH [28], así como otras infecciones graves normalmente sólo presentes en inmunodeficientes [288]. Los niños ENI también presentan una predisposición especial a sufrir patología respiratoria más grave [289], incluso con ratios de infecciones respiratorias equivalentes a los niños VIH positivos [290], así como una mayor incidencia de infecciones por estreptococo del grupo B, principalmente postnatales, y de mayor gravedad que en la población general [291]. Además, los estudios que han encontrado diferencias en la morbilidad, más frecuentemente lo han hecho entre las series de niños más graves (aquellos que necesitaron ingresos) [281, 292], mostrando peor respuesta al tratamiento [293, 294], así como anemia más grave en los ingresos por malaria [295]. De

esto se deduce que puede que no existan grandes diferencias en el número de eventos, pero si en la gravedad de éstos [284].

Las niños ENI por el VIH que han estado expuestos a antirretrovirales, también presentan alteraciones cardíacas que pueden empeorar su pronóstico, haciendo necesario un especial seguimiento de este tipo de patología [296]. Así mismo, tienen un peor pronóstico postoperatorio, con un mayor riesgo de presentar infecciones y otras complicaciones postquirúrgicas [297].

3.5.3. Factores de riesgo para un peor pronóstico en los niños ENI

Existen varios factores de riesgo que se han relacionado con un peor pronóstico en los niños ENI. Algunos de ellos son la muerte materna [22], la gravedad de la enfermedad de la madre [298], los CD4 maternos [282, 286, 292, 298], la carga viral materna [298], la anemia materna [299] o el bajo peso al nacimiento [300]. Junto a ellos, las recomendaciones de limitar la lactancia materna en los hijos de madres VIH positivas, se ha demostrado como un importante factor de riesgo de morbi-mortalidad [2, 240], y se considera el principal factor modificable [17]. Además se considera un factor de confusión, ya que es la principal diferencia entre cohortes de niños expuestos y no expuestos al VIH en diversos estudios [17].

La OMS recomienda la lactancia artificial para los hijos de madres VIH positivas siempre que esta sea AFASS, lo que en África subsahariana ocurre excepcionalmente [301]. En caso contrario se recomienda lactancia materna hasta que el niño tenga acceso a una dieta segura y equilibrada. La dificultad de la aplicación de estas recomendaciones ha llevado a las madres VIH positivas a un desmame precoz de sus hijos en ausencia de una alternativa AFASS, con el consiguiente aumento de la exposición a patógenos y alteración de sus funciones inmunitarias y su crecimiento [17]. Por otro lado, debido a la asociación entre la TMH-VIH y la lactancia mixta, en muchos casos el desmame fue abrupto lo que empeoró el estado nutricional de esos niños sin un aumento de la supervivencia libre de VIH [302]. Por el contrario, el hecho de que la mayoría de las infecciones observadas en los niños ENI sean de origen respiratorio, apoya el hecho de que la mayor morbilidad en estos niños no se debe sólo al tipo de alimentación, ya que la lactancia materna se asocia principalmente a una disminución de infecciones gastrointestinales [284]. Además, también se han observado peores indicadores de salud en niños ENI comparado con niños no expuestos en estudios en los que ambos siguieron un tipo de alimentación similar [282, 292, 303].

La desnutrición también se ha propuesto como una posible causa de mal pronóstico en los niños ENI, como sugiere un estudio en niños post-operados [297]. Los niños ENI presentaron peores curvas de crecimiento que los niños no expuestos, principalmente en los primeros meses de vida, sólo para algunos de los parámetros estudiados y de forma limitada en el tiempo [282, 303-305]. Algunos autores sugieren que las diferencias observadas en las curvas de crecimiento podrían ser secundarias al bajo peso al nacimiento de algunos de estos niños [282, 304]. Otra posible explicación es la menor producción de leche de la madres VIH positivas más enfermas, que presentan mastitis frecuentemente [305]. Las diferencias, aunque

estadísticamente significativas, son transitorias y pequeñas (0.2-0.3 Z score), y no se han observado en todos los estudios en los que la cohorte de niños ENI presentaron peor pronóstico [284].

La mayor exposición de los niños ENI a otras infecciones frecuentes en sus padres inmunodeprimidos, como tuberculosis, *P. jirovecii* o citomegalovirus, es otro factor de riesgo añadido en estos niños.

En un estudio realizado en el año 2012 se analizó la prevalencia de las infecciones graves en los niños ENI controlando factores como bajo peso al nacimiento, prematuridad, calendario vacunal desactualizado, desnutrición, anemia en el niño o inmunosupresión materna, pero los resultados continuaron mostrando peores índices sanitarios entre los niños ENI, lo que demuestra la cantidad de factores involucrados y la complejidad de controlarlos [284]. La siguiente figura resume todos estos factores:

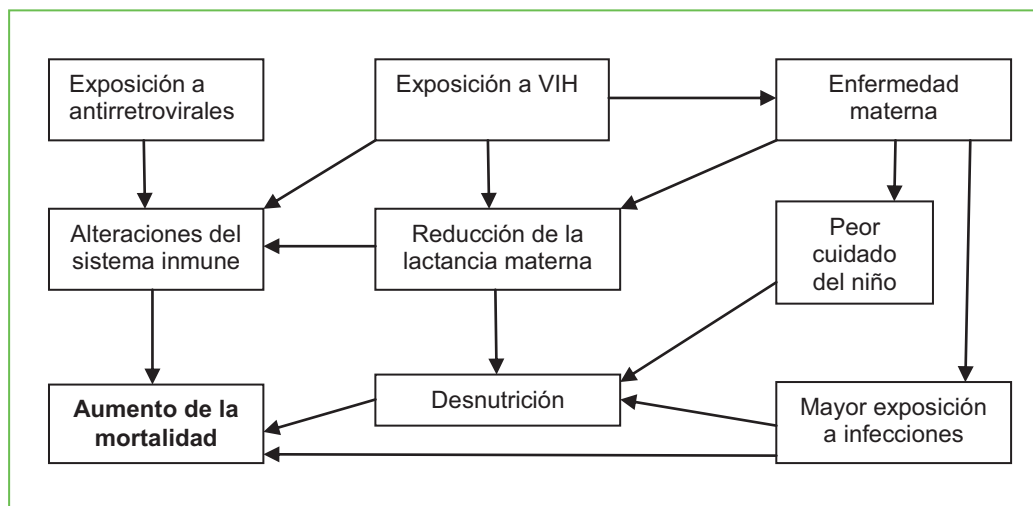


Figura 2: Mecanismos que pueden contribuir a la mayor morbilidad y mortalidad de los niños ENI. Adaptación de la figura de S. Filteau [17].

II. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

- La etiología de la anemia en niños en edad preescolar en África subsahariana, aun siendo multifactorial, puede variar según las regiones y la gravedad de la anemia. Las infecciones como la malaria y las deficiencias nutricionales como la deficiencia de hierro son las principales causas de anemia en esta población.
- Los niños VIH negativos nacidos de madres VIH positivas tienen más riesgo que los hijos de madres VIH negativas de presentar anemia, inmunidad alterada y una mayor morbilidad.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Profundizar en el conocimiento de la anemia y la exposición perinatal al VIH en niños en edad preescolar de un área semi-rural del Sur de África con el fin de orientar políticas de salud pública que disminuyan su frecuencia y consecuencias.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las principales etiologías de anemia en niños menores de 5 años.
- Determinar el papel que tienen la hemozoína y los gametocitos de *Plasmodium falciparum* en la médula ósea en la patogenia de la anemia asociada a malaria.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores existentes para el diagnóstico de la deficiencia de hierro en un área con alta prevalencia de infecciones.
- Evaluar el impacto de la exposición al VIH en los parámetros hematológicos e inmunológicos en lactantes VIH negativos hijos de madres VIH positivas.
- Describir la morbilidad durante el primer año de vida de los lactantes VIH negativos hijos de madres VIH positivas.

III. Materiales y métodos

El trabajo de campo de los estudios descritos en esta tesis se ha realizado en el Centro de Investigación de Manhiça (CISM), y en el Hospital Distrital de Manhiça (HDM). Ambos se encuentran situados en el distrito de Manhiça, en la provincia de Maputo, en el Sur de Mozambique. Mozambique es un país del cono Sur de África. La figura 3 muestra su situación en el continente africano. Su índice de desarrollo humano en el año 2012 fue 185 de 186 países [306].

Figura 3: Situación de Mozambique en el mapa del cono Sur de África



Manhiça es un área semi-rural situada a 80 kilómetros al norte de la capital del país, Maputo. Esta región, situada a las orillas del río Incomati, tiene una extensión de 2.380 Km² y una población registrada en el censo de 2007 de 157.642 habitantes, 12% de los cuales eran niños menores de 5 años. Su economía se basa en la agricultura de subsistencia. La figura 4 muestra el distrito de Manhiça.

Desde 1996, el CISM mantiene un sistema de vigilancia demográfica [307] que en el año 2009 abarcaba una población de 84.726 habitantes (18% menores de 5 años) en un área de unos 500 Km². El sistema de vigilancia se mantiene actualizado mediante un sistema de rotación que permite visitar todos los agregados familiares cada 6 meses e identificar a cada uno de los aproximadamente 10.000 niños menores de 5 años del área. Los nacimientos, las muertes, los movimientos migratorios y los embarazos son registrados, así como cada visita realizada al hospital o a cualquiera de los centros de salud periféricos. En el momento de realizarse el estudio, el HDM daba servicio a una población de 140.000 habitantes y contaba con una zona de ingreso de 110 camas, consultas externas, servicio de urgencias hospitalarias de 24 horas y un quirófano. Existía además un hospital para pacientes infectados por el VIH

que atendía a cerca de 1.000 niños menores de 15 años, de los cuales 175 se encontraban en tratamiento antirretroviral.

La tasa de mortalidad en menores de 5 años fue de 138,6/1.000 en 2005 [307]. Las principales causas de muerte fueron malaria, infecciones respiratorias y VIH/SIDA [308]. La transmisión de malaria en Manhiça es perenne, con una marcada estacionalidad en la época de lluvias que abarca de noviembre a abril, y principalmente debida a *Plasmodium falciparum* [309]. El principal vector involucrado es el mosquito *Anopheles funestus* y la tasa de inoculación entomológica en el 2002 era de 38 picaduras infectivas por persona y año [310]. La transmisión vertical de VIH en el primer mes de vida era del 12% y el riesgo general de transmisión de VIH durante el primer año ascendía al 26% [311].

Figura 4: Distrito de Manhiça.



Obtenido de www.manhica.org. Acceso 1 de abril de 2014.

IV. Resultados

Artículo 1: Etiología de la anemia en niños de un área semi-rural de Mozambique

Cinta Moraleda, Ruth Aguilar, Llorenç Quintó, Tacilta Nhampossa, Montse Renom, Augusto Nhabomba, Sozinho Acácio, John J. Aponte, Delino Nhalungo, Ariel H. Achtman, Louis Schofield, Helder Martins, Eusebio Macete, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez

Resumen

Antecedentes y objetivos

Los grados moderados de anemia también se asocian a una mayor morbi-mortalidad. A pesar de esta evidencia, los programas para el control de la anemia son deficientes, reflejando el escaso conocimiento sobre la contribución de las diferentes etiologías de la anemia. Con la intención de mejorar el control de la anemia en las poblaciones más vulnerables se realizó un estudio para determinar su etiología en niños africanos en edad preescolar.

Métodos

Se llevó a cabo un estudio en Mozambique de casos y controles, siendo los casos 443 niños preescolares hospitalizados con anemia (concentración de Hb < 11gr/dl) y los controles comunitarios 289 niños sin anemia. Se realizaron análisis univariado y de regresión logística multivariable para identificar los factores de riesgo asociados a la anemia y se estimaron sus fracciones atribuibles ajustadas (AAF).

Resultados

La infección por malaria (odds ratio ajustado (AOR)=8,39, $p<0,0001$; AAF=37%), el bajo peso para la altura (AOR=8,10, $p<0,0001$; AAF=43%), la deficiencia de pre-albúmina (AOR=7,11, $p<0,0001$; AAF=77%), la deficiencia de albúmina (AOR=4,29, $p=0,0012$; AAF=30%), la infección por VIH (AOR=5,73, $p=0,0060$; AAF=18%) y la deficiencia de hierro (AOR=4,05, $p<0,0001$; AAF=53%) se asociaron con anemia. La deficiencia de vitamina A y la alfa-talasemia fueron frecuentes (69% y 64%, respectivamente en casos), pero no se asociaron con la anemia de manera independiente. La bacteriemia (Odds ratio (OR)=8,49, $p=0,004$), la infección por Parvovirus-B19 (OR=6,05, $p=0,017$) y la infección por VEB (OR=2,10, $p=0,0015$) se relacionaron con anemia sólo en el análisis no ajustado. Ni la deficiencia de vitamina B12, ni los parásitos intestinales, se asociaron con anemia.

Conclusiones

La desnutrición, la deficiencia de hierro y las infecciones por malaria y VIH son las principales causas de anemia en los niños mozambiqueños preescolares. Es necesario reforzar los programas efectivos y las estrategias para la prevención y el manejo de estas patologías. A pesar de ello, la deficiencia de hierro, una condición frecuente, prevenible y tratable permanece olvidada por la comunidad de la salud pública internacional.

**Etiology of anemia in children from a rural area in
Mozambique**

Journal:	<i>Pediatrics</i>
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Regular Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Moraleda, Cinta; Barcelona Institute for Global Health, Maternal, Child and Reproductive Health Initiative; Manhiça Health Research Center, CISM Aguilar, Ruth; Barcelona Institute for Global Health, CEK; CIBER Epidemiology and Public Health , CIBERESP Quinto, Llorenç; Barcelona Institute for Global Health, Statistics Nhampossa, Tacilta; Manhiça Health Research Center, CISM Renom, Montse; Barcelona Institute for Global Health, Maternal, Child and Reproductive Health Initiative; Manhiça Health Research Center, CISM Nhabomba, Augusto; Manhiça Health Research Center, CISM Acacio, Sozinho; Manhiça Health Research Center, CISM Aponte, John; Barcelona Institute for Global Health, Statistics; Manhiça Health Research Center, CISM Nhalungo, Delino; Manhiça Health Research Center, CISM Achtman, Ariel; Walter and Eliza Hall Institute Medical Research, Infection and Immunity; University of Melbourne, Medical Biology Schofield, Louis; Walter and Eliza Hall Institute Medical Research, Infection and Immunity; University of Melbourne, Medical Biology; James Cook University, Australian Institute of Tropical Health and Medicine Martins, Helder; Manhiça Health Research Center, CISM Macete, Eusebio; Manhiça Health Research Center, CISM; Ministry of Health, National directorate of Health Alonso, Pedro; Barcelona Institute for Global Health, Direction; Manhiça Health Research Center, CISM Menendez, Clara; Barcelona Institute for Global Health, Maternal, Child and Reproductive Health Initiative ; Manhiça Health Research Center, CISM; CIBER Epidemiology and Public Health, CIBERESP
Keyword/Topic:	Blood Disorders < Hematology/Oncology, Public Health

Etiology of anemia in children from a rural area in Mozambique

Cinta Moraleda M.D.^{1,2}, Ruth Aguilar Ph.D.^{1,2,3}, Llorenç Quintó BSc., MPH.¹, Tacilta Nhampossa M.D.², Montserrat Renom M.D.^{1,2}, Augusto Nhabomba MSc.², Sozinho Acácio M.D.², John J. Aponte M.D., Ph.D.^{1,2}, Delino Nhalungo MSc.², Ariel H. Achtman Ph.D.^{4,5}, Louis Schofield Ph.D.^{4,5,6}, Helder Martins M.D.², Eusebio Macete M.D., Ph.D.^{2,7}, Pedro L. Alonso M.D., Ph.D.^{1,2}, Clara Menéndez M.D., Ph.D.^{1,2,3}

Affiliations: ¹Barcelona Institute for Global Health, Barcelona, Spain

²Manhiça Health Research Center (CISM), Manhiça, Mozambique

³CIBER Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain

⁴Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research, 1G, Royal Parade, Parkville Victoria 3052, Australia

⁵Department of Medical Biology The University of Melbourne, Victoria, Australia

⁶Australian Institute of Tropical Health and Medicine. James Cook University. PO Box 6811, Cairns QLD 4870, Australia

⁷National Directorate of Health, Ministry of Health, Maputo, Mozambique

Address correspondence to: Clara Menéndez, Barcelona Institute for Global Health, Barcelona, Spain. Rosselló 132, 5th floor, E-08036, Barcelona, Spain. Telephone +34 93 227 5400 - ext 3116; Fax +34 93 227 1850; E-mail: menendez@clinic.ub.es

Short title: Etiology of pediatric anemia in sub-Saharan Africa

Abbreviations: AAF-adjusted attributable fractions ; AF-attributable fraction; AOR-adjusted odds ratio; CISM-Centro de Investigação em Saúde de Manhiça; CRP-C-reactive protein; DSS-Demographic Surveillance System; EBV-Epstein-Barr virus; G6PD-Glucose 6-phosphate dehydrogenase; Hb-hemoglobine; ID-iron deficiency; MDH-Manhiça District Hospital; PV-B19-Parvovirus B19; qPCR-real time quantitative PCR; SD-standard deviations; TfR-F index-ratio of soluble transferrin receptor to log ferritin; WHO-World Health Organization.

Key words: Anemia, iron deficiency, children, Sub-Saharan Africa; malaria; HIV

Funding source: This study was funded by the Agencia de Cooperación Internacional de Las Illes Balears, Spain and the Fundación Ramón Areces. The Centro de Investigação em Saúde de Manhiça receives core funding from the Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID). The Walter and Eliza Hall Institute receives Victorian State Government Operational Infrastructure Support and Australian Government NHMRC IRIISS. LS received support as an International Research Scholars of the Howard Hughes Medical Institute and from an NH&MRC Program Grant #637406. AHA received support from the Victorian Community Foundation–The George Perry Fund. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Financial Disclosure: The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to disclose.

What's Known on This Subject

Young children have the world's highest prevalence of anemia, which is of multifactorial etiology preventing its successful control. Lack of consensus in the safety iron supplementation in malaria areas has led to absence of effective preventive programs against iron deficiency.

What This Study Adds

Undernutrition, iron deficiency, malaria and HIV infections are main causes of anemia in Mozambican preschool children. Prevention of iron deficiency that accounted for more than half of anemia cases would have a high impact in the reduction of anemia burden.

Review Copy

Contributor's Statement:

Cinta Moraleda, Ruth Aguilar, Montse Renom, John J. Aponte, Helder Martins, Pablo Alonso and Clara Menéndez: contributed to conception and design of the study;

Cinta Moraleda, Ruth Aguilar, Tacilta Nhampossa, Montse Renom, Augusto Nhabomba, Sozinho Acacio, Delino Nhalungo, Ariel H. Achtman, Eusebio Macete and Clara Menendez: contributed to acquisition of data;

Cinta Moraleda, Ruth Aguilar, Llorenç Quintó, John J. Aponte and Clara Menéndez: analysed the data; all authors contributed to interpretation of data;

Cinta Moraleda, Ruth Aguilar and Clara Menéndez: drafted the article;
All authors read, revised the article critically for important intellectual content, and gave final approval of the version to be published.

Review Copy

ABSTRACT

Background and objectives

Even moderate degrees of anemia are associated with increased mortality and morbidity. Despite this evidence, effective anemia control programs are lacking, which reflect the poor understanding on the contribution of the different etiologies to anemia. In order to improve anemia control in the most vulnerable population, a study to determine the etiology of anemia among pre-school African children was performed.

Methods

We undertook a case-control study of 443 preschool hospitalized children with anemia (hemoglobin concentration <11g/dl) and 289 community controls without anemia in Mozambique. Both univariable and multivariable logistic regression analyses were performed to identify factors associated with anemia and adjusted attributable fractions (AAF) were estimated when appropriate.

Results

Malaria (adjusted odds ratio (AOR)=8.39, $p<0.0001$; AAF=37%), wasting (AOR=8.10, $p<0.0001$; AAF=43%), prealbumin deficiency (AOR=7.11, $p<0.0001$; AAF=77%), albumin deficiency (AOR=4.29, $p=0.0012$; AAF=30%), HIV (AOR=5.73, $p=0.0060$; AAF=18%), and iron deficiency (ID) (AOR=4.05, $p<0.0001$; AAF=53%) were associated with anemia. Vitamin A deficiency and alpha-thalassemia were frequent (69% and 64%, respectively in cases) but not independently related with anemia. Bacteremia (Odds ratio (OR)=8.49, $p=0.004$), Parvovirus-B19 (OR=6.05, $p=0.017$) and Epstein-Barr virus (OR=2.10, $p=0.0015$) infections were related to anemia only in the unadjusted analysis. Neither vitamin B12 deficiency nor intestinal parasites were associated with anemia.

Conclusions

Undernutrition, ID, malaria, and HIV are main etiologies related with anemia in Mozambican preschool children. Effective programs and strategies for the prevention and management of these conditions need to be reinforced. However, ID, a common preventable and treatable condition, remains neglected in international public health community.

INTRODUCTION

Despite significant improvements over the last two decades, global anemia prevalence in 2010 was 33%, causing 68 million Years Lived with Disability (nearly 9% of global total), more than other major causes such as severe depression and chronic respiratory diseases. Children under the age of 5 years are the group most vulnerable to the harmful long-term effects of anemia. Young children had the highest prevalence in all areas and the highest mean severity in all low- and middle-income regions. This was the only age group with increased anemia prevalence from 1990 to 2010.¹

Despite causing so much disability, anemia does not receive the attention it deserves by the public health community. Such lack of prioritization may be partly due to the fact that anemia is thought of as a by-product of other disease processes rather than as a target for intervention in itself. For these reasons the World Health Organization (WHO) has emphasized the need of addressing the etiology of anemia in different settings and populations.² With the aim of providing evidence to guide control policies, a study to determine the etiology and risk factors of anemia was undertaken in pre-school children from a rural area of Mozambique, where they remain unknown.³

MATERIAL AND METHODS

Study area

The study was conducted at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) and the Manhiça District Hospital (MDH), Southern Mozambique. The CISM runs a continuous Demographic Surveillance System (DSS) and round-the-clock morbidity surveillance at the MDH. The area has been described in detail elsewhere.⁴

Study design

A case-control study was designed to recruit 450 hospital anemia cases and 450 community controls. Children with clinical criteria for hospital admission with age between 1-59 months, no history of blood transfusion in the previous month and residence in the CISM DSS area were offered to participate in the study. Those children whose guardians signed the informed consent had their hemoglobin (Hb) screened by Hemocue HB 201⁺ system (Ängelom, Sweden), and those with Hb <11 g/dl were recruited as cases. Recruitment started in October 2008 and ended in August 2010 and it run continuously during working hours (8:00 am-16:00 pm). In order to avoid the confounding effect of season a maximum of ten cases per week were recruited until reaching the sample size of 450 cases.

Community controls were randomly selected from the DSS among children between 1-59 months of age, and visited at home by project personnel. Children with no history of blood transfusion in the previous month and whose guardians signed the informed consent had their Hb screened by Hemocue. Those with Hb ≥ 11 g/dl were invited to complete the study visit at the MDH. Due to the high prevalence of anemic children in the community (91%) (unpublished data), 289 community controls were recruited during the study period. Enrolment of cases and controls occurred simultaneously.

Clinical examination was performed and the information entered onto standardized questionnaires with socio-demographic data. Blood smears and filter paper blood spots were prepared from capillary blood and a 4 mL venous sample was taken. Urine and stool samples were collected.

Ethics statement

The study was approved by the National Mozambican Ethics Committee and the Hospital Clínic of Barcelona Ethics Review Committee.

Laboratory methods

Hematologic studies

Blood counts were performed using a *Sysmex analyzer KX21* (Sysmex Long Grove, IL, USA). Reticulocyte counts were estimated by microscopy on cresil blue stained blood smears.

Biochemical studies

Albumin, prealbumin, and CRP were measured in an ADVIA 2400 analyzer (Siemens Healthcare, Spain). Folic acid, vitamin B12 and ferritin were measured in an ADVIA Centaur (Siemens Healthcare, Spain). sTfR was measured in a BN-II nephelometer (Dade-Siemens Healthcare, Spain). Vitamin A was measured by reversed phase high-performance liquid chromatography.⁵ Erythropoietin quantification was performed using the Quantikine human Erythropoietin immune-analysis kit (R&D Systems, USA).

Bacteriologic, virologic and parasitologic studies

Blood cultures were done in the BACTEC® 9050 (Becton-Dickinson, USA). HIV status was assessed using the Determine HIV-1/2 Rapid Test (Abbott Laboratories, USA) and confirmed by the Uni-Gold Rapid Test (Trinity Biotech Co., Ireland). HIV-DNA was detected using the Amplicor HIV-1 DNA-PCR kit (Roche Diagnostics, USA). Epstein-Barr virus (EBV) and Parvovirus B19 (PV-B19) were identified by real time quantitative PCR (qPCR) using the Artus PCR kits (QIAGEN, Spain). *Plasmodium falciparum* (Pf) parasites were identified by microscopy on Giemsa-stained blood films. Pf qPCR was done on microscopically negative samples. *Schistosoma haematobium* was determined by direct microscopic examination of urine sediment.⁶ Intestinal parasites in stool were detected by microscopic examination using the merthiolate-iodine-formalin concentrations method.⁷

Genetic studies

Hemoglobinopathies and β -thalassemia were assessed using the β -thalassemia Short Program from the Variant Hemoglobin Testing System® (Bio-Rad, Hercules, USA), which was based on the separation and relative quantification of hemoglobin fractions, fetal and A2 by HPLC. Detection of α -thalassemia (3.7 kb deletion) was performed by the GAP-PCR method.⁸ Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency was determined using the Beutler fluorescent spot test.⁹

Definitions

Anemia was categorized as severe (Hb <5 g/dl) or moderate (Hb \geq 5 to <11 g/dl). Fever was defined as axillary temperature \geq 37.5 °C. Bacteremia was defined as at least one bacterium isolated in blood excluding contaminants. *Plasmodium falciparum* (Pf) infection was defined as presence of asexual parasites in blood by microscopy or qPCR.

Artículo 1

Clinical malaria was defined as *Pf* infection plus fever or history of fever in the preceding 24 hours. Detection of parasites by qPCR and a negative blood smear defined submicroscopic *Pf* infections. Hyperparasitemic *Pf* infection was defined as >100,000 parasites/ μ l of blood. HIV infection was defined as a HIV-DNA positive result in children \leq 18 months of age, and as two positive rapid tests, or discordant results, with HIV-DNA positive result in older children. EBV and PV-B19 infections were defined as detection of the viruses in blood by qPCR.

Wasting was defined as a weight for height/length Z-score of <-2 standard deviations (SD).¹⁰ Albumin deficiency was defined as <34 g/l (laboratory reference value), and prealbumin deficiency as <0.142 g/l in children <6 months of age, <0.120 g/l in children 6-12 months of age and <0.108 g/l in children 13-59 months of age. Folate deficiency was defined as <3 ng/ml (laboratory reference value). Vitamin A deficiency was defined as <20 μ g/dl, and vitamin B12 deficiency as <200 pg/ml. Iron deficiency was defined as the ratio of soluble transferrin receptor to log ferritin (TfR-F index) >1.5 if CRP <1 mg/dl, and >0.8 if CRP \geq 1 mg/dl. This biomarker was identified as the best predictor of iron deficiency with an accuracy of 71%, using the bone marrow iron content as the gold standard¹¹. In order to be able to compare iron deficiency prevalence between cases and controls this iron deficiency definition was used instead of bone marrow iron content, since bone marrow examination was undertaken in anemic children only¹¹. Inflammation was defined as CRP level \geq 1 mg/dl. Ineffective erythropoiesis was a Reticulocyte Production Index <2¹². The attributable fraction (AF) is defined as the amount of disease that can be attributed to a specific risk factor. It combines relative risk and the prevalence of exposure to measure the public health burden of a risk factor

by estimating the proportion of cases of a disease that would not have occurred if the exposure was absent¹³.

Statistical analysis

Data were double entered using Microsoft Visual FoxPro 5.0 (Microsoft Corp., USA) and analyzed using STATA 12 (STATA Corporation, College Station, USA). Crude comparisons were performed by Chi-square or Fisher's exact tests for proportions, and the Student's t test or Wilcoxon rank sum test for means or medians, respectively. Multivariable regression analysis was performed by stepwise including all variables with p-value <0.05 in the crude models, using significance levels of 0.05 and 0.10 for addition to and for removal from the model, respectively. Vitamin B12 deficiency and G6PD deficiency were included based on biologic plausibility. No children had clinical malaria or hyperparasitemia among the controls and these variables were not included in the regression models. Due to the difficulty in obtaining sufficient volume of blood sample in some children, α -thalassemia was analyzed in 258 subjects only and it was also excluded from the regression analysis. Missing observations were excluded from the multivariate model. AF were estimated using Bruzzi's approach.¹⁴ The variance of adjusted AF (AAF) was approximated by Taylor series to first derivative terms (delta method).¹⁵

RESULTS

Characteristics of the participants

From October 2008 to August 2010, 736 cases and controls were enrolled. Six children were recruited twice and were included in the first group in which they participated; one

case older than 5 years of age was excluded. The analysis was restricted to 443 cases and 289 community controls.

Demographic, clinical and socioeconomic characteristics of participants are shown in Tables 1 and 2.

Risk factors associated with anemia

Distribution of risk factors associated with anemia is summarized in Table 3. Adjusted (for age and sex) Odds Ratios (AOR) are shown in Figure 1.

Undernutrition

Cases had higher prevalence of wasting than controls (44% vs. 11%, $p < 0.0001$). Deficiencies in albumin and prealbumin were more prevalent in cases than in controls. Iron deficiency was found in 69% (263/381) of cases and 43% (111/260) of controls ($p < 0.0001$). Iron deficiency was more frequent among children with moderate anemia [70%(241/346)] than in children with severe anemia [63%(22/35)] or in controls [43%(111/260); $p < 0.0001$]. The crude AF of iron deficiency was 47%, 95%CI [39, 55] for moderate anemia and 35%, 95%CI [15, 55] for severe anemia. Vitamin A deficiency was more frequent in cases, while the prevalence of vitamin B12 deficiency was similar in both groups ($p = 0.28$). Folate deficiency was not observed.

Bacteremia

Cases had higher prevalence of bacteremia than controls [8%(34/433) vs. 1%(3/286); $p = 0.0001$]. The commonest isolated bacteria were *Streptococcus pneumoniae* (32%), *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* (15% each). Among cases, bacteremia was

similar between children with and without iron deficiency [7%(17/258) vs. 8%(9/115); p=0.6649].

Viral infections

Cases had higher prevalence than controls of infections with HIV [21%(93/443) vs. 2%(6/289); p <0.0001], PV-B19 [6%(26/443) vs. 2%(6/287); p=0.0149] and EBV [27%(117/441) vs. 14%(39/286); p<0.0001]. Fifty out of the ninety-three HIV-positive cases and one out of the six HIV-positive controls were diagnosed at recruitment into the study.

Parasitic infections

Pf infection was present in 42%(179/428) of cases and 7%(21/287) of controls (p<0.0001). Among cases, the prevalence of clinical malaria was similar between those with iron deficiency [44%(114/258)] and those without it [40%(45/111)] (p=0.5166). Among children with severe anemia, 71% (25/35) had *Pf* parasitemia compared to 39% (154/393) of those with moderate anemia (p<0.0001). The prevalence of intestinal parasitic infections was low in both groups and more prevalent among controls [6% (10/154) vs. 3%(6/205); p=0.1051].

Erythrocyte genetic disorders

α -thalassemia was found in 53% of children, being more prevalent in cases [64%(77/121) with 16% homozygous (a-/a-) and 48% heterozygous (aa/a-)] than in controls [43%(59/137) with 15% homozygous and 28% heterozygous]; p=0.0010]. The frequency of G6PD deficiency was similar in the two groups [10%(44/236) in cases and 8%(22/271) in controls; p=0.3805]. Four children with sickle cell trait and 2 with

hemoglobinopathy type E were identified. No cases of sickle cell disease were diagnosed. The β -thalassemia trait was observed in 5 children (1 case and 4 controls).

Multivariable analysis

Age, wasting, deficiencies of prealbumin, albumin and iron, and *Pf* and HIV infections were factors independently associated with anemia (Table 4). The two main AAF of anemia were prealbumin deficiency and iron deficiency, (77%, 95% CI [69, 86], and 53%, 95% CI, [42, 64], respectively), followed by wasting (43%, 95% CI [39; 48]), and *Pf* infection (37%, 95% CI [33, 41]). The AAF of anemia associated with HIV was 18% (95% CI [13, 22]) (Table 4).

DISCUSSION

This paper describes a novel study on the etiology of anemia in children with varying degrees of anemia. The findings confirm the multifactorial and overlapping etiology of anemia and indicate the factors associated with anemia that would require priority public health actions.

One limitation of this study is the absence of hospital controls, which would have allowed ruling out possible confounding factors associated to being severely sick and that could have overestimated the effect of some diagnosis associated with hospital admission (such as HIV, malaria and other infections). However, recruiting hospital controls was not possible because of the extremely high prevalence of anemia among admitted children in this setting (Moraleta et al personal communication). Similarly,

due to the high prevalence of anemia in the community, it was not possible to enrol the planned sample size of controls. The implications of these limitations on the results are unclear and would depend on the assumptions made as to the proportion of controls exposed to the factor.

Albumin and prealbumin deficiencies were very prevalent among cases, while nearly 50% were wasted. Both proteins are markers of malnutrition, but they are also affected by inflammation,¹⁶ explaining why these factors were independently associated with anemia. In contrast, vitamin A deficiency was not independently related with the risk of anemia. This might be due to the association between reduced albumin and prealbumin with vitamin A deficiency.¹⁷ On the other hand, vitamin A deficiency was observed in the majority of cases and in over a quarter of the controls. This might be explained by an overestimation of this deficiency since vitamin A decreases with inflammation¹⁸. Alternatively, it may also reflect a poor uptake of vitamin A supplementation programs, suggesting that effectiveness monitoring of these programs is needed to guide policies to reduce this deficiency.

Inflammation, measured as an elevated PCR, was very common among cases (82%). PCR elevation occurs in many pathologies being quite unspecific, and thus difficult to interpret. For this reason PCR was not included in the multivariable analysis.

In contrast with previous observations in Malawi,¹⁹ and similarly to other reports,²⁰ vitamin B12 deficiency was not associated with a risk of anemia in this study. The general evidence suggests that vitamin B12 deficiency is not a major contributor to anemia in African children.

In this study, folate deficiency was not observed. This may have been underestimated due to difficulties in folate plasma measurement,²¹ or to its increase in malaria infection due to hemolysis;²² however, folate levels were also high in children without malaria. Tests with increased sensitivity to measure folate levels are needed in malaria exposed populations.²¹

The proportion of children with *Pf* parasitemia was increased in those with severe anemia, suggesting that malaria may contribute more importantly to severe than to moderate anemia. In contrast with other studies, iron deficiency was not protective of malaria infection among cases.²³

Prevalences of bacteremia, PV-B19 and EBV infections were higher in cases than in controls, but no independently significant associations were found with their risk of anemia. This may be due to the association of these infections with other factors included in the model such as HIV infection and malaria.^{19,24,25}

Helminthic infections were rare and not associated with anemia. These findings, consistent with other published data among pre-school children^{26,27} and with studies in this same setting where molecular techniques were used (Mandomando et al. unpublished data), are relevant when considering the target age groups of deworming programs.

In agreement with previous observations in Mozambique, the prevalence of sickle-cell trait was very low.²⁸ On the other hand, more than 50% of those in whom it was tested

presented any subset of α -thalassemia, which was associated with an increased risk of anemia,²⁹ indicating that mean cell hemoglobin concentration is not a suitable marker of iron status in populations with high prevalence of the α -thalassemia trait.¹¹ G6PD deficiency was not associated with an increased risk of anemia despite that most cases harbored infections.

Iron deficiency was very prevalent among cases and was independently associated with anemia. Iron deficiency was also very frequent among controls. An important fraction of anemia was due to iron deficiency (AAF 53%), indicating that prevention of iron deficiency in these children might have a considerable impact in reducing anemia prevalence. The association of iron deficiency with anemia was in sharp contrast with data from Malawi where iron deficiency appeared to be related to a reduced risk of severe anemia.¹⁹ The authors explain their finding by the observed inverse association between iron deficiency and bacteremia, and the contribution of bacteremia to anemia.¹⁹ In the current study, both bacteremia and iron deficiency were related to anemia, but iron deficiency was not associated with a reduced prevalence of bacteremia among cases. The dissimilar observations could be explained by different definitions of study groups, and distinct contributions of iron deficiency to anemia depending on its severity. In the Malawian study, cases were children with severe anemia, while in the current one cases had any degree of anemia. In the present study, iron deficiency appeared to be a more relevant contributor to moderate than to severe anemia, where other factors might play a more important role.

Despite having been identified as the 13th greatest risk factor for burden of disease globally (4th in sub-Saharan Africa),³⁰ prevention of iron deficiency in children exposed

to malaria and high infectious pressure remains unresolved. Discrepancies between the Cochrane review, which concludes that iron supplementation does not adversely affect children living in malaria areas,³¹ and the WHO guidelines which recommend iron supplementation in these areas only if children have proven to be iron deficient,³² leads to the absence of preventive programs for this significant global health problem.

CONCLUSION

In Mozambican preschool children, undernutrition, and iron deficiency were found to contribute significantly to anemia, indicating that their prevention may have a major global impact. Malaria and HIV infections were also important contributors to anemia but the impact of their control would be place specific. These findings should inform the development of future interventional studies (such as those focused on iron supplementation or nutritional improvement), which would then guide the design of effective programs to prevent anemia, a major killer of young children in developing countries.

Acknowledgements

The authors are grateful to the parents and their infants participating in the study. We are also grateful to the dedicated staff of the Manhiça District Hospital, as well as the laboratory, clinical, field, and data management staff at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Mozambique and to the investigators from the Hospital Clínic de Barcelona that performed the different determinations: Vives Corrons, MD PhD, and M^a del Mar Mañú, BSc PhD, Red Cell Pathology Unit, Biomedical Diagnostic Centre, University Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain, for the erythrocyte genetic disorders; Ramón Deulofeu, PhD, Clinical Biochemistry Laboratory, Hospital Clínic Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain, for the vitamins, albumin, prealbumin and iron deficiency markers determinations; and M^a Ángeles Marcos, MD PhD, Department of Microbiology, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona), Barcelona, Spain, for the EBV and PV B19 determinations.

Review Copy

REFERENCES

1. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*. 2014;123(5):615-624. doi: 610.1182/blood-2013-1106-508325. Epub 502013 Dec 508322.
2. WHO, UNICEF. Joint statement by the World Health Organization and the United Nations Children's Fund. Focusing on anemia. 2004.
3. Omar C, Martins H. Indicadores a utilizar no processo de produção do plano de desenvolvimento sanitario 2000-2005. Vol. CNCS/XXIV/98/PA-7. Maputo, Mozambique: Ministry of Health of Mozambique; 1998.
4. Sacoore C, Nhacolo A, Nhalungo D, et al. Profile: Manhica Health Research Centre (Manhica HDSS). *Int J Epidemiol*. 2013;42(5):1309-1318.
5. Pastor MC, Codoceo R, Deulofeu R, et al. Procedimiento recomendado para la determinacion de retinol en suero o plasma. *Quimica Clinica*. 1998;17:38-41.
6. WHO. Sedimentation Method. In Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology. Geneva: World Health Organization; 1991:33-35.
7. Saperro JJ, Lawless DK. The MIF stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. *Am J Trop Med Hyg*. 1953;2(4):613-619.
8. Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol*. 1993;83(1):105-111.
9. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Lohr GW, Ramot B, Valentine WN. International Committee for Standardization in Haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Br J Haematol*. 1979;43(3):465-467.
10. CDC. Centers for Disease Control and Prevention Clinical Growth Charts. Available at: http://www.cdc.gov/growthcharts/clinical_charts.htm.
11. Aguilar R, Moraleta C, Quinto L, et al. Challenges in the diagnosis of iron deficiency in children exposed to high prevalence of infections. *PLoS One*. 2012;7(11):e50584.
12. Ouma C, Keller CC, Davenport GC, et al. A novel functional variant in the stem cell growth factor promoter protects against severe malarial anemia. *Infect Immun*. 2010;78(1):453-460.
13. Steenland K, Armstrong B. An overview of methods for calculating the burden of disease due to specific risk factors. *Epidemiology*. 2006;17(5):512-519.
14. Bruzzi P, Green SB, Byar DP, Brinton LA, Schairer C. Estimating the population attributable risk for multiple risk factors using case-control data. *Am J Epidemiol*. 1985;122(5):904-914.
15. Oehlert GW. A note on the delta method. *American Statistician*. 1992;46:27-29.
16. Fleck A. Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation. *Proc Nutr Soc*. 1989;48(3):347-354.
17. Rosales FJ, Topping JD, Smith JE, Shankar AH, Ross AC. Relation of serum retinol to acute phase proteins and malarial morbidity in Papua New Guinea children. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(6):1582-1588.
18. Wieringa FT, Dijkhuizen MA, West CE, Northrop-Clewes CA, Muhilal. Estimation of the effect of the acute phase response on indicators of micronutrient status in Indonesian infants. *J Nutr*. 2002;132(10):3061-3066.
19. Calis JC, Phiri KS, Faragher EB, et al. Severe anemia in Malawian children. *N Engl J Med*. 2008;358(9):888-899.

20. Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B12 or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2 Suppl):S74-85.
21. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem.* 2000;46(8 Pt 2):1277-1283.
22. Bradley-Moore AM, Greenwood BM, Bradley AK, et al. Malaria chemoprophylaxis with chloroquine in young Nigerian children. IV. Its effect on haematological measurements. *Ann Trop Med Parasitol.* 1985;79(6):585-595.
23. Sazawal S, Black RE, Ramsan M, et al. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2006;367(9505):133-143.
24. Koduri PR. Parvovirus B19-related anemia in HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS.* 2000;14(1):7-11.
25. Moormann AM, Chelimo K, Sumba OP, et al. Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. *J Infect Dis.* 2005;191(8):1233-1238. Epub 2005 Mar 1239.
26. Kung'u JK, Goodman D, Haji HJ, et al. Early helminth infections are inversely related to anemia, malnutrition, and malaria and are not associated with inflammation in 6- to 23-month-old Zanzibari children. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(6):1062-1070. doi: 10.1093/ajtmh.2009.1009-0091.
27. Kahigwa E, Schellenberg D, Sanz S, et al. Risk factors for presentation to hospital with severe anemia in Tanzanian children: a case-control study. *Trop Med Int Health.* 2002;7(10):823-830.
28. Willcox MC, Liljestrand J, Bergstrom S. Abnormal haemoglobins among pregnant women from Mozambique. *J Med Genet.* 1986;23(2):151-152.
29. Manning L, Laman M, Rosanas-Urgell A, et al. Severe anemia in Papua New Guinean children from a malaria-endemic area: a case-control etiologic study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1972.
30. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2224-2260. doi: 2210.1016/S0140-6736(2212)61766-61768.
31. Okebe JU, Yahav D, Shbita R, Paul M. Oral iron supplements for children in malaria-endemic areas. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(10):CD006589. doi: 006510.001002/14651858.CD14006589.pub14651853.
32. WHO. Conclusions and recommendations of the WHO Consultation on prevention and control of iron deficiency in infants and young children in malaria-endemic areas. *Food Nutr Bull.* 2007;28(4 Suppl):S621-627.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Odds Ratios adjusted for age and gender and 95% confidence intervals for factors associated with anemia, according to study group (Cases vs. Controls).

Abbreviations: CRP: C-reactive protein, G6PD: glucose 6 phosphate dehydrogenase, TfR-F index: ratio of soluble transferrin receptor to log ferritin, WAZ: weight for age Z score.

Review Copy

Table 1. Demographic and clinical characteristics of cases and community controls.

Characteristic	Study groups		p-value
	Cases	Controls	
Gender ¹ (Male)	261/443 (59%)	132/289 (46%)	0.0004 ²
Age (months) ³	19.40 (14.08) [443]	26.61 (18.51) [289]	< 0.0001 ⁴
Jaundice ¹	5/443 (1%)	0/288 (0%)	0.1628 ⁵
Palpable spleen ¹	96/443 (22%)	1/288 (0%)	< 0.0001 ²
Fever ¹	389/443 (88%)	1/289 (0%)	< 0.0001 ²
Hemoglobin g/dl ³	7.88 (1.98) [443]	11.66 (0.75) [289]	< 0.0001 ⁴
Hemoglobin < 5 g/dl ¹	40/443 (9%)	0/289 (0%)	< 0.0001 ²
MCV (fl) ³	71.53 (9.64) [427]	75.63 (7.02) [270]	< 0.0001 ⁴
MCHC (g/dl) ⁶	32.60 (4.20) [425]	34.00 (3.30) [270]	< 0.0001 ⁷
RBC distribution width-sd (fl) ⁶	45.40 (9.60) [420]	41.75 (6.10) [270]	< 0.0001 ⁷
White Blood Cells (x10 ³ /μl) ⁸	10.54 (7.54) [426]	8.75 (3.44) [272]	< 0.0001 ⁴
CRP (mg/dl) ⁶	5.99 (10.77) [432]	0.05 (0.25) [282]	< 0.0001 ⁷
EPO (U/l) ⁶	53.45 (176.10) [434]	10.50 (7.00) [283]	< 0.0001 ⁷
Inflammation ¹	356/432 (82%)	27/282 (10%)	< 0.0001 ²
Insufficient erythropoiesis ¹	311/326 (95%)	172/195 (88%)	0.0022 ²
Duration of infant admission (days) ³	4.93 (4.94) [426]	-	
Outcome of admission ¹	Alive	386/425 (91%)	-
	Died	13/425 (3%)	-
	Left	13/425 (3%)	-
	Transferred	13/425 (3%)	-

1: n/N (percentage); 2: Chi-squared test; 3: Arithmetic Mean (SD) [n]; 4: t-test; 5: Fisher's exact test; 6: Median (IQR) [n]; 7: Wilcoxon Rank Sum test; 8: Geometric Mean (SD) [n].

Abbreviations: CRP: C-reactive protein, EPO: erythropoietin, MCHC: mean cell hemoglobin concentration, MCV: mean cell volume, RBC: red blood cells.

Table 2. Socioeconomic characteristics of cases and community controls.

Characteristic		Study groups		p-value
		Cases	Controls	
Mother's age (years) ¹		25.59 (6.31) [376]	26.50 (7.03) [281]	0.0826 ²
Number of children ¹		1.73 (1.61) [354]	1.99 (1.85) [270]	0.0549 ²
Marital status ³	Married	17/432 (4%)	7/279 (3%)	0.4006 ⁴
	Union	295/432 (68%)	207/279 (74%)	
	Maiden	89/432 (21%)	44/279 (16%)	
	Separate	20/432 (5%)	13/279 (5%)	
	Widow	11/432 (3%)	8/279 (3%)	
Mother had education ³		255/440 (58%)	199/287 (69%)	0.0019 ⁴
Mother works outside home ³		111/443 (25%)	190/289 (66%)	< 0.0001 ⁴
House of cement ³		149/443 (34%)	126/289 (44%)	0.0065 ⁴
Number of rooms ⁵		1 (1) [443]	2 (2) [289]	< 0.0001 ⁶

1: Arithmetic Mean (SD) [n]; 2: t-test; 3: n/N (percentage); 4: Chi-squared test; 5: Median (IQR) [n]; 6: Wilcoxon Rank Sum test.

Table 3. Distribution of possible etiologic and confounding factors of anemia among cases and community controls.

Variable	Study groups		Total	p-value
	Cases	Controls		
Undernutrition				
Wasting (WAZ < -2) ¹	197/443 (44%)	32/284 (11%)	229/727 (31%)	< 0.0001 ²
Albumin deficiency ¹	175/432 (41%)	11/282 (4%)	186/714 (26%)	< 0.0001 ²
Prealbumin deficiency ¹	389/430 (90%)	97/280 (35%)	486/710 (68%)	< 0.0001 ²
Iron deficiency ¹	263/381 (69%)	111/260 (43%)	374/715 (58%)	< 0.0001 ²
Folate deficiency ¹	0/381 (0%)	0/255 (0%)	0/636 (0%)	.
Vitamin A deficiency ¹	301/434 (69%)	79/283 (28%)	380/717 (53%)	< 0.0001 ²
Vitamin B12 deficiency ¹	68/413 (16%)	53/269 (20%)	121 (18%)	0.2794 ²
Viral infections				
HIV ¹	Negative	297/443 (67%)	266/289 (92%)	< 0.0001 ²
	Positive	93/443 (21%)	6/443 (2%)	
	Indeterminate	4/443 (1%)	0/443 (0%)	
	Not done	49/443 (11%)	17/443 (6%)	
Parvovirus B19 infection ¹	26/436 (6%)	6/287 (2%)	32/730 (4%)	0.0149 ²
EBV infection ¹	117/441 (27%)	39/286 (14%)	156/727 (21%)	< 0.0001 ²
Bacteremia¹	34/433 (8%) ⁴	3/286 (1%) ⁵	37/719 (5%)	0.0001 ²
Parasitic infections				
<i>Plasmodium falciparum</i> ¹	179/428 (42%)	21/287 (7%)	200/715 (28%)	< 0.0001 ²
Hyperparasitemic <i>Pf.</i> ¹	34/428 (8%)	0/287 (0%)	34/715 (5%)	< 0.0001 ²
Submicroscopic <i>Pf.</i> ¹	37/322 (11%)	12/284 (4%)	49/666 (8%)	0.0011 ²
Clinical malaria ¹	172/428 (40%)	0/287 (0%)	172/715 (24%)	< 0.0001 ²
Intestinal parasites ¹	6/205 (3%) ⁶	10/154 (6%) ⁷	16/359 (4%)	0.1051 ²
<i>Schistosoma haematobium</i> ¹	0/172 (0%)	0/175 (0%)	0/347 (0%)	
Genetic disorders				
G6PD deficiency ¹	44/436 (10%)	22/271 (8%)	66/707 (9%)	0.3805 ²
Hemoglobinopathy ^{1,8}	4/431 (1%)	2/263 (1%)	6/694 (1%)	1.0000 ³
β-Thalassemia ¹	1/431 (0%)	4/263 (2%)	5/694 (1%)	0.0711 ³
α-Thalassemia ¹	77/121 (64%)	59/137 (43%)	136/258 (53%)	0.0010 ²

1: n/N (column percentage); 2: Chi-squared test; 3: Fisher's exact test; 4: 11 *Streptococcus pneumoniae*, 5 *Staphylococcus aureus*, 5 *Escherichia coli*, 3 *Salmonella typhimurium*, 10 others. 5: 1 *E. coli*, 1 *Klebsiella spp* and 1 gram negative bacilli, lactose fermenting oxidase negative (these findings were considered contaminations or transient bacteremia); 6: the intestinal parasites are 3 *Ascaris lumbricoides*, 2 *Giardia lamblia*, 1 *Strongyloides stercoralis*, 7: the intestinal parasites are 6 *Ascaris lumbricoides*, 2 *Giardia lamblia*, 1 *Entamoeba histolytica*, 1 *Strongyloides stercoralis*, 8: Hemoglobinopathy includes S and E. **Abbreviations:** EBV: Epstein-Barr virus, G6PD: glucose 6 phosphate dehydrogenase, *Pf*: *Plasmodium falciparum*, WAZ: weight for age Z score.

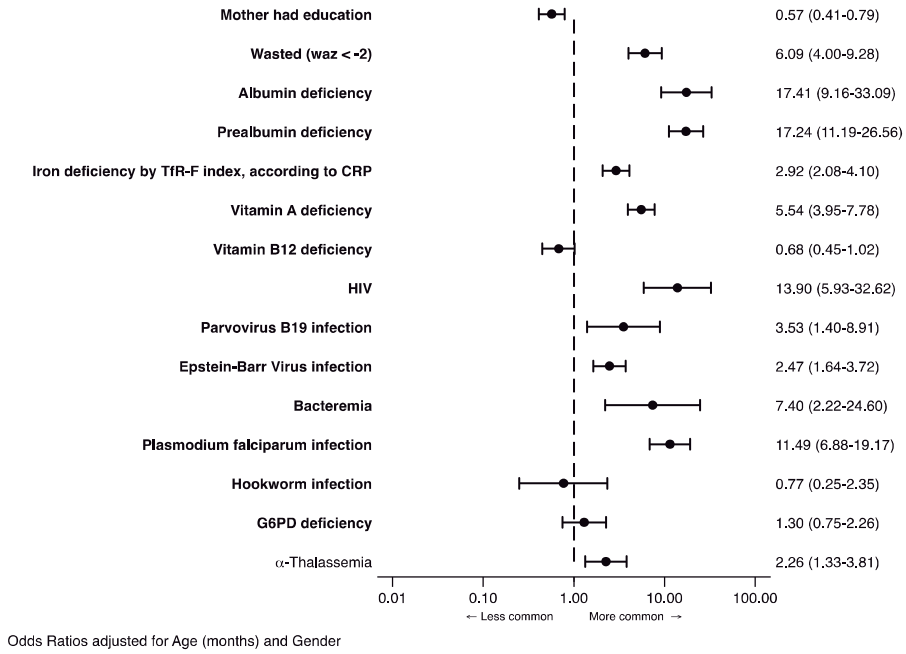
Table 4. Adjusted odds ratios from logistic regression model and adjusted attributable fractions for anemia.

Risk factor	Proportion of cases with factor (%)	Adjusted association			AAF		AC
		OR	(95% CI)	p-value	Estimate (%)	(95% CI)	
Prealb def. ¹	90.1	7.11	(3.55; 14.24)	< 0.0001	77.42	(68.62; 86.23)	235
Wasted ¹	49.2	8.10	(3.82; 17.18)	< 0.0001	43.10	(38.54; 47.67)	131
<i>Pf</i> infection ¹	42.2	8.39	(3.82; 18.40)	< 0.0001	37.21	(33.25; 41.16)	113
Iron def. ¹	70.0	4.05	(2.16; 7.61)	< 0.0001	52.71	(41.85; 63.57)	160
Albumin def. ¹	39.6	4.29	(1.78; 10.35)	0.0012	30.37	(22.24; 38.51)	92
HIV ¹	21.5	5.73	(1.65; 19.92)	0.0060	17.71	(13.05; 22.37)	54
<i>All risk factors in model</i>					97.51	(96.16; 98.87)	295

Abbreviations: AAF: Adjusted attributable fractions, AC: Attributable cases, CI: Confidence interval, def: deficiency, *Pf*: *Plasmodium falciparum*, Prealb: prealbumin, OR: Odds Ratio.

The odds ratios presented in this table were adjusted for all the variables included in it. Besides, they were also adjusted for the socio-demographic characteristics that were significant in that multivariate model (age and “mother works outside home”), which were protective so the AAF were not calculated.

Artículo 1



View Copy

Artículo 2: Retos en el diagnóstico de la deficiencia de hierro en niños expuestos a una alta prevalencia de infecciones

Ruth Aguilar, Cinta Moraleda, Llorenç Quintó, Montse Renom, Lázaro Mussacate, Eusebio Macete, Josep L. Aguilar, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez

Resumen

Antecedentes

La OMS recomienda la administración de suplementos de hierro en áreas de alta prevalencia de infecciones sólo a los niños deficientes de hierro, pero esto es raramente implementado. Una de las principales razones es la idea de que los suplementos de hierro aumentan la susceptibilidad frente a algunas infecciones como la malaria. Otra razón es que la infección afecta los marcadores actualmente utilizados para el diagnóstico de la deficiencia de hierro, dificultándolo. Con el objetivo de mejorar el diagnóstico y el manejo de la ferropenia se han evaluado diferentes marcadores de deficiencia de hierro en niños expuestos a una alta prevalencia de infecciones.

Metodología y principales hallazgos

Los marcadores de hierro séricos se compararon con el contenido de hierro en médula ósea determinado en 180 niños anémicos que consultaron en un hospital rural de Mozambique. El 80% (144/180) de ellos presentaron deficiencia de hierro en el examen de médula ósea, 88% (155/176) sufría algún proceso inflamatorio, 66% (119/180) tenían anemia moderada, 25% (45/180) anemia grave y 9% (16/180) anemia muy grave. La CHCM presentó una sensibilidad del 51% y una especificidad del 71% para la detección de deficiencia de hierro. El RsTF y el índice de receptor de transferrina-ferritina (RsTF/logaritmo de ferritina) (ajustado por la proteína C reactiva) mostraron las mejores áreas bajo las curvas ROC (0,75 y 0,76, respectivamente), y fueron los marcadores más sensibles para la detección de deficiencia de hierro (83% y 75%, respectivamente), pero con especificidades moderadas (50% y 56%, respectivamente).

Conclusiones

La deficiencia de hierro determinada mediante el examen de médula ósea fue extremadamente frecuente en estos niños expuestos a una alta prevalencia de infecciones. A pesar de ello, incluso utilizando los mejores marcadores séricos de deficiencia de hierro, ésta no pudo ser identificada en un 25% de los niños. Aunque estos resultados no son directamente extrapolables a la comunidad, ante estos hallazgos es urgente disponer de unos indicadores de ferropenia más fiables, asequibles y sencillos de usar, para reducir la anemia por deficiencia de hierro en los PRB donde es más prevalente.

Challenges in the Diagnosis of Iron Deficiency in Children Exposed to High Prevalence of Infections

Ruth Aguilar^{1,2,3*}, Cinta Moraleda^{1,3}, Llorenç Quintó¹, Montse Renom^{1,3}, Lázaro Mussacate³, Eusebio Macete³, Josep L. Aguilar⁴, Pedro L. Alonso^{1,3}, Clara Menéndez^{1,2,3}

1 Barcelona Centre for International Health Research, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** CIBER Epidemiology and Public Health, Barcelona, Spain, **3** Manhica Health Research Center, Maputo, Mozambique, **4** Department of Pathology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Background: While WHO guidelines recommend iron supplements to only iron-deficient children in high infection pressure areas, these are rarely implemented. One of the reasons for this is the commonly held view that iron supplementation increases the susceptibility to some infectious diseases including malaria. Secondly, currently used markers to diagnose iron deficiency are also modified by infections. With the objective of improving iron deficiency diagnosis and thus, its management, we evaluated the performance of iron markers in children exposed to high infection pressure.

Methodology/Principal Findings: Iron markers were compared to bone marrow findings in 180 anaemic children attending a rural hospital in southern Mozambique. Eighty percent (144/180) of the children had iron deficiency by bone marrow examination, 88% (155/176) had an inflammatory process, 66% (119/180) had moderate anaemia, 25% (45/180) severe anaemia and 9% (16/180) very severe anaemia. Mean cell haemoglobin concentration had a sensitivity of 51% and specificity of 71% for detecting iron deficiency. Soluble transferrin receptor (sTfR) and soluble transferrin receptor/log ferritin (TfR-F) index (adjusted by C reactive protein) showed the highest areas under the ROC curve (AUC^{ROC}) (0.75 and 0.76, respectively), and were the most sensitive markers in detecting iron deficiency (83% and 75%, respectively), but with moderate specificities (50% and 56%, respectively).

Conclusions/Significance: Iron deficiency by bone marrow examination was extremely frequent in these children exposed to high prevalence of infections. However, even the best markers of bone marrow iron deficiency did not identify around a quarter of iron-deficient children. Tough not directly extrapolated to the community, these findings urge for more reliable, affordable and easy to measure iron indicators to reduce the burden of iron deficiency anaemia in resource-poor settings where it is most prevalent.

Citation: Aguilar R, Moraleda C, Quintó L, Renom M, Mussacate L, et al. (2012) Challenges in the Diagnosis of Iron Deficiency in Children Exposed to High Prevalence of Infections. PLoS ONE 7(11): e50584. doi:10.1371/journal.pone.0050584

Editor: Amanda Bruce, University of Missouri-Kansas City, United States of America

Received: August 17, 2012; **Accepted:** October 23, 2012; **Published:** November 27, 2012

Copyright: © 2012 Aguilar 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: This work was funded by the Agencia de Cooperación Internacional de Las Illes Balears and the Ramón Areces Foundation. The Centro de Investigação em Saúde da Manhica receives core support from the Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID). 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: ruth.aguilar@cresib.cat

Introduction

Iron deficiency (ID) is the most common and widespread nutrient deficiency, affecting approximately two billion people worldwide and resulting in over 500 million cases of anaemia [1,2]. In sub-Saharan Africa, the prevalence of iron-deficiency anaemia (IDA) is estimated around 60% [1,2], with 40 to 50% of children under five years of age in developing countries being iron deficient [3]. ID has been estimated to cause around 800,000 deaths and 35,057,000 disability adjusted life years lost annually [2], with the greatest toll in South-East Asia and Africa [1,4].

By six months of age there is a physiological depletion of the iron stores that were accumulated by the foetus in the last months of pregnancy. If the infant's diet does not provide enough iron, there is a significant risk to develop IDA. This physiological iron deficiency is often exacerbated by the early introduction of weaning foods [4], that frequently contain iron absorption inhibitors [5]. Iron deficiency may also be worsened by intestinal

chronic blood loss from intestinal parasitic infections [3,6]. All these determinants are frequent in developing countries, leading to a prevalence of ID that may reach more than 30% by 12 months of age [7]. Because IDA tends to develop slowly, adaptation occurs and the disease can go unrecognized for long periods, yet having an important impact on the children's physical and cognitive development [8].

The controversy around the risk-benefit ratio of giving iron supplements to individuals exposed to malaria is still unresolved [9,10]. While a recent Cochrane review on this issue concluded that "iron supplementation does not adversely affect children living in malaria-endemic areas and should not be withheld from them" [11], the current WHO guidelines on iron supplementation to children exposed to malaria and high prevalence of infections recommend "against universal iron supplementation for children under the age of two years living in malaria-endemic areas" [12,13]. Moreover, screening to identify iron-deficient children is

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study participants.

Characteristics	Result
Age (months)*	22.06 (13.67)
Gender	Male 102 (57%)
	Female 78 (43%)
Fever	163 (91%)
Wasted (WAZ<-2)	88 (49%)
Stunted (HAZ<-2) (n = 179)	56 (31%)
Haemoglobin*	7.73 (1.97)
Degree of anaemia	Moderate 119 (66%)
	Severe 45 (25%)
	Very severe 16 (9%)
Inflammation (n = 176)	155 (88%)
<i>P. falciparum</i> (n=170)	74 (44%)
Clinical Malaria (n=170)	73 (43%)
HIV (n = 164)	40 (24%)
Parvovirus B19	15 (8%)
Epstein-Barr virus	56 (31%)
Bacteraemia (n = 173)	13 (8%)
α-Thalassaemia (n = 41)	32 (78%)
Bone marrow iron content	Absent 54 (30%)
	Diminished 90 (50%)
	Normal 14 (8%)
	Increased 22 (12%)

*Arithmetic Mean (SD).
 N = 180 and results expressed as n (%) unless otherwise indicated.
 Abbreviations: HAZ, height for age Z score; Hb, haemoglobin; HIV, human immunodeficiency virus; WAZ, weight for age Z score.
 doi:10.1371/journal.pone.0050584.t001

Table 2. Proportion of children classified as iron deficient using internationally accepted cut-off values of iron markers.

Iron marker	Obs.	Normal levels	Iron deficient	
			n	%
Ferritin (ng/ml)	173	30–300	21	12
Ferritin (ng/ml) by CRP	173		15	9
CRP<1 mg/dl	21	12–300		
CRP≥1 mg/dl	152	30–300		
Ferritin (ng/ml) by age	173		1	1
3–5 months	6	50–200		
>5 months	167	7–140		
sTfR (mg/l)	163	0.83–1.76	124	76
TfR-F index	163	≤1.5	57	35
TfR-F index by CRP	163		63	39
CRP<1 mg/dl	17	≤1.5		
CRP≥1 mg/dl	146	≤0.8		
Plasma iron (µg/dl)	176	22–150	114	65
Transferrin (g/l)	176	2.0–3.85	1	1
Transferrin saturation (%)	176	16–45	135	77
TIBC (mg/l)	176	1–4	24	14
MCHC (g/dl)*	173	32.0–36.8	81	47
MCV (fl) by age	174		87	50
<2 years	110	70–91		
≥2 years	64	73–89		

Abbreviations: CRP, C reactive protein; MCHC, mean cell haemoglobin concentration; MCV, mean cell volume; Obs, observations; sTfR, soluble transferrin receptor; TfR-F index, transferrin-ferritin index; TIBC, total iron binding capacity.
 doi:10.1371/journal.pone.0050584.t002

recommended “with directed treatment of iron-deficient children only” [13]. This inconsistency between the evidence and what it is actually recommended is leading to different interpretations by policy makers and health personnel, and a lack of implementation of policies to prevent a significant global health problem.

The diagnosis of IDA may be suggested by some signs and symptoms, but specially by blood tests indicating low haemoglobin, ferritin, and plasma iron levels. However, it has long been recognized that in developing countries interpretation of these and other biochemical tests is limited by the confounding effects of infection, inflammation and malnutrition [14,15,16,17]. Thus, precisely where IDA is most common, it is also more difficult to diagnose and therefore treat.

A reliable, non-invasive tool for the assessment of ID in these populations remains elusive. The use of the ratio of soluble transferrin receptor to log ferritin concentrations (sTfR/log ferritin index) has been advocated to assess iron status [18]. However, this index is also limited because its parameters are influenced by the erythropoietic activity and inflammation [19,20]. Moreover, we found that malaria infection was associated with a significant increase in sTfR plasma levels, even higher than those observed in IDA, thus questioning the role of sTfR levels in the diagnosis of IDA in individuals exposed to malaria [16].

Until now, the microscopic examination of Perl’s Prussian blue stained bone marrow aspirate remains the “gold standard” for the assessment of iron stores [21]. However, this is an invasive

procedure and not logistically feasible in most settings where the diagnosis of ID is both most needed and problematic.

A previous study among severely anaemic Malawian children comparing various iron markers against bone marrow iron content found that TfR-F index was the best predictor of bone marrow iron stores deficiency (sensitivity 74% and specificity 73%) [22]. However, even using this index as a proxy for ID, a significant number of iron deficient children would not be diagnosed and thus receive adequate treatment. On the other hand, evaluation of the performances of iron markers in other well defined populations from highly infectious settings is needed to know if they could be extrapolated. In order to contribute to improving the diagnosis of ID in children exposed to high infection pressure, we have evaluated the sensitivity and specificity of currently used iron markers using bone marrow iron content as the “gold standard” in Mozambican children with several degrees of anaemia.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study protocol was approved by the National Mozambican Ethics Committee and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committee. Parents-guardians were informed of the goals, procedures, benefits and risks of taking a bone marrow sample from their child, and it was never offered to them any financial or material inducement to agree on it. They were also given the choice of consenting to the participation of their child in the

Table 3. Sensitivity, specificity and accuracy of internationally accepted cut-off values of iron markers to identify iron stores deficiency using bone marrow iron content as “gold standard”.

Iron marker	True		False		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
	Pos	Neg	Pos	Neg			
Ferritin (ng/ml)	21	35	0	117	15	100	32
Ferritin (ng/ml) ¹	15	35	0	123	11	100	29
Ferritin (ng/ml) ²	1	35	0	137	1	100	21
sTfR	107	17	17	22	83	50	76
TfR-F index	54	31	3	75	42	91	52
TfR-F index ³	97	19	15	32	75	56	71
Plasma iron	98	19	16	43	70	54	66
Transferrin	1	35	0	140	1	100	20
Transferrin saturation	114	14	21	27	81	40	73
TIBC	24	35	0	117	17	100	34
MCHC	71	24	10	68	51	71	55
MCV ⁴	69	16	18	71	49	47	49

¹By C reactive protein (CRP): <12 ng/ml if CRP<1 mg/dl, and <30 ng/ml if CRP≥1 mg/dl.
²By age: <50 ng/ml in children 3–5 months of age, and <7 ng/ml in children >5 months of age.
³By CRP: >1.5 if CRP<1 mg/dl, and >0.8 if CRP≥1 mg/dl.
⁴By age: <70 fl in children<2 years of age, and <73 fl in children ≥2 years of age.
 Abbreviations: MCHC, mean cell haemoglobin concentration; MCV, mean cell volume; Neg, negative; Pos, positive; sTfR, soluble transferrin receptor; TfR-F index, transferrin-ferritin index; TIBC, total iron binding capacity.
 doi:10.1371/journal.pone.0050584.t003

anaemia case-control study but refusing to bone marrow sample donation for the iron biomarkers study here presented. All the explanations were given in Portuguese (the National language) and when required in Changana (the local language). The parents-guardians of all children included in the study provided written informed consent.

Study Site

The study was carried out at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) in Manhiça District, southern Mozambique. The characteristics of the area have been described in detail elsewhere [23,24,25]. Malaria transmission of moderate intensity is perennial with some seasonality. More than 95% of the malaria infections are due to *Plasmodium falciparum* [26]. Adjacent to the CISM is the Manhiça District Hospital (MDH), a 110 bed health facility. The main causes of hospital attendance and admission among children in the area are pneumonia [27], malaria [25], anaemia [24], malnutrition and HIV-related diseases (unpublished data). HIV prevalence in pregnant women was 29% in 2010 [28].

Study Participants and Procedures

The study was undertaken as part of a case-control study on the aetiology and risk factors of anaemia in children less than 5 years of age. Children aged 1 to 59 months, attending the MDH emergency department between October 2008 to August 2010

Table 4. AUC^{ROC} values for iron markers to identify children with iron stores deficiency*.

Iron marker	Area under ROC curve	(95% CI)	p-value
Ferritin	0.70	(0.61, 0.79)	0.0268
sTfR	0.75	(0.66, 0.84)	0.0059
TfR-F index	0.76	(0.68, 0.85)	0.0024
Plasma iron	0.64	(0.53, 0.75)	0.1584
Transferrin	0.71	(0.61, 0.81)	0.0298
Transferrin saturation	0.70	(0.60, 0.80)	0.0326
TIBC	0.71	(0.61, 0.81)	0.028
MCHC	0.59	(0.49, 0.70)	0.3382
MCV	0.55	(0.43, 0.66)	0.6311

*This analysis includes only children with results for all iron markers (n = 159). Abbreviations: CI, confidence interval; MCHC, mean cell haemoglobin concentration; MCV, mean cell volume; Obs, observations; ROC, receiver operating characteristic; sTfR, soluble transferrin receptor; TfR-F index, transferrin-ferritin index; TIBC, total iron binding capacity.
 doi:10.1371/journal.pone.0050584.t004

with anaemia (haemoglobin (Hb) <11 g/dl), and with no history of blood transfusion in the preceding 4 weeks, were recruited as cases if their parents-guardians gave written informed consent. Haemoglobin concentration was measured at the time of recruitment by the HemoCue® system (HemoCue® HB 201+, Ångelholm, Sweden). A complete clinical examination was performed and the information was entered onto standardized questionnaires together with demographic data. Four ml of venous blood were collected by venipuncture for malaria parasitaemia examination, bacterial culture, full blood count and biochemical and molecular determinations. Participating children were offered voluntary HIV counselling and testing. A bone marrow aspiration was performed from the anterior-superior iliac crest or the tibia, under conscious sedation with parenteral ketamine, atropine and diazepam [29,30,31]. Bone marrow aspirates were not performed in children <3 months of age or with medical counter-indications such as severe respiratory distress, history of seizures, suspected intracranial hypertension, or any risk at the discretion of the responsible clinician. There were no adverse effects associated to bone marrow biopsy, however there were three adverse effects associated to sedation. One child presented **bronchial hypersecretion and bone marrow aspirate was then not performed. Two other children vomited during the aspirate, also due to the administration of sedatives.** Resuscitation equipment was always available during the procedure. All children received treatment according to their clinical condition and following national guidelines.

Laboratory Methods

A complete blood count was performed on an automated haematology analyzer Sysmex XT-2000i (Sysmex Corporation, Randburg, South Africa). *P. falciparum* parasites were identified by microscopy of thick and thin Giemsa-stained blood films [32]. *P. falciparum*-specific real time quantitative PCR (qPCR) was performed on microscopically negative samples [33]. HIV status was assessed using the Determine HIV-1/2 Rapid Test (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) and positive results were confirmed by the Uni-Gold Rapid Test (Trinity Biotech Co., Wicklow, Ireland). For children <18 months who were positive by both HIV rapid tests and for cases with discordant results, HIV infection was confirmed using the HIV-1 DNA-PCR kit (Roche Molecular

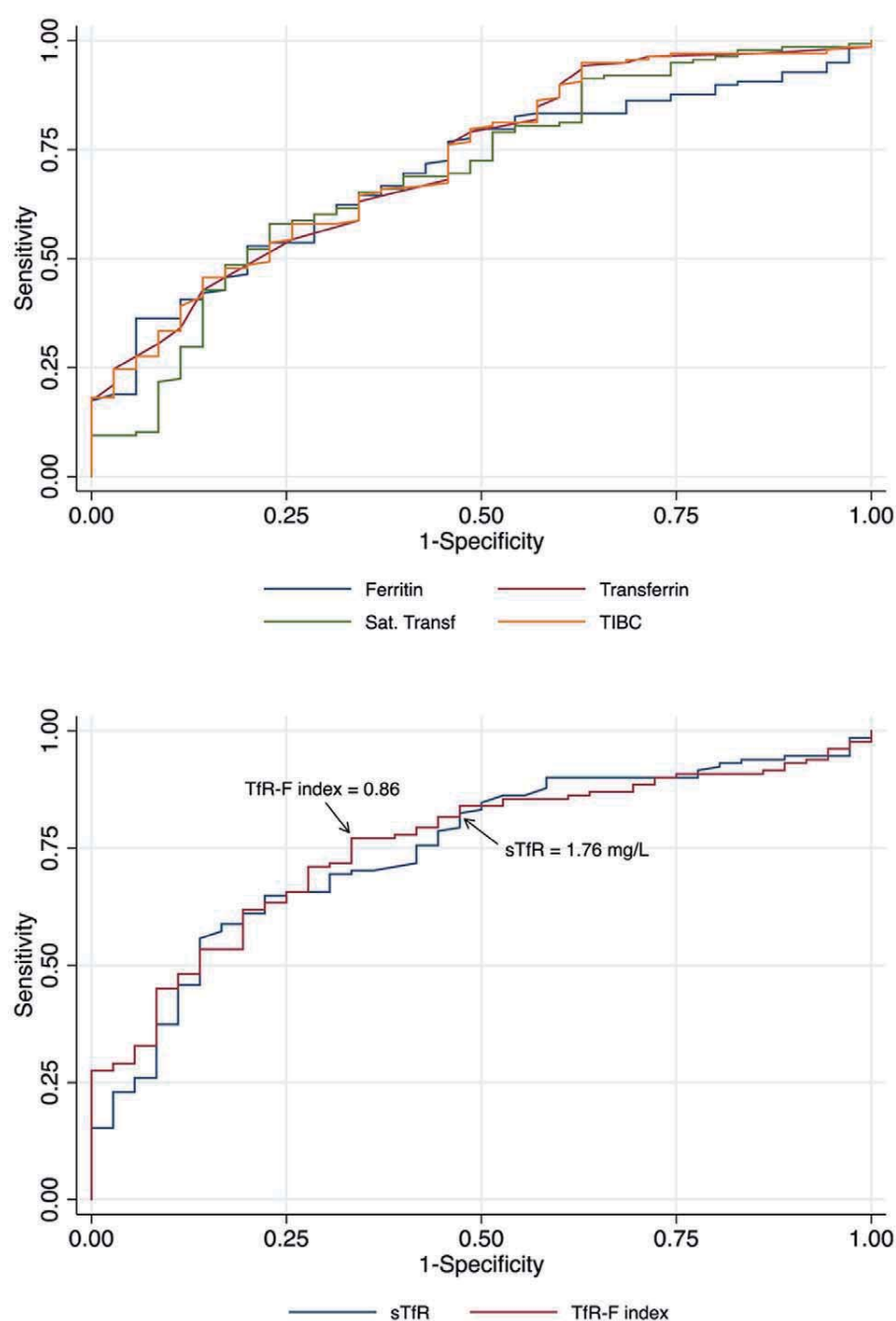


Figure 1. Receiver operating characteristic curves of the iron markers in the identification of iron stores deficiency. Cut-off values for sTfR and TfR-F index with the highest sensitivity to detect iron deficiency maintaining the specificity $\geq 50\%$ are indicated with arrows. Abbreviations: Sat. Transf., transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; TfR-F index, transferrin-ferritin index; TIBC, total iron binding capacity. doi:10.1371/journal.pone.0050584.g001

Systems, Branchburg, NJ, USA) [34,35]. Blood was cultured using an automated system (BACTEC® 9050; Becton-Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA) [36,37]. Epstein-Barr virus (EBV) and Parvovirus B19 (PV-B19) were identified by real time qPCR using the Artus EBV RG PCR and the Artus Parvo B19 RG PCR kits (QIAGEN), respectively. Diagnosis of α -thalassaemia (3.7 kb deletion) was performed by the GAP-PCR [38] in 121 anaemic children of the case-control study, of which only 41 had analysable bone marrow material to be included in this analysis.

Plasma was stored at -80°C until iron biochemical markers were determined. Plasma iron, transferrin and C reactive protein (CRP) were measured in an ADVIA 2400 analyser (Siemens Healthcare, Barcelona, Spain). Ferritin was measured in an ADVIA Centaur analyser (Siemens Healthcare, Barcelona, Spain). sTfR was measured in a BN-II nephelometer (Dade-Siemens Healthcare, Barcelona, Spain). Transferrin saturation and TIBC were calculated from the transferrin and iron data according to a standard formula [39].

Bone marrow smears were air-dried, fixed with formaldehyde vapour and stained by the Perls' Prussian blue method using chlorhydric solution of potassium ferrocyanide and Harris haematoxylin. Bone marrow iron content was semi-quantitatively estimated classifying the amount of blue stained haemosiderin perls in bone marrow fragments (aggregates of bone marrow cells) according to 4 categories: 0 (absent), 1 (diminished), 2 (normal) and 3 (abundant) [40]. The categories 0 and 1 were considered indicative of iron stores deficiency [40]. The quantification of haemosiderin perls was performed by an experienced haematologist blinded to clinical and laboratory data (JLA).

Definitions and Cut-off Values

Moderate anaemia was defined as an Hb concentration <11 and ≥ 7 g/dl, severe anaemia as Hb <7 and ≥ 5 g/dl, and very severe anaemia as Hb <5 g/dl. *P. falciparum* infection was defined as presence of asexual parasites in blood detected either by microscopy or real time qPCR. Clinical malaria was defined as the above plus fever (axillary temperature $\geq 37^{\circ}\text{C}$) or history of fever in the preceding 24 hours. Inflammation was defined as CRP ≥ 1 mg/dl [41]. Wasting was defined as weight for height/length Z-score < -2 standard deviations (SD) and stunting as height for age Z-score < -2 SD.

Internationally accepted cut-off values for the iron status markers used in the analysis were as follows: i) ferritin <12 ng/ml if CRP <1 mg/dl, and <30 ng/ml if CRP ≥ 1 mg/dl [42]; <50 ng/ml in children 3–5 months of age, and <7 ng/ml in children >5 months of age [43]; ii) plasma iron <22 $\mu\text{g/dl}$ [43]; iii) plasma transferrin >3.85 g/l [43]; iv) TIBC ≥ 4 mg/l [43]; v) transferrin saturation $<16\%$ [42]; vi) sTfR ≥ 1.76 mg/l (laboratory reference); vii) TfR-F index [sTfR/log ferritin] >1.5 if CRP <1 mg/dl, and >0.8 if CRP ≥ 1 mg/dl [18,44]; viii) MCHC <32 g/dl [42]; ix) MCV <70 fl in children <2 years of age, and <73 fl in children ≥ 2 years of age [45].

Statistical Analysis

The prevalence of iron stores deficiency diagnosed by each marker was estimated as the percentage of children with a value of that marker outside the internationally accepted normal range. The classification of ID by each marker was compared with the classification obtained using the "gold standard" (iron content in the bone marrow) to determine sensitivity, specificity and accuracy of each of them. To visualize the efficacy of each marker to detect ID, Receiver Operating Characteristics (ROC) curves were constructed and the areas under the resulting ROC curves (AUC^{ROC}) were calculated [46]. When a marker does not identify ID the ROC curve lies close to the diagonal and the AUC^{ROC} is close to 0.5. Therefore an AUC^{ROC} not statistically different to 0.5 indicates an ineffective test [47]. Only for those markers with an $\text{AUC}^{\text{ROC}} \geq 0.75$, ROC curves were used to identify new cut-off values with maximal sensitivity to detect ID maintaining the specificity as high as possible over 50%. All comparisons were made for a two-tailed significance level of 0.05. The analysis was performed using the statistical software STATA (version 12.0, STATA Corporation, College Station, TX, USA).

Results

Characteristics of the Study Participants

A total of 443 anaemic children were recruited as cases for the case-control study and from them, 292 (66%) underwent a bone marrow aspiration. Reasons for not performing the bone marrow aspiration were: age below 3 months in 32 (7%) cases, potential risks of sedation in 65 (15%) cases [history of seizures in 47 (11%),

respiratory distress in 9 (2%) and other potential risks in 9 (2%)], adverse effects of sedation in 1 (0.2%) case, technical problems that did not allow the bone marrow aspiration in 47 (11%) cases, and parental withdraw of consent in 6 (1%) cases. Of those children with a bone marrow sample, bone marrow iron content could not be assessed in 112 (38%) cases because of absence of marrow fragments in the bone marrow smears. Thus, the analysis is restricted to the 180 (62%) cases with bone marrow smears assessable for iron content.

Children included in the analysis had an average age, gender distribution and mean Hb concentration similar to that of children who were not included. The mean ages of children included and not included in the study were (mean \pm SD) 22.06 ± 13.67 and 19.97 ± 13.56 months, respectively ($p = 0.1229$); the percentage of males was 57% and 59%, respectively ($p = 0.6421$); and the mean Hb concentrations were (mean \pm SD) 7.73 ± 1.97 g/dl and 7.85 ± 2.03 g/dl, respectively ($p = 0.5584$).

Demographic and clinical characteristics of the study participants are shown in table 1. Eighty percent (144/180) of the children had iron stores deficiency on the basis of bone marrow iron content. Sixty six per cent (119/180) had moderate anaemia, 25% (45/180) had severe anaemia and 9% (16/180) had very severe anaemia. An inflammatory process defined by a CRP ≥ 1 mg/dl was detected in 88% (155/176) of the study participants. Forty four per cent (74/170) of children had *P. falciparum* infection and 43% (73/170) had clinical malaria. An EBV infection was detected in 31% (56/180) of the children, PV-B19 was found in 8% (15/180), 24% (40/164) were HIV positive and 8% (13/173) had bacteraemia. Seventy eight per cent (32/41) of the children were α -thalassaemia carriers.

Iron Deficiency Assessment with Iron Markers

Prevalence of iron stores deficiency by the different markers according to their internationally accepted normal levels is shown in table 2. The proportion of children classified as iron deficient ranged from 1% using plasma transferrin or ferritin by age, to 77% using transferrin saturation. When plasma ferritin was used, the prevalence of ID was 1%, 9% and 12%, depending on whether age, CRP levels or none of them were considered, respectively. TIBC was associated with the lowest ID prevalence after plasma ferritin and transferrin (Table 2).

Table 3 shows the sensitivity and specificity of the different iron markers using the internationally accepted cut-off values and iron content in the bone marrow as reference. The iron markers with the lowest sensitivities were plasma ferritin (15%, 11% when combined with CRP, and 1% when combined with age), transferrin (1%) and TIBC (17%). TfR-F index and MCHC had lower sensitivities (42% and 51%, respectively) than specificities (91% and 71%, respectively), while sTfR, TfR-F index by CRP, plasma iron and transferrin saturation had higher sensitivities (83%, 75%, 70% and 81%) than specificities (50%, 56%, 54% and 40%, respectively), and all four parameters showed the highest accuracies (76%, 71%, 66% and 73%, respectively).

The AUC^{ROC} for each marker are shown in Table 4. Ferritin, transferrin, sTfR, TfR-F index, transferrin saturation and TIBC had significantly higher AUC^{ROC} than 0.5. Among them, sTfR and TfR-F index showed $\text{AUC}^{\text{ROC}} \geq 0.75$ (0.75 and 0.76 respectively) (Fig. 1), thus ROC curves from these two markers were used to explore new cut-off values with maximal sensitivity to identify ID. For sTfR the ROC curve showed no better cut-off than the current one of 1.76, which already had a sensitivity of 83% and a specificity of 50%. The ROC curve for TfR-F index showed that a cut-off of 0.86 instead of the current one of 1.5 (43% change) increased the sensitivity from 42% to 78% and the

accuracy from 52% to 75%, but the specificity was reduced from 91% to 65%.

Discussion

This is the first study on the evaluation of iron markers to identify ID in a high infection pressure setting among anaemic children with any degree of anaemia. The study compares iron markers to bone marrow iron content as the “gold standard”, and shows that detection of ID still remains unresolved in settings with high infection pressure, where ID is most prevalent and its diagnosis and management most needed.

In agreement with a previous report, in this study ferritin, transferrin and TIBC had the lowest sensitivities to diagnose ID [22]. The low sensitivity of ferritin is explained for being an acute phase reactant [19], and thus, its plasma concentration may not reflect the actual iron status in the presence of inflammation, which was very prevalent in the study population (88%) [19,48]. To solve this limitation, it is usually recommended to measure another acute phase protein [such as CRP or α -1-acid glycoprotein], and to adjust the ferritin level by the presence of inflammation [49]. However, in this study the sensitivity of ferritin did not improve after adjustment by the level of CRP, which could be explained by the stabilization of ferritin levels once iron stores are exhausted [48]. The observed low sensitivities of both transferrin and TIBC may also be due to their alteration during an inflammatory process [19,50]. Transferrin is an acute negative protein, i.e., it decreases during an inflammatory process, while TIBC values derive from the measurement of transferrin and therefore are also affected by inflammation.

The TfR-F index has been suggested as a useful parameter for the identification of iron depletion even in settings with high infection pressure [18], and it was shown to be the best predictor of bone marrow iron stores deficiency in a previous report [22]. In contrast, in this study the TfR-F index showed a low sensitivity (42%), and only its adjustment by the level of CRP [44] increased the sensitivity to 75%, while reducing the specificity from 91% to 56%.

We found that sTfR, TfR-F index (adjusted by the level of CRP), and transferrin saturation showed the highest sensitivities. Moreover, sTfR and TfR-F index showed the highest AUC^{ROC} (≥ 0.75). The sTfR ROC curve indicated that there was no alternative cut-off with higher sensitivity than that of the current one (1.76 mg/l) without lowering the specificity below 50%. For the TfR-F index, the ROC curve showed that the sensitivity of this marker could be improved from 42% to 78% by changing the current cut-off from 1.5 to 0.86. It can be noticed that the performance of TfR-F index with the cut-off of 0.86 is similar to the performance of TfR-F index corrected by the CRP level (1.5 if CRP < 1 mg/dl; 0.8 if CRP \geq 1 mg/dl). However, this similarity is not coincidental, since 88% of the study participants had a CRP \geq 1 mg/dl. This observation is in contrast with that of a previous study, whereby in spite of a similar prevalence of inflammation (89%) it was found that the TfR-F index unadjusted by the CRP level was a good marker of ID [22]. The findings of the current study show that the TfR-F index should be adjusted by the CRP level for maximal prediction of bone marrow iron stores deficiency in our setting, and indicate a lack of consistency of the diagnostic efficiency of current iron markers across different populations.

In this study, the MCHC, which could be a potentially feasible iron marker for resource poor settings, had an AUC^{ROC} of only

0.59 ($p=0.3382$). This finding is also in contrast with the performance of this marker observed in the Malawian study where the AUC^{ROC} of MCHC was 0.68 ($p=0.001$) [22]. The poor performance of MCHC in our study could be due to the high prevalence of α -thalassaemia in this population (64% among the 121 anaemic children in the case-control study; 78% among the 41 study participants included in this analysis). It has been reported that α -thalassaemia carriers have lower MCHC than non-carriers, making this marker not suitable to detect hypoferraemia in this group [51].

Differences in the participant's selection criteria between the Malawian study and the present one may explain the discrepancies observed in the performance of the different iron markers studied. In the aforementioned study only severely anaemic children were included (Hb < 5 g/dl), which may preclude its general applicability to the majority of anaemic children who do not have severe anaemia. In the present study all children with anaemia of any degree were recruited (Hb < 11 g/dl). They were children with clinical conditions that required hospital admission and for whom investigation of anaemia is recommended in other less resource-limited settings. The pathophysiology of anaemia may vary by its severity [52], and this may be reflected in different inflammatory processes and rates of erythropoiesis, which may have distinct effects on the iron markers evaluated.

The findings of this study show that the majority (80%) of the anaemic children were iron deficient by direct assessment of iron stores, and that sTfR and TfR-F index adjusted by CRP are the most sensitive markers with specificities of at least 50% to identify ID in this study population. However, even with these markers, 17% and 25% of children, respectively, will not be diagnosed of ID and therefore adequately treated. The fact that the children included in the study were those attending the hospital may limit the extrapolation of the findings to children in the community. However, obvious ethical reasons would not have allowed to perform bone marrow aspirations in healthy (though may be iron-deficient) children; on the other hand, children attending the hospital with anaemia are likely to be those with the greatest need to be diagnosed and adequately treated.

In summary, even the best indirect indicators of ID not only failed to detect an important proportion of iron-deficient cases, but also their assessment is not feasible in most developing settings where the majority of ID occurs. Thus, more reliable, affordable, and easy to measure iron markers are urgently needed to reduce the burden of ID anaemia in resource-poor settings where it is more frequent and severe.

Acknowledgments

We thank the children and their parents-guardians for their participation in the study. We are also grateful to the staff of the MDH and the CISM for their work during the study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RA C. Moraleda MR EM PLA C. Menéndez. Performed the experiments: RA C. Moraleda JLA MR LM. Analyzed the data: RA C. Moraleda LQ. Wrote the paper: RA C. Moraleda C. Menéndez. Interpreted the data: RA C. Moraleda LQ MR LM EM JLA PLA C. Menéndez. Revised the article critically for important intellectual content: RA C. Moraleda LQ MR LM EM JLA PLA C. Menéndez. Read and gave final approval of the version to be published: RA C. Moraleda LQ MR LM EM JLA PLA C. Menéndez.

References

- WHO/CDC (2005) Assessing the Iron Status of Populations: report of a joint WHO/CDC technical consultation on the assessment of iron status at the population level. Geneva, World Health Organization.
- WHO (2008) Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva, World Health Organization.
- Stoltzfus R, Dreyfus ML (1998) Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. Edited by INACG, WHO and UNICEF IUNACG Washington.
- FAO/WHO (2005) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin, Mineral Requirements. Iron. Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition. 2nd Edition. Geneva, World Health Organization, 246–278.
- Lind T, Lonnerdal B, Persson LA, Stenlund H, Tennefors C, et al. (2003) Effects of weaning cereals with different phytate contents on hemoglobin, iron stores, and serum zinc: a randomized intervention in infants from 6 to 12 mo of age. *Am J Clin Nutr* 78: 168–175.
- Crompton DW, Nesheim MC (2002) Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr* 22: 35–59.
- Menendez C, Schellenberg D, Quinto L, Kahigwa E, Alvarez L, et al. (2004) The effects of short-term iron supplementation on iron status in infants in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 71: 434–440.
- Lozoff B (2007) Iron deficiency and child development. *Food Nutr Bull* 28: S560–571.
- Menendez C, Kahigwa E, Hirt R, Voumatsou P, Aponte JJ, et al. (1997) Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet* 350: 844–850.
- Sazawal S, Black RE, Ramsan M, Chwaya HM, Stoltzfus RJ, et al. (2006) Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 367: 133–143.
- Okeke JU, Yahav D, Shbita R, Paul M (2011) Oral iron supplements for children in malaria-endemic areas. *Cochrane Database Syst Rev*: CD006589.
- WHO UNICEF (2006) Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent. Joint Statement WHO UNICEF.
- WHO (2007) Conclusions and recommendations of the WHO Consultation on prevention and control of iron deficiency in infants and young children in malaria endemic areas. *Food and Nutrition Bulletin* 28: 621–631.
- Nyakeriga AM, Troye-Blomberg M, Dorfman JR, Alexander ND, Back R, et al. (2004) Iron deficiency and malaria among children living on the coast of Kenya. *J Infect Dis* 190: 439–447.
- Zimmermann MB, Molinari L, Staubli-Asobayire F, Hess SY, Chaouki N, et al. (2005) Serum transferrin receptor and zinc protoporphyrin as indicators of iron status in African children. *Am J Clin Nutr* 81: 615–623.
- Menendez C, Quinto LL, Kahigwa E, Alvarez L, Fernandez R, et al. (2001) Effect of malaria on soluble transferrin receptor levels in Tanzanian infants. *Am J Trop Med Hyg* 65: 138–142.
- Williams TN, Maitland K, Rees DC, Peto TE, Bowden DK, et al. (1999) Reduced soluble transferrin receptor concentrations in acute malaria in Vanuatu. *Am J Trop Med Hyg* 60: 875–878.
- Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A (1997) Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 89: 1052–1057.
- Konijn AM (1994) Iron metabolism in inflammation. *Baillieres Clin Haematol* 7: 829–849.
- Cook JD, Skikne BS, Baynes RD (1993) Serum transferrin receptor. *Annu Rev Med* 44: 63–74.
- Phiri KS, Calis JC, Kachala D, Borgstein E, Waluza J, et al. (2009) Improved method for assessing iron stores in the bone marrow. *J Clin Pathol* 62: 685–689.
- Phiri KS, Calis JC, Siyasiya A, Bates I, Brabin B, et al. (2009) New cut-off values for ferritin and soluble transferrin receptor for the assessment of iron deficiency in children in a high infection pressure area. *J Clin Pathol* 62: 1103–1106.
- Alonso P, Sautte F, Aponte JJ, Gomez-Olive FX, Nhalongo A, et al. (2001) Manhica DSS, Mozambique. Population, Health and Survival at INDEPTH Sites 1.
- Guinovart C, Bassat Q, Sigauque B, Aide P, Sacarlal J, et al. (2008) Malaria in rural Mozambique. Part I: children attending the outpatient clinic. *Malar J* 7: 36.
- Bassat Q, Guinovart C, Sigauque B, Aide P, Sacarlal J, et al. (2008) Malaria in rural Mozambique. Part II: children admitted to hospital. *Malar J* 7: 37.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, et al. (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364: 1411–1420.
- Roca A, Sigauque B, Quinto L, Morais L, Berenguera A, et al. (2010) Estimating the vaccine-preventable burden of hospitalized pneumonia among young Mozambican children. *Vaccine* 28: 4851–4857.
- Gonzalez R, Munguambe K, Aponte J, Bavo C, Nhalungo D, et al. (2012) High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a community-based survey. *HIV Med* [Epub ahead of print].
- Priestley SJ, Taylor J, McAdam CM, Francis P (2001) Ketamine sedation for children in the emergency department. *Emerg Med (Fremantle)* 13: 82–90.
- Migita RT, Klein EJ, Garrison MM (2006) Sedation and analgesia for pediatric fracture reduction in the emergency department: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 160: 46–51.
- Parker RI, Mahan RA, Giugliano D, Parker MM (1997) Efficacy and safety of intravenous midazolam and ketamine as sedation for therapeutic and diagnostic procedures in children. *Pediatrics* 99: 427–431.
- Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, et al. (1994) Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 344: 1175–1181.
- Mayor A, Serra-Casas E, Bardaji A, Sanz S, Puyol L, et al. (2009) Sub-microscopic infections and long-term recrudescence of *Plasmodium falciparum* in Mozambican pregnant women. *Malar J* 8: 9.
- Sigauque B, Roca A, Bassat Q, Morais L, Quinto L, et al. (2009) Severe pneumonia in Mozambican young children: clinical and radiological characteristics and risk factors. *J Trop Pediatr* 55: 379–387.
- WHO (2007) Case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children.
- Roca A, Sigauque B, Quinto L, Mandomando I, Valles X, et al. (2006) Invasive pneumococcal disease in children <5 years of age in rural Mozambique. *Trop Med Int Health* 11: 1422–1431.
- Valles X, Flannery B, Roca A, Mandomando I, Sigauque B, et al. (2006) Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive and nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Mozambique. *Trop Med Int Health* 11: 358–366.
- Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J (1993) Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 83: 105–111.
- Gambino R, Desvarieux E, Orth M, Matan H, Ackattupathil T, et al. (1997) The relation between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically measured transferrin concentrations in human serum. *Clin Chem* 43: 2408–2412.
- Beutler E, Robson MJ, Buttenwieser E (1958) A comparison of the plasma iron, iron-binding capacity, sternal marrow iron and other methods in the clinical evaluation of iron stores. *Ann Intern Med* 48: 60–82.
- Gabay C, Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340: 448–454.
- WHO UNICEF, UNU (2003) Iron Deficiency Anaemia Assessment, Prevention and Control. A guide for programme managers. WHO/NHD/0101 WHO Geneva.
- Nicholson JF, Pesce MA (2004) Pruebas de laboratorio en lactantes y niños. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, eds *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th ed Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier chap 709.
- Thomas C, Thomas L (2002) Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 48: 1066–1076.
- Brugnara C, Oski FA, Nathan DG (2009) Diagnostic approach to anemic patient. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE Nathan and Oski's *Hematology of infancy and childhood* 7th ed Saunders Elsevier chap 10
- Armitage P, Berry G (1994) *Statistical methods in epidemiology. Diagnostic tests and screening procedures. Statistical Methods in Medical Research*, Third edition, Blackwell Scientific Publications.
- DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL (1988) Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44: 837–845.
- Skikne BS, Flowers CH, Cook JD (1990) Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 75: 1870–1876.
- Thurnham DI, McCabe LD, Haldar S, Wieringa FT, Northrop-Clewes CA, et al. (2010) Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 92: 546–555.
- Northrop-Clewes CA (2008) Interpreting indicators of iron status during an acute phase response—lessons from malaria and human immunodeficiency virus. *Ann Clin Biochem* 45: 18–32.
- Vaya A, Suescum M, Hernandez JL, Perez ML, Palanca S, et al. (2011) Rheological red blood cell behaviour in minor alpha-thalassaemia carriers. *Clin Hemorheol Microcirc* 48: 241–246.
- Boele van Hensbroek M, Calis JC, Phiri KS, Vet R, Munthali F, et al. (2010) Pathophysiological mechanisms of severe anaemia in Malawian children. *PLoS One* 5(9): e12589.

Artículo 3: La gravedad de la anemia se asocia con la presencia de hemozoína en la médula ósea en niños expuestos a *Plasmodium falciparum*

Ruth Aguilar, Cinta Moraleda, Ariel H. Achtman, Alfredo Mayor, Llorenç Quintó, Pau Cisteró, Augusto Nhabomba, Eusebio Macete, Louis Schofield, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez

Resumen

La anemia es una importante causa de muerte en las áreas endémicas de malaria. A pesar de ello, los efectos de la presencia de parásitos de *Plasmodium falciparum* y de hemozoína en la médula ósea son poco conocidos. En este trabajo se ha estudiado la presencia de parásitos de malaria y de hemozoína en la médula ósea de 290 niños anémicos atendidos en un hospital rural de Mozambique. Las infecciones por *P. falciparum* en sangre periférica se determinaron mediante microscopía y RCP. La parasitemia, la presencia de hemozoína y la diseritropoyesis en médula ósea se determinaron mediante microscopía. Un 42% (123/290) de los niños tenían parásitos en la médula ósea y un 49% (111/226) presentaron hemozoína, siendo concomitante con parasitemia en un 83% (92/111) de los casos. Las formas sexuales y asexuales maduras del parásito fueron muy prevalentes (62% gametocitos, 71% trofozoitos, 23% esquizontes) sugiriendo que existe secuestro en este tejido. Un 16% (19/120) de los niños sin infección periférica presentaron hemozoína en la médula ósea. La presencia de hemozoína en médula ósea se asoció de manera independiente con una menor concentración de hemoglobina ($p=0,005$) y se observó más frecuentemente en las médulas óseas que presentaron diseritropoyesis ($p=0,010$). Los resultados de este estudio *ex vivo* sugieren que la hemozoína en la médula ósea tiene un papel en la patogénesis de la anemia asociada a malaria a través de una eritropoyesis ineficaz. Este hallazgo puede tener importantes implicaciones en el desarrollo de drogas para prevenir y tratar la anemia asociada a malaria.

Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to *Plasmodium falciparum*

Ruth Aguilar,^{1,2,3} Cinta Moraleda,^{1,3}
Ariel H. Achtman,^{4,5} Alfredo Mayor,^{1,2}
Llorenç Quintó,¹ Pau Cisteró,¹
Augusto Nhabomba,³ Eusebio Macete,³
Louis Schofield,^{4,5} Pedro L. Alonso^{1,3}
and Clara Menéndez^{1,3}

¹Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic – University of Barcelona), ²CIBER Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain, ³Manhiça Health Research Centre (CISM), Maputo, Mozambique, ⁴Division of Infection and Immunity, The Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research, and ⁵Department of Medical Biology, The University of Melbourne, Melbourne, Vic., Australia

Received 12 September 2013; accepted for publication 28 November 2013

Correspondence: Clara Menéndez, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic – University of Barcelona), Rosselló 132, 5th floor, E-08036 Barcelona, Spain. E-mail: MENENDEZ@clinic.ub.es

The importance of acute haemolysis to malarial anaemia is well characterized (Akinosoglou *et al*, 2012). However, less is known about the contributions of abnormal development of erythroid precursors (dyserythropoiesis) and inadequate erythropoietic response driven by proinflammatory cytokines and other potential mediators of inflammation, such as haemozoin (Hz) (Casals-Pascual *et al*, 2006; Keller *et al*, 2009; McDevitt *et al*, 2004). The capacity of *Plasmodium falciparum* to sequester in many organs and vascular beds (Beeson & Brown, 2002) suggests that parasites may also sequester in the bone marrow where they could directly influence erythropoiesis. In agreement with this, several reports have described the presence of sexual (Abdulsalam *et al*, 2010; Farfour *et al*, 2012; Imirzalioglu *et al*, 2006; Smalley *et al*, 1981; Smalley & Brown, 1980) and asexual (Smalley *et al*, 1981; Wickramasinghe *et al*, 1987) *P. falciparum* parasites in bone marrows of malaria-infected or -exposed patients. However, many of these reports are individual case studies (Abdulsalam *et al*, 2010; Farfour *et al*, 2012; Imirzalioglu

Summary

There are no large-scale *ex vivo* studies addressing the contribution of *Plasmodium falciparum* in the bone marrow to anaemia. The presence of malaria parasites and haemozoin were studied in bone marrows from 290 anaemic children attending a rural hospital in Mozambique. Peripheral blood infections were determined by microscopy and polymerase chain reactions. Bone marrow parasitaemia, haemozoin and dyserythropoiesis were microscopically assessed. Forty-two percent (123/290) of children had parasites in the bone marrow and 49% (111/226) had haemozoin, overlapping with parasitaemia in 83% (92/111) of cases. Sexual and mature asexual parasites were highly prevalent (62% gametocytes, 71% trophozoites, 23% schizonts) suggesting their sequestration in this tissue. Sixteen percent (19/120) of children without peripheral infection had haemozoin in the bone marrow. Haemozoin in the bone marrow was independently associated with decreased Hb concentration ($P = 0.005$) and was more common in dyserythropoietic bone marrows ($P = 0.010$). The results of this *ex vivo* study suggest that haemozoin in the bone marrow has a role in the pathogenesis of malarial-anaemia through ineffective erythropoiesis. This finding may have clinical implications for the development of drugs targeted to prevent and treat malarial-anaemia.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, haemozoin, bone marrow, dyserythropoiesis, anaemia.

et al, 2006), and comparisons with patients from the same area without peripheral blood infection are lacking. Moreover, from sub-Saharan Africa, where malaria transmission is most intense, only one study in 22 Gambian children has reported the prevalence and density of *P. falciparum* parasites in the bone marrow (Smalley *et al*, 1981). There is even less information on the presence and role of Hz – one of the products of haemoglobin digestion by the parasites – in this tissue. Only one study reported the presence of Hz in myeloid and erythroid cells of post-mortem bone marrow sections from children who died with severe malaria (Casals-Pascual *et al*, 2006). However, the presence and clinical impact of Hz in the bone marrow of children exposed to malaria (not necessarily currently infected with the parasite) has not yet been studied *ex vivo*. In spite of the evidence suggesting the role of bone marrow dysfunction in the pathogenesis of malarial anaemia (Casals-Pascual *et al*, 2006; Keller *et al*, 2009; Were *et al*, 2006), there is little detailed *ex vivo* information on the presence of malaria parasites and/or Hz

R. Aguilar *et al*

in this tissue, and there is only *in vitro* data on the negative effects of Hz on the development of erythroid cells (Awandare *et al*, 2011; Lamikanra *et al*, 2009; Schrimpe & Wright, 2009; Skorokhod *et al*, 2010).

In order to better understand the involvement of bone marrow *P. falciparum* infection in the pathogenesis of malarial anaemia, we present here the findings of the first large-scale *ex vivo* study on the presence and effects of malaria parasites and Hz in the bone marrow of anaemic children exposed to malaria.

Methods

Study site, participants and procedures

The study was carried out at the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) in Manhiça District, southern Mozambique, where malaria transmission is of moderate intensity and perennial with some seasonality, and more than 95% of the malaria infections are due to *P. falciparum* (Alonso *et al*, 2001; Guinovart *et al*, 2008). In this setting, the prevalence of anaemia (Hb <110 g/l) among apparently healthy children aged 1–59 months old in the community is 91.2% (C. Moraleda, R. Aguilar, L. Quintó, M. Renom, A. Nhabomba, J. J. Aponte, D. Nhalungo, H. Martins, E. Macete, P. L. Alonso, C. Menéndez, unpublished data).

The study was undertaken as part of a case–control study on the aetiology and risk factors of anaemia in children. For the study here presented, children aged 1–59 months, admitted to the Manhiça District Hospital (MDH) between October 2008 and August 2010 with anaemia [Hb <110 g/l by the HemoCue system (HemoCue® HB 201+, Ängelholm, Sweden)], and with no history of blood transfusion in the preceding 4 weeks, were recruited as participants.

A complete clinical examination was performed and the information was recorded onto standardized questionnaires together with demographic data. Four millilitre of venous blood were collected by venepuncture. Bone marrow was aspirated from the anterior-superior iliac crest or the tibia, under conscious sedation with parenteral ketamine, atropine and diazepam. To exclude possible artefacts due to phagocytosis and cell lysis, bone marrow smears were performed immediately after bone marrow aspiration and, to minimize the contamination with peripheral blood, the smears were prepared with the first drops of the aspirate. Bone marrow aspirates were not performed in children <3 months of age or with medical contra-indications, such as severe respiratory distress, history of seizures, suspected intracranial hypertension, or any risk identified by the responsible paediatrician. There were no adverse effects associated to bone marrow biopsy, but there were three adverse effects associated to sedation. One child presented bronchial hyper-secretion and bone marrow aspirate was then not performed. Two other children vomited during the aspirate, also due to the administration of sedatives. Resuscitation equipment was always

available during the procedure. All children received treatment after sample collection, according to their clinical condition and following the national guidelines.

The study protocol was approved by the National Mozambican Ethics Committee and the Hospital Clínic of Barcelona Ethics Review Committee. The parents/guardians of all children included in the study provided written informed consent after being informed of the goals, procedures, benefits and risks of taking a bone marrow sample from their child, and were offered no financial or material inducement for participation.

Laboratory methods

Reticulocyte counts were performed on Cresil Blue stained peripheral blood films, and *P. falciparum* detection/quantification on Giemsa stained smears according to standard, quality-controlled procedures (Alonso *et al*, 1994). To calculate peripheral blood parasite density, *P. falciparum* asexual stages and leucocytes were counted in the same fields until either 500 parasites or leucocytes had been recorded and 8000 leucocytes/ μ l of blood were assumed. *P. falciparum*-specific real time quantitative PCR (qPCR) was performed on all microscopically negative peripheral blood samples to identify submicroscopic parasitaemia as previously described (Mayor *et al*, 2009). Briefly, DNA was extracted from 20 μ l of blood spotted onto filter paper and eluted in 100 μ l of water, and 5 μ l of DNA were screened for *P. falciparum* DNA by qPCR targeting the 18S ribosomal RNA gene.

Bone marrow smears were fixed and stained with May-Grünwald Eosin Methylene Blue solution and 10% Giemsa for cytological and parasitological examination. To obtain the myelogram data, two bone marrow smears were examined under 100 \times objective and oil immersion lens (1000 \times final magnification), and 100 cells were counted in 13–15 fields from each smear (7–8 central cells per field). Results were expressed as the average percentage of each type of cells observed. Iron content in the bone marrow was assessed by the Perls' Prussian blue method. Smears were evaluated blinded to clinical and laboratory details. Bone marrow smears were considered microscopically negative for *P. falciparum* when no parasites were detected after the examination of 100 fields at 100 \times magnification. Asexual parasitaemia was estimated as the percentage of infected red blood cells (iRBCs) in 1000 RBCs, and gametocytes were counted in 100 fields. Hz content was assessed in bone marrow macroscopic cell aggregates (also called fragments, spicules or particles), which are composed of stromal and parenchymal cells and are needed for an optimal bone marrow smear examination (Bain, 2001; Lee *et al*, 2008; Phiri *et al*, 2009). Hz was detected by light microscopy as coarse brown granular material with birefringence under polarized light (Romagosa *et al*, 2004). The Hz content was semi-quantitatively classified as: absent (no granules); little (few heterogeneously distributed granules); medium (larger numbers of homogeneously

distributed granules); abundant (many granules, some of them overlapping in conglomerates).

Human immunodeficiency virus (HIV) status was assessed using the Determine HIV-1/2 Rapid Test (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) and confirmed by the Uni-Gold Rapid Test (Trinity Biotech Co., Bray, Ireland). HIV PCR from dried blood spot was performed using the AmpliCor HIV-1 DNA-PCR kit (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA). Haemoglobinopathies were assessed by HPLC using the β -thalassaemia Short Program from the Variant Haemoglobin Testing System[®] (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Detection of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency was performed by the Beutler fluorescent spot test (Beutler *et al*, 1979).

Definitions and statistical analysis

Peripheral blood malaria infection was defined as presence of *P. falciparum* asexual parasites detected by either microscopy or real time qPCR. Submicroscopic *P. falciparum* infection was defined as the detection of parasites in blood by real time qPCR and blood smear negative. Fever was defined as axillary temperature $\geq 37^\circ\text{C}$. Clinical malaria was defined as peripheral blood malaria infection plus fever or history of fever in the preceding 24 h. Severe anaemia was defined as Hb < 50 g/l. Cerebral malaria was defined as deep coma (Blantyre coma score ≤ 2) (Newton *et al*, 1997). Respiratory distress was defined as deep breathing or chest in-drawing. HIV infection was defined as PCR-positive for children ≤ 18 month of age; two rapid tests positive or discordant results and PCR positive for children ≥ 18 months of age. Bone marrow dyserythropoiesis was defined as the presence of erythroblasts with bi- and tri-nuclearity, inter-nuclear chromatin bridges, nuclear pyknosis or any other chromatin alterations (Wickramasinghe, 1997). Bone marrow erythroid arrest was defined as a proportion of erythroid cells $\leq 15\%$, and erythroid hyperplasia as a proportion of erythroid cells $\geq 40\%$. Reticulocytopenia was defined as a percentage of reticulocytes in peripheral blood $< 0.5\%$. Severe ineffective erythropoiesis was defined as a Reticulocyte Production Index (RPI) < 1 (Ouma *et al*, 2010), where $\text{RPI} = \text{reticulocyte index (RI)}/\text{maturation factor (MF)}$, where $\text{RI} = [\text{reticulocyte count (\%)} \times \text{haematocrit (Hct)}/0.36]$ and $\text{MF} = b + (m)(x)$, where $b = 1$, $m = 0.05$, and $x = (\text{average normal population Hct} - \text{patient Hct})$. Iron deficiency was defined as an absent or diminished amount of blue stained haemosiderin perls in bone marrow cell aggregates (Aguilar *et al*, 2012).

Differences in clinical and demographic parameters between malaria and no-malaria infected children were evaluated by Student's *t*-test when continuous variables and by Fisher's exact test when categorical variables. Differences in mean Hb levels between children with or without *P. falciparum* in peripheral blood and in bone marrow, and between children with and without dyserythropoiesis were evaluated by Student's *t*-test. Differences in the prevalence of peripheral

blood infection and bone marrow abnormalities according to bone marrow parasitaemia and/or Hz where analysed by Fisher's exact test. The associations of dyserythropoiesis with iron deficiency, erythroid hyperplasia, erythroid arrest, reticulocytopenia and severe ineffective erythropoiesis were analysed by Chi-square test. Non-parametric tests were used to analyse parasite densities: Spearman's correlation coefficient to evaluate the relationship between parasite density in bone marrow and in peripheral blood; Rank Sum test to evaluate differences in bone marrow parasite density according to dyserythropoiesis; and Wilcoxon-type test for trend to evaluate the trend of bone marrow parasite density across groups with increasing Hz content. Differences in the associations between Hz, peripheral blood parasitaemia, bone marrow parasitaemia and dyserythropoiesis were analysed by Fisher's exact test. Multivariate linear regression models were applied to evaluate the adjusted association of Hb concentration with asexual parasitaemia, gametocytaemia and Hz content in the bone marrow; samples positive for asexual parasitaemia or for gametocytaemia were each divided into two groups using as cut-off the median value for each group. Statistical analyses were performed using STATA.12 (STATA Corporation, College Station, TX, USA). All *P*-values are two-sided and were considered significant when < 0.05 .

Results

Characteristics of the study participants

We examined 290 anaemic children who had undergone bone marrow aspiration as cases in an anaemia case-control study. Demographic and clinical characteristics of the study participants are shown in Table I. *Plasmodium falciparum* parasites were detected in peripheral blood of 138 (48%) children, with 112 microscopic and 26 submicroscopic infections. Ninety-eight percent (122/125) of *P. falciparum*-infected children presented with clinical malaria, and the median [interquartile range (IQR)] of preceding days they had signs and symptoms were 1 (1–2). The mean [\pm standard deviation (SD)] Hb concentration was 76 (± 21) g/l, and was lower in children with *P. falciparum* peripheral blood infection (66 ± 21 g/l) than in non-infected children (84 ± 16 g/l) ($P < 0.001$). Twenty one percent of the *P. falciparum*-infected children presented severe anaemia (Hb < 50 g/l) vs. only 5% of the non-infected ones ($P < 0.001$). Only 10% of the malaria-infected children showed respiratory distress vs. 30% of the non-infected ones. None of the malaria-infected children presented cerebral malaria. From the 290 children included in the study, 260 had bone marrow myelogram data, and from those, the mean (\pm SD) densities of erythroid and myeloid progenitors were 28 (± 15)% and 51 (± 14)%, respectively. Two hundred and fifteen children had normo- to hyper-cellular bone marrows, required to diagnose erythroid arrest or erythroid hyperplasia. Eighteen percent (38/215) of children presented erythroid arrest and

Table I. Demographic and clinical characteristics of the children included in the study.

	Total (n = 290)	Malaria (n = 138)	No malaria (n = 152)	P value
Age, months (mean ± SD)	21 ± 14	24 ± 14	18 ± 13	<0.001
Male (n, %)	164 (56.5)	76 (55)	88 (58)	0.637
Haemoglobin (g/l) (mean ± SD)	76 ± 21	66 ± 21	84 ± 16	<0.001
Fever (n, %)	262 (90)	135 (98)	127 (84)	<0.001
HIV (n, %)				
Positive	59 (20)	13 (9)	46 (30)	<0.001
Negative	196 (67)	107 (78)	86 (57)	
Indeterminate	3 (1)	1 (1)	2 (1)	
No data	35 (12)	17 (12)	18 (12)	
G6PD deficiency (n, %)	28/286 (10)	15/137 (11)	13/149 (9)	0.556
Haemoglobin S (n, %)	2/282 (1)	1/132 (1)	1/150 (1)	0.265
Respiratory distress (n, %)	60 (21)	15 (11)	45 (30)	<0.001
Severe anaemia (n, %)	36 (12)	29 (21)	7 (5)	<0.001
Diagnoses (n, %)				
Convulsions	7 (2)	1 (1)	6 (4)	<0.001
Diarrhoea	17 (6)	1 (1)	16 (10)	
LRTI	16 (5)	4 (3)	12 (8)	
URTI	2 (1)	1 (1)	1 (1)	
Malnutrition	43 (15)	6 (4)	37 (24)	
Meningitis	3 (1)	1 (1)	2 (1)	
Nephritis	4 (1)	0 (0)	4 (3)	
Pneumonia	56 (19)	7 (5)	49 (32)	
Septicaemia	3 (1)	1 (1)	2 (1)	
SSTI	6 (2)	1 (1)	5 (3)	
Tuberculosis	3 (1)	0 (0)	3 (2)	
Other	12 (4)	0 (0)	12 (8)	
No data	4 (1)	1 (1)	3 (2)	
Outcome (n, %)				
Alive	260 (90)	128 (93)	132 (87)	0.04
Dead	7 (2)	0 (0)	7 (5)	
Left	7 (2)	2 (1.5)	5 (3)	
Transferred	11 (4)	6 (4)	5 (3)	
No data	5 (2)	2 (1.5)	3 (2)	

G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; HIV, human immunodeficiency virus; LRTI, lower respiratory tract infection; SD, standard deviation; SSTI, skin or soft tissue infection; URTI, upper respiratory tract infection.

P values are from Fisher's exact test (categorical variables) and Student's *t* test (continuous variables).

27% (58/215) showed erythroid hyperplasia. Bone marrow dyserythropoiesis was observed in 68% (161/237) of children, with nuclear pyknosis followed by irregular nuclei as the most commonly detected anomalies (data not shown). Prevalences of bone marrow abnormalities according to bone marrow parasitaemia and/or H_z are shown in Table II. Dyserythropoiesis was more prevalent in bone marrows with H_z, and erythroid hyperplasia was more prevalent in bone marrows with parasites. The frequency of reticulocytopenia did not vary depending on the presence/absence of parasites/H_z in bone marrow, and severe ineffective erythropoiesis showed a trend to be higher in children with parasites in the bone marrow. The mean (±SD) Hb concentration was lower in children with dyserythropoiesis compared to children without dyserythropoiesis (72.7 ± 21.3 g/l vs. 79.7 ± 19.8 g/l, *P* = 0.017). Children with dyserythropoiesis did not have an increased prevalence of erythroid arrest [13% (19/149) vs.

18% (13/72), *P* = 0.294] or erythroid hyperplasia [22% (33/149) vs. 33% (24/72), *P* = 0.075]. However, they had an increased prevalence of reticulocytopenia [50% (58/115) vs. 31% (18/59), *P* = 0.012], and of severe ineffective erythropoiesis [92% (100/109) vs. 76% (41/54), *P* = 0.005] compared to children without dyserythropoiesis. Eighty percent (144/180) of children had iron store deficiency by bone marrow examination, but there was no difference in the frequency of dyserythropoiesis between those children showing iron deficiency and those who did not (*P* = 0.321).

Prevalence of Plasmodium falciparum sexual and asexual stages and H_z in the bone marrow

Forty-two percent (123/290) of children presented parasites in the bone marrow. Ring stages were found in 98% (120/123) of parasitized bone marrows, trophozoites in 71% (87/123),

Table II. Peripheral blood infection and bone marrow abnormalities according to bone marrow parasitaemia and/or haemozoin.

	Bone marrow (<i>n</i> = 226)				<i>P</i> value
	No parasites or Hz (<i>n</i> = 113)	Only parasites (<i>n</i> = 2)	Only Hz (<i>n</i> = 19)	Parasites and Hz (<i>n</i> = 92)	
Peripheral blood					
Microscopic parasitaemia 87/226 (38.5%)	1/113 (0.9)	2/2 (100)	1/19 (5.3)	83/92 (90.2)	<0.001
Submicroscopic parasitaemia 18/226 (7.9%)	11/113 (9.7)	0/2 (0)	2/19 (10.5)	6/92 (6.5)	0.718
No parasitaemia 120/226 (53.1%)	101/113 (89.4)	0/2 (0)	16/19 (84.2)	3/92 (3.3)	<0.001
Bone marrow abnormalities					
Dyseithropoiesis 129/185 (69.7%)	54/89 (60.7)	1/1 (50)	15/16 (93.7)	59/79 (74.7)	0.016
Erythroid arrest 34/209 (16.3%)	26/108 (24.1)	0/2 (0)	4/17 (23.5)	4/82 (4.9)	0.001
Erythroid hyperplasia 58/209 (27.7%)	20/108 (18.5)	1/2 (50)	4/17 (23.5)	33/82 (40.2)	0.005
Reticulocytopenia 80/167 (47.9%)	40/84 (47.6)	2/2 (100)	4/13 (30.7)	34/68 (50)	0.306
Severe ineffective erythropoiesis 138/157 (87.9%)	66/79 (83.5)	2/2 (100)	8/10 (80)	62/66 (93.9)	0.129

Hz, haemozoin.

Data are *n/N* (column percentage).

schizonts in 23% (28/123) and gametocytes of different maturity stages in 62% (76/123) (Fig 1A). Ninety-six percent (73/76) of the bone marrows with gametocytes also contained asexual parasites. The densities of sexual and asexual bone marrow parasites were not correlated (*r*-Spearman = 0.0108, *P* = 0.932).

Aggregates of cells required for Hz assessment were present in 78% (226/290) of bone marrow smears (Fig 1B, C). Forty-nine percent (111/226) of children presented Hz in the bone marrow, and its presence was associated with *P. falciparum* parasitaemia in 83% (92/111) of cases (*P* < 0.001). Among parasite-positive bone marrows, asexual parasite density increased with increasing Hz content (*P* = 0.032) (Fig 2). Parasites or Hz were detected independently of each other in the bone marrow of 1% (2/226) and 8% (19/226) children, respectively.

Association of *Plasmodium falciparum* peripheral blood parasitaemia with bone marrow parasitaemia and Hz

Eighty-nine percent (109/123) of children with microscopically detectable parasites in the bone marrow also had peripheral blood microscopic infections; and 98% (164/167) of children without parasites detected in the bone marrow were also negative in peripheral blood by microscopy (*P* < 0.001). There was a positive correlation between asexual parasite densities at the microscopic level in both compartments (*r*-Spearman = 0.846, *P* < 0.001) (Fig 3). Of the 26 children with sub-patent peripheral blood infections, 16

(62%) did not have parasites in the bone marrow by microscopic examination. Ninety-seven percent (89/92) of children with parasites and Hz in the bone marrow showed peripheral blood infection; and 89% (101/113) of children with neither parasites nor Hz in the bone marrow showed no peripheral blood infection (*P* < 0.001) (Table II). Interestingly, 16% (19/120) of children without peripheral blood infection had Hz in the bone marrow and 2.5% (3/120) had also parasites in this tissue (Table II).

Ninety-six percent (73/76) of children with gametocytes in the bone marrow had data on gametocytes in peripheral blood, and 14% of those (10/73) showed sexual parasites in peripheral circulation. Gametocytes in peripheral blood were detected in only 1% (2/206) of the children without gametocytes in the bone marrow (with peripheral blood data not available for eight children).

Impact of *Plasmodium falciparum* parasitaemia and Hz in the bone marrow on anaemia and dyserythropoiesis

The Hb concentration was statistically significantly lower in children with parasites in the bone marrow compared to children without parasites [mean (\pm SD): 65 (\pm 22) vs. 83 (\pm 17) g/l, respectively; *P* < 0.001]; and among children with parasites in this tissue, the Hb concentration was lower when gametocytes were observed [mean (\pm SD): 61 (\pm 19) vs. 73 (\pm 23) g/l; *P* < 0.001]. In the regression models adjusted for peripheral blood infection, the Hb concentration was statistically significantly associated with the Hz content

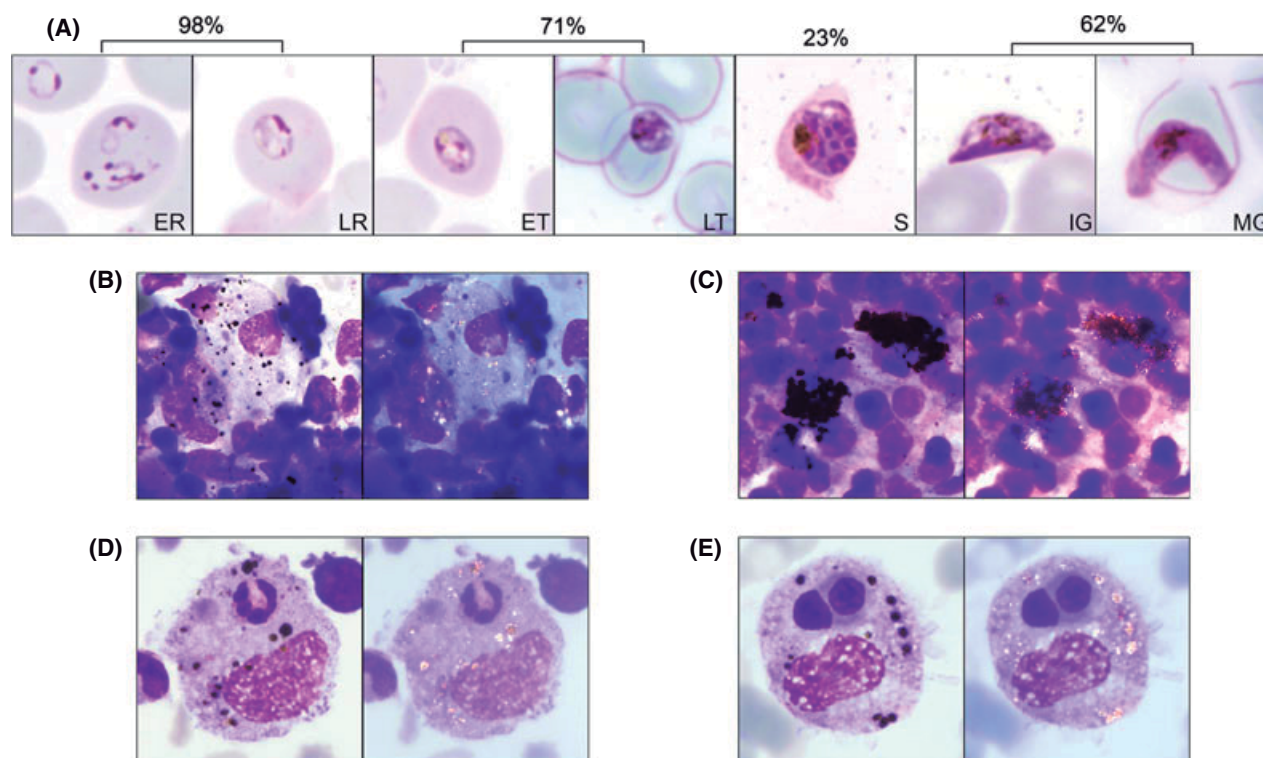


Fig 1. Representative images of *Plasmodium falciparum* sexual and asexual parasites and haemozoin observed in bone marrow smears (A–E). (A) Sexual and asexual parasite forms in different maturation stages (ER, early ring; LR, late ring; ET, early trophozoite; LT, late trophozoite; S, schizont; IG, immature gametocyte; MG, mature gametocyte). Percentages refer to the proportion of bone marrow samples with parasites containing the indicated stage. (B) Medium amount of haemozoin in an aggregate of bone marrow cells (right image: under polarized light). (C) Abundant amount of haemozoin in an aggregate of bone marrow cells (right image: under polarized light). (D, E) Macrophages containing haemozoin (right images: under polarized light). Images were obtained by microscopy at 100 \times magnification of bone marrow smears fixed and stained with May-Grünwald Eosin Methylene Blue solution and 10% Giemsa. Images were taken with an Olympus BX51 microscope equipped with an Olympus DP70 camera and the Olympus Cell[^]B Image Acquisition Software.

($P < 0.001$) and with the presence of gametocytes ($P = 0.021$), but not with bone marrow asexual parasitaemia ($P = 0.395$). In the multivariate model applied to analyse the associations of peripheral blood infection, bone marrow asexual parasitaemia, bone marrow gametocytaemia and bone marrow Hz content with the Hb concentration, only peripheral blood infection and bone marrow Hz content remained independently associated with reduced Hb concentration ($P = 0.041$ and $P = 0.005$, respectively) (Table III).

Bone marrows with dyserythropoiesis showed a higher prevalence of Hz than did those without it [57% (74/129) vs. 37% (21/57), $P = 0.011$] (Fig 4A). Among Hz-positive bone marrows, there was no statistically significant difference in Hz level between bone marrows with and without dyserythropoiesis [mean (\pm SD) of Hz content: 2.16 (\pm 0.10) vs. 1.86 (\pm 0.17), $P = 0.122$] (Fig 4B). Although not statistically significant, children with dyserythropoiesis showed a trend towards a higher prevalence of malaria parasitaemia in the bone marrow compared to those without dyserythropoiesis [45% (69/152) vs. 35% (25/72), $P = 0.148$] (Fig 4C). Among parasite-positive bone marrows, those with dyserythropoiesis showed higher asexual parasite densities in this tissue than

those without dyserythropoiesis [median (IQR) of % iRBCs: 2.8 (1.2–5.9) vs. 1.2 (0.1–3.8), $P = 0.008$] (Fig 4D).

Discussion

This is the first large-scale *ex vivo* study on the presence and effects of *P. falciparum* parasites and Hz in the bone marrow of anaemic children exposed to malaria. The study shows that the majority of *P. falciparum* peripheral blood infections are accompanied by bone marrow infections of positively correlated parasitaemia and Hz content; and that sexual and mature asexual parasites are highly prevalent, which might suggest their sequestration in this tissue. More importantly, the study demonstrates that the presence and content of Hz in the bone marrow is significantly and independently associated with a decreased Hb concentration, suggesting its contribution to malarial anaemia. In addition, the observed association with dyserythropoiesis indicates a probable pathogenic mechanism of Hz in the development of anaemia through ineffective erythropoiesis (Casals-Pascual *et al*, 2006).

The majority of infected bone marrows contained a mixture of sexual and asexual *P. falciparum* parasites of different

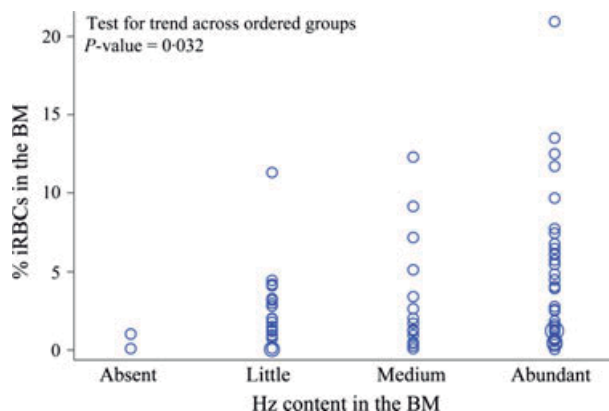


Fig 2. Bone marrow parasite density by haemozoin content. Wilcoxon-type test for trend was used to evaluate the trend of bone marrow parasite density across groups with increasing haemozoin content. Only bone marrow samples containing malaria parasites were included in the analysis. The area of each circle is proportional to the number of observations. BM, bone marrow; Hz, haemozoin; iRBCs, infected red blood cells.

maturity stages. Among the asexual forms, rings and trophozoites were the most prevalent stages followed by schizonts. The prevalence of trophozoites in the bone marrow was similar and that of schizonts higher compared to prevalences reported for the placenta (71% vs. 96% and 23% vs. 2–13%, respectively) (Beeson *et al*, 2002), where they are acknowledged to sequester, suggesting that mature asexual forms may also sequester in the bone marrow. Sequestration of mature asexual parasites in this tissue ties in with evidence for sexually committed trophozoites (Silvestrini *et al*, 2000), whose induction in the bone marrow would allow the resulting gametocyte progeny to be retained for maturation (Alano, 2007). The high prevalence of gametocytes found in the bone marrow compared to their significantly lower prevalence in peripheral blood stresses the role of this tissue as a gametocyte source and reservoir, and it is in agreement with a previously reported preferential localization of *P. falciparum* immature gametocytes in the bone marrow of 22 Gambian children (Smalley *et al*, 1981).

Half of the children included in the study presented Hz in their bone marrows. Hz is reported to have somewhat contradictory bioactivities on the immune system. It has been shown to either induce (Sherry *et al*, 1995) or inhibit (Skorokhod *et al*, 2004) dendritic cells maturation, and either induce the T-helper cell type 1 (TH1) cytokines tumour necrosis factor (TNF) and interleukin (IL) 12 (Coban *et al*, 2005; Sherry *et al*, 1995) or the immunoregulatory cytokine IL10 (Deshpande & Shastry, 2004). Hz has also been shown to inhibit proliferative responses by human leucocytes (Deshpande & Shastry, 2004), and to promote monocyte and macrophage dysfunction by impairing phagocytosis and the expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (Schwarzer *et al*, 2003, 1992). Recent *in vitro* studies have shown that the Hz-containing digestive vacuoles

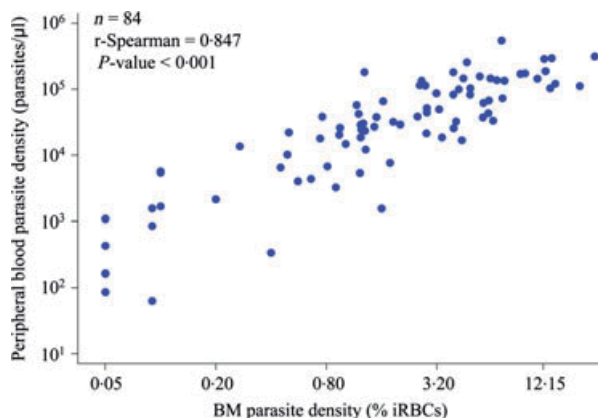


Fig 3. Correlation between peripheral blood and bone marrow *Plasmodium falciparum* parasite densities. Spearman's correlation coefficient was used to evaluate the relationship between parasite density in bone marrow and in peripheral blood. Only pairs of samples that were both microscopically parasitaemia positive were included in the analysis. BM, bone marrow; iRBCs, infected red blood cells.

Table III. Multivariate regression analysis of the association of peripheral blood infection, bone marrow parasitaemia and bone marrow haemozoin with the haemoglobin concentration.

Covariate	Coefficient*	95% CI	Overall P-value
Asexual parasitaemia in BM (% iRBCs)			
<2† vs. Negative	6.6	(-0.55, 1.87)	0.562
≥2 vs. <2†	-1.1	(-1.01, 0.78)	
Gametocytaemia in BM (number of gametocytes/100 fields)			
<5† vs. Negative	-7.5	(-1.90, 0.41)	0.420
≥5 vs. <5†	2.5	(-0.79, 1.29)	
Hz in BM			
Little vs. Absent	-7.1	(-1.54, 0.12)	0.005
Medium vs. Little	-10.5	(-2.07, -0.04)	
Abundant vs. Medium	-1.4	(-1.26, 0.98)	
Presence of peripheral blood infection	-9.2	(-1.80, -0.04)	0.041

BM, bone marrow; CI, Confidence Interval; iRBCs, infected red blood cells.

N = 216.

The cut-off points between the two groups of positive asexual parasitaemia and gametocytaemia were based on the median value of each variable.

95% CI based on Robust estimate of SD.

*Average difference in Hb concentration (g/l) in the compared category *versus* the reference category, accounting for other variables in the model.

†These categories do not include negative results.

released after erythrocytes rupture impair the killing function of polymorphonuclear granulocytes (Dasari *et al*, 2011), and activate the complement and coagulation enzymatic cascades (Dasari *et al*, 2012), contributing to the pathogenesis of malaria (Dasari & Bhakdi, 2012). Recent *in vitro* studies have

R. Aguilar *et al*

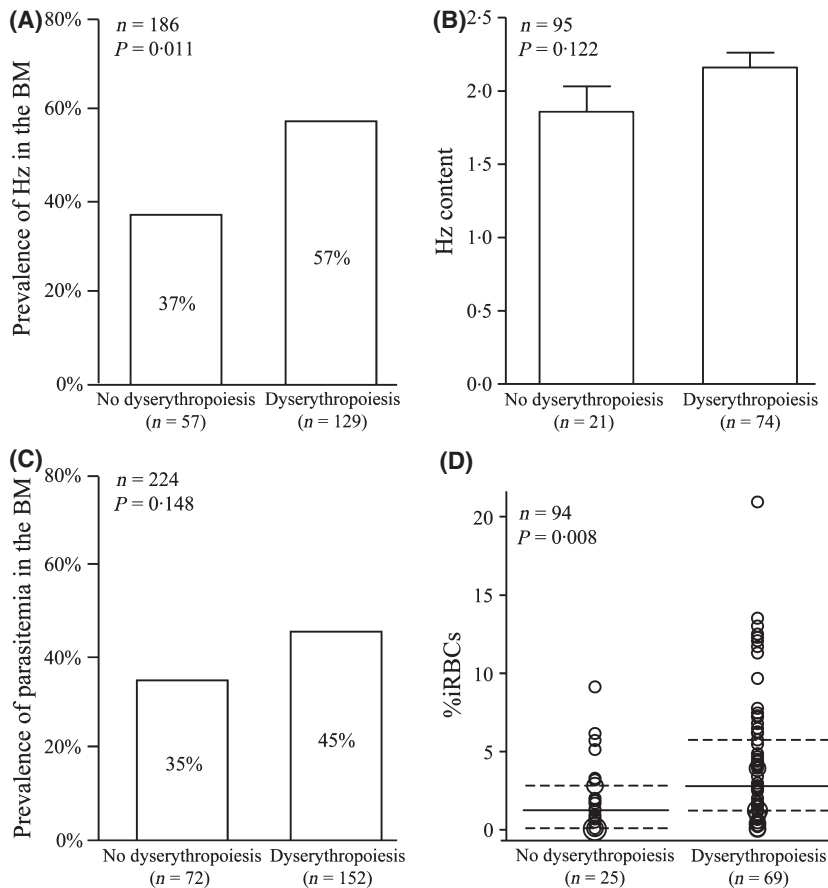


Fig 4. Relationship of dyserythropoiesis to haemozoin and parasitaemia in the bone marrow (A–D). (A) Differences in the prevalence of Hz in the bone marrow between children with and without dyserythropoiesis. (B) Differences in the level of Hz content in the bone marrow (0, absent; 1, little; 2, medium; 3, abundant) between children with and without dyserythropoiesis. (C) Differences in the prevalence of parasitaemia in the bone marrow between children with and without dyserythropoiesis. (D) Differences in parasite density in the bone marrow between children with and without dyserythropoiesis. Differences in A–C were analysed by Fisher’s exact test, and differences in panel D were analysed by Rank Sum test. In B, columns present means \pm standard error. In D, the area of the circle is proportional to the number of observations, and the median, 25 and 75th percentiles are indicated by horizontal lines. BM, bone marrow; Hz, haemozoin; iRBCs, infected red blood cells.

also reported that Hz stimulates the release of cytokines, chemokines and lipo-peroxides by macrophages, and this has been suggested to contribute indirectly to anaemia and dyserythropoiesis by negatively affecting the development of erythroid cells (Awandare *et al*, 2011; Skorokhod *et al*, 2010). Moreover, *in vitro* studies have also shown that Hz may have a direct harmful effect on erythroid precursors by delaying the expression of erythroid markers and increasing the apoptosis of progenitor cells (Lamikanra *et al*, 2009; Schrimpe & Wright, 2009). In addition, peripheral blood Hz may also have a deleterious effect on circulating erythrocytes by decreasing their deformability and thus increasing their phagocytic elimination (Nuchsongsin *et al*, 2007; Skorokhod *et al*, 2007). In agreement with this, several studies have reported an association between the amount of peripheral blood Hz and the degree of anaemia (Awandare *et al*, 2007; Casals-Pascual *et al*, 2006; Giribaldi *et al*, 2004; Keller *et al*, 2004). Our detection of Hz and, to a lesser extent, of parasites in bone marrow in the absence of peripheral infection may be a sign of past malaria infections (Ismail *et al*, 2000). Hz is ingested by circulating and resident phagocytes, being deposited in different tissues where it can stay for long periods after the infection has been resolved (Frita *et al*, 2012). In agreement with this, Hz content in the bone marrow increased with age, and the same was observed for the preva-

lence of dyserythropoiesis (Fig S1). Thus, it is not possible to distinguish whether the associations of Hz with anaemia and dyserythropoiesis are due to a history of longer exposure to bone marrow parasites, or to potential Hz toxicity. It may be speculated that the association of bone marrow Hz with reduced Hb concentration is explained by Hz being a biomarker of chronicity of infections. However, the independent effect of Hz on the Hb concentration demonstrated in this study suggests a possible direct effect of this parasitic product on the pathogenesis of malarial anaemia.

Increased proportions of abnormal erythroblasts have been reported among African children and Thai adults with different presentations of clinical malaria (Abdalla *et al*, 1980; Abdalla, 1990; Phillips *et al*, 1986; Wickramasinghe *et al*, 1987), but it is not clear whether the location of parasites is important. Interestingly, when adjusting for peripheral blood infection, the parasitaemia in the bone marrow in our study does not appear to have an independent additional effect on the Hb concentration. However, it is possible that the strong correlation between bone marrow and peripheral blood parasitaemias may be obscuring a direct impact of bone marrow parasites on Hb levels in the multivariate analysis. This hypothesis is also supported by the significant association observed between increased levels of bone marrow parasitaemia and dyserythropoiesis.

A link between Hz and dyserythropoiesis is reinforced by a post-mortem study in children who died with malaria, where an association of Hz with the proportion of abnormal erythroblasts was seen (Casals-Pascual *et al*, 2006). However, in the current study, more than one-third of children with normal erythroblasts had Hz in the bone marrow, and almost half of the children with dyserythropoiesis did not have Hz in this tissue. The absence of dyserythropoiesis in the presence of Hz might be explained by infections in which the detrimental effects of Hz are not yet seen. On the other hand, the presence of dyserythropoiesis in the absence of Hz might be due to other causes, such as viral infections (mainly hepatitis, parvovirus B19 or HIV) (Calenda & Chermann, 1992; Carpenter *et al*, 2004; Klco *et al*, 2010), and micronutrient deficiencies such as iron deficiency (Rozman *et al*, 1992). However, the current study did not find an association between iron deficiency and dyserythropoiesis.

A potential limitation of this study is the use of a semi-quantitative method to measure Hz in bone marrow cellular aggregates. This method entails subjectivity, which could be a constraint in terms of comparability of the results with those from other studies using different approaches (Casals-Pascual *et al*, 2006). Future studies should consider the use of a highly sensitive, quantitative luminescence-based Hz method that has been recently developed (Deroost *et al*, 2012). Another limitation of the study is the classification of dyserythropoiesis as present or absent. The degree of dyserythropoiesis is variable, so future studies should include its quantification.

In summary, this is the first large-scale *ex vivo* study to show that Hz in the bone marrow is associated with anaemia, and supports the hypothesis of a direct pathogenic mechanism of Hz in this association previously observed in *in vitro* studies. The large sample size, compared to previous studies, for evaluating the presence and role of parasites and Hz in bone marrow strengthen the validity of the observations. In addition, this study has shown that sexual and mature asexual *P. falciparum* parasites are highly prevalent in the bone marrow of malaria infected children, suggesting their sequestration in this tissue and emphasizing the relevance of looking at the molecular mechanisms involved. Overall, the findings of this study may have clinical implications by suggesting that the development of drugs capable of blocking the damaging effects of Hz on erythroid cells could be used in reducing the severity and persistence of malarial

anaemia, one of the major killers of children exposed to this parasitic infection.

Acknowledgements

We thank the children and their parents/guardians for their participation in the study. We are also grateful to the staff of the Manhiça District Hospital and the Manhiça Health Research Center for their work during the study, and to Jaume Ordi for his help with detection of bone marrow Hz. This work was supported by the Agencia de Cooperación Internacional de Las Illes Balears and the Fundación Ramón Areces. The Centro de Investigação em Saúde da Manhiça receives core support from the Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID). The Walter and Eliza Hall Institute receives Victorian State Government Operational Infrastructure Support and Australian Government NHMRC IRIISS. The funding sources did not have any involvement in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. The researchers are independent from the funders.

Authorship contributions

R.A., C.Mo., A.H.A., L.S. and C.M., contributed to conception and design of the study; R.A., C.Mo., P.C. and A.N., contributed to acquisition of data; R.A., C.Mo. and L.Q., analysed the data; all authors contributed to interpretation of data; R.A., C.Mo., A.H.A., A.M., and C.M., drafted the article; all authors revised the article critically for important intellectual content; all authors read and gave final approval of the published version.

Conflict of interest disclosure

The authors do not have any commercial or other association that might pose a conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig S1. Haemozoin levels and presence/absence of dyserythropoiesis stratified by age.

References

- Abdalla, S.H. (1990) Hematopoiesis in human malaria. *Blood Cells*, **16**, 401–416. discussion 417–409.
- Abdalla, S., Weatherall, D.J., Wickramasinghe, S.N. & Hughes, M. (1980) The anaemia of *P. falciparum* malaria. *British Journal of Haematology*, **46**, 171–183.
- Abdulsalam, A.H., Sabeeh, N. & Bain, B.J. (2010) Immature *Plasmodium falciparum* gametocytes in bone marrow. *American Journal of Hematology*, **85**, 943.
- Aguilar, R., Moraleda, C., Quinto, L., Renom, M., Mussacate, L., Macete, E., Aguilar, J.L., Alonso, P.L. & Menendez, C. (2012) Challenges in the diagnosis of iron deficiency in children exposed to high prevalence of infections. *PLoS One*, **7**, e50584.
- Akinosoglou, K.S., Solomou, E.E. & Gogos, C.A. (2012) Malaria: a haematological disease. *Hematology*, **17**, 106–114.
- Alano, P. (2007) *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Molecular Microbiology*, **66**, 291–302.
- Alonso, P.L., Smith, T., Schellenberg, J.R., Masanja, H., Mwanusye, S., Urassa, H., Bastos de Azevedo, I., Chongela, J., Kobero, S., Menendez,

- C., Hurt, N., Thomas, M.C., Lyimo, E., Weiss, N.A., Hayes, R., Kitua, A.Y., López, M.C., Kilama, W.L., Teuscher, T. & Tanner, M. (1994) Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet*, **344**, 1175–1181.
- Alonso, P., Saute, F., Aponte, J.J., Gomez-Olive, F.X., Nhacolo, A., Thomson, R., Macete, E., Abacassamo, F., Ventura, P.J., Bosch, X., Menendez, C. & Dgedge, M. (2001) Population, Health and Survival at INDEPTH Sites, Vol. 1. Manhica DSS, Mozambique, pp. 189–195. International Development Research Centre, Ottawa, Ontario, Canada.
- Awandare, G.A., Ouma, Y., Ouma, C., Were, T., Otieno, R., Keller, C.C., Davenport, G.C., Hittner, J.B., Vulule, J., Ferrell, R., Ong'echa, J.M. & Perkins, D.J. (2007) Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infection and Immunity*, **75**, 201–210.
- Awandare, G.A., Kempaiah, P., Ochiel, D.O., Piazza, P., Keller, C.C. & Perkins, D.J. (2011) Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an *in vitro* model. *American Journal of Hematology*, **86**, 155–162.
- Bain, B.J. (2001) Bone marrow aspiration. *Journal of Clinical Pathology*, **54**, 657–663.
- Beeson, J.G. & Brown, G.V. (2002) Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 258–271.
- Beeson, J.G., Amin, N., Kanjala, M. & Rogerson, S.J. (2002) Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infection and Immunity*, **70**, 5412–5415.
- Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Lohr, G.W., Ramot, B. & Valentine, W.N. (1979) International Committee for Standardization in Haematology: recommended screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *British Journal of Haematology*, **43**, 465–467.
- Calenda, V. & Chermann, J.C. (1992) The effects of HIV on hematopoiesis. *European Journal of Haematology*, **48**, 181–186.
- Carpenter, S.L., Zimmerman, S.A. & Ware, R.E. (2004) Acute parvovirus B19 infection mimicking congenital dyserythropoietic anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **26**, 133–135.
- Casals-Pascual, C., Kai, O., Cheung, J.O., Williams, S., Lowe, B., Nyanoti, M., Williams, T.N., Maitland, K., Molyneux, M., Newton, C.R., Peshu, N., Watt, S.M. & Roberts, D.J. (2006) Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, **108**, 2569–2577.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T. & Akira, S. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *Journal of Experimental Medicine*, **201**, 19–25.
- Dasari, P. & Bhakdi, S. (2012) Pathogenesis of malaria revisited. *Medical Microbiology and Immunology*, **201**, 599–604.
- Dasari, P., Reiss, K., Lingelbach, K., Baumeister, S., Lucius, R., Udomsangpetch, R., Bhakdi, S.C. & Bhakdi, S. (2011) Digestive vacuoles of *Plasmodium falciparum* are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, **118**, 4946–4956.
- Dasari, P., Heber, S.D., Beisele, M., Torzewski, M., Reifenberg, K., Orning, C., Fries, A., Zapf, A.L., Baumeister, S., Lingelbach, K., Udomsangpetch, R., Bhakdi, S.C., Reiss, K. & Bhakdi, S. (2012) Digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. *Blood*, **119**, 4301–4310.
- Deroost, K., Lays, N., Noppen, S., Martens, E., Opdenakker, G. & Van den Steen, P.E. (2012) Improved methods for haemozoin quantification in tissues yield organ- and parasite-specific information in malaria-infected mice. *Malaria Journal*, **11**, 166.
- Deshpande, P. & Shastry, P. (2004) Modulation of cytokine profiles by malaria pigment-hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC. *Cytokine*, **28**, 205–213.
- Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M. & Buffet, P. (2012) The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? *Malaria Journal*, **11**, 285.
- Frita, R., Carapau, D., Mota, M.M. & Hanscheid, T. (2012) *In Vivo* hemozoin kinetics after clearance of plasmodium berghii infection in mice. *Malaria Research and Treatment*, **2012**, 373086.
- Giribaldi, G., Ulliers, D., Schwarzer, E., Roberts, I., Piacibello, W. & Arese, P. (2004) Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. *Haematologica*, **89**, 492–493.
- Guinovart, C., Bassat, Q., Sigauque, B., Aide, P., Sacarlal, J., Nhamposha, T., Bardaji, A., Nhacolo, A., Macete, E., Mandomando, I., Aponte, J.J., Menendez, C. & Alonso, P.L. (2008) Malaria in rural Mozambique. Part I: children attending the outpatient clinic. *Malaria Journal*, **7**, 36.
- Imirzalioglu, C., Soydan, N., Schaller, M., Bretzel, R.G., Chakraborty, T. & Domann, E. (2006) Diagnosis of mixed *Plasmodium malariae* and *P. vivax* infection in a development aid volunteer by examination of bone-marrow specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, 2307–2310.
- Ismail, M.R., Ordi, J., Menendez, C., Ventura, P.J., Aponte, J.J., Kahigwa, E., Hirt, R., Cardesa, A. & Alonso, P.L. (2000) Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Human Pathology*, **31**, 85–93.
- Keller, C.C., Kremsner, P.G., Hittner, J.B., Misukonis, M.A., Weinberg, J.B. & Perkins, D.J. (2004) Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*, **72**, 4868–4873.
- Keller, C.C., Ouma, C., Ouma, Y., Awandare, G.A., Davenport, G.C., Were, T., Hittner, J.B., Vulule, J.M., Ong'echa, J.M. & Perkins, D.J. (2009) Suppression of a novel hematopoietic mediator in children with severe malarial anemia. *Infection and Immunity*, **77**, 3864–3871.
- Klco, J.M., Geng, B., Brunt, E.M., Hassan, A., Nguyen, T.D., Kreisel, F.H., Lisker-Melman, M. & Frater, J.L. (2010) Bone marrow biopsy in patients with hepatitis C virus infection: spectrum of findings and diagnostic utility. *American Journal of Hematology*, **85**, 106–110.
- Lamikanra, A.A., Theron, M., Kooij, T.W. & Roberts, D.J. (2009) Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One*, **4**, e8446.
- Lee, S.H., Erber, W.N., Porwit, A., Tomonaga, M. & Peterson, L.C. (2008) ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *International Journal of Laboratory Hematology*, **30**, 349–364.
- Mayor, A., Serra-Casas, E., Bardaji, A., Sanz, S., Puyol, L., Cistero, P., Sigauque, B., Mandomando, I., Aponte, J.J., Alonso, P.L. & Menendez, C. (2009) Sub-microscopic infections and long-term recrudescence of *Plasmodium falciparum* in Mozambican pregnant women. *Malaria Journal*, **8**, 9.
- McDevitt, M.A., Xie, J., Gordeuk, V. & Bucala, R. (2004) The anemia of malaria infection: role of inflammatory cytokines. *Current Hematology Reports*, **3**, 97–106.
- Newton, C.R., Chokwe, T., Schellenberg, J.A., Winstanley, P.A., Forster, D., Peshu, N., Kirkham, F.J. & Marsh, K. (1997) Coma scales for children with severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **91**, 161–165.
- Nuchongsin, F., Chotivanich, K., Charunwatthanap, P., Omodeo-Sale, F., Taramelli, D., Day, N.P., White, N.J. & Dondorp, A.M. (2007) Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 617–622.
- Ouma, C., Keller, C.C., Davenport, G.C., Were, T., Konah, S., Otieno, M.F., Hittner, J.B., Vulule, J.M., Martinson, J., Ong'echa, J.M., Ferrell, R.E. & Perkins, D.J. (2010) A novel functional variant in the stem cell growth factor promoter protects against severe malarial anemia. *Infection and Immunity*, **78**, 453–460.
- Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Warrell, D.A., Lee, S.H., Karbwang, J., Warrell, M.J., White, N.J., Swasdichai, C. & Weatherall, D.J. (1986) The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *The Quarterly Journal of Medicine*, **58**, 305–323.
- Phiri, K.S., Calis, J.C., Kachala, D., Borgstein, E., Waluza, J., Bates, I., Brabin, B. & van

- Hensbroek, M.B. (2009) Improved method for assessing iron stores in the bone marrow. *Journal of Clinical Pathology*, **62**, 685–689.
- Romagosa, C., Menendez, C., Ismail, M.R., Quinto, L., Ferrer, B., Alonso, P.L. & Ordi, J. (2004) Polarisation microscopy increases the sensitivity of hemozoin and *Plasmodium* detection in the histological assessment of placental malaria. *Acta Tropica*, **90**, 277–284.
- Rozman, M., Masat, T., Feliu, E. & Rozman, C. (1992) Dyserythropoiesis in iron-deficiency anemia: ultrastructural reassessment. *American Journal of Hematology*, **41**, 147–150.
- Schrimpe, A.C. & Wright, D.W. (2009) Comparative analysis of gene expression changes mediated by individual constituents of hemozoin. *Chemical Research in Toxicology*, **22**, 433–445.
- Schwarzer, E., Turrini, F., Ulliers, D., Giribaldi, G., Ginsburg, H. & Arese, P. (1992) Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *Journal of Experimental Medicine*, **176**, 1033–1041.
- Schwarzer, E., Kuhn, H., Valente, E. & Arese, P. (2003) Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood*, **101**, 722–728.
- Sherry, B.A., Alava, G., Tracey, K.J., Martiney, J., Cerami, A. & Slater, A.F. (1995) Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) *in vitro*, and altered thermoregulation *in vivo*. *Journal of Inflammation*, **45**, 85–96.
- Silvestrini, F., Alano, P. & Williams, J.L. (2000) Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, **121**, 465–471.
- Skorokhod, O.A., Alessio, M., Mordmuller, B., Arese, P. & Schwarzer, E. (2004) Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **173**, 4066–4074.
- Skorokhod, A., Schwarzer, E., Gremo, G. & Arese, P. (2007) HNE produced by the malaria parasite *Plasmodium falciparum* generates HNE-protein adducts and decreases erythrocyte deformability. *Redox Report*, **12**, 73–75.
- Skorokhod, O.A., Caione, L., Marrocco, T., Migliardi, G., Barrera, V., Arese, P., Piacibello, W. & Schwarzer, E. (2010) Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood*, **116**, 4328–4337.
- Smalley, M.E. & Brown, J. (1980) The distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**, 103–105.
- Smalley, M.E., Abdalla, S. & Brown, J. (1981) The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**, 103–105.
- Were, T., Hittner, J.B., Ouma, C., Otieno, R.O., Orago, A.S., Ong'echa, J.M., Vulule, J.M., Keller, C.C. & Perkins, D.J. (2006) Suppression of RANTES in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Haematologica*, **91**, 1396–1399.
- Wickramasinghe, S.N. (1997) Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *British Journal of Haematology*, **98**, 785–797.
- Wickramasinghe, S.N., Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Warrell, D.A. & Hughes, M. (1987) The bone marrow in human cerebral malaria: parasite sequestration within sinusoids. *British Journal of Haematology*, **66**, 295–306.

Artículo 4: Evidencia molecular de la presencia de gametocitos inmaduros de *Plasmodium falciparum* en la médula ósea

Ruth Aguilar, Ariel Magallon-Tejada, Ariel H. Achtman, Cinta Moraleda, Regina Joice, Pau Cisteró, Connie S. N. Li Wai Suen, Augusto Nhabomba, Eusebio Macete, Ivo Mueller, Matthias Marti, Pedro L. Alonso, Clara Menéndez, Louis Schofield, Alfredo Mayor

Resumen

Los gametocitos inmaduros de *Plasmodium falciparum* no se observan en sangre periférica. Sin embargo, nunca se ha evaluado la presencia de los diferentes estadios de gametocitos en otros órganos, como la médula ósea, mediante técnicas moleculares que son más sensibles que la microscopía óptica. En este estudio se han cuantificado los estadios sexuales de *P. falciparum* en médula ósea (n=174) y en sangre periférica (n=70) de niños anémicos mozambiqueños mediante RCP cuantitativa específicamente dirigida para gametocitos en fase temprana (PF14_0748;PHISTa), intermedia (PF13_0247;Pfs48/45) y madura (PF10_0303; Pfs25).

En los niños positivos para el gen constitutivo del *P. falciparum* (PF08_0085; gen de la enzima conjugadora de ubiquitina) en médula ósea (n=136) y sangre periférica (n=25) la prevalencia de gametocitos inmaduros fue mayor en médula ósea (temprana: 95% vs 20%, $p<0,001$; intermedia: 80% vs 16%; $p<0,001$) que en sangre periférica. Por el contrario, los gametocitos maduros fueron más prevalentes (100% vs 51%, $p<0,001$) y abundantes ($p<0,001$) en sangre periférica que en médula ósea. La anemia grave (3,57; 95% intervalo de confianza 1,49-8,53) y la diseritropoyesis (6,21; 95% intervalo de confianza 2,24-17,25) se asociaron de forma independiente con una mayor prevalencia de gametocitos maduros en médula ósea. Estos resultados destacan la alta prevalencia y abundancia de estadios sexuales precoces en médula ósea, así como la relación entre el desarrollo de gametocitos en este tejido y alteraciones hematológicas.

Plenary Paper

RED CELLS, IRON, AND ERYTHROPOIESIS

Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow

Ruth Aguilar,¹⁻³ Ariel Magallon-Tejada,¹ Ariel H. Achtman,^{4,5} Cinta Moraleda,^{1,3} Regina Joice,⁶ Pau Cisteró,¹ Connie S. N. Li Wai Suen,^{4,5} Augusto Nhabomba,³ Eusebio Macete,³ Ivo Mueller,^{1,4,5,7} Matthias Marti,⁶ Pedro L. Alonso,^{1,3} Clara Menéndez,^{1,2,3} Louis Schofield,^{4,5} and Alfredo Mayor¹⁻³

¹Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Centros de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública, Madrid, Spain; ³Centro de Investigação em Saúde de Manhiça, Maputo, Mozambique; ⁴Division of Infection and Immunity, The Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research, Melbourne, Australia; ⁵Department of Medical Biology, The University of Melbourne, Melbourne, Australia; ⁶Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA; and ⁷Papua New Guinea Institute of Medical Research, Madang, Papua New Guinea

Key Points

- In *P falciparum*-infected anemic children, immature gametocytes are more prevalent and abundant in bone marrow than in peripheral blood.
- *P falciparum*-infected anemic children are gametocyte carriers that can potentially contribute to malaria transmission.

Plasmodium falciparum immature gametocytes are not observed in peripheral blood. However, gametocyte stages in organs such as bone marrow have never been assessed by molecular techniques, which are more sensitive than optical microscopy. We quantified *P falciparum* sexual stages in bone marrow (n = 174) and peripheral blood (n = 70) of Mozambican anemic children by quantitative polymerase chain reaction targeting transcripts specific for early (PF14_0748; PHISTa), intermediate (PF13_0247; Pfs48/45), and mature (PF10_0303; Pfs25) gametocytes. Among children positive for the *P falciparum* housekeeping gene (PF08_0085; ubiquitin-conjugating enzyme gene) in bone marrow (n = 136) and peripheral blood (n = 25), prevalence of immature gametocytes was higher in bone marrow than peripheral blood (early: 95% vs 20%, $P < .001$; intermediate: 80% vs 16%; $P < .001$), as were transcript levels ($P < .001$ for both stages). In contrast, mature gametocytes were more prevalent (100% vs 51%, $P < .001$) and abundant ($P < .001$) in peripheral blood than in the bone marrow. Severe anemia (3.57, 95% confidence interval 1.49-8.53) and dyserythropoiesis (6.21, 95% confidence interval 2.24-17.25) were independently associated with a higher prevalence of mature gametocytes in bone

marrow. Our results highlight the high prevalence and abundance of early sexual stages in bone marrow, as well as the relationship between hematological disturbances and gametocyte development in this tissue. (*Blood*. 2014;123(7):959-966)

Introduction

Cytoadhesive interactions with host receptors mediate the sequestration of *Plasmodium falciparum* mature asexual parasites in different organs and tissues, a phenomenon that is suggested to reduce destruction of infected erythrocytes in the spleen and eventually lead to severe malaria.¹ A similar phenomenon has been hypothesized for the immature stages of gametocytes that, after maturation, are responsible for *Plasmodium* transmission from humans to the mosquito.² However, the organs where gametocytes develop and the mechanisms underlying this process are not well defined.

A small proportion of *P falciparum* parasites divert from the asexual erythrocytic cycle and develop into gametocytes through a maturation process classically divided into 5 morphological stages (I-V).^{3,4} Factors contributing to the genesis and development of gametocytes in vivo are largely unknown. Because only gametocytes at the mature stage V are microscopically detectable in peripheral blood,⁵ it has been suggested that developing stages may be retained in internal organs. Evidence for such enrichment is scarce, with several case reports showing an abundance of immature gametocytes

in the spleen and bone marrow.⁵⁻⁸ However, these studies are of limited scale and used standard light microscopy as the only method for gametocyte detection and stage differentiation; standard light microscopy is known to have low sensitivity compared with molecular tools^{9,10} and to miss a substantial proportion of *P falciparum* infections in surveys of endemic populations.¹¹⁻¹³ The information on gametocyte stages detected by molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) is scarce for *P falciparum* infections in peripheral blood and absent for infections in the bone marrow. Such a lack of data limits the accurate assessment of malaria transmission at a community level, which is critical to enabling rational development of a transmission-blocking vaccine¹⁴ and to support elimination and eradication of *P falciparum* and *P vivax*.¹⁵

A better understanding of the dynamics between the multiplication of *P falciparum*, gametocytogenesis, and malaria transmission is essential to enabling development of new tools to disrupt malaria transmission.¹⁵ To expand investigation beyond case reports and autopsy studies and overcome limitations in the

Submitted August 15, 2013; accepted October 31, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 13, 2013; DOI 10.1182/blood-2013-08-520767.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2014 by The American Society of Hematology

Table 1. Baseline characteristics of children included in the study

	Severe anemia		P
	No (n = 86)	Yes (n = 88)	
Age (months) (median, IQR)	16 (10, 28)	23.5 (16, 33)	.002
Male (n, %)	47 (55)	48 (55)	1.000
Hemoglobin (g/dL) (median, IQR)	9.65 (9.2, 10.2)	5.4 (4.3, 6.15)	<.001
Fever (n, %)	48 (56)	51 (58)	.878
Hemozoin (n, %)*	18 (27)	53 (81)	<.001
Dyserythropoiesis (n, %) [†]	39 (59)	52 (74)	.070
Asexual parasitemia (microscopy)			
Bone marrow (n, %) [‡]	18 (22)	55 (66)	<.001
Peripheral blood (n, %)	20 (23)	55 (62)	<.001

IQR, interquartile range. P values are from Fisher (categorical variables) and Mann-Whitney tests (continuous variables).

*42 missing.

[†]38 missing.

[‡]11 missing.

sensitivity and gametocyte stage differentiation of optical microscopy, we used a stage-specific quantitative reverse-transcriptase PCR (qPCR) to compare the prevalence and levels of gametocytes in 174 bone marrow samples and 70 matched peripheral blood samples from Mozambican anemic children, and identified factors associated with the development of sexual stages.

Methods

Study site, participants, and sample collection

The study was carried out at the Centro de Investigação em Saúde de Manhica in the Manhica District of southern Mozambique.¹⁶ Malaria transmission, mainly from *P. falciparum* (95%), is of moderate and perennial intensity with marked seasonality. To assess dynamics of *P. falciparum* gametocyte stages in bone marrow and peripheral blood of anemic children, 174 1- to 59-month-old children admitted to the Manhica District Hospital between October 2008 and August 2010 with hemoglobin <11 g/dL by the HemoCue system (HemoCue HB 201⁺; Ängelholm, Sweden) and no history of blood transfusion in the preceding 4 weeks who had undergone bone marrow aspiration were recruited as participants.

A complete clinical examination of the 174 children recruited for the study was performed, and the information was recorded onto standardized questionnaires together with demographic data. *P. falciparum* was detected by microscopy in peripheral blood films following standard, quality-controlled procedures.¹⁷ Four milliliters of venous blood were collected by venipuncture into a heparinized Vacutainer from a subset of children (n = 70). Three to 4 mL of bone marrow were aspirated from the anterosuperior iliac crest or the tibia of the 174 children under conscious sedation with parenteral atropine, ketamine, and diazepam.^{18,19} The first drops of the aspirate were used to prepare smears and the rest of the sample was collected into an EDTA-coated Vacutainer. Bone marrow aspirates were not performed in children <3 months of age or with medical counterindications such as severe respiratory distress, recent history of seizures, suspected intracranial hypertension, or any other risk identified by the responsible pediatrician. Resuscitation equipment was always available during the procedure.

The study protocol was approved by the National Mozambican Ethics Committee and the Hospital Clínic of Barcelona Ethics Review Committee. The parents/guardians of all children included in the study provided written informed consent after being informed of the goals, benefits, and risks of the procedures and were offered no financial or material inducements for participation. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All children received treatment according to national guidelines.

Bone marrow smear examination

Bone marrow smears were fixed and stained with May-Grünwald eosin methylene blue solution and 10% Giemsa for cytological and parasitological

examination. Smear cytology was evaluated by an experienced hematologist who was blinded to clinical and laboratory details. Dyserythropoiesis was successfully assessed in 136 of the bone marrow smears and defined as the presence of erythroblasts with binuclearity and trinuclearity, internuclear chromatin bridges, nuclear pyknosis, or any other chromatin alterations.²⁰ Bone marrow smears were considered microscopically negative for *P. falciparum* if no parasites were detected in 100 fields at ×100 magnification. Hemozoin, identified as coarse brown granular material with birefringence under polarized light,²¹ was assessed in bone marrow cellular aggregates observed in 132 of the smears. Stage I gametocytes were defined as round parasites, sometimes with slightly pointed ends, and hemozoin located in elongated granules; stage II as oat grain-shaped parasites with pointed ends and scattered granules of hemozoin; stage III as elongated “D”-shaped parasites; stage IV as symmetrical, elongated, spindle-shaped parasites with pointed ends; and stage V as sausage-shaped parasites with rounded ends.^{3,22,23}

CRP and EPO measurements

Peripheral blood was centrifuged and plasma samples were used to quantify C-reactive protein (CRP) and erythropoietin (EPO) levels, using an ADVIA 2400 automated analyzer (Siemens Healthcare, Barcelona, Spain) and the Quantikine human Erythropoietin kit (R&D Systems, Minneapolis, MN), respectively.

RNA extraction and cDNA synthesis

Two milliliters of bone marrow aspirate were transferred to a Paxgene Bone Marrow RNA Tube (QIAGEN) and 100 μL of peripheral red blood cells to 1 mL of Trizol (Invitrogen) for RNA stabilization. Samples were stored at -80°C until RNA preparation using the Paxgene Bone Marrow RNA Kit (QIAGEN) and the PureLink RNA Mini kit (Invitrogen) for bone marrow and peripheral blood samples, respectively. Quantity and purity of RNA were assessed with a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) or a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA was treated with DNase using the Turbo DNA-free kit (Invitrogen). Contamination with genomic parasite DNA was assessed by a TaqMan qPCR specific for the *P. falciparum* 18S ribosomal gene^{24,25}; positive samples were retreated with DNase and retested for lack of genomic DNA. RNA (2 μg) was used for complementary DNA (cDNA) conversion with the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) using a 2-hour incubation step at 42°C to maximize yields.

qPCR of gametocyte maturation stages

Early, intermediate, and mature gametocyte transcripts were detected using primers for 3 gametocyte markers selected from published microarray expression data for their tight windows of high expression during a certain period of gametocyte development.²⁶⁻²⁸ These primers have been previously developed and validated in a study on autopsy tissue sections by Joice et al (R.J., Sandra K. Nilsson, Jacqui Montgomery, Selasi Dankwa, Elizabeth Egan, Belinda Morahan, Karl B. Seydel, Lucia Bertuccini, Pietro Alano, Kim C. Williamson, Manoj T. Duraisingh, Terrie E. Taylor, Danny A. Milner, M.M., manuscript submitted September 2013): *PHISTA* gene (*PF14_0748*; peak expression in early gametocytes, stages I-II; forward (Fw): ATT CAA GGG TAG TTC CTA GAG CAG TGT GG; reverse (Rv): AGC ACT CGT AAT TCT AAC ACT GGG) as a marker of young gametocytes; transmission-blocking antigen precursor *Pfs48/45* (*PF13_0247*; peak in intermediate gametocytes, stages III-IV; Fw: GTA AGC CTA GCT CTT TGA ATA GTG

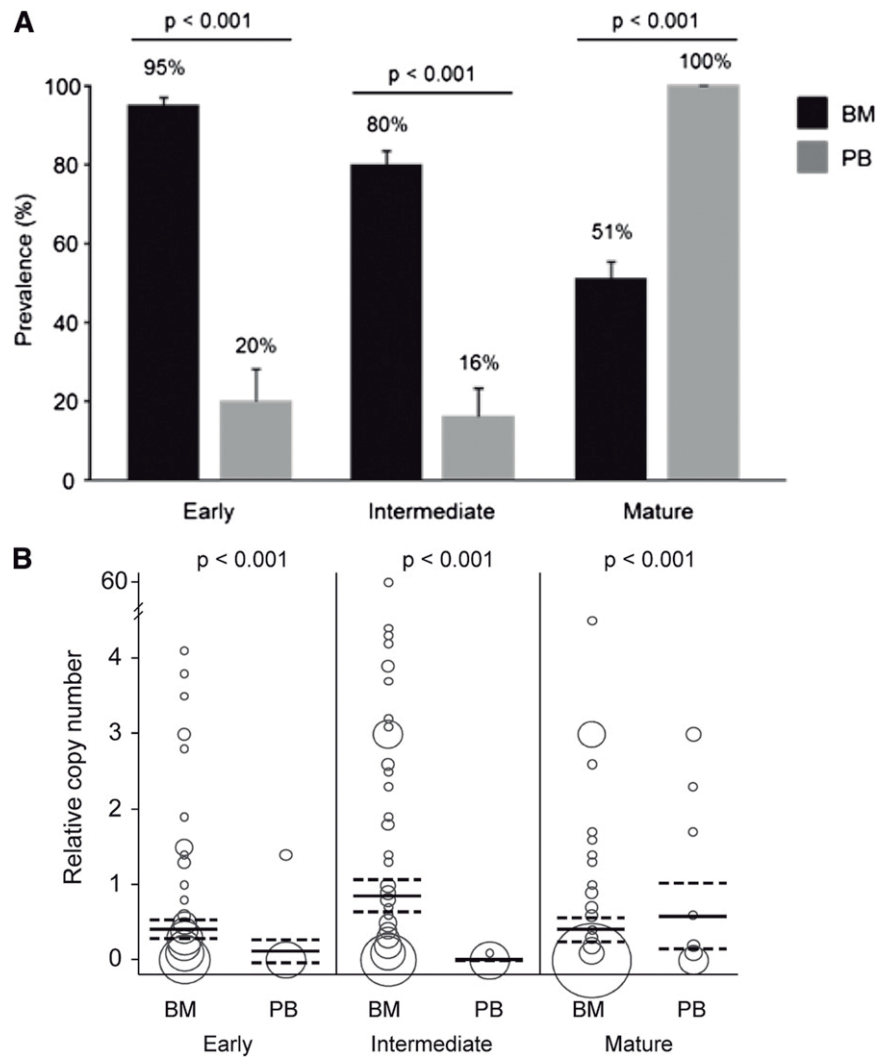
Table 2. Prevalence of gametocyte-positive samples determined by microscopy and qPCR

	Gametocytes, n (%)			
	Microscopy		qPCR	
	Peripheral blood	Bone marrow*	Peripheral blood	Bone marrow
Positive	9 (5.2)	46 (28.4)	25 (14.4) [†]	133 (76.4) [†]
Negative	165 (94.8)	116 (71.6)	149 (85.6)	41 (23.6)

*12 samples not determined.

[†]Samples positive for at least 1 of the 3 gametocyte-stage markers.

Figure 1. *P. falciparum* gametocyte stages in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) detected by qPCR. (A) Prevalence and standard error of early, intermediate, and mature gametocyte stages. (B) Relative transcript copy numbers expressed as the ratio between copy numbers of gametocyte transcripts and *P. falciparum* ubiquitin-conjugating enzyme transcript. The area of the circle is proportional to the number of observations, and mean copy number and 95% confidence intervals are indicated by horizontal lines. Samples positive for the housekeeping gene are included in the analysis: 136 BM and 25 PB samples.



A; Rv: GAC CTA CGT TCA CGC ATA TCT GGC T) for intermediate gametocytes; and ookinete surface antigen precursor *Pfs25* (*PF10_0303*; peak in mature gametocytes, stage V; Fw: GGA AAT CCC GTT TCA TAC GCT TGT; Rv: TCT TGT ACA TTG GGA ACT TTG CCT) for late developing and mature gametocytes. Final reaction volumes of 20 μ L included 4 μ L of cDNA (~8 ng/ μ L) and 10 μ L of iQ SYBR Green Master Mix (BioRad). qPCRs were performed in a ViiA7 analyzer (Applied Biosystems) with 10 minutes at 95°C (1 cycle), 30 seconds at 95°C, and 1 minute at 58°C (40 cycles). Each sample was analyzed in triplicate alongside a dilution series of cDNA from messenger RNA targets cloned into pGEM plasmids for absolute quantification of transcript copy numbers. Positive transcription was defined as a cycle threshold value within the standard curve's cycle threshold range. To normalize for the level of parasitemia and amount of cDNA loaded in each reaction, relative transcript levels were calculated as the ratio between copy numbers of gametocyte transcripts and the *P. falciparum* ubiquitin-conjugating enzyme (*PF08_0085*) transcript (housekeeping [HK] gene). This HK gene was chosen for being highly constitutively expressed across patients and parasite life-cycle stages,²⁹⁻³² and was also quantified by qPCR (Fw: GGT GTT AGT GGC TCA CCA ATA GGA; Rv: GTA CCA CCT TCC CAT GGA GTA TCA), as described previously.³³

Definitions and statistical methods

Fever was defined as axillary temperature $\geq 37.5^\circ\text{C}$, moderate anemia as hemoglobin concentration between 11 and 7 g/dL, and severe anemia as hemoglobin concentration < 7 g/dL. The high and low EPO, CRP, and age categories were defined based on their median values from the 174 children

included in the study. Asexual submicroscopic parasitemias, defined as a parasite-negative result by microscopy but positive by qPCR for the *P. falciparum* HK gene, were assigned a parasite density of 0.1 parasites per

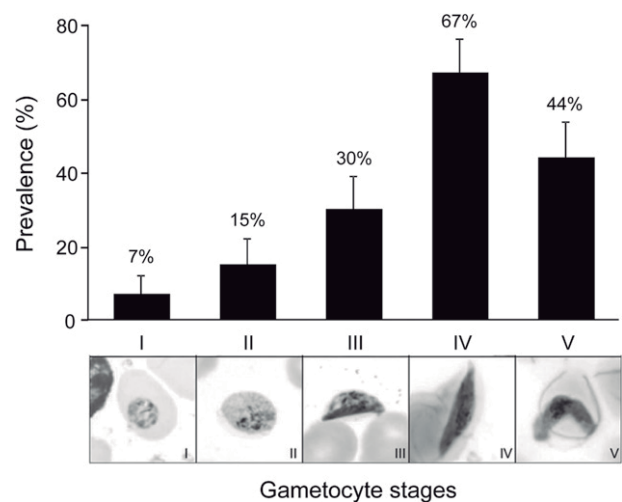


Figure 2. Prevalence of *P. falciparum* gametocyte stages in gametocyte-positive bone marrows as detected by microscopy. Prevalence and standard error of the different gametocyte stages in bone marrow samples that are gametocyte-positive by microscopy (n = 27).

Table 3. Paired analyses comparing the prevalence and transcript levels of gametocyte stage markers between bone marrow and peripheral blood

Bone marrow	Prevalence			Relative transcript copy number*				
	Peripheral blood		P†	Bone marrow–Peripheral blood				P‡
	Positive	Negative		n > 0‡	n < 0‡	Median§	Interquartile range	
Early								
Positive	3	13	<.001	15	1	0.098	0.043, 0.295	.004
Negative	0	0						
Intermediate								
Positive	3	13	<.001	16	0	0.210	0.034, 1.696	<.001
Negative	0	0						
Mature								
Positive	15	0	.032	10	6	0.110	–0.047, 1.539	.148
Negative	1	0						

n = 16 paired samples.

*Ratio between copy numbers of gametocyte transcripts and *P. falciparum* ubiquitin-conjugating enzyme transcript.

†Prevalences were compared using the McNemar test.

‡Number of pairs showing a higher (n > 0) or lower (n < 0) copy number of transcripts in bone marrow compared with peripheral blood.

§Median of the difference.

¶Relative transcript copy numbers were compared using the Wilcoxon signed-rank test.

microliter of blood. Categorical and continuous variables were compared between groups using the Fisher exact test and Mann-Whitney *U* test, respectively. McNemar and Wilcoxon signed-rank tests were used for comparisons between paired samples. The correlations between relative transcript copy numbers and parasite density were assessed by Spearman test. Associations of the prevalence of gametocyte stages in the bone marrow and of log-transformed relative transcript copy numbers with demographic and clinical parameters were assessed by Fisher test and Student *t* test, respectively. Backward stepwise regression models were performed including variables significantly associated in the univariate analysis. Multiple imputation analysis was performed on the missing values (range 1.83%-25.71%) using the Amelia II software, version 1.6.3. Regression was carried out on each of the 10 imputed datasets and the results were combined. Statistical analyses were performed using STATA.12 (STATA Corporation, College Station, TX). All *P* values are 2-sided and were considered significant when <.05.

Results

Characteristics of the study participants

A total of 174 anemic children who had undergone bone marrow aspiration were included in this study (Table 1). The median age of participants was 20 months (interquartile range [IQR] 12, 30), and 55% (95/174) were male. The median hemoglobin concentration was 6.9 (IQR 5.4, 9.6) g/dL, with 50% (88/174) of the children being severely anemic (hemoglobin <7 g/dL) and 57% (99/174) presenting with a fever at sample collection. Hemozoin was observed in 54% (71/132) of the bone marrow samples and signs of dyserythropoiesis in 67% (91/136), with nuclear pyknosis followed by irregular nuclei as the most commonly detected anomalies. The prevalence of dyserythropoiesis was similar in children with and without fever (36 of 57 [63%] vs 55 of 91 [60%], *P* = .464). Children with severe anemia were older and had a higher prevalence of hemozoin and asexual *P. falciparum* infection detected by microscopy in the bone marrow, as well as in peripheral blood, compared with nonseverely anemic children (Table 1). Seventy-eight percent (136/174) of the bone marrow samples and 36% (25/70) of the peripheral blood samples were positive for the *P. falciparum* HK gene by qPCR. Sixteen (23%) of the 70 children with data from both bone marrow and peripheral blood samples were positive for the *P. falciparum* HK gene in both compartments.

P. falciparum gametocyte stages in bone marrow and peripheral blood

Sexual *P. falciparum* parasites were detected by microscopy in the peripheral blood of 5% (9/174) of the children and in the bone marrow of 28% (46/162) (Table 2). Prevalence and relative transcript copy numbers of qPCR-detected gametocyte stages in bone marrow

Table 4. Prevalence of early, intermediate, and mature gametocytes in bone marrow according to demographic and clinical parameters

	Early		Intermediate		Mature	
	n (%)	<i>P</i>	n (%)	<i>P</i>	n (%)	<i>P</i>
Age (months)						
≤20 (n = 80)	76 (95)	1.000	61 (76)	.196	35 (44)	.037
>20 (n = 56)	53 (95)		48 (86)		35 (63)	
Sex						
Male (n = 77)	73 (95)	1.000	61 (79)	.830	39 (51)	.864
Female (n = 59)	56 (95)		48 (81)		31 (53)	
Fever						
No (n = 57)	52 (91)	.130	42 (74)	.130	26 (46)	.298
Yes (n = 79)	77 (97)		67 (85)		44 (56)	
CRP*						
Low (n = 68)	64 (94)	.682	51 (75)	.080	26 (38)	.003
High (n = 63)	61 (97)		55 (87)		41 (65)	
Severe anemia						
No (n = 74)	71 (96)	.702	59 (80)	1.000	24 (32)	<.001
Yes (n = 62)	58 (94)		50 (81)		46 (74)	
EPO†						
Low (n = 73)	70 (96)	1.000	60 (82)	.824	31 (42)	.024
High (n = 59)	56 (95)		47 (80)		37 (63)	
Asexual parasitemia (BM)‡						
Submic (n = 81)	76 (94)	1.000	62 (77)	.173	29 (36)	<.001
Patent (n = 46)	44 (96)		40 (87)		35 (76)	
Hemozoin						
No (n = 56)	52 (93)	.686	43 (77)	.472	16 (29)	<.001
Yes (n = 47)	45 (96)		39 (83)		33 (70)	
Dyserythropoiesis						
No (n = 33)	30 (91)	.373	25 (76)	.422	7 (21)	<.001
Yes (n = 73)	70 (96)		61 (84)		45 (62)	

P values are from Fisher test.

Submic, submicroscopic infections.

*Median: 7.44 mg/dL.

†Median: 88.65 U/L.

‡Submicroscopic if parasites were detected only by qPCR.

Table 5. Relative transcript levels of early, intermediate, and mature gametocyte stage markers in bone marrow positive for the different gametocyte stages according to demographic and clinical parameters

	n	Relative transcript levels (×100)*							
		Early		n	Intermediate		n	Mature	
		GM (95%CI)	P		GM (95%CI)	P		GM (95%CI)	P
Age (months)									
≤20	76	17.2 (12.0, 24.9)	.296	61	40.8 (23.2, 72.0)	.314	35	8.5 (3.2, 22.7)	.200
>20	53	12.8 (8.2, 19.8)		48	26.3 (13.4, 51.4)		35	20.3 (7.8, 52.6)	
Sex									
Male	73	14.9 (10.2, 21.9)	.871	61	29.9 (16.7, 53.3)	.541	39	13.6 (5.7, 32.4)	.90
Female	56	15.7 (10.3, 23.7)		48	39.1 (20.2, 75.5)		31	12.5 (4.1, 38.5)	
Fever									
No	52	21.0 (13.6, 32.4)	.061	42	48.0 (25.7, 89.4)	.195	26	40.6 (13.2, 125.1)	.009
Yes	77	12.3 (8.5, 17.7)		67	26.9 (15.0, 48.3)		44	6.7 (3.0, 15.1)	
CRP†									
Low	64	14.1 (9.2, 21.6)	.880	51	31.3 (15.9, 61.5)	.790	26	4.5 (1.5, 13.3)	.016
High	61	14.7 (10.2, 21.3)		55	35.2 (19.6, 63.5)		41	23.5 (10.1, 54.7)	
Severe anemia									
No	71	16.2 (11.2, 23.4)	.639	59	31.8 (16.8, 60.1)	.776	24	2.7 (0.9, 7.9)	<.001
Yes	58	14.2 (9.2, 21.9)		50	36.0 (20.2, 64.2)		46	30.1 (13.8, 65.4)	
EPO‡									
Low	70	14.3 (9.9, 20.6)	.898	60	26.1 (14.2, 47.9)	.236	31	3.8 (1.4, 10.2)	.002
High	56	14.8 (9.6, 23.0)		47	44.2 (23.5, 83.1)		37	30.1 (12.8, 70.8)	
Asexual parasitemia (BM)¶									
Submic	76	21.9 (15.9, 30.2)	.001	62	60.1 (37.9, 95.4)	<.001	29	9.7 (3.2, 29.3)	.386
Patent	44	8.4 (5.0, 14.1)		40	10.7 (4.9, 23.3)		35	17.6 (7.3, 42.5)	
Hemozoin									
No	52	24.0 (16.5, 34.8)	.009	43	60.0 (35.7, 100.9)	.006	16	8.6 (2.0, 37.8)	.317
Yes	45	10.6 (6.4, 17.5)		39	17.1 (8.0, 36.3)		33	20.9 (7.4, 59.3)	
Dyserythropoiesis									
No	30	18.9 (11.9, 29.9)	.479	25	27.5 (11.6, 65.5)	.753	7	13.4 (0.5, 376.1)	.885
Yes	70	14.8 (9.9, 22.1)		61	32.5 (18.3, 57.7)		45	11.3 (4.9, 25.9)	

P values are from Student *t* test using log transformed values.

CI, confidence interval; GM, geometric mean; submic, submicroscopic infections.

*Ratio (×100) between copy numbers of gametocyte transcripts and *P. falciparum* ubiquitin-conjugating enzyme transcript.

†Median: 7.44 mg/dL.

‡Median: 88.65 U/L.

¶Submicroscopic if parasites were detected only by qPCR.

and peripheral blood are shown in Table 2 and Figure 1. Among the 136 bone marrow samples and 25 peripheral blood samples that were positive for *P. falciparum* based on qPCR detection of the HK gene, 133 (98%) and 25 (100%), respectively, were positive for at least 1 gametocyte stage marker. Of these gametocyte qPCR-positive samples, microscopy data were available for 124 bone marrow samples with 27 (22%) gametocyte-positive (Figure 2) and for 25 peripheral blood samples with 3 (12%) gametocyte-positive. Prevalence of early and intermediate gametocyte stages in bone marrow (n = 136) were 4.8 and 5 times higher, respectively, compared with peripheral blood (n = 25), whereas mature gametocytes were twice as prevalent in peripheral blood as in bone marrow (*P* < .001 in the 3 comparisons; Figure 1A). Similarly, relative transcript levels of early and intermediate gametocyte markers were higher in bone marrow compared with peripheral blood, and mature gametocyte transcripts were higher in peripheral blood than in bone marrow (*P* < .001 in the 3 comparisons; Figure 1B). In the paired analysis including the 16 children positive by qPCR for *P. falciparum* both in bone marrow and peripheral blood, early and intermediate stages were found to be significantly more prevalent and more highly expressed in bone marrow compared with peripheral blood (Table 3).

Parameters associated with gametocyte stages in bone marrow

The univariate analyses showed that the presence of microscopically detected parasites and/or hemozoin in bone marrow, age >20 months,

high CRP and EPO levels, severe anemia, and dyserythropoiesis were significantly associated with an increased prevalence (Table 4) and relative transcript copy numbers (Table 5) of mature gametocytes in bone marrow. Moreover, relative transcript copy numbers of mature stages in bone marrow were positively correlated with parasite densities in peripheral blood ($\rho = 0.301, P < .001$). The backward stepwise regression analysis with imputed data showed independent positive associations between the prevalence of mature stages and severe anemia (*P* = .004), dyserythropoiesis (*P* < .001), as well as the presence of a microscopic infection in the bone marrow (*P* = .004) (Table 6). Moreover, relative transcript copy numbers of mature gametocytes were positively associated with severe anemia (*P* < .001) and negatively with fever (*P* = .003) (Table 6). Among the 25 children with qPCR-detected *P. falciparum* infection in peripheral blood, relative transcript copy numbers of mature stages in peripheral blood were lower in severely anemic children (median: 0.086, IQR 0.014, 1.657) compared with those with moderate anemia (0.011, IQR 0.003, 0.671; *P* = .052).

In contrast to mature stages, prevalence and levels of immature gametocytes were not found to be associated with severe anemia nor dyserythropoiesis (Tables 4-6). Relative transcript copy numbers of early and intermediate gametocytes were increased in children with submicroscopic infections in the bone marrow (Table 6) and decreased with increasing parasite densities (early: $\rho = -0.344, P < .001$; intermediate: $\rho = -0.217, P = .011$).

Table 6. Demographic and clinical parameters associated with prevalence and relative transcript levels of early, intermediate, and mature gametocyte stages in bone marrow estimated by backward regression models

	n	Significant variables	Effect size (95% CI)	P
Without imputation				
Prevalences				
Early	86	—		
Intermediate	86	—		
Mature	86	Severe anemia	2.94 (1.01, 8.61)	.049
		Dyserythropoiesis	6.31 (1.75, 22.75)	.005
		Microscopic infection	4.54 (1.45, 14.21)	.009
Levels				
Early	96	Hemozoin	0.43 (0.23, 0.78)	.007
Intermediate	81	Microscopic infection	0.21 (0.083, 0.51)	.001
Mature	67	Severe anemia	18.37 (5.53, 60.9)	<.001
		Fever	0.26 (0.079, 0.83)	.026
With imputation				
Prevalences				
Early	136	—		
Intermediate	136	—		
Mature	136	Severe anemia	3.57 (1.49, 8.53)	.004
		Dyserythropoiesis	6.21 (2.24, 17.25)	<.001
		Microscopic infection	4.09 (1.58, 10.60)	.004
Levels				
Early	129	Microscopic infection	0.41 (0.23, 0.73)	.003
Intermediate	109	Microscopic infection	0.20 (0.083, 0.48)	<.001
Mature	70	Severe anemia	11.41 (3.37, 38.58)	<.001
		Fever	0.16 (0.049, 0.54)	.003

CI, confidence interval.

Discussion

This is the first ex vivo study on malaria-exposed children to apply molecular detection and stage differentiation of *P falciparum* gametocytes in the bone marrow, and to highlight the unexpectedly high prevalence of sexual stages as well as abundance of immature stages in this site compared with peripheral blood. The results also suggest a relationship between hematological disturbances and gametocyte development in the bone marrow.

In this study, practically every *P falciparum*-infected child carried gametocytes in the bone marrow (98%) and peripheral blood (100%). Most of these gametocyte-positive samples (78% in bone marrow and 88% in peripheral blood) were negative by microscopy, demonstrating the high prevalence of submicroscopic low-density gametocytemias in human hosts. Such underdetection in peripheral blood is concordant with a meta-analysis of 5 studies showing that the prevalence of gametocytes detected by microscopy in peripheral blood was only 2.8% to 26.6% of that detected by PCR.³⁴ Early-stage gametocytes in bone marrow were particularly susceptible to underdetection by microscopy, probably because of the difficulty in distinguishing them from trophozoites³⁵ and other nucleated host cells. Given that submicroscopic gametocyte infections are capable of infecting mosquitoes and contributing to transmission,³⁶ these results suggest a higher potential for malaria transmission than previously observed in microscopically based studies.²

qPCR-based detection of sexual stage-specific transcripts showed that immature gametocytes were 5 times more prevalent and also more abundant in bone marrow compared with peripheral blood. This in contrast to the more mature gametocytemias observed in peripheral blood, although mature gametocytes were still observed in the

circulating in the bone marrow. The very low transcript levels of immature gametocytes in the peripheral blood of 20% of the children suggest that the highly sensitive qPCR might be detecting residual early sexual stages in the bloodstream that may have escaped from the bone marrow. These results are in agreement with recent findings suggesting that mechanical properties of erythrocytes infected by immature gametocyte stages (ie, decreased deformability leading to the retention of immature gametocytes within the marrow)³⁷⁻³⁹ may play a role in their localization in the bone marrow. However, it cannot be ruled out that cytoadhesion of erythrocytes infected by sexually committed trophozoites to specific receptors in the bone marrow may contribute to the enrichment of early sexual stages in this organ. Selective accumulation of immature gametocytes in bone marrow during the 8 to 12 days they need for maturation may provide them with a better niche for survival than the lumen of small vessels if, for example, their clearance is reduced in the special immune environment of the bone marrow.⁴⁰ However, it is still not clear if gametocytogenesis can be induced in bone marrow by the high concentration of erythrocyte progenitors^{41,42} or other soluble factors⁴³ or alternatively gametocytes are produced elsewhere and sequester in the bone marrow.

This study showed an elevated carriage of mature gametocytes in peripheral blood of *P falciparum*-infected children with severe anemia,^{2,44,45} representing an important infectious reservoir given the high numbers of anemic children in Mozambique (3.8 million children younger than age 10 years, 11.5% of them with severe anemia⁴⁶) and in other African countries where malaria is endemic.^{47,48} Several interpretations for the observed association between gametocytemia and severe anemia are possible: (1) factors associated with severe anemia such as an increased erythropoiesis and/or the elevated production of EPO^{42,43,49,50} may stimulate the maturation of gametocytes in bone marrow and increase their release into peripheral blood; (2) long-term infections or high asexual parasite densities, as observed in this and other studies,⁵¹ leading to severe anemia may provide a longer time for gametocyte maturation; or (3) parasite sequestration in the bone marrow may alter or inhibit the differentiation of hematopoietic progenitors and increase the risk of severe anemia. Other factors such as high temperatures or increased levels of cytokines during febrile paroxysms may also contribute to eliminating mature gametocytes or delay the maturation of early stages, as suggested by the observation of reduced levels of mature stages among children with fever.^{44,45,52} In contrast to mature stages, prevalence and levels of early sexual stages were independent of severe anemia, dyserythropoiesis, or fever in the children in this study. Moreover, the univariate analysis found that relative levels of developing gametocytes decreased with increasing parasite densities in the bone marrow. These observations suggest that the relative contribution of immature gametocytes to the pool of parasites in peripheral blood is reduced in high-density infections, and that the genesis of gametocytes is not related to hematological disturbances.

This study has 2 main limitations. First, the analysis was restricted to anemic children. Dynamics of *P falciparum* sexual stages in children with other disease spectrum (ie, asymptomatic) as well as older children and adults with higher levels of antimalarial immunity stills needs to be addressed at the molecular level. Second, gametocyte stages in tissues other than bone marrow and peripheral blood were not assessed in this ex vivo study. Therefore it cannot be ruled out that other organs of the host may be implicated in the maturation of *P falciparum* sexual stages. However, a recent autopsy study provides independent evidence for the malaria sexual stage development in the hematopoietic system of the bone marrow (R.J., Sandra K. Nilsson,

Jacqui Montgomery, Selasi Dankwa, Elizabeth Egan, Belinda Morahan, Karl B. Seydel, Lucia Bertuccini, Pietro Alano, Kim C. Williamson, Manoj T. Duraisingh, Terrie E. Taylor, Danny A. Milner, M.M., manuscript submitted September 2013), supporting the concept of bone marrow as a major source of immature gametocytes.

In summary, the qPCR-based detection of stage-specific gametocyte transcripts shows an enrichment of immature gametocytes in bone marrow compared with peripheral blood demonstrating their enrichment in this tissue. In addition, this study shows that almost all *P. falciparum*-infected anemic children were gametocyte carriers potentially contributing to transmission, and points out a relationship between severe anemia, dyserythropoiesis, and gametocyte maturation in the bone marrow rather than with genesis of gametocytes. These findings indicate that strategies targeting gametocytes should take into account the high prevalence of low-density gametocytemias that are undetected by microscopy and the increased contribution of severely anemic children to the *P. falciparum*-transmissible reservoir.

Acknowledgments

The authors thank the children and their parents/guardians for their participation in the study, the staff of the Manhiça District Hospital and the Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) for their work and dedication, and Alfred Cortés, Manuel Llinás, and Silvie Huijben for their useful comments and suggestions.

This study received financial support from the Agencia de Cooperación Internacional de Las Illes Balears, the Fundación Ramón Areces, and the Bill and Melinda Gates Foundation (Malaria Transmission Epidemiology Project). The CISM receives

core support from the Spanish Agency for International Cooperation and Development. The Walter and Eliza Hall Institute receives Victorian State Government Operational Infrastructure Support and Australian Government National Health and Medical Research Council (NHMRC) Independent Research Institutes Infrastructure Support Scheme. L.S. received support from an NHMRC Program Grant; I.M. from an NHMRC Senior Research Fellowship; A.M.-T. from the Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Panamá; M.M. from the National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (R01A107755801); and A.M. from the Instituto de Salud Carlos III (CP-04/00220).

Authorship

Contribution: R.A., A.M.-T., A.H.A., R.J., I.M., M.M., C. Menéndez, L.S., and A.M. contributed to conception and design of the study; R.A., A.M.-T., A.H.A., R.J., C. Moraleda, E.M., P.L.A., C. Menéndez, P.C., and A.N. contributed to acquisition of data; R.A., I.M., C.S.N.L.W.S., and A.M. analyzed the data; all authors contributed to interpretation of data; R.A., A.M.-T., A.M., and C. Menéndez drafted the article; and all authors read, revised the article critically for important intellectual content, and gave final approval of the version to be published.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Alfredo Mayor, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic - University of Barcelona), Rosselló 153, CEK 1st Floor, E-08036, Barcelona, Spain; e-mail: AGMAYOR@clinic.ub.es.

References

- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002; 415(6872):673-679.
- Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(2):377-410.
- Hawking F, Wilson ME, Gammage K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1971;65(5):549-559.
- Sinden RE. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. *Parasitology*. 2009;136(12):1427-1434.
- Smalley ME, Abdalla S, Brown J. The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(1):103-105.
- Thomson JG, Robertson A. The structure and development of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1935;29:31-40.
- Abdulsalam AH, Sabeeh N, Bain BJ. Immature *Plasmodium falciparum* gametocytes in bone marrow. *Am J Hematol*. 2010;85(12):943.
- Farfour E, Charlotte F, Settegrana C, Miyara M, Buffet P. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? *Malar J*. 2012;11:285.
- Karl S, Davis TM, St-Pierre TG. A comparison of the sensitivities of detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by magnetic fractionation, thick blood film microscopy, and RT-PCR. *Malar J*. 2009;8:98.
- Schneider P, Bousema T, Omar S, et al. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int J Parasitol*. 2006;36(4):403-408.
- Ouédraogo AL, de Vlas SJ, Nèbié I, et al. Seasonal patterns of *Plasmodium falciparum* gametocyte prevalence and density in a rural population of Burkina Faso. *Acta Trop*. 2008; 105(1):28-34.
- Paganotti GM, Palladino C, Modiano D, et al. Genetic complexity and gametocyte production of *Plasmodium falciparum* in Fulani and Mossi communities in Burkina Faso. *Parasitology*. 2006; 132(Pt 5):607-614.
- Shekalaghe SA, Bousema JT, Kunei KK, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania. *Trop Med Int Health*. 2007;12(4):547-553.
- malERA Consultative Group on Vaccines. A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000398.
- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, et al. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000406.
- Alonso P, Saute F, Aponte JJ, et al. Manhiça DSS, Mozambique. In: *International Development Research Centre, ed. Population and Health and Survival at INDEPTH Sites*. Vol. 1. 2001; 1:189-195.
- Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, et al. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet*. 1994; 344(8931):1175-1181.
- Migita RT, Klein EJ, Garrison MM. Sedation and analgesia for pediatric fracture reduction in the emergency department: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006;160(1):46-51.
- Priestley SJ, Taylor J, McAdam CM, Francis P. Ketamine sedation for children in the emergency department. *Emerg Med (Fremantle)*. 2001;13(1): 82-90.
- Wickramasinghe SN. Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol*. 1997;98(4):785-797.
- Romagosa C, Menendez C, Ismail MR, et al. Polarisation microscopy increases the sensitivity of hemozoin and *Plasmodium* detection in the histological assessment of placental malaria. *Acta Trop*. 2004;90(3):277-284.
- Alano P. *Plasmodium falciparum* gametocytes: still many secrets of a hidden life. *Mol Microbiol*. 2007;66(2):291-302.
- Lobo CA, Kumar N. Sexual differentiation and development in the malaria parasite. *Parasitol Today*. 1998;14(4):146-150.
- Mayor A, Serra-Casas E, Bardaji A, et al. Sub-microscopic infections and long-term recrudescence of *Plasmodium falciparum* in Mozambican pregnant women. *Malar J*. 2009;8:9.
- Wampfler R, Mwingira F, Javati S, et al. Strategies for detection of *Plasmodium* species gametocytes. *PLoS One*. 2013;8(9):e76316.

26. Young JA, Fivelman QL, Blair PL, et al. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(1):67-79.
27. Eksi S, Haile Y, Furuya T, Ma L, Su X, Williamson KC. Identification of a subtelomeric gene family expressed during the asexual-sexual stage transition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(1):90-99.
28. Silvestrini F, Bozdech Z, Lanfrancotti A, et al. Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143(1):100-110.
29. Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science.* 2003;301(5639):1503-1508.
30. Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 2003;1(1):E5.
31. Llinás M, Bozdech Z, Wong ED, Adai AT, DeRisi JL. Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(4):1166-1173.
32. Lemieux JE, Gomez-Escobar N, Feller A, et al. Statistical estimation of cell-cycle progression and lineage commitment in *Plasmodium falciparum* reveals a homogeneous pattern of transcription in ex vivo culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(18):7559-7564.
33. Daily JP, Scanfeld D, Pochet N, et al. Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature.* 2007;450(7172):1091-1095.
34. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1509-1517.
35. Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Arieff F, Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2004;3:24.
36. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):470-474.
37. Aingaran M, Zhang R, Law SK, et al. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol.* 2012;14(7):983-993.
38. Tibúrcio M, Niang M, Deplaine G, et al. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood.* 2012;119(24):e172-e180.
39. Tibúrcio M, Silvestrini F, Bertuccini L, et al. Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface [published online ahead of print November 1, 2012]. *Cell Microbiol.*
40. Zhao E, Xu H, Wang L, et al. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(1):11-19.
41. Peatey CL, Watson JA, Trenholme KR, et al. Enhanced gametocyte formation in erythrocyte progenitor cells: a site-specific adaptation by *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 2013;208(7):1170-1174.
42. Trager W, Gill GS, Lawrence C, Nagel RL. *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol.* 1999;91(2):115-118.
43. Reece SE, Duncan AB, West SA, Read AF. Host cell preference and variable transmission strategies in malaria parasites. *Proc Biol Sci.* 2005;272(1562):511-517.
44. Stepniewska K, Price RN, Sutherland CJ, et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. *Malar J.* 2008;7:249.
45. von Seidlein L, Drakeley C, Greenwood B, Walraven G, Targett G. Risk factors for gametocyte carriage in Gambian children. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):523-527.
46. Mabunda S, Casimiro S, Quinto L, Alonso P. A country-wide malaria survey in Mozambique. I. *Plasmodium falciparum* infection in children in different epidemiological settings. *Malar J.* 2008;7:216.
47. McElroy PD, ter Kuile FO, Lal AA, et al. Effect of *Plasmodium falciparum* parasitemia density on hemoglobin concentrations among full-term, normal birth weight children in western Kenya, IV. The Asembo Bay Cohort Project. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(4):504-512.
48. Premji Z, Hamisi Y, Shiff C, Minjas J, Lubega P, Makwaya C. Anaemia and *Plasmodium falciparum* infections among young children in an holoendemic area, Bagamoyo, Tanzania. *Acta Trop.* 1995;59(1):55-64.
49. Gautret P, Miltgen F, Gantier JC, Chabaud AG, Landau I. Enhanced gametocyte formation by *Plasmodium chabaudi* in immature erythrocytes: pattern of production, sequestration, and infectivity to mosquitoes. *J Parasitol.* 1996;82(6):900-906.
50. Trager W, Gill GS. Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozool.* 1992;39(3):429-432.
51. Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology.* 1990;100(Pt 2):191-200.
52. Sowunmi A, Fateye BA, Adediji AA, Fehintola FA, Happi TC. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated *falciparum* malaria in children. *Parasitology.* 2004;129(Pt 3):255-262.

Artículo 5: Impacto de la exposición al VIH en los indicadores de salud de los niños VIH negativos nacidos de madres VIH positivas en África subsahariana

Cinta Moraleda, Nilsa de Deus, Celia Serna-Bolea, Montse Renom, Llorenç Quintó, Eusebio Macete, Clara Menéndez*, Denise Naniche*

Resumen

Antecedentes

En los países con alta prevalencia de VIH, hasta un 30% de los lactantes pueden estar expuestos al VIH pero no infectarse (ENI); a pesar de ello, el impacto de VIH materno en la salud de estos niños todavía no es del todo conocido.

Métodos

158 lactantes (menores de 1 año) ENI y 160 lactantes no expuestos al VIH mozambiqueños fueron evaluados 1, 3, 9 y 12 meses después del nacimiento. En cada visita se realizó un cuestionario, un ADN-RCP para VIH, análisis hematológicos y determinaciones de CD4 y CD8. Se registraron todas las visitas a las consultas externas y todos los ingresos. Los niños ENI recibieron profilaxis con cotrimoxazol.

Resultados

Los niños ENI presentaron menor hematocrito que los niños no expuestos hasta los 9 meses de edad ($p=0,024$, $p=0,025$, $p=0,012$ respectivamente). El porcentaje de células T CD4 fue un 3% menor [95%CI (0,86; 5,15), $p=0,006$] y el porcentaje de las células T CD8 1,15 veces mayor [95%CI (1,06; 1,25), $p=0,001$] en los niños ENI comparado con los niños no expuestos. Los lactantes ENI presentaron un Z score de peso para la edad menor ($p=0,049$), pero una menor incidencia de consultas en general ($p=0,042$), por diarrea ($p=0,001$) y por afecciones respiratorias ($p=0,042$).

Conclusiones

Los niños ENI presentaron más frecuentemente anemia, tenían un peor estado nutricional y tuvieron alteraciones en el perfil inmunológico comparado con los niños no expuestos. La profilaxis con cotrimoxazol podría explicar la reducción en la morbilidad leve. Estos hallazgos refuerzan la continuación de la profilaxis con cotrimoxazol y la necesidad de entender las consecuencias de la exposición al VIH materno en este grupo de niños tan vulnerable.

Impact of HIV Exposure on Health Outcomes in HIV-Negative Infants Born to HIV-Positive Mothers in Sub-Saharan Africa

Cinta Moraleda, MD,*† Nilsa de Deus, PhD,*‡ Celia Serna-Bolea, PhD,† Montse Renom, MD,*† Llorenç Quintó, BSc, MPH,† Eusebio Macete, MD, PhD,*§ Clara Menéndez, MD, PhD,*† and Denise Naniche, PhD†

Background: Up to 30% of infants may be HIV-exposed non-infected (ENI) in countries with high HIV prevalence, but the impact of maternal HIV on the child's health remains unclear.

Methods: One hundred fifty-eight HIV ENI and 160 unexposed (UE) Mozambican infants were evaluated at 1, 3, 9, and 12 months postdelivery. At each visit, a questionnaire was administered, and HIV DNA polymerase chain reaction and hematologic and CD4/CD8 determinations were measured. Linear mixed models were used to evaluate differences in hematologic parameters and T-cell counts between the study groups. All outpatient visits and admissions were registered. ENI infants received cotrimoxazol prophylaxis (CTXP). Negative binomial regression models were estimated to compare incidence rates of outpatient visits and admissions.

Results: Hematocrit was lower in ENI than in UE infants at 1, 3, and 9 months of age ($P = 0.024$, 0.025 , and 0.012 , respectively). Percentage of CD4 T cells was 3% lower (95% confidence interval: 0.86 to 5.15; $P = 0.006$) and percentage of CD8 T cells 1.15 times higher (95% confidence interval: 1.06 to 1.25; $P = 0.001$) in ENI vs. UE infants. ENI infants had a lower weight-for-age Z score ($P = 0.049$) but reduced incidence of outpatient visits, overall ($P = 0.042$), diarrhea ($P = 0.001$), and respiratory conditions ($P = 0.042$).

Conclusions: ENI children were more frequently anemic, had poorer nutritional status, and alterations in some immunologic

profiles compared with UE children. CTPX may explain their reduced mild morbidity. These findings may reinforce continuation of CTPX and the need to understand the consequences of maternal HIV exposure in this vulnerable group of children.

Key Words: HIV-exposed noninfected infants, morbidity, anemia, sub-Saharan Africa, cotrimoxazol

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2014;65:182–189)

INTRODUCTION

The HIV pandemic affects over 34 million people worldwide. Southern Africa remains the most affected area, where up to 40% of women live with HIV.¹ The number of infants exposed to HIV during pregnancy, delivery, and breast-feeding is thus steadily increasing.² In addition, the health of exposed noninfected children (ENIC) may also be affected by their mother's HIV status.²

Most studies on clinical outcomes in ENIC have been conducted in industrialized countries, where the disease burden and health systems are not comparable with the African region. In addition, studies conducted in sub-Saharan Africa have often been performed without a control group of HIV-unexposed (UE) children (UEC) or have not been designed to study ENIC.^{3–6} As a consequence, the impact of maternal HIV infection on their infant's health is not well established. Some studies suggest an increased mortality^{6–10} and morbidity^{3,9,11,12} in African ENIC, whereas others have observed similar health indicators compared with UEC.^{4,13,14} It has also been suggested that adverse outcomes could be because of nonspecific risk factors known to be associated with child morbidity and mortality that are also related to maternal HIV infection, such as maternal disease, type of feeding, child's anemia, low birth weight (LBW), and prematurity.^{2,10,11,15} However, immunologic alterations have been reported in ENIC as compared with UEC, including an increased level of CD8 T cells, reduced naive CD4 T cells, increased memory T cells, and an increased prevalence of neutropenia^{16–18} (de Deus N, Moraleda C, Serna-Bolea C, Renom M, Menéndez C, Naniche D, unpublished data, 2012). Although some of these factors specifically associated with HIV exposure, such as decreased CD4 T-cell counts, might have an impact on morbidity and mortality of ENIC,^{19,20} the overall clinical relevance of these abnormalities is still unclear.

Received for publication June 3, 2013; accepted September 22, 2013.

From the *Manhiça Health Research Centre (CISM), Maputo, Mozambique; †Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ‡National Institute of Health, Maputo, Mozambique; and §National Directorate of Health, Ministry of Health, Maputo, Mozambique.

C.S. has received a grant from Spanish Ministry of Health (grant number PI070233). For the remaining authors none were declared. The Manhiça Health Research Centre receives core funding from the Spanish Agency for International Cooperation and Development and the HIV day hospital from the Agència Catalana de Cooperació al Desenvolupament.

There is no potential conflict of interest. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

C. Menendez and D.N. contributed equally.

Presented in part at the 13th European AIDS Conference, October 12–15, 2011, Belgrade, Serbia. Abstract number PE15.6/1.

Correspondence to: Cinta Moraleda, MD, Barcelona Centre for International Health Research, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Rosselló 132, 4-2 08036 Barcelona, Spain (e-mail: cinta.moraleda@cresib.cat).

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

Cotrimoxazol (CTX) prophylaxis (CTXP) has been associated with a decreased morbidity and mortality among HIV-infected children²¹ and among HIV-negative siblings of HIV patients,²² and it is indicated for ENIC in low resource settings.²³ However, this recommendation is being reconsidered because of a lack of information of a protective effect in ENIC, the strengthening and duration of prophylaxis of mother-to-child transmission (PMTCT) programs, and the concern for development of bacterial resistance to CTX.^{24,25}

The objective of this study was to help in guiding targeted clinical and preventive protocols for ENIC by increasing the knowledge of the clinical, immunologic, and hematologic profiles of these children.

METHODS

Study Setting and Population

The study was conducted at the Manhiça district hospital (MDH) and the Manhiça Health Research Centre, Manhiça District, southern Mozambique. Since 1996, the Manhiça Health Research Centre has run a continuous demographic surveillance system with over 84,700 inhabitants under surveillance in 2009 and a morbidity surveillance, whereby all pediatric hospital admissions and visits to the outpatient department (OPD) at the MDH and other health posts are registered using standardized questionnaires. Malaria transmission is perennial with marked seasonality and mainly because of *Plasmodium falciparum*.²⁶ At the time of the study, the antenatal clinic prevalence of HIV infection in pregnant women was 29%.²⁷ National guidelines for PMTCT of HIV during the study followed the 2006 World Health Organization recommendation.²⁸ After the first month of the study, the PMTCT national policy for all infants born to HIV mothers changed to 4 weeks of daily zidovudine and a single dose of nevirapine; they also received CTXP from 4 weeks of age until 2 months after weaning, as long as they had a HIV-negative serology test, while the mothers were counseled to exclusively breast-feed until 6 months of age.²⁹ The protocol was approved by the National Committee on Health Bioethics of Mozambique and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committee.

Study Procedures

This study was a prospective, observational cohort study comparing 2 groups of children: those born to HIV-positive women and those born to HIV-negative women. All women residents in the study area delivering a singleton live born at the MDH were invited to participate. Infants who needed urgent medical care at birth were transferred to the pediatric ward and were not included. After giving informed consent, the mothers were tested for HIV using the Determine HIV-1/2 Rapid Test (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Positive results were confirmed by the Uni-Gold Rapid Test (Trinity Biotech Co, Wicklow, Ireland). Exclusion criteria included a multiple delivery and/or having an indeterminate HIV test. A 5-mL venous sample was drawn from the HIV-positive mothers for CD4 and viral load determinations. All HIV-positive women were referred for clinical management

according to the national guidelines. At the time of delivery, the baby's birth weight was measured on a digital scale and length using a height board. Gestational age was assessed by the Dubowitz's method.³⁰

Study follow-up consisted of passive clinical surveillance of all outpatient visits and hospital admissions included in the morbidity surveillance (as described above) up to 1 year of age; in addition, 4 cross-sectional visits at 1, 3, 9, and 12 months postdelivery were carried out. At each visit, a standardized questionnaire, recording clinical data and feeding habits, was completed. A 1.5-mL venous sample was collected for hematologic and CD4/CD8 determinations, and a filter paper was prepared for HIV DNA polymerase chain reaction (PCR) test. Infants were considered uninfected if the HIV DNA-PCR at 1 month was negative or indeterminate and confirmed negative 2 weeks later. HIV DNA-PCR-negative infants born to HIV-positive mothers were assigned to the ENI group, and infants born to HIV-negative mothers were considered UE. At each subsequent study visit (3, 9, and 12 months), infants were tested for HIV DNA detected by PCR. Those with positive HIV DNA-PCR had a second PCR performed for confirmation, and if it was confirmed, they were referred for clinical management and were withdrawn from further study procedures.

Laboratory Methods

The HIV status of the infants was assessed from dried blood spot on filter paper using the Amplicor HIV-1 DNA-PCR kit (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). Maternal HIV RNA viral load was determined from frozen plasma using the Amplicor HIV-1 Monitor assay version 1.5 (Roche Diagnostics). The assay has a sensitivity of 400 copies per milliliter. For the statistical analyses, plasma HIV-1 RNA concentrations below the limit of detection were assigned the value of 200 copies per milliliter. T-cell counts were determined by flow cytometry in a FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) after whole-blood staining with fluorochrome-labeled antibodies to CD3, CD8, CD4, and CD45 in Truecount tubes. Hematologic determinations were assessed on whole blood using a Coulter counter.

Clinical Definitions

Clinical malaria was defined as either current fever (axillary temperature, $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) or a history of fever in the preceding 24 hours, plus a *P. falciparum* asexual parasitemia of any density on a blood slide. Diarrhea was defined as ≥ 3 watery loose stools in the previous 24 hours. Clinical severe pneumonia (CSP) was defined as dyspnea or cough, with increased respiratory rate according to age group and lower chest retractions. Acute lower respiratory infection (ALRI) was defined as fever plus abnormal lung auscultation without criteria for CSP. Acute upper respiratory infection (AURI) was defined as history of cough for less than 15 days without inclusion criteria for CSP or ALRI. Moderate wasting was defined as less than -2 weight-for-age Z score, moderate stunting as less than -2 length-for-age Z score, and moderate underweight as less than -2 weight-for-length Z score.

Growth disturbances were considered severe in these 3 anthropometric parameters when Z score was less than -3 .³¹ Exclusive breast-feeding was considered when the infant only received breast milk without any additional solid or liquid foods, including water. Mixed feeding was considered when the infant received breast-feeding and any additional solid or liquid foods and formula feeding when the infant received infant formula with or without other foods or liquids, without breast milk.³² PMTCT was considered complete for the mother if she had received all treatments according to the guidelines²⁸ and for the newborn if he/she received 1 dose of nevirapine in the first 72 hours after birth plus daily zidovudine for 4 weeks after delivery.²⁸ Anemia was defined as a hematocrit $<33\%$, microcytosis as a mean corpuscular volume <70 fL, and LBW as a birth weight <2.500 grams. An infant was considered premature if the gestational age was <37 weeks and a mother grand multipara if she had ≥ 5 previous deliveries. High viral load was considered $>10^4$ log₁₀ copies per milliliter.³³

Statistical Analyses

Microsoft FoxPro version 5.0 (Microsoft Corp, Redmond, WA) was used for data entry, validation, and cleaning of data, and statistical analysis was performed with STATA release 11 (StataCorp, College Station, TX). Comparisons between groups for proportions were assessed using the χ^2 test or Fisher exact test where appropriate. The Kruskal–Wallis test was used to compare independent continuous variables between groups. Linear mixed models were used to evaluate differences in hematologic parameters and T-cell counts between the study groups. These models take into account the structure of the data variance with repeated measures for each child and were estimated by maximum likelihood using a random intercept term at the subject level. The model validation is based on assessment of the residuals. Because %CD8 violates the assumption of normality of its residual, it is analyzed in logarithmic scale. According to this, coefficients from the regression models should be read as absolute differences between means for those variables analyzed in linear scale and proportional differences (ratios between geometric means) for those variables analyzed in logarithmic scale.

Incidence of outpatient visits and admissions was calculated using the observation period for the infants from the day of birth until the study participant reached any of the following: (1) withdrawal or lost of follow-up of the study, (2) death, (3) became HIV positive, or (4) reached 12 months of age. The date when an infant was considered HIV positive was the midpoint between the visit in which the result was positive and the previous visit. Children were excluded from the morbidity analysis for the periods spent outside the study area. An arbitrary lag of 15 days (28 for malaria outcomes) was applied after each registered episode during which children did not contribute to the time at risk or to the cases. Negative binomial regression models were estimated to compare incidence rates (IR), and *P* values were calculated using the likelihood ratio test.

A logistic regression model was created to test the association between mortality and the HIV status group

[results reported as odds ratio and 95% confidence interval (CI)]. The probability of mother-to-child transmission during the first year of life was calculated as $1 - (\text{negative proportion at 1 month visit} \times \text{negative proportion at 3 months visit} \times \text{negative proportion at 9 months visit} \times \text{negative proportion at 12 months visit}) \times 100$.

RESULTS

Study Population

Between August 2008 and June 2009, 158 HIV-positive mothers and 160 HIV-negative mothers and their children were enrolled. Characteristics of mother–infant pairs at delivery are shown in Table 1. Birth outcomes were similar in both groups. Among HIV-positive mothers, 5% (7/151) had CD4 below 200 counts per microliter at delivery (Table 2) and 13% (21/158) had received highly active antiretroviral therapy before delivery.

Mother-to-Child Transmission of HIV and Feeding Habits

Eighty-two percent (129/158) of the mothers and 70% (110/158) of their children had received complete PMTCT of HIV. At 1 month of age, HIV transmission rate was 9% [10/109 (95% CI: 3.7 to 14.7)]. Feeding methods were similar in the 2 groups until 6 months of age. Thereafter, the percentage of ENIC who were weaned increased progressively reaching 18% [10/55 (95% CI: 9.1 to 31.0)] at 9 months of age and

TABLE 1. Demographic Characteristics of Study Women and Their Infants at Delivery According to Maternal HIV Status

	HIV-Positive Women (n = 158)	HIV-Negative Women (n = 160)	<i>P</i>
Women			
Age (yrs), median (range)	25 (15–43)	23 (15–42)	0.048*
Parity			
Primigravidae, n (%)	28 (18)	32 (20)	0.604†
Multigravidae, n (%)	130 (82)	128 (80)	
Newborn			
Sex (male), n (%)	82 (52)	79 (49)	0.653†
GA (wk), median (IQR)	39 (37–39)	39 (38.5–39)	0.096*
Preterm, n (%)	8 (5)	4 (3)	0.255†
Birth weight (g), median (IQR)	3000 (2800–3300)	3100 (2900–3350)	0.253*
LBW, n (%)	10/154 (7)	7/155 (5)	0.446‡
Birth length (cm), median (IQR)	49 (48.0–49.8)	49 (48.5–50.0)	0.213*
BHC (cm), median (IQR)	35 (34–36)	35 (34–36)	0.989*

* Kruskal–Wallis test.

† χ^2 test.

‡ Fisher exact test.

BHC, birth head circumference; GA, gestational age.

TABLE 2. Virological and Immunologic Characteristics of HIV-Positive Women at Delivery

Maternal CD4 cell count (cells/ μ L)	n = 151
Absolute count, median (IQR)	606 (444–837)
<200, n (%)	7 (5)
200–349, n (%)	21 (14)
350–500, n (%)	24 (16)
\geq 500, n (%)	99 (66)
Maternal viral load (\log_{10} copies/mL)	n = 82
\log_{10} copies/mL, median (IQR)	4.1 (3.2–4.7)
>10 ⁴ , n (%)	43 (52)

47% [20/42 (95% CI: 32.0 to 63.6)] at 12 months of age, whereas at both ages, 100% of UEC were still breast-feeding ($P = 0.005$ and $P < 0.001$ for 9 and 12 months, respectively). Mixed feeding in ENIC was 10% (95% CI: 4.9 to 17.6) at 1 month, 43% (95% CI: 33.7 to 58.1) at 3 months, 75% (95% CI: 61.0 to 85.2) at 9 months, and 52% (95% CI: 36.4 to 68.0) at 12 months of age. The rate of HIV transmission through breast-feeding assessed at 3, 9, and 12 months was 8% [6/76 (95% CI: 1.7 to 14.1)], 8% [5/59 (95% CI: 1.2 to 15.8)], and 5% [2/44 (95% CI: 1.9 to 10.9)], respectively. The estimated rate of mother-to-child transmission of HIV in the first year of life was 27%.

Hematologic Parameters During Infancy

The hematologic parameters of ENIC and UEC were compared at 1, 3, 9, and 12 months of age and assessed longitudinally. Median values of hematocrit were significantly lower in ENIC compared with UEC at 1, 3, and 9 months of age ($P = 0.024$, 0.025 , and 0.012 , respectively) (Fig. 1A). Multivariate longitudinal analysis showed that hematocrit remained lower in ENIC compared with UEC after adjusting for age (difference between means: -2.09 ; 95% CI: -3.34 to -0.84 ; $P = 0.001$). A similar but nonsignificant trend for lower hemoglobin in ENIC vs. UEC was also observed (Fig. 1B). The prevalence of anemia was consistently higher in ENIC vs. UEC but only reached statistical significance at 9 months of age. [64% (49/77) vs. 52% (30/58) at 1 month, $P = 0.164$; 86% (37/43) vs. 77% (24/31) at 3 months, $P = 0.336$; 94% (50/53) vs. 78% (25/32) at 9 months, $P = 0.025$; and 92% (35/38) vs. 91% (29/32) at 12 months, $P = 0.826$]. Overall, the mean corpuscular volume values (Fig. 1C) and the prevalence of microcytosis were similar between the 2 groups [0% vs. 0% at 1 month; 9% (4/43) vs. 6% (2/31) at 3 months, $P = 0.658$; 66% (35/53) vs. 59% (19/32) at 9 months, $P = 0.536$; and 71% (27/38) vs. 82% (27/33) at 12 months, $P = 0.289$]. Total leukocyte (Fig. 1D), platelet, neutrophil, and lymphocyte counts did not differ between groups nor over time (data not shown).

At 1 month of age, ENIC had significantly lower median %CD4 T cells [44% interquartile range (IQR) (39–50) vs. 47% IQR (43–53), $P = 0.034$] and higher %CD8 T cells [19% IQR (15–25) vs. 15% IQR (13–21), $P = 0.0057$] than UEC (Figs. 1E, F). Multivariate longitudinal analysis showed

that after adjusting for age, the %CD4 T cells was lower in ENIC compared with UEC (difference between means: -3.01 ; 95% CI: -5.15 to -0.86 ; $P = 0.006$). Similarly, after adjusting for age, ENIC had higher %CD8 T cells (ratio of geometric means: 1.5; 95% CI: 1.06 to 1.25; $P = 0.001$) compared with UEC.

Morbidity During Infancy

One hundred fifty-three study children with PCR results at 1 month were included in the morbidity analysis. Among these infants under follow-up, 540 OPD visits and 34 admissions were registered during passive clinical surveillance. IR of overall outpatient visits at 1 year of age were lower in ENIC than in UEC ($P = 0.042$). During the first month of life, no differences in IR were observed (Table 3). ENIC had significantly fewer OPD visits with the diagnoses of diarrhea and AURI than did UEC ($P = 0.001$ and 0.042 , respectively; Table 3). The IR of OPD visits with ALRI (0.77, 95% CI: 0.53 to 1.11), conjunctivitis (0.65, 95% CI: 0.29 to 1.45), and skin lesions (0.76, 95% CI: 0.46 to 1.26) also tended to be lower among ENIC compared with UEC (Table 3). There were no differences in the incidences of hospital admissions between the 2 groups of children neither during the first month of life ($P = 0.175$) nor during the next 12 months of follow-up ($P = 0.282$). Hospital admissions for CSP only occurred in 7 children, but its IR ratio in ENIC vs. UEC was 5.6 (95% CI: 0.67 to 46.55; $P = 0.057$) (Table 4). During the study follow-up, 4 children died among ENIC and 1 child among UEC (odds ratio: 3.74; 95% CI: 0.41 to 34.26; $P = 0.195$).

Nutritional Parameters

Multivariate longitudinal analysis showed that after adjusting for age, the weight-for-age Z score was lower in ENIC than in UEC (difference between means: -0.27 ; 95% CI: -0.53 to 0.00 ; $P = 0.049$). The proportions of moderate and severe wasting, stunting, and underweight were similar among ENIC and UEC (data not shown).

DISCUSSION

The findings of this study show that compared with UE infants, HIV ENI infants had an increased frequency of anemia, poorer nutritional status, and alterations in some immunologic profiles. In addition, although the risk of outpatient attendances was lower in ENIC, the risk of severe pneumonia was increased in these children compared with UE infants.

Reduced hematocrit and hemoglobin and increased anemia have previously been described in ENIC.³⁴ It has been suggested that these changes might be associated with exposure to antiretrovirals for PMTCT³⁵ or because of a direct impact of the virus on fetal erythropoiesis.³⁶ This type of anemia is mainly macrocytic and usually resolves within the first 3 months of life.^{35,37–39} In this study, ENIC were more frequently anemic than UEC at all times, especially at 9 months of age, and in many, the anemia was microcytic, thus arguing against zidovudine as the main cause of anemia.

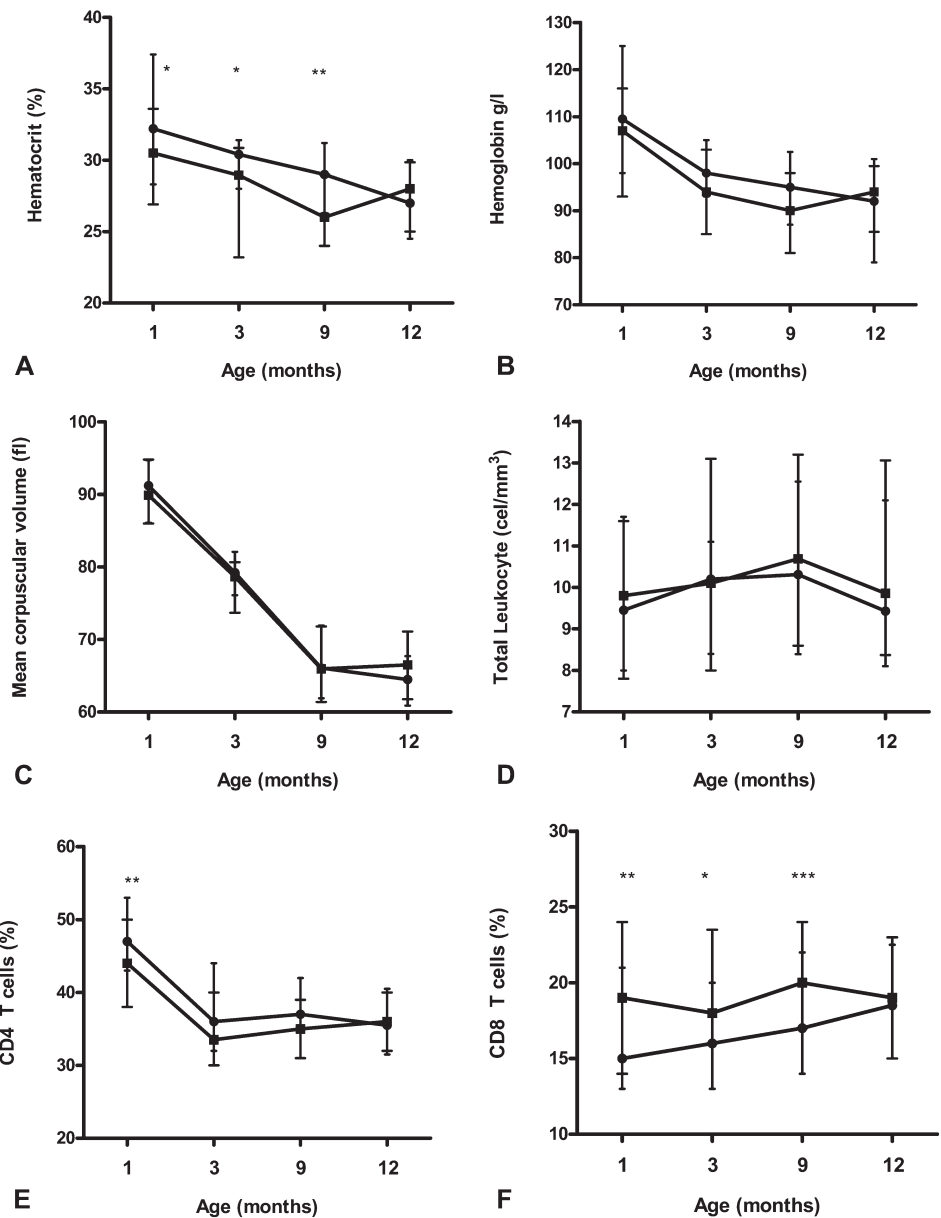


FIGURE 1. Dynamics of hematologic and immunologic parameters over the first year of life in ENI and UE infants. A, hematocrit (%), (B) hemoglobin (grams per liter), (C) mean corpuscular volume (femtoliters), (D) total leukocyte counts (cells per cubic millimeter), (E) CD4 T-cell percent (%), and (F) CD8 T-cell percent (%). UE (●) and ENI (■). Medians and interquartile ranges are plotted. Asterisks indicate *P* value by Wilcoxon rank sum test, *, <0.025; **, <0.01; ***, <0.05 between groups.

It could be speculated that the anemia in these children may be associated with inadequate nutrition in ENIC, as suggested by the early weaning in the HIV-exposed group or to increased exposure of ENIC to infectious diseases.² CTPX exposure may also result in anemia as a secondary effect of this drug.⁴⁰ However, in this study, the lower level of hematocrit was already present at 1 month, before initiation of CTPX. Additionally, CTPX-associated anemia is characteristically megaloblastic,⁴¹ which was not the case in this study. In addition, it has been observed that HIV-infected children taking CTPX have significantly higher hemoglobin levels than children with placebo.⁴² Although it is known that anemia in children is associated with increased morbidity and mortality,⁴³ the clinical impact of reduced hematocrit levels in ENIC is still unclear. As previously reported, we found an imbalance in T-cell populations with higher CD8 levels and

lower CD4 levels in ENIC compared with UEC.^{16,18,44} The clinical implications of these findings are not well understood.

Children born to HIV-positive mothers with CD4 <200 cells per microliter are more likely to have a poor birth outcome and increased infant morbidity and mortality.^{7,11,15,45,46} In this study, the prevalence of LBW and prematurity in ENIC was not significantly higher than in UEC. This is probably because of the few HIV-positive women with CD4 counts below 200 cells per microliter in this study.

Interestingly, ENIC had a significantly lower risk of OPD visits than did UEC, mainly because of a decreased risk of diarrhea and AURI episodes. This lower OPD attendance is probably related to the antibacterial effect of CTPX that ENIC routinely receive through a special clinic at the MDH. Alternatively, this additional clinical follow-up might have affected the health-seeking behavior of mothers of ENIC

TABLE 3. IR Ratios (IRRs) of Outpatient Visits in Infants by HIV Exposure Status

	Episodes	Time at Risk (PYAR)	IR	IRR	95% CI	<i>P</i> *
No. visits to OPD						
UE	291	69.37	4.19	1		0.042
ENI	249	74.61	3.34	0.79	0.63 to 0.99	
No. visits to OPD at first month						
UE	18	5.95	3.03	1		0.909
ENI	19	6.52	2.91	0.96	0.51 to 1.83	
Diarrhea						
UE	62	67.66	0.92	1		0.001
ENI	37	73.81	0.50	0.54	0.34 to 0.86	
Clinical malaria						
UE	12	69.41	0.17	1		0.743
ENI	15	74.25	0.20	1.16	0.48 to 2.79	
AURI						
UE	144	64.46	2.23	1		0.042
ENI	115	70.69	1.63	0.71	0.51 to 0.99	
ALRI						
UE	84	66.74	1.26	1		0.160
ENI	71	72.47	0.98	0.77	0.53 to 1.11	
Otitis media						
UE	12	69.67	0.17	1		0.304
ENI	19	74.51	0.26	1.49	0.69 to 3.18	
Conjunctivitis						
UE	21	69.30	0.30	1		0.293
ENI	15	74.67	0.20	0.65	0.29 to 1.45	
Skin lesions						
UE	34	68.82	0.49	1	1	0.291
ENI	28	74.15	0.38	0.76	0.46 to 1.26	

* *P* value from negative binomial regression model using likelihood ratio test. IR, episodes per "time at risk;" PYAR, person-year-at-risk. Statistically significant differences are highlighted in bold print.

TABLE 4. IR Ratios (IRRs) of Admissions to Hospital in Infants by HIV Exposure Status

	Episodes	Time at Risk (PYAR)	IR	IRR	95% CI	<i>P</i> *
No. admissions						
UE	13	69.63	0.19	1		0.282
ENI	21	74.48	0.28	1.51	0.71 to 3.18	
No. admissions at first month						
UE	2	5.97	0.33	1		0.175
ENI	6	6.37	0.94	2.81	0.57 to 13.92	
Diarrhea						
UE	3	70.04	0.04	1		0.931
ENI	3	75.16	0.04	0.93	0.19 to 4.62	
Clinical malaria						
UE	4	69.86	0.06	1		0.479
ENI	7	74.86	0.09	1.61	0.43 to 6.04	
CSP						
UE	1	70.12	0.01	1		0.057
ENI	6	75.07	0.08	5.60	0.67 to 46.55	

* *P* value from negative binomial regression model using likelihood ratio test. IR, episodes per "time at risk;" PYAR, person-year-at-risk.

in ENIC. This could be explained by a misdiagnosis of tuberculosis.¹² Tuberculosis is frequent among infants born to HIV-positive mothers,² but it is difficult to diagnose in small children in poor resource settings,⁵² and it is not preventable by CTPX. Alternatively, it may be possible that CTPX is less effective in preventing CSP than mild respiratory infections⁵³ or that those ENIC with CSP were poor compliers for CTX. Larger studies will be necessary to elucidate CSP risk in ENIC.

CTXP for ENIC is being reconsidered because of the concerns regarding the development of bacterial resistance.^{24,25} In the current study, despite an established PMTCT program, the rate of vertical transmission at 12 months of age was 27%, which illustrates the shortcomings of the health-care system. It might be premature to discontinue the CTPX in ENIC in the current context of continued breast-feeding up to 12 months of age and poor uptake of antiretrovirals.¹ More information is needed on the impact of CTPX on infant health and uptake of PMTCT interventions before changing the current policy.

In conclusion, the findings of this study have shown that ENIC have more anemia, are nutritionally disadvantaged, and have immunologic alterations, which may all have clinical consequences that need to be studied in larger prospective studies. We have also shown that CTPX may have a role in reducing morbidity in ENIC. This information is crucial to assist in tailoring public health policies for the management of this group of vulnerable infants in sub-Saharan Africa.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all the mothers and their infants who participated in the study, also to the dedicated staff of the Manhica District Hospital, and to the field, clinic, and data management staff at the Manhica Health Research Centre, Mozambique.

reducing their attendance to the OPD. It is important to note that previous studies documenting an increased morbidity in ENIC were performed in contexts where CTPX was not available.^{3,9,11} Contrary to the other reports suggesting a non-significant increased risk of diarrhea with CTPX,⁴⁷⁻⁴⁹ the findings of this study showed a significant effect of CTPX in decreasing the risk of AURI (by 30%) and diarrhea (by 50%). This was observed even in the presence of high levels of bacterial resistance to CTX in this setting.⁵⁰ The contribution of CTPX to these findings is also supported by the lack of difference in the incidence of OPD visits between the 2 groups of infants in the first month of life before the initiation of CTPX. Discrepancies between this and other reports regarding the effect of CTPX on morbidity in ENIC might be explained by the differences in age, feeding modes, duration of CTPX, or follow-up. It has been shown that CTPX confers protection against malaria.^{49,51} However, we were unable to assess the effect of CTPX on malaria incidence because of the small number of malaria episodes registered during the follow-up. We did, however, observe a borderline significant increased incidence of hospital admissions for CSP

REFERENCES

- WHO. GLOBAL HIV/AIDS RESPONSE. Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. 2011. Available at: http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/index.html. Accessed May 1, 2013.
- Filteau S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop Med Int Health*. 2009;14:276–287.
- Thea DM, St Louis ME, Atido U, et al. A prospective study of diarrhea and HIV-1 infection among 429 Zairian infants. *N Engl J Med*. 1993;329:1696–1702.
- Spira R, Lepage P, Msellati P, et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. Mother-to-Child HIV-1 Transmission Study Group. *Pediatrics*. 1999;104:e56.
- Venkatesh KK, de Bruyn G, Marinda E, et al. Morbidity and mortality among infants born to HIV-infected women in South Africa: implications for child health in resource-limited settings. *J Trop Pediatr*. 2011;57:109–119.
- Brahmbhatt H, Kigozi G, Wabwire-Mangen F, et al. Mortality in HIV-infected and uninfected children of HIV-infected and uninfected mothers in rural Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;41:504–508.
- Marinda E, Humphrey JH, Iliff PJ, et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:519–526.
- Mugwaneza P, Umutooni NW, Ruton H, et al. Under-two child mortality according to maternal HIV status in Rwanda: assessing outcomes within the National PMTCT Program. *Pan Afr Med J*. 2011;9:37.
- Shapiro RL, Lockman S, Kim S, et al. Infant morbidity, mortality, and breast milk immunologic profiles among breast-feeding HIV-infected and HIV-uninfected women in Botswana. *J Infect Dis*. 2007;196:562–569.
- Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, et al. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet*. 2004;364:1236–1243.
- Koyanagi A, Humphrey JH, Ntozini R, et al. Morbidity among human immunodeficiency virus-exposed but uninfected, human immunodeficiency virus-infected, and human immunodeficiency virus-unexposed infants in Zimbabwe before availability of highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:45–51.
- McNally LM, Jeena PM, Gajee K, et al. Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. *Lancet*. 2007;369:1440–1451.
- Lepage P, Dabis F, Hitimana DG, et al. Perinatal transmission of HIV-1: lack of impact of maternal HIV infection on characteristics of livebirths and on neonatal mortality in Kigali, Rwanda. *AIDS*. 1991;5:295–300.
- Taha TE, Graham SM, Kumwenda NI, et al. Morbidity among human immunodeficiency virus-1-infected and -uninfected African children. *Pediatrics*. 2000;106:E77.
- Rollins NC, Coovadia HM, Bland RM, et al. Pregnancy outcomes in HIV-infected and uninfected women in rural and urban South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;44:321–328.
- Clerici M, Saresella M, Colombo F, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood*. 2000;96:3866–3871.
- Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood*. 2001;98:398–404.
- Miyamoto M, Pessoa SD, Ono E, et al. Low CD4+ T-cell levels and B-cell apoptosis in vertically HIV-exposed noninfected children and adolescents. *J Trop Pediatr*. 2010;56:427–432.
- Mussi-Pinhata MM, Motta F, Freimanis-Hance L, et al. Lower respiratory tract infections among human immunodeficiency virus-exposed, uninfected infants. *Int J Infect Dis*. 2010;14(suppl 3):e176–182.
- Sutcliffe CG, Scott S, Mugala N, et al. Survival from 9 months of age among HIV-infected and uninfected Zambian children prior to the availability of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2008;47:837–844.
- Chintu C, Bhat GJ, Walker AS, et al. Co-trimoxazole as prophylaxis against opportunistic infections in HIV-infected Zambian children (CHAP): a double-blind randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364:1865–1871.
- Memmin J, Lule J, Ekwari JP, et al. Cotrimoxazole prophylaxis by HIV-infected persons in Uganda reduces morbidity and mortality among HIV-uninfected family members. *AIDS*. 2005;19:1035–1042.
- Provisional WHO/UNAIDS recommendations on the use of cotrimoxazole prophylaxis in adults and children living with HIV/AIDS in Africa. *Afr Health Sci*. 2001;1:30–31.
- Gill CJ, Sabin LL, Tham J, et al. Reconsidering empirical cotrimoxazole prophylaxis for infants exposed to HIV infection. *Bull World Health Organ*. 2004;82:290–297.
- Coutsoudis A, Coovadia HM, Kindra G. Time for new recommendations on cotrimoxazole prophylaxis for HIV-exposed infants in developing countries? *Bull World Health Organ*. 2010;88:949–950.
- Guinovart C, Bassat Q, Sigauque B, et al. Malaria in rural Mozambique. Part I: children attending the outpatient clinic. *Malar J*. 2008;7:36.
- Gonzalez R, Mungambe K, Aponte J, et al. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a community-based survey. *HIV Med*. 2012;13:581–588.
- WHO. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: towards universal access. Recommendations for a public health approach. 2006. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/mtct/antiretroviral/en/index.html>. Accessed May 1, 2013.
- WHO. HIV and infant feeding: update based on the technical consultation held on behalf of the Inter-agency Team (IATT) on Prevention of HIV Infections in Pregnant Women, Mothers and their Infants. 2006. Available at: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241595964/en/index.html. Accessed May 1, 2013.
- Dubowitz LM, Dubowitz V, Goldberg C. Clinical assessment of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1970;77:1–10.
- CDC. Centers for disease control and Prevention clinical growth Charts. Available at: http://www.cdc.gov/growthcharts/clinical_charts.htm. Accessed May 1, 2013.
- WHO. Nutrition topics. Exclusive breastfeeding. Available at: http://www.who.int/nutrition/topics/exclusive_breastfeeding/en. Accessed May 1, 2012.
- Burns DN, Landesman S, Wright DJ, et al. Influence of other maternal variables on the relationship between maternal virus load and mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 1997;175:1206–1210.
- Mwinga K, Vermund SH, Chen YQ, et al. Selected hematologic and biochemical measurements in African HIV-infected and uninfected pregnant women and their infants: the HIV Prevention Trials Network 024 protocol. *BMC Pediatr*. 2009;9:49.
- Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyaux C, et al. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS*. 2003;17:2053–2061.
- Burstein Y, Rashbaum WK, Hatch WC, et al. Alterations in human fetal hematopoiesis are associated with maternal HIV infection. *Pediatr Res*. 1992;32:155–159.
- Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331:1173–1180.
- Fernandez Ibieta M, Ramos Amador JT, Gonzalez Tome MI, et al. Anaemia and neutropenia in a cohort of non-infected children of HIV-positive mothers [in Spanish]. *An Pediatr (Barc)*. 2008;69:533–543.
- Lahoz R, Noguera A, Rovira N, et al. Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants: implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:376–379.
- Rieder MJ, King SM, Read S. Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole among children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:1028–1031.
- Watkins D, Whitehead MV, Rosenblatt DS. Megaloblastic anemia. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, et al, eds. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier. 2009;chap 11.
- Prendergast A, Walker AS, Mulenga V, et al. Improved growth and anemia in HIV-infected African children taking cotrimoxazole prophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2011;52:953–956. doi: 910.1093/cid/cir1029.
- Brabin BJ, Premji Z, Verhoeff F. An analysis of anemia and child mortality. *J Nutr*. 2001;131(2S-2):636S–645S; discussion 646S–648S.
- Embree J, Bwayo J, Nagelkerke N, et al. Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected children in Nairobi. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:397–403.
- Kuhn L, Kasonde P, Sinkala M, et al. Does severity of HIV disease in HIV-infected mothers affect mortality and morbidity among their uninfected infants? *Clin Infect Dis*. 2005;41:1654–1661.

46. Chilongozi D, Wang L, Brown L, et al. Morbidity and mortality among a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected pregnant women and their infants from Malawi, Zambia, and Tanzania. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:808–814.
47. Coutsooudis A, Pillay K, Spooner E, et al. Routinely available cotrimoxazole prophylaxis and occurrence of respiratory and diarrhoeal morbidity in infants born to HIV-infected mothers in South Africa. *S Afr Med J*. 2005;95:339–345.
48. Coutsooudis A, Kindra G, Esterhuizen T. Impact of cotrimoxazole prophylaxis on the health of breast-fed, HIV-exposed, HIV-negative infants in a resource-limited setting. *AIDS*. 2011;25:1797–1799.
49. Sandison TG, Homsy J, Arinaitwe E, et al. Protective efficacy of co-trimoxazole prophylaxis against malaria in HIV exposed children in rural Uganda: a randomised clinical trial. *BMJ*. 2011;342:d1617.
50. Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:522–527.
51. Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, et al. Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and disease. *J Infect Dis*. 2005;192:1823–1829.
52. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, et al. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1078–1090.
53. Straus WL, Qazi SA, Kundi Z, et al. Antimicrobial resistance and clinical effectiveness of co-trimoxazole versus amoxicillin for pneumonia among children in Pakistan: randomised controlled trial. Pakistan Co-trimoxazole Study Group. *Lancet*. 1998;352:270–274.

Artículo 6: Impacto de la carga viral materna elevada en el parto sobre las poblaciones de células T en lactantes no infectados por el VIH en Mozambique

Nilsa de Deus*, [Cinta Moraleda*](#), Celia Serna-Bolea, Montse Renom, Clara Menéndez, Denise Naniche

Resumen

Antecedentes

Se ha descrito que los niños ENI presentan alteraciones inmunes comparados con los niños no expuestos al VIH. Este estudio pretende caracterizar las poblaciones de células T un mes después del nacimiento en los niños ENI y en niños no expuestos que viven en un área semi-rural del sur de Mozambique.

Métodos

Entre Agosto de 2008 y Junio de 2009 en el HDM se reclutaron después del parto parejas madre-hijo como parte de un estudio observacional prospectivo sobre los índices sanitarios e inmunológicos en lactantes ENI. Se invitó a los niños a realizar una visita clínica al mes de vida en la que se realizó una ADN-RCP para VIH y análisis inmunofenotípicos. El análisis primario evaluó las diferencias inmunológicas entre los niños ENI y los no expuestos, mientras que el análisis secundario evaluó el impacto de la carga viral ARN materna en el grupo de niños ENI. Los niños con ADN-RCP para VIH positiva no se incluyeron en el análisis.

Resultados

Al mes de edad, 74 niños ENI y 56 niños no expuestos presentaron niveles similares de células T CD8 y T CD4 naive, memoria y activadas. Los niveles de células T CD8 naive y activadas se asociaron a la carga viral ARN materna en el parto. Los niños ENI nacidos de madres con cargas virales mayores de $5 \log_{10}$ copias/ml tuvieron niveles medios menores de células T CD8 naive ($p=0,04$) y niveles medios mayores de células T CD8 memoria ($p=0,014$).

Conclusiones

Este estudio sugiere que la exposición a una carga viral ARN de VIH materna alta aumenta el riesgo de los niños de tener alteraciones precoces de la población de células T. Conseguir mejorar los programas de profilaxis de TMH-VIH para que más mujeres tengan niveles indetectables de carga viral es crucial para disminuir la transmisión vertical, pero también para reducir las consecuencias de la exposición al VIH en los niños ENI.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Impact of elevated maternal HIV viral load at delivery on T-cell populations in HIV exposed uninfected infants in Mozambique

Nilsa de Deus^{1,2†}, Cinta Moraleda^{2,3†}, Celia Serna-Bolea³, Montse Renom^{2,3}, Clara Menendez^{2,3} and Denise Naniche^{2,3*}

Abstract

Background: HIV-uninfected infants born to HIV-infected mothers (HIV-exposed uninfected, HEU) have been described to have immune alterations as compared to unexposed infants. This study sought to characterize T-cell populations after birth in HEU infants and unexposed infants living in a semirural area in southern Mozambique.

Methods: Between August 2008 and June 2009 mother-infant pairs were enrolled at the Manhica District Hospital at delivery into a prospective observational analysis of immunological and health outcomes in HEU infants. Infants were invited to return at one month of age for a clinical examination, HIV DNA-PCR, and immunophenotypic analyses. The primary analysis sought to assess immunological differences between HEU and unexposed groups, whereas the secondary analysis assessed the impact of maternal HIV RNA viral load in the HEU group. Infants who had a positive HIV DNA-PCR test were not included in the analysis.

Results: At one month of age, the 74 HEU and the 56 unexposed infants had similar median levels of naïve, memory and activated CD8 and CD4 T-cells. Infant naïve and activated CD8 T-cells were found to be associated with maternal HIV-RNA load at delivery. HEU infants born to women with HIV-RNA loads above 5 log₁₀ copies/mL had lower median levels of naïve CD8 T-cells ($p = 0.04$), and higher median levels of memory CD8 T-cells, ($p = 0.014$).

Conclusions: This study suggests that exposure to elevated maternal HIV-RNA puts the infant at higher risk of having early T-cell abnormalities. Improving prophylaxis of mother to child HIV programs such that more women have undetectable viral load is crucial to decrease vertical transmission of HIV, but may also be important to reduce the consequences of HIV virus exposure in HEU infants.

Keywords: HIV-exposed uninfected, T-cell, Naïve, Memory, Maternal HIV-RNA load, Africa

Background

Mother to child transmission (MTCT) of HIV occurs at a rate of 15% to 40% in a breastfeeding population in the absence of prevention measures [1]. However, prevention of MTCT of HIV (pMTCT-HIV) through anti-retroviral prophylaxis, cesarean deliveries and formula feeding has successfully reduced MTCT to less than 1% in resource-rich countries [2-4]. In Sub-Saharan African countries, the last decade has witnessed a major rollout of pMTCT-HIV programs, which has contributed to

dropping rates of vertical transmission of HIV. However, with antenatal clinic HIV prevalence reaching 30% in some countries [5,6], many infants are potentially exposed to HIV, although remaining uninfected. These HIV-exposed uninfected (HEU) infants may have immunological alterations which could lead to weakened responses to infections and vaccines and vulnerability to disease [7].

There is clear evidence that HEU infants present cytopenias including neutropenia as well as imbalances in levels of total CD4 and CD8 T-cells [8-20]. There is also increasing evidence that other immune abnormalities may be present in HEU infants, albeit to differing degrees, such as, altered cytokine production or memory/naïve T-cell skewing [10,11,13-15,21-24]. The duration

* Correspondence: dsuzanne@clinic.ub.es

†Equal contributors

²Manhica Health Research Centre (CISM), Manhica, Mozambique

³Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, C/Rossello 132, 4^a, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

of these abnormalities is not clear. HEU infants may also have lower thymus output and increased immune activation as compared to unexposed infants [9,14,21]. However, reduced thymic size in HEU was not found to lead to differences in T cell phenotypes or function between HEU and unexposed infants at 15 months of age [25]. Some studies have suggested an important role of maternal and infant antiretroviral exposure in triggering immunological alterations, but the impact remains unclear [22,26]. HEU studies on lymphocytes and thymus output have mainly been conducted in Europe, North America and Brazil. The situation may be more complex in Sub-Saharan Africa [19] where independently of HIV, Africans have been shown to have lower levels of CD4, naïve T-cells and increased levels of activated T-cells as compared to Europeans [27-31]. In addition, environmental and setting-specific factors affecting immunological indicators may vary widely in Sub-Saharan Africa. For example, in areas of high malaria endemicity such as Mozambique, cord blood lymphocytes from mothers infected with malaria are often primed to parasite antigens and exhibit higher level of activation [32,33].

The clinical consequences of immune alterations observed in HEU infants are unknown. There has been an observation that HEU infants may mount a weaker immune response to BCG than infants born to HIV-uninfected women [34,35]. Another consequence of impaired immunity could be that the severity, frequency and mortality associated with infections is exacerbated in HEU infants as compared to unexposed infants [36-39]; however it is not clear whether this is due to specific immune alterations [40-43] or to other mechanisms.

This study sought to characterize T-cell populations after birth in HEU infants and unexposed infants living in a semirural area in southern Mozambique where HIV clade C is the predominant circulating virus.

Methods

Study population

This study was conducted from August 2008 to August 2010 at the Manhiça District Hospital in southern Mozambique. The present study is integrated into a prospective observational analysis of immunological and health outcomes in infants born to HIV-infected mothers which has been described elsewhere [20]. National guidelines for pMTCT-HIV during the study followed the 2006 World Health Organization (WHO) recommendation [44]. At the time of the study, Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) was indicated for women in WHO disease stage 3 or 4 or CD4 < 250 counts/ μ l. For infants whose mothers received a complete pMTCT-HIV was based on a single dose of nevirapine (NVP) and daily zidovudine (AZT) during 1 week post-delivery and for those whose mothers did not receive a complete prophylaxis a

single dose of NVP and 4 weeks of daily AZT was recommended. After the first month of the study, the pMTCT-HIV national recommendation for children changed, and 4 weeks of daily AZT was recommended for all infants born to HIV-infected mothers. pMTCT-HIV was considered complete for the mother if she had received all treatments according to the guidelines, and for the newborn if he/she had received one dose of nevirapine in the first 72 hours after birth plus daily zidovudine for 4 weeks after delivery [44]. Women were counselled to exclusively breastfeed through 6 months. All HIV-infected mothers and HIV-infected infants were referred to the day hospital for clinical management according to national guidelines.

All participating mothers gave written informed consent, and the study protocol was approved by the Mozambican National Bioethics and the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Review Committees.

Study procedures

At enrolment HIV serology testing was performed in the mothers using the Determine HIV-1/2 Rapid Test (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) and positive results were confirmed by the Uni-Gold Rapid Test (Trinity Biotech Co., Wicklow, Ireland) according to national guidelines. A 5 mL venous sample was drawn from HIV-positive mothers for CD4 cell counts and viral load determinations. Infants were invited to return at one month of age for a clinical examination, HIV DNA-PCR, and blood drawing. Infants who had a positive HIV DNA-PCR test were not included in the analysis. Due to the difficult blood extraction, several children did not have enough blood for all the determinations. Only the children with all the parameters available were included in this analysis. The mother-infant pairs included: 1) HIV-infected mothers and their HEU infants and 2) HIV-uninfected mothers and their unexposed infants.

HIV serological and virological determinations

Infants were tested for HIV-1 using the Amplicor DNA-PCR kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). HIV-RNA quantification was performed from cryopreserved plasma samples with the commercial Roche Amplicor Monitor, version 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The assay had a lower limit of detection of 400 HIV-1 RNA 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.

Immunophenotypic analysis

CD4 and CD8 counting was performed from fresh whole blood after staining with labelled antibodies: CD4, CD3, CD8, and CD45 in TruCount tubes (Becton Dickinson Biosciences, California, USA). Samples were assessed by flow cytometry on a FACS Calibur (Becton Dickinson).

Analysis was completed using Multiset software (Becton Dickinson Biosciences, California, USA).

To assess the percentage of activated CD4 and CD8 T lymphocytes, cell staining was performed with CD3, CD4 or CD8, CD38, and HLA-DR antibodies. Activated T-cells were defined as those CD4 or CD8 T-cells expressing both CD38 and HLA-DR surface markers. The percentage of naïve CD4 and CD8 was determined with CD62L and CD45RA antibodies whereas the percentage of memory CD4 and CD8 T-cells was evaluated by pan-CD45RO antibody staining.

Statistical analysis and definitions

HEU infants were defined as those having a negative HIV-DNA PCR test at 1 month of age. Parity was categorized as primiparous if this was the first pregnancy and multiparous if the mother had had any previous pregnancy. Low birth weight was defined as birth weight < 2500 grams.

Comparisons between groups for proportions were assessed using the chi-square test or Fisher’s exact test where appropriate. For the T-cell population studies, analyses were made on continuous variables. The Kruskal-Wallis test was used to compare independent continuous variables between groups. The Wilcoxon signed rank test was used for analysis of paired data. The Spearman correlation was used to assess correlations between non-normally distributed continuous variables.

Statistical analysis was performed using STATA version 12.0 (StataCorp, College Station, TX). The primary analysis sought to assess immunological differences between HEU and unexposed groups, whereas the secondary analysis assessed the impact of the maternal HIV RNA viral load within the HEU group.

Results

Study population

Between August 2008 and June 2009, 318 mothers, 158 HIV-infected women and 160 HIV-uninfected women were enrolled at the Manhiça District Hospital [20]. Of these, 110 HIV-infected and 75 HIV-uninfected women came to the clinic at the infant’s one month visit and were included in this study. Ten infants were determined to be HIV-infected at 1 month of age and excluded from the analysis. Of the remaining 175 mother-infant pairs, 130 infants had all immunological measures at 1 month of age, (74 infants born to HIV-infected mothers and 56 infants born to HIV-uninfected mothers). The 45 mother-infant pairs lost to follow up were comparable to the 130 used in this analysis in terms of demographic characteristics (data not shown).

Demographic and clinical characteristics of mothers and their infants at delivery were comparable between HEU and unexposed groups (Table 1). The 130 mother-infant pairs included in this analysis were comparable to the overall study population in terms of parity, age and birth weight and for HIV-infected women in terms of CD4 counts and HIV RNA levels (data not shown) [20]. At delivery the median maternal CD4 T-cell counts of HIV-infected mothers was 624 cells/μl (IQR: 495–837) and 17% of the women had levels below 350 CD4 cells/μl. Only 20.63% of the HIV-infected women had undetectable HIV RNA at delivery and median HIV RNA load was 3.91 log₁₀ copies/mL (IQR: 2.97-4.67). Eighty-two percent of HIV-infected mothers received complete pMTCT-HIV. At one-month of age, close to 90% of infants were receiving exclusive breastfeeding.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of mothers and their infants at delivery according to maternal HIV serostatus (n = 130)

	HIV-infected		HIV-uninfected		P
	N = 74		N = 56		
Parity (n, %)					
primigravidae	14	18.92	11	19.64	0.917
multigravidae	60	81.08	45	80.36	
Age (yrs) [median (IQR)]		25 (22–30)		23 (20–31)	0.335
Low Birth weight, (n, %)	3	4.17	1	1.82	0.453
Birth weight (gr) [median (IQR)]		3000 (2800–3300)		3100 (2900–3350)	0.253
Sex, (n, %)					
male	42	56.76	23	41.07	0.077
female	32	43.24	33	58.03	
Maternal HIV RNA log ₁₀ * (copies/mL) [median (IQR)]		3.91 (2.97-4.67)		NA	
Maternal CD4 counts (cells/μl) [median (IQR)]		624 (495–837)		NA	

IQR: interquartile range.

*Analysis is based on n = 63 infants with maternal HIV RNA measures available.

Distribution of T-cell populations among HEU and unexposed infants at 1 month of age

To investigate the impact of maternal HIV infection on the distribution of infant T-cells subsets, percent activated, naïve and memory CD4 and CD8 T-cell subsets were assessed in HEU and UE infants.

At one month of age, the seventy-four HEU and the fifty-six unexposed infants had similar median levels of naïve, memory and activated CD8 and CD4 T-cells (Figure 1).

The impact of maternal HIV viral load on levels of naïve and memory CD8 T-cells

Within HEU infants, levels of naïve CD8 T-cells showed a significant negative association with maternal HIV RNA viral load (Spearman correlation: $\rho = -0.324$, $p = 0.016$) whereas levels of naïve CD4 T-cells were not significantly associated with maternal HIV RNA (Figure 2). Memory CD8 T-cells and activated CD8 T-cells were positively associated with maternal HIV RNA viral load (memory: Spearman $\rho = 0.293$ $p = 0.031$ and activated:

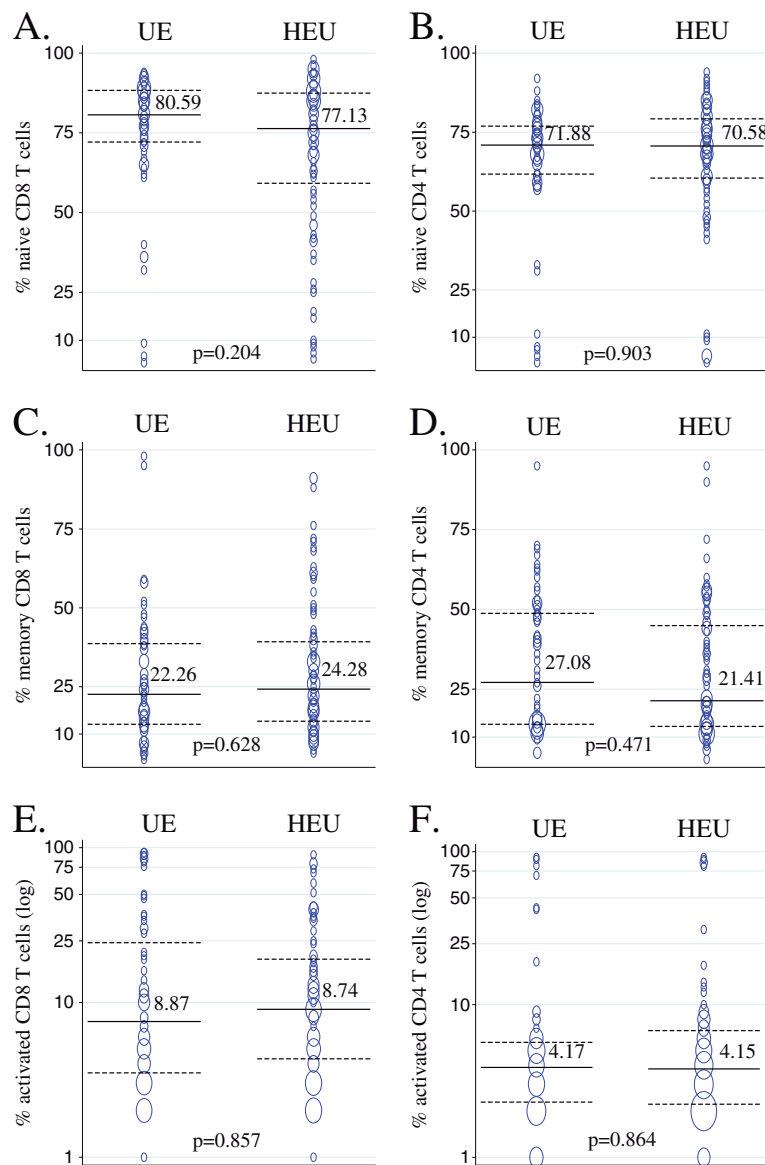
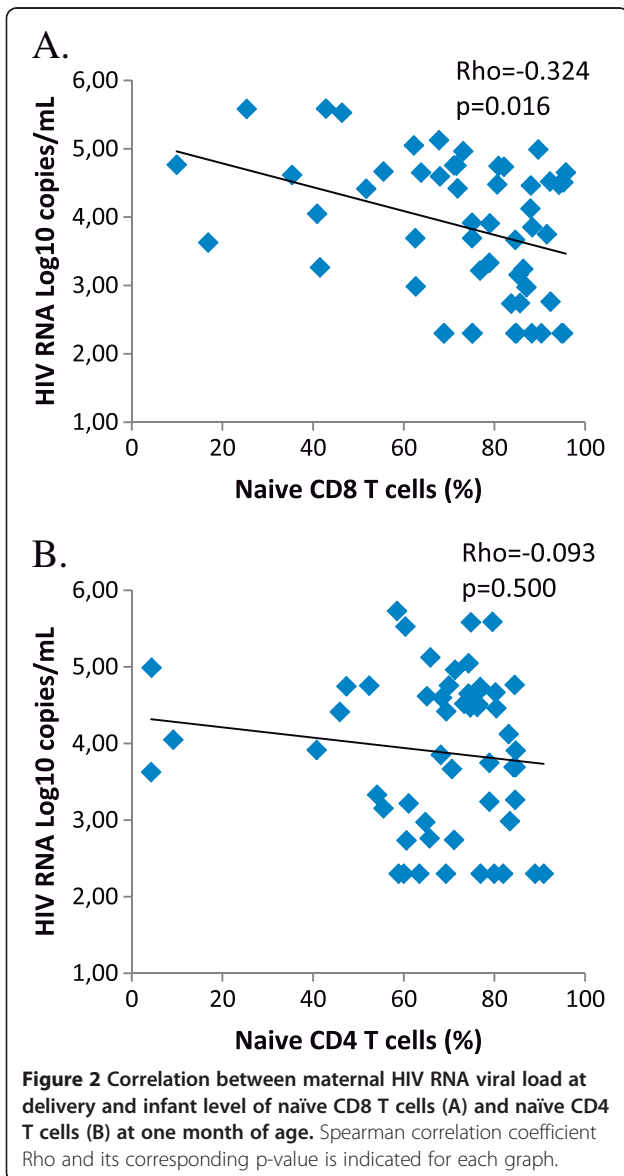


Figure 1 Distribution of T-cell populations among HIV-exposed infected (HEU) and unexposed (UE) infants at 1 month of age. Medians for data from HEU (n = 74) and UE (n = 56) are indicated and plotted in solid lines with dotted lines representing interquartile ranges. The size of bubbles is proportional to number of observations. **A**, **C**, and **E** show naïve, memory and activated CD8 T-cell populations and **B**, **D** and **F** show naïve, memory and activated CD4 T-cell populations.



Spearman $\rho = 0.312$ $p = 0.02$). Percentage of activated and memory CD4 T-cells were not significantly associated with maternal HIV RNA viral load ($p = 0.180$, $p = 0.733$ respectively).

When HEU infants were categorized according to their mothers HIV RNA at delivery, HEU infants born to women with HIV viral load above $5 \log_{10}$ copies/mL had significantly lower levels of naïve CD8 T-cells and higher levels of memory CD8 T-cells at 1 month of age as compared to infants born to women with HIV RNA level below $5 \log_{10}$ copies/mL (Table 2). Maternal HIV RNA above $5 \log_{10}$ copies/mL was also associated with increased levels of activated CD8 T-cells although this did not reach significance. There were no associations between maternal HIV RNA loads and levels of infant naïve, activated or memory CD4 T-cells (Table 2). The

Table 2 Levels of T-cell populations in HIV exposed uninfected infants at 1 month of age according to maternal HIV RNA viral load at delivery

Cell population	HIV RNA $\geq 5 \log_{10}$ (n = 6) [median (IQR)]	HIV RNA $< 5 \log_{10}$ (n = 57) [median (IQR)]	p-value*
CD8 T-cells			
counts (cells/ μ l)	1585 (1080–1702)	1112 (71–1447)	0.14
activated (%)	25.8 (11.2–40.3)	8.8 (3.3–18.3)	0.09
naïve (%)	54.3 (42.8–67.8)	79.8 (67.6–88.2)	0.04
memory (%)	54.6 (30.5–75.8)	21.9 (14.3–40.3)	0.014
CD4 T-cells			
counts (cells/ μ l)	2594 (2174–3185)	2291 (1955–3028)	0.337
activated (%)	5.3 (4.0–7.8)	3.5 (2.1–6.5)	0.557
naïve (%)	70.1 (60.4–74.8)	70.3 (60.6–78.9)	0.79
memory (%)	19.8 (15.4–21.7)	23.9 (13.2–45.8)	0.574

Analysis is based on n = 63 infants with maternal HIV RNA measures available. *P-value from kruskal-wallis test.

infants born to women with high HIV RNA levels remained HIV-uninfected at subsequent visits although two were lost to follow up at the 12 month visit within the prospective observational study.

Higher maternal CD4 counts at delivery were significantly associated with higher level of infant naïve CD4 T-cells (spearman correlation: $\rho = 0.365$ $p = 0.0018$) but not with naïve CD8 T-cells (spearman correlation: $\rho = 0.007$ $p = 0.95$) nor with memory CD4 or CD8 T-cells ($p = 0.104$ and $p = 0.811$ respectively).

Discussion

In this study, at one month of age, HEU and unexposed infants had comparable median percentages of naïve, memory and activated CD4 T-cells and CD8 T-cells. However, within the HEU infant group, HEU born to women with high maternal HIV RNA level at delivery showed skewed naïve and activated CD8 T-cell populations at one month of age as compared to HEU infants born to women with lower viral load. In addition, maternal CD4 counts at delivery were positively associated with levels of infant naïve CD4 T-cells.

A naïve immune system with little previous antigen stimulation is expected to have high levels of naïve T-cells and low activation. With age, the levels of naïve cells decrease and memory cells increase reflecting antigen exposure [45,46]. HIV-infected infants show an activated phenotype whereby they display a decrease in naïve CD4 and/or CD8 T-cells and an increase in activated and memory T-cells [47]. Some studies have suggested that HEU infants also have naïve/memory T-cell skewing, albeit to a lesser extent, whereas other studies have not observed this skewing in HEU [11,13–15,19]. In the current study, differences in naïve/

memory T-cell skewing were not observed at one month of age between HEU and UE. However, significantly lower median %CD4 T-cells and higher %CD8 T-cells were observed in these HEU as compared to UE [20]. The inconsistency in the literature regarding naïve/memory T-cell skewing in HEU infants leads to speculation as to the impact of factors such as time point of measurement, comparability of birth outcomes between HEU and UE infants, overall disease burden and maternal viral load. Studies of thymic naïve T-cell output in HEU infants by Nielsen et al., [14] found birth outcomes such as gestational age, birth weight and mode of delivery to impact observed infant naïve T cell levels. This could lead to confounding when assessing lymphocyte subset differences between HEU and UE which have very different birth outcomes. Additionally, time points for assessment of lymphocyte subsets have ranged from birth to adolescence, thus contributing to non-comparability of results. In our cohort, the birth weight, mode of delivery and feeding was not significantly different between HEU and unexposed infants. Since those infants requiring urgent care at birth were not included in our study, the absence of naïve/memory lymphocyte skewing in HEU at one month of age could be due to exclusion of those infants with poor birth outcomes. Alternatively, Manhiça is an endemic region of *P. falciparum* malaria and thus heightened malaria-induced immune activation in newborns could have masked differences due to HIV exposure. Our results showing correlation between maternal HIV viral load and infant CD8 T cell skewing suggest that only a sub population of HEU show T-cell skewing.

This study is one of the first to our knowledge to describe a relationship between maternal HIV RNA level and naïve/memory skewing in CD8 T-cell populations in HEU infants. This complements a recent study from Canada which showed that high maternal viral load was associated with higher levels of CD19+ B-cells in HEU infants [48]. Both studies point to a dose-dependent association of maternal HIV RNA level with lymphocyte subset skewing. In most cohorts studied in resource-rich countries, HIV viral load is undetectable or low due to effective pMTCT-HIV. In the current study, despite the existence of a pMTCT-HIV program, nearly 80% of women had detectable viral load at delivery. Among the HEU infants, linear associations were observed between levels of maternal HIV RNA viral load at delivery and naïve, pan-memory and activated CD8 T-cells. Maternal HIV viral load greater than 5 log₁₀ copies/mL was associated with a significantly lower percentage of naïve CD8 T-cells and a higher percentage of memory CD8 T-cells as compared to HEU infants born to mothers with maternal HIV RNA below 5 log₁₀ copies/mL. *In utero* infant exposure to maternal HIV particles and/or proteins could lead to lymphocyte subset skewing but may

require a certain threshold or duration of maternal HIV exposure to be observed. The existence of such a threshold may help to explain inconsistent results in HEU immune abnormalities across studies. Additionally, in breastfeeding populations, the infant is potentially continuously exposed to HIV through breastmilk which would be higher in those women with higher plasma HIV RNA levels.

The main study limitations are the small sample size, particularly in the high maternal HIV RNA group, and the lack of evaluation of the duration of the T-cell skewing. Further studies including monitoring breast milk viral load exposure will be necessary. The analysis of memory T-cells was performed using the CD45RO marker, which is a non-specific marker of mature phenotype T-cells and does not distinguish between central and effector memory. The use of CD45RO may have underestimated levels of memory cells by excluding stem cell memory cells which are CD45RO [49] but this would have affected both HEU and UE groups. Other more specific markers that require greater than 4-color flow cytometry could not be assessed in Manhiça.

Conclusions

In conclusion, HEU infants born to women with high maternal HIV RNA level at delivery had skewed naïve and activated CD8 T-cell populations at one month of age. Improving pMTCT-HIV programs such that more women have undetectable viral load is crucial to decrease vertical transmission of HIV, but may also be important to reduce the consequences of HIV virus exposure in HEU infants. The current recommendation of HAART for all HIV-infected pregnant women (the B+ option) is promising and will serve to reduce infant HIV exposure in Sub-Saharan Africa [50]. However, there will be a lag time until infant HIV exposure is eliminated in the region, thus elucidation of the clinical relevance of infant's exposure to maternal HIV [20,51-53] and its impact on altered T-cell populations should remain a priority.

Abbreviations

AZT: Zidovudine; HAART: Highly active antiretroviral therapy; HEU: HIV-exposed uninfected; MTCT: Mother to child transmission; NVP: Nevirapine; pMTCT-HIV: Prevention of MTCT of HIV; WHO: World Health Organization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CMo, CSB, MR, CM, and DN contributed to conception and design of the study; ND, CMo, CSB, MR, CM and DN contributed to acquisition of data; ND, CMo and DN analysed the data; all authors contributed to interpretation of data; ND, CMo and DN drafted the article; All authors read, revised the article critically for important intellectual content, and gave final approval of the version to be published.

Acknowledgments

The authors are grateful to all the participants in the study and their infants, also to the dedicated staff of the Manhiça District Hospital, 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 Jorcelina Rungo, Madalena Almeida, Marta Macamo, Luísa Agostinho, Lucas Nhatumbo, Nelito Ernesto José, Bendita Zavale, and Arnaldo Nhabunga for their contribution to patient visits, follow-up, laboratory tests and data management. The authors thank Llorenç Quinto for guidance in the statistical analysis.

Funding: This work was supported by the Spanish Ministry of Health [grant number PI070233]. The Manhiça Health Research Centre (CISM) receives core funding from the Spanish Agency for International Cooperation (AECID) and the HIV day hospital from the Agencia Catalana de Cooperació al Desenvolupament (ACCD). C.S. has received a grant from Spanish Ministry of Health [grant number PI070233]. For the remaining authors none were declared. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹National Institute of Health, Maputo, Mozambique. ²Manhiça Health Research Centre (CISM), Manhiça, Mozambique. ³Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, C/Rossello 132, 4^a, Barcelona, Spain.

Received: 12 August 2014 Accepted: 15 January 2015

Published online: 03 February 2015

References

- 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*. 2006;6(11):726–32.
- Kind C, Rudin C, Siegrist CA, Wyler CA, Biedermann K, Lauper U, et al. Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. *Swiss Neonatal HIV Study Group*. *Aids*. 1998;12(2):205–10.
- Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Rekeciewicz C, Berrebi A, Benifla JL, Burgard M, et al. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA*. 2001;285(16):2083–93.
- European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2005;40(3):458–65.
- Abdool Karim Q, Kharsany AB, Frohlich JA, Werner L, Mashego M, Mlotshwa M, et al. Stabilizing HIV prevalence masks high HIV incidence rates amongst rural and urban women in KwaZulu-Natal, South Africa. *Int J Epidemiol*. 2010;39:2010–3.
- Gonzalez R, Munguambe K, Aponte J, Bavo C, Nhalungo D, Macete E, et al. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a community-based survey. *HIV Med*. 2012;13(10):581–8.
- Filteau S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop Med Int Health*. 2009;14(3):276–87.
- Bunders M, Thorne C, Newell ML. Maternal and infant factors and lymphocyte, CD4 and CD8 cell counts in uninfected children of HIV-1-infected mothers. *Aids*. 2005;19(10):1071–9.
- Rich KC, Brambilla D, Pitt J, Moye J, Cooper E, Hillyer G, et al. Lymphocyte phenotyping in infants: maturation of lymphocyte subpopulations and the effects of HIV infection. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85(3):273–81.
- Borges-Almeida E, Milanez HM, Vilela MM, Cunha FG, Abramczuk BM, Reis-Alves SC, et al. The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infect Dis*. 2011;11:38.
- Clerici M, Saresella M, Colombo F, Fossati S, Sala N, Bricalli D, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood*. 2000;96(12):3866–71.
- Kuhn L, Kasonde P, Sinkala M, Kankasa C, Semrau K, Scott N, et al. Does severity of HIV disease in HIV-infected mothers affect mortality and morbidity among their uninfected infants? *Clin Infect Dis*. 2005;41(11):1654–61. Epub 2005 Oct 1627.
- Miyamoto M, Pessoa SD, Ono E, Machado DM, Salomao R, Succi RC, et al. Low CD4+ T-cell levels and B-cell apoptosis in vertically HIV-exposed noninfected children and adolescents. *J Trop Pediatr*. 2010;56(6):427–32.
- Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, Clark DR, Sorensen TU, Dreves AM, et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood*. 2001;98(2):398–404.
- Ono E, Nunes dos Santos AM, de Menezes Succi RC, Machado DM, de Angelis DS, Salomao R, et al. Imbalance of naive and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(8):700–8.
- Pahwa S, Read JS, Yin W, Matthews Y, Shearer W, Diaz C, et al. CD4+/CD8+ T cell ratio for diagnosis of HIV-1 infection in infants: Women and Infants Transmission Study. *Pediatrics*. 2008;122(2):331–9.
- Embree J, Bwayo J, Nagelkerke N, Njenga S, Nyange P, Ndinya-Achola J, et al. Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected children in Nairobi. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(4):397–403.
- Kupka R, Msamanga GI, Aboud S, Manji KP, Duggan C, Fawzi WW. Patterns and predictors of CD4 T-cell counts among children born to HIV-infected women in Tanzania. *J Trop Pediatr*. 2009;55(5):290–6.
- Mansoor N, Abel B, Scriba TJ, Hughes J, de Kock M, Tameris M, et al. Significantly skewed memory CD8+ T cell subsets in HIV-1 infected infants during the first year of life. *Clin Immunol*. 2009;130(3):280–9.
- Moraleda C, de Deus N, Serna-Bolea C, Renom M, Quinto L, Macete E, et al. Impact of HIV Exposure on Health Outcomes in HIV-Negative Infants Born to HIV-Positive Mothers in Sub-Saharan Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;65(2):182–9.
- Schramm DB, Kuhn L, Gray GE, Tiemessen CT. In vivo effects of HIV-1 exposure in the presence and absence of single-dose nevirapine on cellular plasma activation markers of infants born to HIV-1-seropositive mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;42(5):545–53.
- Kasahara TM, Hygino J, Blanco B, Xavier L, Araujo-Lima CF, Guillermo LV, et al. The impact of maternal anti-retroviral therapy on cytokine profile in the uninfected neonates. *Hum Immunol*. 2013;74(9):1051–6.
- Reikie BA, Adams RC, Leligdowicz A, Ho K, Naidoo S, Ruck CE, et al. Altered innate immune development in HIV-exposed uninfected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;66(3):245–55.
- Slyker JA, Lohman-Payne B, John-Stewart GC, Dong T, Mbori-Ngacha D, Tapia K, et al. The impact of HIV-1 infection and exposure on natural killer (NK) cell phenotype in Kenyan infants during the first year of life. *Frontiers Immunol*. 2012;3:399.
- Kolte L, Rosenfeldt V, Vang L, Jeppesen D, Karlsson I, Ryder LP, et al. Reduced thymic size but no evidence of impaired thymic function in uninfected children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(4):325–30.
- Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyau C, Blanche S. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *Aids*. 2003;17(14):2053–61.
- Bunders M, Lugada E, Mermin J, Downing R, Were W, Thorne C, et al. Within and between race differences in lymphocyte, CD4+, CD8+ and neutrophil levels in HIV-uninfected children with or without HIV exposure in Europe and Uganda. *Ann Trop Paediatr*. 2006;26(3):169–79.
- Eggena MP, Barugahare B, Okello M, Mutyalu 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(5):694–701. Epub 2005 Jan 2031.
- 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(6):1171–6.
- Messele T, Abdulkadir M, Fontanet AL, Petros B, Hamann D, Koot M, et al. Reduced naive and increased activated CD4 and CD8 cells in healthy adult Ethiopians compared with their Dutch counterparts. *Clin Exp Immunol*. 1999;115(3):443–50.
- Rizzardini G, Trabattini D, Saresella M, Piconi S, Lukwiya M, Declich S, et al. Immune activation in HIV-infected African individuals. Italian-Ugandan AIDS cooperation program. *Aids*. 1998;12(18):2387–96.
- Steiner K, Myrie L, Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Dent A, et al. Fetal immune activation to malaria antigens enhances susceptibility to in vitro HIV infection in cord blood mononuclear cells. *J Infect Dis*. 2010;202(6):899–907.
- Ismaili J, van der Sande M, Holland MJ, Sambou I, Keita S, Allsopp C, et al. *Plasmodium falciparum* infection of the placenta affects newborn immune responses. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(3):414–21.

34. Mazzola TN, da Silva MT, Abramczuk BM, Moreno YM, Lima SC, Zorzeto TQ, et al. Impaired *Bacillus Calmette-Guerin* cellular immune response in HIV-exposed, uninfected infants. *Aids*. 2011;25(17):2079–87.
35. Kidzeru EB, Hesselting AC, Passmore JA, Myer L, Gamielidien H, Tchakoute CT, et al. In-utero exposure to maternal HIV infection alters T-cell immune responses to vaccination in HIV-uninfected infants. *Aids*. 2014;28(10):1421–30.
36. Venkatesh KK, de Bruyn G, Marinda E, Otwombe K, van Niekerk R, Urban M, et al. Morbidity and mortality among infants born to HIV-infected women in South Africa: implications for child health in resource-limited settings. *J Trop Pediatr*. 2011;57(2):109–19.
37. Marston M, Zaba B, Salomon JA, Brahmbhatt H, Bagenda D. Estimating the net effect of HIV on child mortality in African populations affected by generalized HIV epidemics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;38(2):219–27.
38. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet*. 2004;364(9441):1236–43.
39. Marinda E, Humphrey JH, Iliff PJ, Mutasa K, Nathoo KJ, Piwoz EG, et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(6):519–26.
40. Heresi GP, Caceres E, Atkins JT, Reuben J, Doyle M. *Pneumocystis carinii* pneumonia in infants who were exposed to human immunodeficiency virus but were not infected: an exception to the AIDS surveillance case definition. *Clin Infect Dis*. 1997;25(3):739–40.
41. Otieno RO, Ouma C, Ong'echa JM, Keller CC, Were T, Waindi EN, et al. Increased severe anemia in HIV-1-exposed and HIV-1-positive infants and children during acute malaria. *AIDS*. 2006;20(2):275–80.
42. Thea DM, St Louis ME, Atido U, Kanjinga K, Kembo B, Matondo M, et al. A prospective study of diarrhea and HIV-1 infection among 429 Zairian infants. *N Engl J Med*. 1993;329(23):1696–702.
43. McNally LM, Jeena PM, Gajee K, Thula SA, Sturm AW, Cassol S, et al. Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. *Lancet*. 2007;369(9571):1440–51.
44. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: towards universal access. Recommendations for a public health approach. [<http://www.who.int/hiv/pub/mtct/guidelines/en/>]
45. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, van Dongen JJ, de Groot R, Boerma GJ, et al. Longitudinal follow-up of blood lymphocyte subpopulations from birth to 1 year of age. *J Pediatr*. 1998;133(4):586–8.
46. Tsegaye A, Wolday D, Otto S, Petros B, Assefa T, Alebachew T, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. *Clin Immunol*. 2003;109(3):338–46.
47. Rabin RL, Roederer M, Maldonado Y, Petru A, Herzenberg LA. Altered representation of naive and memory CD8 T cell subsets in HIV-infected children. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2054–60.
48. Kakkar F, Lamarre V, Ducruet T, Boucher M, Valois S, Soudeyns H, et al. Impact of maternal HIV-1 viremia on lymphocyte subsets among HIV-exposed uninfected infants: protective mechanism or immunodeficiency. *BMC Infect Dis*. 2014;14:236.
49. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):24–35.
50. WHO: Consolidated Guidelines on the use of Antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection; recommendations for a public health approach. Geneva: 2013.
51. Sugandhi N, Rodrigues J, Kim M, Ahmed S, Amzel A, Tolle M, et al. Child Survival Working Group of the Interagency Task Team on the P et al. HIV-exposed infants: rethinking care for a lifelong condition. *Aids*. 2013;27 Suppl 2:S187–95.
52. Kourtis AP, Wiener J, Kayira D, Chasela C, Ellington SR, Hyde L, et al. Health outcomes of HIV-exposed uninfected African infants. *Aids*. 2013;27(5):749–59.
53. Rollins NC, Ndirangu J, Bland RM, Coutsooudis A, Coovadia HM, Newell ML. Exclusive Breastfeeding, Diarrhoeal Morbidity and All-Cause Mortality in Infants of HIV-Infected and HIV Uninfected Mothers: An Intervention Cohort Study in KwaZulu Natal, South Africa. *PLoS One*. 2013;8(12):e81307.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



V. Revisión de los principales resultados y discusión

Los estudios presentados en esta tesis profundizan en dos patologías que son muy frecuentes y tienen un gran impacto en la salud de los niños en África subsahariana, la anemia y la exposición perinatal al VIH. Ambas patologías se asocian a la pobreza y se relacionan estrechamente [167]. En el primer artículo de esta tesis, se ha mostrado que la infección por VIH es una causa frecuente de anemia en la población estudiada, y en el quinto artículo se ha observado que la exposición perinatal al VIH es un factor de riesgo para el desarrollo de anemia.

1. Etiología de la anemia

Los resultados del primer artículo permiten aumentar el conocimiento de la etiología de la anemia en un área semi-rural del sur de Mozambique. Los hallazgos confirman la etiología multifactorial de la anemia e indican qué enfermedades deberían prevenirse de manera prioritaria para disminuir las consecuencias de la anemia en este y otros lugares similares.

En este artículo, y confirmando la hipótesis planteada, la infección por *Plasmodium falciparum* fue un factor independientemente asociado a la anemia. Esta infección se observó en un 42% de los casos y en un 7% de los controles. En contra de lo observado en otros estudios, la prevalencia de malaria fue similar en los individuos con deficiencia de hierro (44%), que en aquellos que no presentaron esa deficiencia (40%), sugiriendo que la ferropenia no actuó como factor protector de malaria entre los casos [76, 77, 312]. La infección por *P. falciparum* fue más frecuente en los niños con anemia grave (71%) que en aquellos con anemia moderada (39%), de lo que se deduce que la malaria tiene un mayor peso en la etiología de la anemia grave que en la de los otros grados de anemia.

Para profundizar en la etiopatogenia de la anemia asociada a la malaria, en el artículo 3 de esta tesis se estudió el impacto de la presencia de este parásito y de hemozoína en las médulas óseas de 290 de estos niños anémicos. Este estudio mostró que la mayoría de los niños con parasitemia por *P. falciparum* en sangre presentaron hemozoína y parásitos, tanto en formas sexuales como asexuales (62% gametocitos, 71% trofozoítos, 23% esquizontes) en médula ósea. Este hallazgo sugiere la existencia de secuestro de parásitos en este órgano, similar al observado en otros órganos como la placenta [313]. Además la presencia de hemozoína se mostró como un factor de riesgo independientemente asociado a niveles más bajos de Hb y mayor prevalencia de diseritropoyesis (y la asociación de ésta última con eritropoyesis ineficaz), mostrando la contribución del pigmento malárico a la anemia relacionada con malaria. Esto concuerda con recientes estudios *in vitro* que describen cómo la

hemozoína estimula la liberación de citoquinas, que se ha sugerido podrían contribuir indirectamente a la diseritropoyesis [151, 152], y con otros que sugieren que la hemozoína podría dañar los precursores eritroides aumentando su apoptosis [153, 154]. Por otro lado también se observó la presencia de hemozoína (16%) y gametocitos en médula ósea (2,5%) en ausencia de parásitos en sangre periférica, lo que podría ser un signo de infecciones pasadas [314]. Con estos resultados no es posible distinguir si la asociación de la hemozoína con la anemia se debe a una historia de exposición de la médula ósea a los parásitos o a la toxicidad de la hemozoína, aunque la relación independiente de la presencia de hemozoína con el grado de anemia observada parece ir a favor de la segunda posibilidad.

En el cuarto artículo de esta tesis se observó que en la médula ósea de los niños anémicos había una importante cantidad de formas sexuales de *P. falciparum*, principalmente inmaduras, demostrando el infra-diagnóstico de las técnicas microscópicas comparadas con el uso de la RCP [315]. Este resultado implica un mayor potencial de transmisión de malaria que el demostrado previamente mediante técnicas microscópicas [316]. Además, los niños con anemia grave y malaria fueron frecuentemente portadores de gametocitos maduros. Se postula que esta asociación pueda ser por varias causas: a) el secuestro de parásitos en la médula ósea podría alterar la diferenciación de los precursores hemáticos originando o agravando la anemia, b) factores asociados con la anemia grave, como la mayor producción de EPO y una eritropoyesis aumentada podrían favorecer la maduración de los gametocitos en médula ósea y su liberación a la sangre periférica [317], o c) las infecciones con parasitemias altas que se asocian más frecuentemente a anemia grave podrían dar mayor tiempo para la maduración de los gametocitos. Por el contrario, la presencia de gametocitos inmaduros en la médula ósea no se asoció de forma independiente con anemia grave.

En el primer artículo también se confirma la hipótesis planteada de que la deficiencia de hierro es una causa importante de anemia en esta población. Esta deficiencia fue muy frecuente entre los casos (69%) y se asoció de manera independiente a la anemia. La deficiencia de hierro también fue prevalente en los controles (43%), lo que explicaría que la asociación observada no fuera tan marcada (AOR=4,05) como la de otros factores como la malnutrición o la malaria. Sin embargo, la AAF (53%) asociada a la deficiencia de hierro fue la segunda más importante después de la deficiencia de pre-albúmina, lo que indicaría que la prevención de la deficiencia de hierro tendría un importante impacto en la reducción de la prevalencia de anemia.

La asociación entre deficiencia de hierro y anemia observada en este estudio, contrasta con los resultados de un reciente estudio realizado en Malawi, donde la deficiencia de hierro se asocia a un menor riesgo de anemia. Los autores explican sus hallazgos por la asociación inversa entre deficiencia de hierro y bacteriemia y la asociación de la bacteriemia con la anemia [312]. En el primer artículo de esta tesis, tanto la bacteriemia como la deficiencia de hierro se

asociaron con anemia en el análisis univariado, pero por el contrario no se observó una menor prevalencia de bacteriemia en los casos con deficiencia de hierro comparados con los casos sin esta deficiencia [7%(17/258) vs. 8%(9/115); $p=0,6649$]. Las diferentes definiciones de casos y controles en ambos estudios podrían ser el origen de las discrepancias observadas. En el estudio de Malawi, los casos eran niños con anemia grave ($Hb < 5$ gr/dl) y los controles, niños sin anemia grave ($Hb \geq 5$ gr/dl) pero con medias de Hb cercanas a 8 gr/dl, y por lo tanto en su mayoría anémicos. En el estudio de etiología de anemia de esta tesis, los casos eran niños con cualquier grado de anemia, y los controles niños sin anemia. En el estudio de Malawi, la deficiencia de hierro fue más frecuente en los controles (la mayoría con anemia moderada) y por ello se observó la deficiencia de hierro como factor “protector” de anemia grave. Esto concuerda con los resultados del primer artículo de esta tesis donde se observó que la deficiencia de hierro tuvo un peso más importante en la etiología de anemia moderada (AF 47%), que en la anemia grave (AF 35%), en la que otros factores como la malaria jugarían un papel más importante.

A pesar de la importancia de la deficiencia de hierro (muy frecuente entre casos y controles) y la anemia por deficiencia de hierro (la segunda causa de anemia según AAF en este estudio), la prevención de esta deficiencia mediante suplementos de hierro, una medida sencilla y costo-efectiva, continúa siendo un problema sin resolver en los países endémicos de malaria. Debido a la relación que se ha observado en diferentes estudios [74, 76, 78] entre los suplementos de hierro y el mayor riesgo de presentar más episodios de malaria y/o parasitemia, las recomendaciones actuales de la OMS [86, 214], orientan al uso de los suplementos de hierro para prevenir su deficiencia sólo en aquellas poblaciones en las que se determine que tienen deficiencia de hierro o que muestren sintomatología de anemia grave. Estas guías son de difícil implantación ya que el diagnóstico de la deficiencia de hierro en los países endémicos de malaria, que además tienen una importante presión infecciosa, es un problema sin resolver. Los marcadores séricos que se afectan en la deficiencia de hierro se afectan también en la inflamación [91], por lo que su uso en los PRB es limitado. El segundo artículo de esta tesis compara varios biomarcadores séricos de deficiencia de hierro con los depósitos de hierro encontrados en la médula ósea (el *gold standard* para el diagnóstico de la deficiencia de hierro). En este artículo se observó que el RsTF y el índice de receptor de transferrina-ferritina (RsTF/logaritmo de ferritina) (ajustado por la proteína C reactiva) mostraron las mejores áreas bajo las curvas ROC (0.75 y 0.76, respectivamente), y fueron los marcadores con mayor sensibilidad para la detección de deficiencia de hierro (83% y 75%, respectivamente), pero con especificidades moderadas (50% y 56%, respectivamente). Aunque estos dos marcadores son la mejor opción entre las estudiadas, continúan siendo una opción deficiente, ya que más de un cuarto de niños podrían ser mal diagnosticados. Es urgente disponer de indicadores de ferropenia más fiables, asequibles y sencillos de usar, para poder diagnosticar y tratar la anemia por deficiencia de hierro en los PRB donde es más prevalente.

Mientras se resuelven los retos diagnósticos de la ferropenia, es necesario mejorar la prevención de la deficiencia de hierro en los niños, población en la que es más prevalente y en la que las consecuencias de este problema son más graves [42]. Para ello es necesario impulsar estudios de intervención que evalúen de manera inequívoca la eficacia, seguridad y coste-efectividad de los suplementos de hierro en niños en lugares endémicos de malaria, donde tanto la deficiencia de hierro como la presencia de otras infecciones son muy prevalentes. También es necesario profundizar en las causas y los factores de riesgo de la asociación entre los suplementos de hierro y la mayor prevalencia de malaria, y confirmar los hallazgos que sugieren que las dosis profilácticas de hierro en los niños menores de 24 semanas, en los que estos suplementos son más necesarios, son seguras y efectivas [80].

El primer artículo de esta tesis muestra una asociación independiente entre la desnutrición y la anemia. Cerca de la mitad de los casos tenían un peso para la altura por debajo de 2 desviaciones estándar con un riesgo más de 8 veces mayor de presentar anemia. Además la deficiencia de pre-albúmina y albúmina, que representan la desnutrición aguda y subaguda, fueron también factores independientemente asociados a la anemia. Estas tres variables presentaron unas AAF de 43%, 77% y 30%, respectivamente, lo que sugiere que su prevención podría tener un importante impacto en la disminución de los casos de anemia. Asimismo, dado que la desnutrición es responsable de hasta un tercio de las muertes en niños menores de 5 años [5], su prevención podría disminuir la mortalidad asociada a la desnutrición y a la anemia. Según se ha observado, el crecimiento económico se corresponde con una mejora equivalente en la nutrición, siendo la principal herramienta para disminuir la prevalencia de desnutrición. A pesar de ello, aunque el crecimiento económico siguiera las previsiones más optimistas, la consecuente reducción de la desnutrición no conseguiría llegar al objetivo del milenio, por lo que habría que llevar a cabo otras intervenciones más directas para reducirla [318].

La exposición perinatal al VIH, como se ha observado en el artículo 5 de esta tesis, también es causa de peores índices nutricionales [319]. En los niños ENI, el origen del menor crecimiento no está definido [319]. En los niños VIH positivos la malnutrición es multifactorial debida a infecciones frecuentes, escasa ingesta oral, diarreas persistentes y la mala-absorción que puede ir asociada a ello [320]. También existe una relación entre la carga viral y la desnutrición ya que los parámetros nutricionales mejoran al iniciarse la terapia antirretroviral. La profilaxis con cotrimoxazol también ha demostrado tener un efecto favorable sobre la malnutrición en los niños VIH, seguramente debido a la disminución de las infecciones, principalmente las gastrointestinales [320]. En los niños ENI, según se ha observado en el quinto artículo de esta tesis, el uso de cotrimoxazol parece ser la causa del menor número de visitas a las consultas externas, principalmente por causas gastrointestinales y respiratorias, lo que podría asociar una mejora en el estado nutricional como ocurre en los niños infectados por

VIH, aunque esto no se ha observado en estudios previos y el diseño de nuestro estudio no permitió determinarlo [321]. Por otro lado, el menor peso al nacimiento asociado a la infección materna parece ser el principal factor relacionado con la malnutrición en los niños ENI [282, 319]. Una implementación más efectiva de los programas de prevención del VIH que disminuyeran el número de madres infectadas así como de los programas de prevención de TMH-VIH podría mejorar los índices nutricionales de estos niños.

En el quinto artículo de esta tesis se ha observado que, durante los primeros 9 meses de vida, los niños ENI tuvieron hematocritos más bajos que los niños no expuestos. A los 9 meses, los niños ENI presentaron anemia en mayor proporción que los no expuestos, aunque estos últimos también fueron anémicos en un alto porcentaje (94% ENI vs. 78% no expuestos), seguramente debido a las principales etiologías que se han expuesto en el primer artículo (desnutrición y deficiencia de hierro).

Otro factor de riesgo de anemia en los niños ENI podría ser la exposición a los antirretrovirales que recibieron sus madres durante el embarazo, y ellos mismos durante las primeras semanas de vida. Esta opción, aunque puede ser causa de anemia en los primeros meses de vida, no parece relevante a los 9 meses de edad, ya que la anemia asociada a estos fármacos, principalmente el AZT, es macrocítica y se resuelve en los primeros 3 meses [236, 245, 247, 251]. La anemia observada en los niños del estudio fue más marcada a los 9 meses y fue principalmente microcítica (66% en los ENI y 59% en los no expuestos). La exposición al cotrimoxazol profiláctico que recibieron los niños ENI también puede producir anemia [193], pero la anemia asociada a este medicamento también es megaloblástica [100] y el cotrimoxazol no se ha constatado como factor de riesgo de anemia en niños ENI en un reciente estudio [322]. Además, el efecto profiláctico del cotrimoxazol comparado con placebo sobre enfermedades como la malaria en niños ENI se asocia a mayores niveles de Hb [194].

La principal causa de anemia en esta cohorte de niños ENI podría ser la deficiencia de hierro, ya que es la principal causa de anemia en el mundo [42], y una de las principales causas de anemia en la población preescolar de Manhiça según los resultados del artículo 1. La deficiencia de hierro materna se asocia con la presencia de anemia en sus hijos durante los primeros meses de vida [195-197]. Las madres de los niños ENI, debido a su infección por VIH, la malabsorción [174] y la helmintiasis asociadas, [323] tienen mayor prevalencia de deficiencia de hierro que las madres VIH negativas, pudiendo ser éste el origen de la anemia observada en los niños ENI. El adecuado cumplimiento del tratamiento profiláctico con hierro recomendado por la OMS durante el embarazo para todas las mujeres, podría ser una herramienta útil para prevenir la anemia en la población de niños ENI [324].

La prevención de la deficiencia de hierro específicamente en el caso de los niños ENI no se recoge en las recomendaciones de la OMS [86, 214]. Algunos estudios sugieren que los suplementos de hierro en los niños VIH positivos pueden tener un efecto perjudicial en la evolución de su enfermedad de base [175, 325], aunque otros no lo confirman [175, 176] haciendo que no existan políticas claras sobre los suplementos de hierro en estos niños. Del mismo modo, debido a la ausencia, según mi conocimiento, de datos sobre los efectos de los suplementos de hierro en los niños ENI, tampoco existen guías específicas para ellos, y deben seguir las creadas para los niños VIH negativos aun teniendo en cuenta que su riesgo de presentar anemia es mayor según se ha demostrado en el artículo 5 de esta tesis.

Por último, el efecto del VIH sobre la eritropoyesis puede ser otra causa de anemia en los niños ENI, como se deduce de las alteraciones en las células progenitoras de la médula ósea observadas en los fetos de mujeres VIH positivas [252]. La exposición perinatal al VIH es por tanto una causa de anemia en los niños de esta área de Mozambique, por lo que deben desarrollarse intervenciones específicas para la prevención de la anemia en esta población, con el objetivo de disminuir sus consecuencias.

Algunas de las conocidas etiologías de anemia no se asociaron con ésta en la población de Manhiça según los resultados del primer artículo de esta tesis.

La deficiencia de vitamina A es un factor relacionado con la anemia, ya que los suplementos de esta vitamina reducen la prevalencia de anemia en algunos, aunque no en todos los estudios, y tienen un efecto sinérgico administrada con los suplementos de hierro [326]. En Mozambique, los suplementos de vitamina A se administran a las mujeres embarazadas después del parto [327] y a los niños entre 6 meses y 5 años de edad [328]. A pesar de ello, la mayoría de los casos de anemia del primer artículo de esta tesis, y más de un cuarto de los controles, presentaron deficiencia de vitamina A. Esto puede explicarse porque la inflamación disminuye los niveles de vitamina A, lo que sobreestimaría esta deficiencia, principalmente entre los casos que presentaron una alta prevalencia de inflamación (82%) [329]. Otra alternativa es que la ejecución de estos programas sea deficiente y las altas prevalencias de deficiencia de vitamina A reflejen un escaso cumplimiento de las políticas [330].

La infección por parásitos intestinales en el estudio sobre la etiología de la anemia fue baja (4% en general), lo que concuerda con los resultados obtenidos en otras poblaciones similares [331, 332], aunque contrasta con otros trabajos realizados también en preescolares [312, 333]. El uso de una sola muestra y la ausencia de técnicas moleculares para el diagnóstico de esta infección podría haber disminuido la capacidad de detección de los parásitos [334]. Además, debido a que el 25% de los casos fueron VIH positivos se esperaría una mayor prevalencia de helmintiasis entre éstos por la asociación descrita entre ambas

infecciones [335, 336]. No obstante, otros autores han descrito una menor prevalencia de helmintos en los pacientes adultos VIH positivos [337-339], y estudios con técnicas moleculares realizados en la misma población presentaron una prevalencia de helmintiasis también baja (Mandomando, comunicación personal). Por otro lado, el uso de mebendazol recomendado por el Ministerio de Salud de Mozambique a partir del primer año de vida cada 6 meses hasta los 5 años podría haber favorecido la baja prevalencia de helmintiasis en estos niños, aunque al no existir datos sobre el cumplimiento ni la cobertura de esta iniciativa, resulta difícil conocer sus implicaciones. Los resultados obtenidos muestran que la desparasitación masiva en los preescolares no sería una estrategia prioritaria en la prevención de la anemia en esta población.

La deficiencia de vitamina B12 es otra conocida causa de anemia [100], asociada a un mayor riesgo de anemia en un destacado estudio en Malawi [312], pero que no se ha observado asociada a anemia en nuestro estudio, ni en otros realizados en mujeres embarazadas y niños africanos [102, 340], ni en un reciente estudio en Papúa Nueva-Guinea [341]. Esta información confirma los resultados obtenidos de un estudio realizado en 2004 también en Mozambique, donde la prevalencia de deficiencia de vitamina B12 fue baja e incluso menor que la presentada en un grupo de niños italianos de edad similar [342]. Por lo tanto, la deficiencia de vitamina B12 no es una causa principal de anemia en la población estudiada, y su prevención no es prioritaria para disminuir la prevalencia de anemia. Por otro lado, la dificultad en la medición de esta vitamina, por la presencia de análogos en el plasma, haría necesario confirmar estos hallazgos complementando la determinación de vitamina B12 con la del AMM, la homocisteína y la holotranscobalamina II [100, 340].

La deficiencia de ácido fólico no se encontró en ninguno de los sujetos estudiados en el artículo 1. Resultados similares se han descrito en otros países africanos como Camerún [330], Malawi [312], Zambia [343] y Gambia [344] o en Papúa Nueva Guinea [341]. La ausencia de la deficiencia de esta vitamina puede ser porque su medición en plasma es complicada [345]. Por un lado, la deficiencia de vitamina B12 puede enmascarar la deficiencia de ácido fólico [345], pero la población de estudio presentó una deficiencia de vitamina B12 moderada (16% en casos y 20% en controles), siendo poco probable que esta sea la única explicación para la ausencia de deficiencia de ácido fólico. Del mismo modo, la hemólisis, que es un fenómeno frecuente en las infecciones por *P. falciparum* también puede enmascarar unos niveles bajos de ácido fólico en sangre [312, 346], sin embargo la hemólisis se observó sólo en un 23% de los casos y en un 7% de los controles. Los niveles normales de folato podrían ser por el consumo frecuente en esta población de vegetales verdes ricos en ácido fólico, como la hoja de mandioca o los grelos, aunque la ausencia de registro de la dieta de los sujetos del estudio impide asegurar dicha afirmación [347]. Por lo tanto, los suplementos profilácticos de ácido fólico, no parecen tener un importante papel en la prevención de la anemia en esta población,

aunque estudios en los que se midiera el ácido fólico intracelular y la homocisteína plasmática reforzarían los resultados observados [348].

La deficiencia de G6PD no se asoció con anemia. Este resultado va en la línea de estudios que demostraron que esta anomalía enzimática no afecta la Hb basal [127, 129, 349] e incluso que es un factor protector de anemia grave en individuos infectados por malaria [130, 350]. Otros autores sin embargo, sugieren que sólo las mujeres heterocigotas presentan protección frente a la malaria [130] y sí encontraron asociación entre anemia y la deficiencia de G6PD [312]. La ausencia de asociación entre anemia y deficiencia de G6PD en este estudio resulta inesperada ya que las infecciones son el principal desencadenante de la anemia hemolítica asociada a la deficiencia de G6PD [351], y la mayoría de los sujetos anémicos de este estudio presentaron infecciones. Por otro lado, no todas las infecciones actúan del mismo modo a la hora de desencadenar las crisis hemolíticas entre los sujetos con deficiencia de G6PD (determinadas bacterias como la *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Streptococcus* beta-hemolítico y otras infecciones como las hepatitis virales y el virus Influenza parecen tener un papel más importante que otros microorganismos), lo que podría originar las diferencias observadas entre estudios [352]. Como ya era esperado, según observaciones previas en Mozambique, la prevalencia de rasgo falciforme fue muy baja y no se registró ningún caso de la enfermedad de células falciformes [353, 354].

2. Impacto de la exposición perinatal al VIH en la salud infantil

Los artículos 5 y 6 de esta tesis exponen el impacto de la exposición al VIH en la salud de los niños nacidos de madres VIH positivas no infectados (ENI). Los niños ENI comparados con los niños no expuestos, presentaron una mayor frecuencia de anemia y desnutrición, según se ha comentado en el apartado anterior. Además se observaron alteraciones en los parámetros inmunológicos y diferencias en la morbilidad.

Según se ha descrito en el quinto artículo y en concordancia con estudios previos [256-258], los niños ENI presentaron mayores niveles de CD8 y menores niveles de CD4 comparado con los niños no expuestos. Por el contrario, en el artículo número 6 no se observaron diferencias en los porcentajes de células T CD4 y CD8 naive, memoria y activadas al mes de edad entre los niños ENI y los no expuestos en concordancia con algunos estudios, pero en discordancia con otros [257, 260, 261, 263, 355]. La inconsistencia de resultados en la literatura lleva a pensar que otros factores como la edad de los sujetos, las diferencias entre ambos grupos al nacimiento de factores clínicos y socio-demográficos, así como la gravedad de la enfermedad materna o la carga viral materna podrían jugar un papel importante. Los análisis de las subclases de las células T se realizaron sólo al mes de edad, por lo que los resultados no son comparables con otros estudios con niños de diferentes edades [257, 260, 261, 263, 355]. En este estudio no se observaron diferencias al nacimiento entre los grupos en

varias variables estudiadas (peso al nacimiento, edad de la madre, paridad, edad gestacional, tipo de parto y tipo de alimentación), aunque los recién nacidos que necesitaron tratamiento urgente al nacimiento no fueron incluidos en el estudio, lo que supone una limitación de éste. Por otro lado, la relación observada entre la carga viral materna y las alteraciones en los subtipos de la células CD8, lleva a pensar que sólo una subpoblación de los niños ENI, aquellos cuyas madres presentan una mayor carga viral ($>10^5$ copias/ml), es la que tiene mayor riesgo de presentar alteraciones en los perfiles inmunológicos. Por ello, una mejora en los programas de prevención de transmisión vertical, aparte del claro beneficio de disminuir el número de niños infectados por VIH, podría aumentar el número de madres con carga viral indetectable y así disminuir las alteraciones inmunológicas asociadas en sus hijos.

Las consecuencias clínicas de las alteraciones inmunológicas observadas en los diferentes estudios no se han definido con claridad [319]. Según la hipótesis de esta tesis, los niños expuestos al VIH, debido a alteraciones en los perfiles inmunológicos, presentarían una mayor morbilidad comparados con el grupo de niños no expuestos. En contra de lo esperado, el número de visitas al servicio de emergencia fue menor en el grupo de niños ENI, principalmente debido a un menor número de episodios de diarrea y de infecciones respiratorias superiores. En el quinto artículo de esta tesis se postula que la menor frecuencia de visitas a las consultas externas podría deberse a la profilaxis con cotrimoxazol que los niños ENI recibieron de manera rutinaria siguiendo las guías nacionales. El hecho de que los principales estudios en los que se había observado una mayor morbilidad en los niños ENI se hubieran realizado previo al uso rutinario del cotrimoxazol [22, 27, 283], así como que el cotrimoxazol disminuye la incidencia de algunas infecciones como la malaria [356, 357] apoyarían esta teoría. También que según se ha observado en el estudio que forma parte de esta tesis no hubiera diferencias en la morbilidad entre los grupos de estudio al mes de vida, antes del inicio de la profilaxis con cotrimoxazol. Por el contrario, otros estudios no observaron que la profilaxis con cotrimoxazol disminuyese el riesgo de diarrea [356, 358, 359]. Las discrepancias entre estudios podrían ser secundarias a las diferencias en la edad de los sujetos de estudio, el tipo de alimentación, la duración de la profilaxis o el tiempo de seguimiento.

En cambio, no se observaron diferencias en el número de ingresos hospitalarios en los niños ENI comparados con los no expuestos, aunque el número de admisiones registrado fue bajo, dificultando el poder obtener conclusiones firmes. Sin embargo, los niños ENI presentaron un mayor número de ingresos por neumonía grave ($p=0,057$), lo que concuerda con estudios en los que los niños ENI presentaron patología respiratoria más grave [289], incluso con ratios de infecciones respiratorias equivalentes a los niños VIH positivos [290]. Además se han descrito casos entre los niños ENI de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, un patógeno oportunista asociado a la infección por VIH [28]. Llama la atención, sin embargo, que la

profilaxis con cotrimoxazol, al igual que pudo disminuir las visitas a las consultas externas, no hubiera disminuido el número de ingresos por neumonía grave. Esos diagnósticos de neumonías graves podrían corresponder a tuberculosis mal diagnosticadas [28], ya que la tuberculosis es frecuente en las madres VIH positivas [17] y es de difícil diagnóstico en los lactantes, principalmente en PRB [360], y no se previene mediante la profilaxis con cotrimoxazol. Por otro lado, puede ser que los niños ENI que presentaron los episodios de neumonía grave fueran malos cumplidores del tratamiento profiláctico, o que el cotrimoxazol sea menos efectivo a la hora de prevenir estos episodios comparados con los más leves [361].

Actualmente el papel del uso del cotrimoxazol profiláctico en los niños ENI se encuentra en discusión debido al incremento de las resistencias bacterianas [362, 363]. Los resultados obtenidos en el artículo 5 de esta tesis, apoyan el uso de éste en la población de niños ENI mientras se realizan estudios más concluyentes sobre este tema.

VI. Conclusiones

1. La anemia es una patología muy frecuente en la población de Manhiça (91% en los niños menores de 5 años de la comunidad) y su etiología es multifactorial. La desnutrición, la malaria, el VIH y la deficiencia de hierro son las principales etiologías relacionadas con la anemia en esta población. La prevención de dichas patologías debe ser prioritaria en el desarrollo de estrategias de salud pública para la prevención de la anemia en Manhiça y lugares similares.
2. La deficiencia de hierro es una patología frecuente también entre los niños sin anemia. Los marcadores séricos de ferropenia disponibles no son adecuados para el diagnóstico de deficiencia de hierro en lugares con una alta prevalencia de infecciones, por lo que desarrollar nuevos marcadores con una mejor sensibilidad, especificidad y coste-efectividad debería de ser prioritario.
3. La prevención de la deficiencia de hierro, una medida existente y coste-efectiva podría tener un impacto importante en la prevención de la anemia. Es necesario definir estrategias para la prevención de la ferropenia basadas en estudios de intervención que evalúen la seguridad de los suplementos férricos en las áreas endémicas de malaria.
4. La deficiencia de vitamina B12, la deficiencia de ácido fólico, la helmintiasis, la esquistosomiasis y la deficiencia de G6PD no se relacionaron con la anemia en este estudio, por lo que el desarrollo de medidas preventivas globales para estas enfermedades con el fin de disminuir la prevalencia de anemia no se justifica. El diagnóstico de la deficiencia de vitamina B12 y de ácido fólico debe optimizarse principalmente en las poblaciones endémicas de malaria.
5. La infección por VEB, parvovirus B19 y la bacteriemia se asociaron con anemia sólo en el análisis univariado. Esto se debe posiblemente a la asociación de estas infecciones con otras patologías independientemente asociadas con la anemia como malaria y VIH.
6. La deficiencia de vitamina A también se asoció con anemia sólo en el análisis univariado, probablemente por la relación de esta deficiencia con la inflamación. La alta prevalencia de esta deficiencia en los casos (69%) y los controles (28%), hace necesario evaluar la efectividad de las políticas de administración de suplementos de vitamina A que están en marcha en el área.
7. La alfa talasemia es muy frecuente en esta población. En poblaciones con alta prevalencia de alfa talasemia la CHCM no es un buen marcador de deficiencia de hierro. La beta talasemia y la anemia de células falciformes no fueron causa de anemia en esta población.
8. La presencia de hemozoína en la médula ósea tiene un papel en la patogénesis de la anemia asociada a malaria a través de una eritropoyesis ineficaz. Este hallazgo puede tener importantes implicaciones en el desarrollo de drogas para prevenir y tratar la anemia asociada a malaria.
9. Los niños anémicos infectados por *P. falciparum* presentaron una mayor prevalencia y número de gametocitos inmaduros en la médula ósea que en sangre periférica, y mayor de

lo esperado según los resultados basados en estudios de microscopía óptica. Las estrategias de prevención de malaria basadas en la erradicación de portadores de gametocitos deberían tener en cuenta estos hallazgos.

10. La prevención de la transmisión vertical del VIH continúa siendo la principal estrategia para disminuir la prevalencia del VIH en la población infantil, y con ello la anemia asociada a esta patología. La exposición perinatal al VIH es un factor de riesgo de anemia, pero las políticas dirigidas a la prevención de la anemia en esa población son escasas.
11. Los niños ENI presentan más frecuentemente anemia, tienen un peor estado nutricional y alteraciones en el perfil inmunológico comparado con los niños no expuestos. La profilaxis con cotrimoxazol parece disminuir la morbilidad en los niños ENI, lo que refuerza la continuación de esta profilaxis en este grupo de niños tan vulnerable.
12. La exposición a una carga viral ARN de VIH materna alta aumenta el riesgo de los niños ENI de tener alteraciones precoces de las poblaciones de células T. Mejorar los programas de profilaxis de TMH-VIH para que más mujeres tengan niveles indetectables de carga viral es crucial para disminuir la transmisión vertical del VIH, pero también lo es para reducir las consecuencias inmunológicas del virus en los niños ENI y sus posibles consecuencias clínicas.

VII. Referencias

1. UN. The Millennium development goals report 2014. Available at <http://www.un.org/millenniumgoals>, **2014**.
2. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet* **2003**; 361:2226-34.
3. GAVI A. Investing in immunisation through the GAVI Alliance. Available at: <http://www.gavi.org/library/publications/the-evidence-base/> **2012**.
4. UN. The Millennium development goals report 2012. Available at <http://www.un.org/millenniumgoals> **2012**.
5. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2012**; 380:2224-60. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61766-8.
6. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* **2008**; 371:243-60. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61690-0.
7. UNICEF. The Millennium development goals. Available at: <http://www.unicef.org/spanish/mdg/childmortality.html> **Access: June 2013**.
8. WHO. Guideline: Vitamin A supplementation in infants and children 6-59 months of age. Geneva, World Health Organization **2011**.
9. Jones G, Steketee RW, Black RE, Bhutta ZA, Morris SS. How many child deaths can we prevent this year? *Lancet* **2003**; 362:65-71.
10. Penny ME. Zinc supplementation in public health. *Ann Nutr Metab* **2013**; 62:31-42. doi: 10.1159/000348263. Epub 2013 May 3.
11. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong JR, et al. The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. *Lancet* **1991**; 337:1499-502.
12. WHO. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: recommendations for a public health approach. Vol. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/mtct/antiretroviral2010/en/index.html>. Geneva: World Health Organization, **2010**.
13. Menendez C, Bardaji A, Sigauque B, et al. Malaria prevention with IPTp during pregnancy reduces neonatal mortality. *PLoS One* **2010**; 5:e9438. doi: 10.1371/journal.pone.0009438.
14. UNAIDS. Global HIV/AIDS response: epidemic update and health sector progress towards universal access. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) **2010**.
15. Brabin BJ, Premji Z, Verhoeff F. An analysis of anemia and child mortality. *The Journal of nutrition* **2001**; 131:636S-45S; discussion 46S-48S.
16. WHO, UNICEF. Joint statement by the World Health Organization and the United Nations Children's Fund. Focusing on anaemia. **2004**.

17. Filteau S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **2009**; 14:276-87.
18. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet* **2004**; 364:1236-43.
19. Peacock-Villada E, Richardson BA, John-Stewart GC. Post-HAART outcomes in pediatric populations: comparison of resource-limited and developed countries. *Pediatrics* **2011**; 127:e423-41. doi: 10.1542/peds.2009-701. Epub 11 Jan 24.
20. Spira R, Lepage P, Msellati P, et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. Mother-to-Child HIV-1 Transmission Study Group. *Pediatrics* **1999**; 104:e56.
21. WHO, UNICEF, UNAIDS. Global update on HIV treatment 2013: Results, impact and opportunities. Geneva: World Health Organization, **2013**.
22. Thea DM, St Louis ME, Atido U, et al. A prospective study of diarrhea and HIV-1 infection among 429 Zairian infants. *The New England journal of medicine* **1993**; 329:1696-702.
23. Taha TE, Graham SM, Kumwenda NI, et al. Morbidity among human immunodeficiency virus-1-infected and -uninfected African children. *Pediatrics* **2000**; 106:E77.
24. Venkatesh KK, de Bruyn G, Marinda E, et al. Morbidity and mortality among infants born to HIV-infected women in South Africa: implications for child health in resource-limited settings. *Journal of tropical pediatrics* **2011**; 57:109-19.
25. Mugwaneza P, Umutoni NW, Ruton H, et al. Under-two child mortality according to maternal HIV status in Rwanda: assessing outcomes within the National PMTCT Program. *The Pan African medical journal* **2011**; 9:37.
26. Brahmbhatt H, Kigozi G, Wabwire-Mangen F, et al. Mortality in HIV-infected and uninfected children of HIV-infected and uninfected mothers in rural Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006**; 41:504-8.
27. Shapiro RL, Lockman S, Kim S, et al. Infant morbidity, mortality, and breast milk immunologic profiles among breast-feeding HIV-infected and HIV-uninfected women in Botswana. *The Journal of infectious diseases* **2007**; 196:562-9.
28. McNally LM, Jeena PM, Gajee K, et al. Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. *Lancet* **2007**; 369:1440-51.
29. WHO. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. **2008**.
30. Behrman, Kliegman, Jenson. *Tratado de Pediatría Nelson*. 17ª ed. Madrid: Elsevier España, **2004**.
31. Carlo Brugnara, Frank A. Oski, David G. Nathan. Diagnostic approach to anemic patient. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:455-66
32. Bernácer M, Leal A. Anemias no hemolíticas. *An Pediatr Contin* **2004**; 2(1):22-30.

33. Sullivan KM, Mei Z, Grummer-Strawn L, Parvanta I. Haemoglobin adjustments to define anaemia. *Trop Med Int Health* **2008**; 13:1267-71. doi: 10.1111/j.365-3156.2008.02143.x. Epub 2008 Aug 20.
34. Carlo Brugnara, Orah S. Platt. The Neonatal Erythrocyte and Its Disorders. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:22-43.
35. Dallman PR, Barr GD, Allen CM, Shinefield HR. Hemoglobin concentration in white, black, and Oriental children: is there a need for separate criteria in screening for anemia? *Am J Clin Nutr* **1978**; 31:377-80.
36. CDC. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). Available at: <http://www.mylaboratoryquality.com>. Accessed June 2013.
37. Quinto L, Aponte JJ, Sacarlal J, et al. Haematological and biochemical indices in young African children: in search of reference intervals. *Trop Med Int Health* **2006**; 11:1741-8.
38. Lugada ES, Mermin J, Kaharuzza F, et al. Population-based hematologic and immunologic reference values for a healthy Ugandan population. *Clin Diagn Lab Immunol* **2004**; 11:29-34.
39. WHO. Estadísticas sanitarias mundiales. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82218/1/9789243564586_spa.pdf. Accessed Nov 2013.
40. Grasbeck R. The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* **2004**; 42:692-7.
41. Rebecca J. Stoltzfus, Michele L. Dreyfuss. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. Washington, D. C.: International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG), World Health Organization (WHO), United Nations Childrens Fund (UNICEF), **1998**.
42. WHO. Iron Deficiency Anaemia. Assessment, Prevention, and Control. A guide for programme managers. Geneva: World Health Organization, **2001**.
43. Group WS. Nutritional anemias. Geneva: World Health Organization, **1968**.
44. Yip R, Johnson C, Dallman PR. Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *Am J Clin Nutr* **1984**; 39:427-36.
45. Walter T, De Andraca I, Chadud P, Perales CG. Iron deficiency anemia: adverse effects on infant psychomotor development. *Pediatrics* **1989**; 84:7-17.
46. Walter T. Effect of iron-deficiency anaemia on cognitive skills in infancy and childhood. *Baillieres Clin Haematol* **1994**; 7:815-27.
47. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* **2014**; 123:615-24. doi: 10.1182/blood-2013-06-508325. Epub 2013 Dec 2.
48. Martins H. Proposta de componente estratégica dum plano de desenvolvimento nutricional em Moçambique. In: *Nutrição Rd*, ed. Maputo: MISAU, **2004**.
49. Martel P. Demographic, nutrition and health components. In collaboration with Vulnerability Assessment Committee: Mozambique Third Multisectoral Assessment. Maputo: UNICEF, **2003**.

50. Mabunda S, Casimiro S, Quinto L, Alonso P. A country-wide malaria survey in Mozambique. I. Plasmodium falciparum infection in children in different epidemiological settings. *Malar J* **2008**; 7:216.:10.1186/475-2875-7-216.
51. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* **2000**; 16:469-76.
52. WHO, UNICEF. Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent. Joint Statement **2006**.
53. Nancy C. Andrews, Christina K. Ullrich, Fleming MD. Disorders of Iron Metabolism and Sideroblastic Anemia. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:522-51.
54. Nancy C Andrews, Christina K Ullrich, Mark D Fleming. Disorders of iron metabolism and sideroblastic anemia. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:521-70.
55. Ziegler EE, Fomon SJ, Nelson SE, et al. Cow milk feeding in infancy: further observations on blood loss from the gastrointestinal tract. *J Pediatr* **1990**; 116:11-8.
56. Knopp S, Becker SL, Ingram KJ, Keiser J, Utzinger J. Diagnosis and treatment of schistosomiasis in children in the era of intensified control. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2013**; 11:1237-58. doi: 10.586/14787210.2013.844066. Epub 2013 Oct 16.
57. David J. Weatherall, Dominic P. Kwiatkowski, David J. Roberts. Hematologic Manifestations of Systemic Diseases in Children of the Developing World. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:1742-60.
58. McCann JC, Ames BN. An overview of evidence for a causal relation between iron deficiency during development and deficits in cognitive or behavioral function. *Am J Clin Nutr* **2007**; 85:931-45.
59. Szajewska H, Rusczyński M, Chmielewska A. Effects of iron supplementation in nonanemic pregnant women, infants, and young children on the mental performance and psychomotor development of children: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **2010**; 91:1684-90. doi: 10.3945/ajcn.2010.29191. Epub 2010 Apr 21.
60. Akman M, Cebeci D, Okur V, Angin H, Abali O, Akman AC. The effects of iron deficiency on infants' developmental test performance. *Acta Paediatr* **2004**; 93:1391-6.
61. Oski FA, Honig AS, Helu B, Howanitz P. Effect of iron therapy on behavior performance in nonanemic, iron-deficient infants. *Pediatrics* **1983**; 71:877-80.
62. Halterman JS, Kaczorowski JM, Aligne CA, Auinger P, Szilagyi PG. Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in the United States. *Pediatrics* **2001**; 107:1381-6.
63. Bruner AB, Joffe A, Duggan AK, Casella JF, Brandt J. Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescent girls. *Lancet* **1996**; 348:992-6.

64. Groner JA, Holtzman NA, Charney E, Mellits ED. A randomized trial of oral iron on tests of short-term memory and attention span in young pregnant women. *J Adolesc Health Care* **1986**; 7:44-8.
65. Idjradinata P, Pollitt E. Reversal of developmental delays in iron-deficient anaemic infants treated with iron. *Lancet* **1993**; 341:1-4.
66. Pala E, Erguven M, Guven S, Erdogan M, Balta T. Psychomotor development in children with iron deficiency and iron-deficiency anemia. *Food Nutr Bull* **2010**; 31:431-5.
67. Rowland TW, Deisroth MB, Green GM, Kelleher JF. The effect of iron therapy on the exercise capacity of nonanemic iron-deficient adolescent runners. *Am J Dis Child* **1988**; 142:165-9.
68. Brutsaert TD, Hernandez-Cordero S, Rivera J, Viola T, Hughes G, Haas JD. Iron supplementation improves progressive fatigue resistance during dynamic knee extensor exercise in iron-depleted, nonanemic women. *Am J Clin Nutr* **2003**; 77:441-8.
69. Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest* **2002**; 32:70-8.
70. Oppenheimer SJ. Iron deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Proceedings of a conference. May 21-24, 2000. Belmont, Maryland, USA. *J Nutr* **2001**; 131:563S-703S.
71. Brock JH. Benefits and dangers of iron during infection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **1999**; 2:507-10.
72. Murray MJ, Murray AB, Murray MB, Murray CJ. The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *British medical journal* **1978**; 2:1113-5.
73. Smith AW, Hendrickse RG, Harrison C, Hayes RJ, Greenwood BM. The effects on malaria of treatment of iron-deficiency anaemia with oral iron in Gambian children. *Ann Trop Paediatr* **1989**; 9:17-23.
74. Oppenheimer SJ, Gibson FD, Macfarlane SB, et al. Iron supplementation increases prevalence and effects of malaria: report on clinical studies in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1986**; 80:603-12.
75. Tielsch JM, Khattry SK, Stoltzfus RJ, et al. Effect of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on preschool child mortality in southern Nepal: community-based, cluster-randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **2006**; 367:144-52.
76. Sazawal S, Black RE, Ramsan M, et al. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **2006**; 367:133-43.
77. Nyakeriga AM, Troye-Blomberg M, Dorfman JR, et al. Iron deficiency and malaria among children living on the coast of Kenya. *J Infect Dis* **2004**; 190:439-47. Epub 2004 Jul 2.
78. Gwamaka M, Kurtis JD, Sorensen BE, et al. Iron deficiency protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria and death in young children. *Clin Infect Dis* **2012**; 54:1137-44. doi: 10.093/cid/cis010. Epub 2012 Feb 21.

79. Raiten D, Namasté S, Brabin B. Considerations for the Safe and Effective Use of Iron Interventions in Areas of Malaria Burden: Full Technical Report; Iron and Malaria Technical Working Group. https://www.nichd.nih.gov/global_nutrition/programs/iron_and_malaria/Pages/working_groups_committees.aspx; Sorrel Namasté (Project Manager), Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH), U.S. Department of Health and Human Services (DHHS); and Daniel Raiten (Project Leader), NICHD, NIH, DHHS., **2009**.
80. Menendez C, Kahigwa E, Hirt R, et al. Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants. *Lancet* **1997**; 350:844-50.
81. Snow RW, Byass P, Shenton FC, Greenwood BM. The relationship between anthropometric measurements and measurements of iron status and susceptibility to malaria in Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1991**; 85:584-9.
82. Verhoef H, West CE, Nzyuko SM, et al. Intermittent administration of iron and sulfadoxine-pyrimethamine to control anaemia in Kenyan children: a randomised controlled trial. *Lancet* **2002**; 360:908-14.
83. Berger J, Dyck JL, Galan P, et al. Effect of daily iron supplementation on iron status, cell-mediated immunity, and incidence of infections in 6-36 month old Togolese children. *Eur J Clin Nutr* **2000**; 54:29-35.
84. Desai MR, Mei JV, Kariuki SK, et al. Randomized, controlled trial of daily iron supplementation and intermittent sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of mild childhood anemia in western Kenya. *J Infect Dis* **2003**; 187:658-66. Epub 2003 Feb 7.
85. Harvey PW, Heywood PF, Nesheim MC, et al. The effect of iron therapy on malarial infection in Papua New Guinean schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg* **1989**; 40:12-8.
86. WHO. Conclusions and recommendations of the WHO Consultation on prevention and control of iron deficiency in infants and young children in malaria-endemic areas. *Food Nutr Bull* **2007**; 28:S621-7.
87. Okebe JU, Yahav D, Shbita R, Paul M. Oral iron supplements for children in malaria-endemic areas. *Cochrane Database Syst Rev* **2011**:CD006589. doi: 10.1002/14651858.CD006589.pub3.
88. Ojukwu JU, Okebe JU, Yahav D, Paul M. Oral iron supplementation for preventing or treating anaemia among children in malaria-endemic areas. *Cochrane Database Syst Rev* **2009**:CD006589. doi: 10.1002/14651858.CD006589.pub2.
89. Sazawal S, Black RE, Kabole I, Dutta A, Dhingra U, Ramsan M. Effect of iron/folic Acid supplementation on the outcome of malaria episodes treated with sulfadoxine-pyrimethamine. *Malar Res Treat* **2014**; 2014:625905.:10.1155/2014/625905. Epub 2014 Jan 19.
90. WHO, CDC, Prevention Technical Consultation. Assessment of Iron Status at the Population Level. Geneva: World Health Organization, **2007**.

91. Phiri KS, Calis JC, Siyasiya A, Bates I, Brabin B, van Hensbroek MB. New cut-off values for ferritin and soluble transferrin receptor for the assessment of iron deficiency in children in a high infection pressure area. *J Clin Pathol* **2009**; 62:1103-6. doi: 10.36/jcp.2009.066498.
92. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *Jama* **1999**; 281:2225-30.
93. Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum transferrin receptor. *Annu Rev Med* **1993**; 44:63-74.
94. Punnonen K, Irtala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* **1997**; 89:1052-7.
95. Zimmermann MB, Molinari L, Staubli-Asobayire F, et al. Serum transferrin receptor and zinc protoporphyrin as indicators of iron status in African children. *Am J Clin Nutr* **2005**; 81:615-23.
96. Menendez C, Quinto LL, Kahigwa E, et al. Effect of malaria on soluble transferrin receptor levels in Tanzanian infants. *Am J Trop Med Hyg* **2001**; 65:138-42.
97. Williams TN, Maitland K, Rees DC, et al. Reduced soluble transferrin receptor concentrations in acute malaria in Vanuatu. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 60:875-8.
98. Jonker FA, Calis JC, Phiri K, et al. Low hepcidin levels in severely anemic Malawian children with high incidence of infectious diseases and bone marrow iron deficiency. *PLoS One* **2013**; 8:e78964. doi: 10.1371/journal.pone.0078964.
99. Sazawal S, Dhingra U, Dhingra P, et al. Efficiency of red cell distribution width in identification of children aged 1-3 years with iron deficiency anemia against traditional hematological markers. *BMC Pediatr* **2014**; 14:8.:10.1186/471-2431-14-8.
100. David Watkins, V. Michael Whitehead, Rosenblatt DS. Megaloblastic anemia. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:469-501.
101. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* **2008**; 29:S238-44.
102. Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B12 or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. *Food and nutrition bulletin* **2008**; 29:S74-85.
103. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* **1988**; 318:1720-8.
104. von Schenck U, Bender-Gotze C, Koletzko B. Persistence of neurological damage induced by dietary vitamin B-12 deficiency in infancy. *Arch Dis Child* **1997**; 77:137-9.
105. Rogers LM, Boy E, Miller JW, Green R, Sabel JC, Allen LH. High prevalence of cobalamin deficiency in Guatemalan schoolchildren: associations with low plasma holotranscobalamin II and elevated serum methylmalonic acid and plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr* **2003**; 77:433-40.
106. Hjelt K, Paerregaard A, Krasilnikoff PA. Giardiasis: haematological status and the absorption of vitamin B12 and folic acid. *Acta Paediatr* **1992**; 81:29-34.

107. Saltzman JR, Russell RM. Nutritional consequences of intestinal bacterial overgrowth. *Compr Ther* **1994**; 20:523-30.
108. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* **2011**; 94:666S-72S. doi: 10.3945/ajcn.110.009613. Epub 2011 Jul 6.
109. Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* **1990**; 34:99-107.
110. Solomon LR. Cobalamin-responsive disorders in the ambulatory care setting: unreliability of cobalamin, methylmalonic acid, and homocysteine testing. *Blood* **2005**; 105:978-85; author reply 1137. Epub 2004 Oct 5.
111. Antony AC. Severe anemia in Malawian children. *N Engl J Med* **2008**; 358:2291; author reply .
112. Vreugdenhil G, Kroos MJ, van Eijk HG, Lowenberg B, Swaak AJ. Impaired iron uptake and transferrin binding by erythroblasts in the anaemia of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **1990**; 29:335-9.
113. Dallalio G, Law E, Means RT, Jr. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood* **2006**; 107:2702-4. Epub 005 Dec 6.
114. Macdougall LG, Moodley G, Eyberg C, Quirk M. Mechanisms of anemia in protein-energy malnutrition in Johannesburg. *Am J Clin Nutr* **1982**; 35:229-35.
115. Wickramasinghe SN, Cotes PM, Gill DS, Tam RC, Grange A, Akinyanju OO. Serum immunoreactive erythropoietin and erythropoiesis in protein-energy malnutrition. *Br J Haematol* **1985**; 60:515-24.
116. Cunha MC, Lima Fda S, Vinolo MA, et al. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. *PLoS One* **2013**; 8:e58872. doi: 10.1371/journal.pone.0058872. Epub 2013 Mar 14.
117. Nakajima K, Crisma AR, Silva GB, Rogero MM, Fock RA, Borelli P. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. *Nutrition* **2014**; 30:82-9. doi: 10.1016/j.nut.2013.05.029.
118. Cunningham MJ, Sankaran VG, Nathan DG, Orkin SH. The Thalassemias Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:1015-106.
119. Wonke B, Modell M, Marlow T, Khan M, Modell B. Microcytosis, iron deficiency and thalassaemia in a multi-ethnic community: a pilot study. *Scand J Clin Lab Invest* **2007**; 67:87-95.
120. Matthew Heeney, George J. Dover. Sickle cell disease. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:949-1014.
121. Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci* **1998**; 850:251-69.

122. Hedrick PW. Resistance to malaria in humans: the impact of strong, recent selection. *Malar J* **2012**; 11:349. doi: 10.1186/475-2875-11-349.
123. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **2012**; 12:457-68. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70055-5. Epub 2012 Mar 23.
124. Luzzatto L. Sick cell anaemia and malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **2012**; 4:e2012065. doi: 10.4084/MJHID.2012.065. Epub 2012 Oct 3.
125. Beet EA. Sick cell disease in the Balovale District of Northern Rhodesia. *East Afr Med J* **1946**; 23:75-86.
126. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization* **2008**; 86:480-7.
127. May J, Meyer CG, Grossterlinden L, et al. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **2000**; 5:119-23.
128. Lucio Luzzatto, Vincenzo Poggi. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:884-900.
129. Carter N, Pamba A, Duparc S, Waitumbi JN. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malaria journal* **2011**; 10:241.
130. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, et al. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* **1998**; 92:2527-34.
131. WHO. World malaria report 2013. Vol. Available at: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/index.html. Geneva: World Health Organization, **2013**.
132. WHO. World malaria report 2009. Geneva: World Health Organization, **2009**.
133. Lackritz EM, Campbell CC, Ruebush TK, 2nd, et al. Effect of blood transfusion on survival among children in a Kenyan hospital. *Lancet* **1992**; 340:524-8.
134. Schellenberg D, Schellenberg JR, Mushi A, et al. The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a community-based study. *Bulletin of the World Health Organization* **2003**; 81:581-90.
135. Abdalla S, Weatherall DJ, Wickramasinghe SN, Hughes M. The anaemia of *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol* **1980**; 46:171-83.
136. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, et al. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated *falciparum* malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q J Med* **1986**; 58:305-23.
137. Mohandas N, An X. Malaria and human red blood cells. *Med Microbiol Immunol* **2012**; 201:593-8. doi: 10.1007/s00430-012-0272-z. Epub 2012 Sep 11.

138. Ioannidis LJ, Nie CQ, Hansen DS. The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye. *Parasitology* **2014**; 141:602-13. doi: 10.1017/S0031182013001984. Epub 2013 Dec 13.
139. Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* **2006**; 107:1192-9. Epub 2005 Oct 6.
140. Omodeo-Sale F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur J Haematol* **2005**; 74:324-32.
141. Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, et al. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 60:733-7.
142. Facer CA, Bray RS, Brown J. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I. Incidence and class specificity. *Clin Exp Immunol* **1979**; 35:119-27.
143. Layez C, Nogueira P, Combes V, et al. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* **2005**; 106:3632-8. Epub 2005 Jul 26.
144. Sonani R, Bhatnagar N, Maitrey G. Autoimmune hemolytic anemia in a patient with Malaria. *Asian J Transfus Sci* **2013**; 7:151-2. doi: 10.4103/0973-6247.115581.
145. Price R, van Vugt M, Phaipun L, et al. Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 60:547-55.
146. Wickramasinghe SN. Dyserythropoiesis and congenital dyserythropoietic anaemias. *Br J Haematol* **1997**; 98:785-97.
147. Abdalla SH. Hematopoiesis in human malaria. *Blood Cells* **1990**; 16:401-16; discussion 17-9.
148. Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *J Inflamm* **1995**; 45:85-96.
149. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **2005**; 201:19-25.
150. Deshpande P, Shastry P. Modulation of cytokine profiles by malaria pigment--hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC. *Cytokine* **2004**; 28:205-13.
151. Awandare GA, Kempaiah P, Ochiel DO, Piazza P, Keller CC, Perkins DJ. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *Am J Hematol* **2011**; 86:155-62.
152. Skorokhod OA, Caione L, Marrocco T, et al. Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood* **2010**; 116:4328-37.
153. Schrimpe AC, Wright DW. Comparative analysis of gene expression changes mediated by individual constituents of hemozoin. *Chem Res Toxicol* **2009**; 22:433-45.

154. Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One* **2009**; 4:e8446.
155. Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* **2006**; 108:2569-77. Epub 006 Jun 27.
156. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* **1993**; 177:145-53.
157. Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* **2007**; 110:18-28. Epub 2007 Mar 6.
158. Thawani N, Tam M, Bellemare MJ, et al. Plasmodium products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors. *J Infect Dis* **2014**; 209:140-9. doi: 10.1093/infdis/jit417. Epub 2013 Aug 6.
159. Doherty CP, Cox SE, Fulford AJ, et al. Iron incorporation and post-malaria anaemia. *PLoS One* **2008**; 3:e2133. doi: 10.1371/journal.pone.0002133.
160. Akiko Shimamura, Nathan DG. Acquired Aplastic Anemia and Pure Red Cell Aplasia. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:276-93.
161. Lefrere JJ, Bourgeois H. Human parvovirus associated with erythroblastopenia in iron deficiency anaemia. *J Clin Pathol* **1986**; 39:1277-8.
162. R. Alan, Ezekowitz B. Hematologic Manifestations of Systemic Diseases. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Vol. I. Philadelphia: Saunders Elsevier, **2009**:1680-96.
163. Morinet F, Leruez-Ville M, Pillet S, Fichelson S. Concise review: Anemia caused by viruses. *Stem Cells* **2011**; 29:1656-60. doi: 10.002/stem.725.
164. Njie R, Bell AI, Jia H, et al. The effects of acute malaria on Epstein-Barr virus (EBV) load and EBV-specific T cell immunity in Gambian children. *J Infect Dis* **2009**; 199:31-8. doi: 10.1086/594373.
165. Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, et al. Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. *Lancet* **1992**; 339:1249-53.
166. Ellaurie M, Burns ER, Rubinstein A. Hematologic manifestations in pediatric HIV infection: severe anemia as a prognostic factor. *Am J Pediatr Hematol Oncol* **1990**; 12:449-53.
167. Calis JC, van Hensbroek MB, de Haan RJ, Moons P, Brabin BJ, Bates I. HIV-associated anemia in children: a systematic review from a global perspective. *Aids* **2008**; 22:1099-112. doi: 10.7/QAD.0b013e3282fa759f.
168. Mueller BU, Tannenbaum S, Pizzo PA. Bone marrow aspirates and biopsies in children with human immunodeficiency virus infection. *J Pediatr Hematol Oncol* **1996**; 18:266-71.
169. Meira DG, Lorand-Metze I, Toro AD, Silva MT, Vilela MM. Bone marrow features in children with HIV infection and peripheral blood cytopenias. *J Trop Pediatr* **2005**; 51:114-9.

170. Mir N, Costello C, Luckit J, Lindley R. HIV-disease and bone marrow changes: a study of 60 cases. *Eur J Haematol* **1989**; 42:339-43.
171. Salome MA, Grotto HZ. Human immunodeficiency virus-related anemia of chronic disease: relationship to hematologic, immune, and iron metabolism parameters, and lack of association with serum interferon-gamma levels. *AIDS Patient Care STDS* **2002**; 16:361-5.
172. Means RT, Jr. Cytokines and anaemia in human immunodeficiency virus infection. *Cytokines Cell Mol Ther* **1997**; 3:179-86.
173. Kreuzer KA, Rockstroh JK, Jelkmann W, Theisen A, Spengler U, Sauerbruch T. Inadequate erythropoietin response to anaemia in HIV patients: relationship to serum levels of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and their soluble receptors. *Br J Haematol* **1997**; 96:235-9.
174. Castaldo A, Tarallo L, Palomba E, et al. Iron deficiency and intestinal malabsorption in HIV disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1996**; 22:359-63.
175. Esan MO, Jonker FA, Hensbroek MB, Calis JC, Phiri KS. Iron deficiency in children with HIV-associated anaemia: a systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2012**; 106:579-87. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.07.002. Epub Jul 28.
176. Esan MO, van Hensbroek MB, Nkhoma E, et al. Iron supplementation in HIV-infected Malawian children with anemia: a double-blind, randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis* **2013**; 57:1626-34. doi: 10.093/cid/cit528. Epub 2013 Aug 15.
177. Redig AJ, Berliner N. Pathogenesis and clinical implications of HIV-related anemia in 2013. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2013**; 2013:377-81. doi:10.1182/asheducation-2013.1.377.
178. Calis JC, Phiri KS, Vet RJ, et al. Erythropoiesis in HIV-infected and uninfected Malawian children with severe anemia. *AIDS* **2010**; 24:2883-7.
179. Moses A, Nelson J, Bagby GC, Jr. The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood* **1998**; 91:1479-95.
180. Volberding PA, Baker KR, Levine AM. Human immunodeficiency virus hematology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2003**:294-313.
181. Spivak JL, Barnes DC, Fuchs E, Quinn TC. Serum immunoreactive erythropoietin in HIV-infected patients. *Jama* **1989**; 261:3104-7.
182. Semba RD, Gray GE. Pathogenesis of anemia during human immunodeficiency virus infection. *J Investig Med* **2001**; 49:225-39.
183. Semba RD, Broadhead R, Taha TE, Totin D, Ricks MO, Kumwenda N. Erythropoietin response to anemia among human immunodeficiency virus-infected infants in Malawi. *Haematologica* **2001**; 86:1221-2.
184. Miller MF, Humphrey JH, Iliff PJ, Malaba LC, Mbuya NV, Stoltzfus RJ. Neonatal erythropoiesis and subsequent anemia in HIV-positive and HIV-negative Zimbabwean babies during the first year of life: a longitudinal study. *BMC Infect Dis* **2006**; 6:1.
185. Tsiakalos A, Routsias JG, Kordossis T, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Sipsas NV. Fine epitope specificity of anti-erythropoietin antibodies reveals molecular mimicry with HIV-1 p17

- protein: a pathogenetic mechanism for HIV-1-related anemia. *J Infect Dis* **2011**; 204:902-11. doi: 10.1093/infdis/jir433.
186. Abkowitz JL, Brown KE, Wood RW, Kovach NL, Green SW, Young NS. Clinical relevance of parvovirus B19 as a cause of anemia in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **1997**; 176:269-73.
187. LaMonte AC, Paul ME, Read JS, et al. Persistent parvovirus B19 infection without the development of chronic anemia in HIV-infected and -uninfected children: the Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* **2004**; 189:847-51. Epub 2004 Feb 9.
188. Azevedo KM, Setubal S, Camacho LA, Velarde LG, Oliveira SA. Seroepidemiological study of human parvovirus B19 among human immunodeficiency virus-infected patients in a medium-sized city in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**; 104:901-4.
189. Vernazza PL, Pfister LA, Siegl G, Cassinotti P. High seroprevalence of parvovirus B19 among patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **1996**; 22:198-9.
190. Nigro G, Luzi G, Fridell E, et al. Parvovirus infection in children with AIDS: high prevalence of B19-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Aids* **1992**; 6:679-84.
191. Frickhofen N, Abkowitz JL, Safford M, et al. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med* **1990**; 113:926-33.
192. Mylonakis E, Dickinson BP, Mileno MD, et al. Persistent parvovirus B19 related anemia of seven years' duration in an HIV-infected patient: complete remission associated with highly active antiretroviral therapy. *Am J Hematol* **1999**; 60:164-6.
193. Rieder MJ, King SM, Read S. Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole among children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* **1997**; 16:1028-31.
194. Prendergast A, Walker AS, Mulenga V, Chintu C, Gibb DM. Improved growth and anemia in HIV-infected African children taking cotrimoxazole prophylaxis. *Clin Infect Dis* **2011**; 52:953-6. doi: 10.1093/cid/cir029.
195. Strauss MB. ANEMIA OF INFANCY FROM MATERNAL IRON DEFICIENCY IN PREGNANCY. *J Clin Invest* **1933**; 12:345-53.
196. Kilbride J, Baker TG, Parapia LA, Khoury SA, Shuqaidef SW, Jerwood D. Anaemia during pregnancy as a risk factor for iron-deficiency anaemia in infancy: a case-control study in Jordan. *Int J Epidemiol* **1999**; 28:461-8.
197. Colomer J, Colomer C, Gutierrez D, et al. Anaemia during pregnancy as a risk factor for infant iron deficiency: report from the Valencia Infant Anaemia Cohort (VIAC) study. *Paediatr Perinat Epidemiol* **1990**; 4:196-204.
198. Sweet DG, Savage G, Tubman TR, Lappin TR, Halliday HL. Study of maternal influences on fetal iron status at term using cord blood transferrin receptors. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **2001**; 84:F40-3.
199. Singla PN, Tyagi M, Shankar R, Dash D, Kumar A. Fetal iron status in maternal anemia. *Acta Paediatr* **1996**; 85:1327-30.

200. Jaime PJC, Herrera-Garza JL, D GO-A. Relationship Between Gestational Iron Deficiency and Iron Deficiency in the Newborn; Erythrocytes. *Hematology* **2000**; 5:257-62.
201. Phiri KS, Calis JC, Faragher B, et al. Long term outcome of severe anaemia in Malawian children. *PLoS One* **2008**; 3:e2903. doi: 10.1371/journal.pone.0002903.
202. Schellenberg D, Menendez C, Kahigwa E, et al. African children with malaria in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: features on admission to the hospital and risk factors for death. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 61:431-8.
203. Marsh K, Forster D, Waruiru C, et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med* **1995**; 332:1399-404.
204. Slutsker L, Taylor TE, Wirima JJ, Steketee RW. In-hospital morbidity and mortality due to malaria-associated severe anaemia in two areas of Malawi with different patterns of malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1994**; 88:548-51.
205. Srikantia SG, Prasad JS, Bhaskaram C, Krishnamachari KA. Anaemia and immune response. *Lancet* **1976**; 1:1307-9.
206. More S, Shivkumar VB, Gangane N, Shende S. Effects of iron deficiency on cognitive function in school going adolescent females in rural area of central India. *Anemia* **2013**; 2013:819136.:10.1155/2013/819136. Epub 2013 Dec 10.
207. Sen A, Kanani SJ. Deleterious functional impact of anemia on young adolescent school girls. *Indian Pediatr* **2006**; 43:219-26.
208. Haas JD, Brownlie Tt. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutr* **2001**; 131:676S-88S; discussion 88S-90S.
209. Sabbatini P. The relationship between anemia and quality of life in cancer patients. *Oncologist* **2000**; 5:19-23.
210. Villamor E, Mbise R, Spiegelman D, Ndossi G, Fawzi WW. Vitamin A supplementation and other predictors of anemia among children from Dar Es Salaam, Tanzania. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2000**; 62:590-7.
211. Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics* **2000**; 105:E51.
212. Lozoff B, Jimenez E, Smith JB. Double burden of iron deficiency in infancy and low socioeconomic status: a longitudinal analysis of cognitive test scores to age 19 years. *Arch Pediatr Adolesc Med* **2006**; 160:1108-13.
213. Allen LH. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* **2000**; 71:1280S-4S.
214. WHO. Intermittent iron supplementation in preschool and school-age children Geneva: World Health Organization, **2011**.
215. WHO. Use of multiple micronutrient powders for home fortification of foods consumed by infants and children 6-23 months of age. Geneva: World Health Organization, **2011**.

216. Zimmermann MB, Biebinger R, Rohner F, et al. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am J Clin Nutr* **2006**; 84:580-6.
217. WHO. Essential Nutrition Actions. Improving maternal, newborn, infant and young child health and nutrition. Geneva: World Health Organization, **2013**.
218. Michael W. Adler. ABC del SIDA. Barcelona: ANCORA, **1988**.
219. Piot P, Quinn TC, Taelman H, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* **1984**; 2:65-9.
220. Van de Perre P, Rouvroy D, Lepage P, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet* **1984**; 2:62-5.
221. Ammann AJ, Cowan MJ, Wara DW, et al. Acquired immunodeficiency in an infant: possible transmission by means of blood products. *Lancet* **1983**; 1:956-8.
222. Oleske J, Minnefor A, Cooper R, Jr., et al. Immune deficiency syndrome in children. *Jama* **1983**; 249:2345-9.
223. Scott GB, Buck BE, Leterman JG, Bloom FL, Parks WP. Acquired immunodeficiency syndrome in infants. *N Engl J Med* **1984**; 310:76-81.
224. Ziegler JB, Cooper DA, Johnson RO, Gold J. Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant. *Lancet* **1985**; 1:896-8.
225. Shannon KM, Ammann AJ. Acquired immune deficiency syndrome in childhood. *J Pediatr* **1985**; 106:332-42.
226. Clumeck N, Sonnet J, Taelman H, et al. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. *N Engl J Med* **1984**; 310:492-7.
227. Mann JM, Francis H, Davachi F, et al. Human immunodeficiency virus seroprevalence in pediatric patients 2 to 14 years of age at Mama Yemo Hospital, Kinshasa, Zaire. *Pediatrics* **1986**; 78:673-7.
228. UNAIDS. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Geneva: World Health Organization, **2013**.
229. WHO, UNAIDS, UNICEF. Global HIV/AIDS response: epidemic update and health sector progress towards universal access. Vol. Available at: http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/. Geneva: World Health Organization, **2011**.
230. Gonzalez R, Mungambe K, Aponte J, et al. High HIV prevalence in a southern semi-rural area of Mozambique: a community-based survey. *HIV medicine* **2012**; 13:581-8.
231. Perez-Hoyos S, Nanche D, Macete E, et al. Stabilization of HIV incidence in women of reproductive age in southern Mozambique. *HIV medicine* **2011**; 23:1468-293.
232. Instituto-Nacional-de-Saúde., Instituto-Nacional-de-Estatística., ICF-Macro. Inquérito Nacional de Prevalência, Riscos Comportamentais e Informação sobre o HIV e SIDA em Moçambique 2009. In: EUA:INS IeIM, ed. Calverton, Maryland, **2010**.
233. 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**; 283:1175-82.

234. Kind C, Rudin C, Siegrist CA, et al. Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. *Aids* **1998**; 12:205-10.
235. Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Rekacewicz C, et al. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *Jama* **2001**; 285:2083-93.
236. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* **1994**; 331:1173-80.
237. Stanton CK, Holtz SA. Levels and trends in cesarean birth in the developing world. *Stud Fam Plann* **2006**; 37:41-8.
238. Shapiro RL, Thior I, Gilbert PB, et al. Maternal single-dose nevirapine versus placebo as part of an antiretroviral strategy to prevent mother-to-child HIV transmission in Botswana. *Aids* **2006**; 20:1281-8.
239. Lallemand M, Jourdain G, Le Coeur S, et al. Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *N Engl J Med* **2004**; 351:217-28. Epub 2004 Jul 9.
240. Fawzy A, Arpadi S, Kankasa C, et al. Early weaning increases diarrhea morbidity and mortality among uninfected children born to HIV-infected mothers in Zambia. *J Infect Dis* **2011**; 203:1222-30. doi: 10.093/infdis/jir019.
241. WHO. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: Towards universal access. Geneva: World Health Organization, **2006**.
242. WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretrovirals drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: World Health Organization, **2013**.
243. Spira R, Lepage P, Msellati P, et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: a five-year prospective study in Rwanda. Mother-to-Child HIV-1 Transmission Study Group. *Pediatrics* **1999**; 104:e56.
244. Mwinga K, Vermund SH, Chen YQ, et al. Selected hematologic and biochemical measurements in African HIV-infected and uninfected pregnant women and their infants: the HIV Prevention Trials Network 024 protocol. *BMC pediatrics* **2009**; 9:49.
245. Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyaux C, Blanche S. Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS* **2003**; 17:2053-61.
246. Briand N, Le Coeur S, Jourdain G, et al. Hematological safety of perinatal exposure to zidovudine in uninfected infants born to HIV type 1-infected women in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2010**; 26:1163-6. doi: 10.089/aid.2010.0034. Epub 2010 Sep 21.
247. Fernandez Ibieta M, Ramos Amador JT, Gonzalez Tome MI, et al. [Anaemia and neutropenia in a cohort of non-infected children of HIV-positive mothers]. *An Pediatr (Barc)* **2008**; 69:533-43.
248. Feiterna-Sperling C, Weizsaecker K, Buhner C, et al. Hematologic effects of maternal antiretroviral therapy and transmission prophylaxis in HIV-1-exposed uninfected newborn infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2007**; 45:43-51.

249. El Beitune P, Duarte G, Quintana SM, Figueiro-Filho EA, Marcolin AC, Abduch R. Antiretroviral therapy during pregnancy and early neonatal life: consequences for HIV-exposed, uninfected children. *Braz J Infect Dis* **2004**; 8:140-50. Epub 2004 Sep 8.
250. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *The New England journal of medicine* **1994**; 331:1173-80.
251. Lahoz R, Noguera A, Rovira N, et al. Antiretroviral-related hematologic short-term toxicity in healthy infants: implications of the new neonatal 4-week zidovudine regimen. *Pediatr Infect Dis J* **2010**; 29:376-9. doi: 10.1097/INF.0b013e3181c81fd4.
252. Burstein Y, Rashbaum WK, Hatch WC, et al. Alterations in human fetal hematopoiesis are associated with maternal HIV infection. *Pediatric research* **1992**; 32:155-9.
253. van Eijk AM, Ayisi JG, Ter Kuile FO, et al. Malaria and human immunodeficiency virus infection as risk factors for anemia in infants in Kisumu, western Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2002**; 67:44-53.
254. Pacheco SE, McIntosh K, Lu M, et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: An analysis of the women and infants transmission study. *J Infect Dis* **2006**; 194:1089-97. Epub 2006 Sep 11.
255. Taha TE, Kumwenda N, Kafulafula G, et al. Haematological changes in African children who received short-term prophylaxis with nevirapine and zidovudine at birth. *Ann Trop Paediatr* **2004**; 24:301-9.
256. Clerici M, Saresella M, Colombo F, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* **2000**; 96:3866-71.
257. Miyamoto M, Pessoa SD, Ono E, et al. Low CD4+ T-cell levels and B-cell apoptosis in vertically HIV-exposed noninfected children and adolescents. *Journal of tropical pediatrics* **2010**; 56:427-32.
258. Embree J, Bwayo J, Nagelkerke N, et al. Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected children in Nairobi. *The Pediatric infectious disease journal* **2001**; 20:397-403.
259. Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood* **2001**; 98:398-404.
260. Ono E, Nunes dos Santos AM, de Menezes Succi RC, et al. Imbalance of naive and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz J Med Biol Res* **2008**; 41:700-8.
261. Clerici M, Saresella M, Colombo F, et al. T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* **2000**; 96:3866-71.
262. Pahwa S, Read JS, Yin W, et al. CD4+/CD8+ T cell ratio for diagnosis of HIV-1 infection in infants: Women and Infants Transmission Study. *Pediatrics* **2008**; 122:331-9.

263. Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, et al. Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood* **2001**; 98:398-404.
264. Schramm DB, Kuhn L, Gray GE, Tiemessen CT. In vivo effects of HIV-1 exposure in the presence and absence of single-dose nevirapine on cellular plasma activation markers of infants born to HIV-1-seropositive mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006**; 42:545-53.
265. Rich KC, Brambilla D, Pitt J, et al. Lymphocyte phenotyping in infants: maturation of lymphocyte subpopulations and the effects of HIV infection. *Clin Immunol Immunopathol* **1997**; 85:273-81.
266. Jones CE, Naidoo S, De Beer C, Esser M, Kampmann B, Hesselning AC. Maternal HIV infection and antibody responses against vaccine-preventable diseases in uninfected infants. *Jama* **2011**; 305:576-84. doi: 10.1001/jama.2011.100.
267. Aaby P, Marx C, Trautner S, et al. Thymus size at birth is associated with infant mortality: a community study from Guinea-Bissau. *Acta Paediatr* **2002**; 91:698-703.
268. Garly ML, Trautner SL, Marx C, et al. Thymus size at 6 months of age and subsequent child mortality. *J Pediatr* **2008**; 153:683-8, 8.
269. Kolte L, Rosenfeldt V, Vang L, et al. Reduced thymic size but no evidence of impaired thymic function in uninfected children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J* **2011**; 30:325-30.
270. Mazzola TN, da Silva MT, Abramczuk BM, et al. Impaired Bacillus Calmette-Guerin cellular immune response in HIV-exposed, uninfected infants. *Aids* **2011**; 25:2079-87.
271. Van Rie A, Madhi SA, Heera JR, et al. Gamma interferon production in response to Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium tuberculosis antigens in infants born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Clin Vaccine Immunol* **2006**; 13:246-52.
272. Abramczuk BM, Mazzola TN, Moreno YM, et al. Impaired humoral response to vaccines among HIV-exposed uninfected infants. *Clin Vaccine Immunol* **2011**; 18:1406-9. doi: 10.128/CVI.05065-11. Epub 2011 Jul 20.
273. Moss WJ, Scott S, Mugala N, et al. Immunogenicity of standard-titer measles vaccine in HIV-1-infected and uninfected Zambian children: an observational study. *J Infect Dis* **2007**; 196:347-55. Epub 2007 Jun 19.
274. Izadnegahdar R, Fox MP, Jeena P, Qazi SA, Thea DM. Revisiting pneumonia and exposure status in infants born to HIV-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J* **2014**; 33:70-2. doi: 10.1097/INF.0b013e31829f0ade.
275. Aldhous MC, Watret KC, Mok JY, Bird AG, Froebel KS. Cytotoxic T lymphocyte activity and CD8 subpopulations in children at risk of HIV infection. *Clin Exp Immunol* **1994**; 97:61-7.
276. Cheyrier R, Langlade-Demoyen P, Marescot MR, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* **1992**; 22:2211-7.

277. De Maria A, Cirillo C, Moretta L. Occurrence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T cell activity in apparently uninfected children born to HIV-1-infected mothers. *J Infect Dis* **1994**; 170:1296-9.
278. Clerici M, Sison AV, Berzofsky JA, et al. Cellular immune factors associated with mother-to-infant transmission of HIV. *Aids* **1993**; 7:1427-33.
279. Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, et al. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* **1993**; 341:860-1.
280. de Moraes-Pinto MI, Almeida AC, Kenj G, et al. Placental transfer and maternally acquired neonatal IgG immunity in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **1996**; 173:1077-84.
281. Shapiro RL, Lockman S, Kim S, et al. Infant morbidity, mortality, and breast milk immunologic profiles among breast-feeding HIV-infected and HIV-uninfected women in Botswana. *J Infect Dis* **2007**; 196:562-9. Epub 2007 Jul 9.
282. Marinda E, Humphrey JH, Iliff PJ, et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *The Pediatric infectious disease journal* **2007**; 26:519-26.
283. Koyanagi A, Humphrey JH, Ntozini R, et al. Morbidity among human immunodeficiency virus-exposed but uninfected, human immunodeficiency virus-infected, and human immunodeficiency virus-unexposed infants in Zimbabwe before availability of highly active antiretroviral therapy. *The Pediatric infectious disease journal* **2011**; 30:45-51.
284. Slogrove A, Reikie B, Naidoo S, et al. HIV-exposed uninfected infants are at increased risk for severe infections in the first year of life. *J Trop Pediatr* **2012**; 58:505-8. doi: 10.1093/tropej/fms019. Epub 2012 May 3.
285. Lepage P, Dabis F, Hitimana DG, et al. Perinatal transmission of HIV-1: lack of impact of maternal HIV infection on characteristics of livebirths and on neonatal mortality in Kigali, Rwanda. *AIDS* **1991**; 5:295-300.
286. Kuhn L, Kasonde P, Sinkala M, et al. Does severity of HIV disease in HIV-infected mothers affect mortality and morbidity among their uninfected infants? *Clin Infect Dis* **2005**; 41:1654-61. Epub 2005 Oct 27.
287. Rollins NC, Coovadia HM, Bland RM, et al. Pregnancy outcomes in HIV-infected and uninfected women in rural and urban South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2007**; 44:321-8.
288. Slogrove AL, Cotton MF, Esser MM. Severe infections in HIV-exposed uninfected infants: clinical evidence of immunodeficiency. *J Trop Pediatr* **2010**; 56:75-81. doi: 10.1093/tropej/fmp057. Epub 2009 Jul 14.
289. Mussi-Pinhata MM, Motta F, Freimanis-Hance L, et al. Lower respiratory tract infections among human immunodeficiency virus-exposed, uninfected infants. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **2010**; 14 Suppl 3:e176-82.
290. Kattan M, Platzker A, Mellins RB, et al. Respiratory diseases in the first year of life in children born to HIV-1-infected women

- Virus infections of the respiratory tract in HIV-infected children. *Pediatr Pulmonol* **2001**; 31:267-76.
291. Epalza C, Goetghebuer T, Hainaut M, et al. High incidence of invasive group B streptococcal infections in HIV-exposed uninfected infants. *Pediatrics* **2010**; 126:e631-8. doi: 10.1542/peds.2010-0183. Epub 2010 Aug 23.
292. Koyanagi A, Humphrey JH, Ntozini R, et al. Morbidity among human immunodeficiency virus-exposed but uninfected, human immunodeficiency virus-infected, and human immunodeficiency virus-unexposed infants in Zimbabwe before availability of highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* **2011**; 30:45-51. doi: 10.1097/INF.0b013e3181ecbf7e.
293. McNally LM, Jeena PM, Gajee K, et al. Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. *Lancet* **2007**; 369:1440-51.
294. Jeena P, Thea DM, MacLeod WB, et al. Failure of standard antimicrobial therapy in children aged 3-59 months with mild or asymptomatic HIV infection and severe pneumonia. *Bull World Health Organ* **2006**; 84:269-75. Epub 2006 Apr 13.
295. Otieno RO, Ouma C, Ong'echa JM, et al. Increased severe anemia in HIV-1-exposed and HIV-1-positive infants and children during acute malaria. *AIDS* **2006**; 20:275-80.
296. Lipshultz SE, Miller TL, Wilkinson JD, et al. Cardiac effects in perinatally HIV-infected and HIV-exposed but uninfected children and adolescents: a view from the United States of America. *J Int AIDS Soc* **2013**; 16:18597. doi: 10.7448/IAS.16.1.18597.
297. Karpelowsky JS, Millar AJ, van der Graaf N, van Bogerijen G, Zar HJ. Comparison of in-hospital morbidity and mortality in HIV-infected and uninfected children after surgery. *Pediatr Surg Int* **2012**; 28:1007-14. Epub 2012 Aug 26.
298. Chilongozi D, Wang L, Brown L, et al. Morbidity and mortality among a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected pregnant women and their infants from Malawi, Zambia, and Tanzania. *Pediatr Infect Dis J* **2008**; 27:808-14. doi: 10.1097/INF.0b013e31817109a4.
299. Chatterjee A, Bosch RJ, Kupka R, Hunter DJ, Msamanga GI, Fawzi WW. Predictors and consequences of anaemia among antiretroviral-naive HIV-infected and HIV-uninfected children in Tanzania. *Public Health Nutr* **2010**; 13:289-96. doi: 10.1017/S1368980009990802. Epub 2009 Aug 4.
300. Wei R, Msamanga GI, Spiegelman D, et al. Association between low birth weight and infant mortality in children born to human immunodeficiency virus 1-infected mothers in Tanzania. *Pediatr Infect Dis J* **2004**; 23:530-5.
301. WHO. HIV and infant feeding: update based on the technical consultation held on behalf of the Inter-agency Team (IATT) on Prevention of HIV Infections in Pregnant Women, Mothers and their Infants **2006**; World Health Organization. Geneva 25-27 October.
302. Kuhn L, Aldrovandi GM, Sinkala M, et al. Effects of early, abrupt weaning on HIV-free survival of children in Zambia. *N Engl J Med* **2008**; 359:130-41. doi: 10.1056/NEJMoa073788. Epub 2008 Jun 4.

303. Lepage P, Msellati P, Hitimana DG, et al. Growth of human immunodeficiency type 1-infected and uninfected children: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda, 1988 to 1993. *Pediatr Infect Dis J* **1996**; 15:479-85.
304. Bailey RC, Kamenga MC, Nsuami MJ, Nieburg P, St Louis ME. Growth of children according to maternal and child HIV, immunological and disease characteristics: a prospective cohort study in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Int J Epidemiol* **1999**; 28:532-40.
305. Makasa M, Kasonka L, Chisenga M, et al. Early growth of infants of HIV-infected and uninfected Zambian women. *Trop Med Int Health* **2007**; 12:594-602.
306. PNUD. Índice de desarrollo humano 2013. El ascenso del Sur: Progreso humano en un mundo diverso. New York, USA: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, **2013**.
307. Nhacolo AQ, Nhalungo DA, Sacoor 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.
308. Sacarlal J, Nhacolo AQ, Sigauque B, et al. A 10 year study of the cause of death in children under 15 years in Manhica, Mozambique. *BMC Public Health* **2009**; 9:67.:10.1186/471-2458-9-67.
309. Guinovart C, Bassat Q, Sigauque B, et al. Malaria in rural Mozambique. Part I: children attending the outpatient clinic. *Malaria journal* **2008**; 7:36.
310. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **2004**; 364:1411-20.
311. Naniche 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**; 80:870-6.
312. Calis JC, Phiri KS, Faragher EB, et al. Severe anemia in Malawian children. *The New England journal of medicine* **2008**; 358:888-99.
313. Beeson JG, Amin N, Kanjala M, Rogerson SJ. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infect Immun* **2002**; 70:5412-5.
314. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol* **2000**; 31:85-93.
315. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* **2009**; 200:1509-17. doi: 10.086/644781.
316. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev* **2011**; 24:377-410. doi: 10.1128/CMR.00051-10.
317. Trager W, Gill GS, Lawrence C, Nagel RL. *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol* **1999**; 91:115-8.

318. Haddad L, Alderman H, Appleton S, Song L, Yohannes Y. Reducing child malnutrition: how far does income growth take us? *World Bank Econ Rev* **2003**; 17:107-31.
319. Filteau S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop Med Int Health* **2009**; 14:276-87. doi: 10.1111/j.365-3156.2009.02220.x. Epub 2009 Jan 20.
320. Arpadi SM. Growth failure in children with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2000**; 25:S37-42.
321. Dow A, Kayira D, Hudgens M, et al. Effects of cotrimoxazole prophylactic treatment on adverse health outcomes among HIV-exposed, uninfected infants. *Pediatr Infect Dis J* **2012**; 31:842-7. doi: 10.1097/INF.0b013e31825c124a.
322. Kourtis AP, Wiener J, Kayira D, et al. Health outcomes of HIV-exposed uninfected African infants. *Aids* **2013**; 27:749-59. doi: 10.1097/QAD.0b013e32835ca29f.
323. Ivan E, Crowther NJ, Mutimura E, Osuwat LO, Janssen S, Grobusch MP. Helminthic infections rates and malaria in HIV-infected pregnant women on anti-retroviral therapy in Rwanda. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**; 7:e2380. doi: 10.1371/journal.pntd.0002380. eCollection 2013.
324. WHO. Directriz: Administración diaria de suplementos de hierro y ácido fólico en el embarazo. Geneva: World Health Organization, **2014**.
325. Afacan YE, Hasan MS, Omene JA. Iron deficiency anemia in HIV infection: immunologic and virologic response. *J Natl Med Assoc* **2002**; 94:73-7.
326. Semba RD, Bloem MW. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. *European journal of clinical nutrition* **2002**; 56:271-81.
327. WHO. Guideline: Vitamin A supplementation in pregnant women. Geneva, World Health Organization **2011**.
328. WHO. Vitamin A supplements: a guide to their use in prevention and treatment of vitamin A deficiency and xerophthalmia. Geneva: World Health Organization **1997**.
329. Wieringa FT, Dijkhuizen MA, West CE, Northrop-Clewes CA, Muhilal. Estimation of the effect of the acute phase response on indicators of micronutrient status in Indonesian infants. *J Nutr* **2002**; 132:3061-6.
330. Engle-Stone R, Ndjebayi AO, Nankap M, Brown KH. Consumption of potentially fortifiable foods by women and young children varies by ecological zone and socio-economic status in Cameroon. *The Journal of nutrition* **2012**; 142:555-65.
331. Kung'u JK, Goodman D, Haji HJ, et al. Early helminth infections are inversely related to anemia, malnutrition, and malaria and are not associated with inflammation in 6- to 23-month-old Zanzibari children. *Am J Trop Med Hyg* **2009**; 81:1062-70. doi: 10.4269/ajtmh.2009.09-0091.
332. Kahigwa E, Schellenberg D, Sanz S, et al. Risk factors for presentation to hospital with severe anaemia in Tanzanian children: a case-control study. *Trop Med Int Health* **2002**; 7:823-30.

333. Kounnavong S, Vongloklam M, Houamboun K, Odermatt P, Boupba B. Soil-transmitted helminth infections and risk factors in preschool children in southern rural Lao People's Democratic Republic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2011**; 105:160-6.
334. Jonker FA, Calis JC, Phiri K, et al. Real-time PCR demonstrates *Ancylostoma duodenale* is a key factor in the etiology of severe anemia and iron deficiency in Malawian pre-school children. *PLoS neglected tropical diseases* **2012**; 6:e1555.
335. Mwambete KD, Tunzo J, Justin-Temu M. Prevalence and Management of Helminthiasis among Underfives Living with HIV/AIDS at Amana Hospital, Tanzania. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* **2012**.
336. Wiwanitkit V. Intestinal parasite infestation in HIV infected patients. *Curr HIV Res* **2006**; 4:87-96.
337. Mwambete KD, Justin-Temu M, Peter S. Prevalence and management of intestinal helminthiasis among HIV-infected patients at Muhimbili National Hospital. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* **2010**; 9:150-6.
338. Nielsen NO, Simonsen PE, Magnussen P, Magesa S, Friis H. Cross-sectional relationship between HIV, lymphatic filariasis and other parasitic infections in adults in coastal northeastern Tanzania. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2006**; 100:543-50.
339. Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Gbadegeshin AH, Iriemenam NC. Comparative study of entero-parasitic infections among HIV sero-positive and sero-negative patients in Lagos, Nigeria. *Acta Trop* **2011**; 120:268-72. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.08.009. Epub Aug 26.
340. Vanderjagt DJ, Brock HS, Melah GS, El-Nafaty AU, Crossey MJ, Glew RH. Nutritional factors associated with anaemia in pregnant women in northern Nigeria. *Journal of health, population, and nutrition* **2007**; 25:75-81.
341. Manning L, Laman M, Rosanas-Urgell A, et al. Severe anemia in Papua New Guinean children from a malaria-endemic area: a case-control etiologic study. *PLoS neglected tropical diseases* **2012**; 6:e1972.
342. Leoncini R, Vannoni D, Guerranti R, et al. Serum folate and vitamin B12 levels in children from Mozambique. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2004**; 23:1301-3.
343. Mulenga M, Malunga P, Bennett S, et al. Folic acid treatment of Zambian children with moderate to severe malaria anemia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2006**; 74:986-90.
344. Abdalla SH. Iron and folate status in Gambian children with malaria. *Annals of tropical paediatrics* **1990**; 10:265-72.
345. Antony AC. Prevalence of cobalamin (vitamin B-12) and folate deficiency in India--audi alteram partem. *The American journal of clinical nutrition* **2001**; 74:157-9.

346. Bradley-Moore AM, Greenwood BM, Bradley AK, et al. Malaria chemoprophylaxis with chloroquine in young Nigerian children. IV. Its effect on haematological measurements. *Annals of tropical medicine and parasitology* **1985**; 79:585-95.
347. Allen LH. Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull* **2008**; 29:S20-34; discussion S5-7.
348. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* **2000**; 46:1277-83.
349. Enevold A, Lusingu JP, Mmbando B, et al. Reduced risk of uncomplicated malaria episodes in children with alpha+-thalassemia in northeastern Tanzania. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **2008**; 78:714-20.
350. Orimadegun AE, Sodeinde O. Glucose-6-phosphate dehydrogenase status and severity of malarial anaemia in Nigerian children. *Journal of infection in developing countries* **2011**; 5:792-8.
351. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* **1994**; 84:3613-36.
352. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician* **2005**; 72:1277-82.
353. Willcox MC, Liljestrand J, Bergstrom S. Abnormal haemoglobins among pregnant women from Mozambique. *Journal of medical genetics* **1986**; 23:151-2.
354. Nieuwenhuis F, Wolf B, Bomba A, De Graaf P. Haematological study in Cabo Delgado province, Mozambique; sickle cell trait and G6PD deficiency. *Tropical and geographical medicine* **1986**; 38:183-7.
355. Mansoor N, Abel B, Scriba TJ, et al. Significantly skewed memory CD8+ T cell subsets in HIV-1 infected infants during the first year of life. *Clin Immunol* **2009**; 130:280-9.
356. Sandison TG, Homsy J, Arinaitwe E, et al. Protective efficacy of co-trimoxazole prophylaxis against malaria in HIV exposed children in rural Uganda: a randomised clinical trial. *BMJ* **2011**; 342:d1617.
357. Thera MA, Sehdev PS, Coulibaly D, et al. Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and disease. *The Journal of infectious diseases* **2005**; 192:1823-9.
358. Coutsooudis A, Pillay K, Spooner E, Coovadia HM, Pembrey L, Newell ML. Routinely available cotrimoxazole prophylaxis and occurrence of respiratory and diarrhoeal morbidity in infants born to HIV-infected mothers in South Africa. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* **2005**; 95:339-45.
359. Coutsooudis A, Kindra G, Esterhuizen T. Impact of cotrimoxazole prophylaxis on the health of breast-fed, HIV-exposed, HIV-negative infants in a resource-limited setting. *AIDS* **2011**; 25:1797-9.
360. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, Starke JR. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med* **2006**; 173:1078-90. Epub 2006 Feb 16.

361. Straus WL, Qazi SA, Kundi Z, Nomani NK, Schwartz B. Antimicrobial resistance and clinical effectiveness of co-trimoxazole versus amoxycillin for pneumonia among children in Pakistan: randomised controlled trial. Pakistan Co-trimoxazole Study Group. *Lancet* **1998**; 352:270-4.
362. Gill CJ, Sabin LL, Tham J, Hamer DH. Reconsidering empirical cotrimoxazole prophylaxis for infants exposed to HIV infection. *Bulletin of the World Health Organization* **2004**; 82:290-7.
363. Coutsooudis A, Coovadia HM, Kindra G. Time for new recommendations on cotrimoxazole prophylaxis for HIV-exposed infants in developing countries? *Bulletin of the World Health Organization* **2010**; 88:949-50.

VIII. Agradecimientos

En el momento en el que se llega a la página en blanco dedicada a los agradecimientos, uno se da cuenta de la cantidad de gente que ha trabajado para que esta tesis sea posible.

En primer lugar, querría agradecer a Eusebio Macete, quien en el año 2005 fue al Hospital 12 de Octubre de Madrid a hablar sobre la vacuna de la malaria. Durante su charla, explicó a la audiencia lo que era el *Centro de Investigação en Saúde de Manhiça* (CISM) y quiénes y cómo se trabajaba allí. Mientras pensaba cuánto me gustaría formar parte de ese proyecto, Eusebio dijo “*si queréis trabajar con nosotros, estáis todos invitados*”. En cuanto Eusebio terminó su exposición llamé a Charly y le dije que quería que nuestro primer destino fuera Mozambique. Aquella decisión, y el hecho de que se materializara varios meses más tarde, cambió nuestras vidas para siempre. Aún me quedaba año y medio de residencia, así que completé esos meses disfrutando como ya lo había hecho durante los años anteriores, aunque con una perspectiva nueva en mi cabeza.

Precisamente quiero continuar mis agradecimientos por el Servicio de Pediatría del Hospital General de Segovia, al que agradezco haber hecho de mí la pediatra que soy, así como el apoyo y cariño que me dieron siempre, haciendo aquella etapa de mi vida inolvidable y entrañable. En especial querría agradecer a Lola Romero todo el esfuerzo que hizo, y su tesón para conseguir que pudiera iniciar mi formación en Medicina Tropical, logrando la primera rotación de una residente de Pediatría de ese hospital en el extranjero, así como haberme puesto en contacto con la Dra. Clara Menéndez, fundamental en el devenir posterior de los acontecimientos y de esta tesis, una vez que supimos que finalmente iríamos destinados a Mozambique.

Nada más llegar a Mozambique, tuve la suerte de encontrar a Miguel González, entonces Coordinador General de la Oficina Técnica de Cooperación Española, quien nos ofreció su amistad de manera sincera y me puso en contacto con el Dr. Pedro Alonso, sumando esfuerzos a los realizados por Lola. También tuve la suerte de encontrar a Juan Manuel Molina, Embajador de España en Maputo, quien se implicó personalmente y desde un primer momento para que pudiera obtener los permisos de trabajo necesarios, demostrando una gran sensibilidad hacia el problema que afecta a muchos cónyuges de funcionarios diplomáticos, a la hora de desarrollar una carrera profesional en igualdad de condiciones y compatibilizándola con la familia. Ambos nos ayudaron de manera muy particular a que nuestro aterrizaje en Maputo fuera lo más ameno posible, en unas circunstancias nada sencillas.

No hay palabras que puedan transmitir mi agradecimiento más profundo y honesto a la Dra. Menéndez y al Dr. Alonso, con quienes bastó un primer encuentro en el hall del hotel

Polana de Maputo para que pasaran a ser Clara y Pedro, lo que pone de manifiesto las grandes personas que son, por la gran oportunidad profesional que me dieron, por su flexibilidad con mi situación familiar, por sus siempre buenos y acertados consejos a lo largo de todos estos años, incluida esta tesis que tantos quebraderos de cabeza me ha dado, y, sobre todo, por su cariño y los muchos y buenos momentos que hemos compartido. Pedro y Clara consiguieron que mi llegada “no prevista”, mi atípica condición debida a mi inmunidad diplomática que la hacía “arriesgada”, mi necesidad de pasar varios días en Maputo para atender dicha condición (y ocuparme del pobre Charly...) y mi inexperiencia, no fueran un impedimento. Realmente fue un acto de fe racional, pues gracias a ellos, poco a poco pude ir ejerciendo como pediatra en el Hospital Distrital de Manhiça, así como iniciar un aprendizaje en investigación clínica participando en los estudios que forman parte de esta tesis, además de algunos más. Esa apuesta de Pedro y Clara es lo que ha guiado mi trayectoria profesional durante estos últimos años y, por qué no decirlo, también nuestras decisiones familiares, algo de lo que me siento muy agradecida y orgullosa.

En la clínica aprendí a lidiar con enfermedades y medicamentos desconocidos; con situaciones sociales previamente impensables; con lo absurdo; a trabajar con menos herramientas y ser imaginativa; a luchar con la muerte y en muchas ocasiones, a tener que aceptar la derrota, aprendiendo la realidad de aquellos que padecen las carencias de los países olvidados. Por todo ello y mucho más, querría agradecer a los que participaron en ese aprendizaje, todos clínicos que compartieron conmigo esos 3 años. No quiero dejar de mencionar a Tacilta Nhampossa, a Sonia Machevo, a Montse Renom, a Nayra Gutiérrez, a Pedro Aide, a Cristian Casademont, a Sozinho Acacio, a Kizito Gondo y a Madalena Ripinga; a los enfermeros; a las “*serventes*”; y a las madres de Manhiça que pusieron en mis manos lo que más querían en el mundo. También a los residentes y estudiantes de las diferentes nacionalidades que pasaron por allí, a los que espero haber transmitido algo de lo que yo también aprendí como profesional y como persona en aquel entorno tan especial que es Manhiça.

Muy especialmente quería agradecerle a Jose Muñoz por haber sido un excelente compañero en la clínica, por su apoyo, sus consejos y su fe ciega en mí; por aquellos cafés que me daban la vida, más allá de la cafeína; y porque continúa siendo un gran amigo. También a Miguel Lanaspá, porque consiguió que volviera a reír en mis últimos meses en la clínica y aún lo sigue haciendo, y por su ayuda junto con María Rupérez en la limpieza de datos del estudio ANEM después de mi salida de Manhiça.

El trabajo en los estudios también fue un gran reto. Tengo que agradecer a Montse porque empezó a explicarme todo desde lo más básico y a Clara y a Denise Naniche por su coordinación y supervisión de los estudios ANEM y ENIC, respectivamente. También al personal de clínica que participó activamente en los estudios, especialmente a Alice Chithango y Albertina Manhiça, por su dedicación en el reclutamiento del estudio de anemia; a los enfermeros Manuel y Jaime por hacer que las difíciles punciones de médula ósea fueran algo

más fáciles; a la enfermera Jorcelyna Rungo y a la “*parteira*” Madalena Almeida por su apoyo en el estudio ENIC. Del mismo modo, querría agradecer la colaboración del personal de laboratorio, de manera particular a Mauricio Rodríguez, Augusto Nhabomba, Nelito Ernesto, Bendita Zavale, Lázaro Mussacate, Helder Bulo y, en especial, a Nilsa de Deus y Celia Serna-Bolea, porque su papel en ENIC fue capital. También a María José López por ayudarme cuando nada funcionaba y a Roberto Álvarez y Amandio Chilengue por su apoyo y flexibilidad con el material. Agradezco la dedicación de los trabajadores de campo, en especial, a Luisa Agostinho, Isabel y Lucas Nhatumbo; a los choferes y personal de administración que hacían que todo funcionara, especialmente, a Constanza y Sheila. A Delino Nhalungo le agradezco su ayuda en la creación de los mapas de ANEM, y a Arnaldo Nhabunga, junto con los “digitadores”, su ayuda en el centro de datos. También querría agradecer su silenciosa y sonriente dedicación a Ernesto Mandlate, cuyo trabajo gestionando el papeleo de los estudios fue una muy importante labor. Y por último y no por ello menos importante, sino todo lo contrario, a los cientos de madres y niños que participaron en estos estudios.

Durante los 3 años que pasé en Mozambique, cada día aprendí algo nuevo. Muchos días fueron difíciles y por eso el apoyo de los buenos amigos que hice allí fue una pieza fundamental para mantener el ánimo y aguantar el tipo. Querría destacar a Sergi en su labor de administrador y amigo, que junto a Salut me transmitieron optimismo y dejaron siempre abierta la puerta de su casa para lo que fuera necesario. Estoy muy agradecida a los fundadores de “Manhiça D’or” y “Radio Manhiça”, mi familia de Manhiça, porque tuve la suerte de encontrarlos y disfrutarlos; Mariajo y Roberto, cuya generosidad, material y espiritual, no tiene límites; a Jose porque “es muy importante”; a Xenia e Isma porque nos traían muy buena onda y la sonrisa siempre se imponía en su presencia; a Nayra por ser como era; a Mauricio por esa manera barroca de ver la vida; a Celia por esa forma sencilla de verla y a Mireia por esos meses que compartimos. Pero también a Ana Belén, Cristian, Marina, Cate, Enric, Fernando, Ana y Pep, por los buenos ratos que pasamos; a Khatia por su ayuda en las revueltas de febrero de 2008; a Esperança por esos trayectos en coche; y al señor Manhiça por lo que me enseñó de jardinería.

A mi querida Raquel, una compañera de piso y una amiga ideal, por las cenas de pasta, por nuestras charlas interminables, por haberme cuidado y aconsejado y por toda su ayuda desde que la conocí hasta el día hoy. Tal vez ella no lo sepa, pero ha jugado un papel muy importante durante todo este tiempo para hacer posible que se pueda presentar esta tesis.

Tras terminar el trabajo de campo y salir de Mozambique, aterricé en Marruecos, donde se me ofreció otra nueva oportunidad como investigadora clínica. Agradezco de nuevo a Pedro y Clara por su apoyo y comprensión, y al equipo de Rabat, en especial a Enric Grau, Pascal Andignac, Eva López, Imane Jroundi y Rachid Benmessaoud, por su flexibilidad para que pudiera continuar con el trabajo que compone esta tesis y atendiendo a mi familia en Casablanca. Gracias otra vez a Mariajo y a Roberto, a Xenia e Isma, por haberme cuidado,

tanto o más si cabe que en Manhiça. Fue increíble que volviéramos a coincidir; y a Quique Bassat, por sus buenos consejos y ayuda que, aunque en la distancia, siempre presente.

En Barcelona, querría dar las gracias a Ruth Aguilar, co-directora de esta tesis, que ha jugado un papel imprescindible en el desarrollo del estudio de anemia y en todos los artículos relacionados con él. Ruth ha sido un importante apoyo para mí desde Barcelona y en Manhiça, una excelente compañera de trabajo y una amiga durante estos años. Asimismo, querría agradecer a Denise Naniche, investigadora senior del estudio ENIC, por la manera en que me ha guiado, ayudado y estimulado con su especial forma de trabajar en el desarrollo de ese estudio y las publicaciones relacionadas. También quería dedicar un especial agradecimiento a Llorenç Quintó, por el importante y exhaustivo trabajo realizado en el análisis estadístico de los datos del estudio de anemia, por su paciencia con nuestras dudas, cambios e imprevistos y por todo lo que me ha enseñado. Agradecer a Montse Pi por sus gestiones administrativas en la última etapa. Y resaltar de nuevo mi agradecimiento a Clara como directora de esta tesis, por todo el tiempo que le ha dedicado, por todo lo que me ha enseñado, principalmente a no rendirme, por sus consejos y por ser mi mentora. Gracias siempre.

Por supuesto, quiero también agradecer a mis padres, Blanca y Antonio, y a mis hermanos, Blanca, Antonio e Isabel, por los cimientos sobre los que he forjado la persona que soy y que me empujan, cada día, a intentar hacer cosas buenas y útiles. Gracias por vuestros ánimos y vuestro apoyo incondicional. Y más especialmente a Isabel por su ayuda con los temas de edición de esta tesis, ya que siempre está dispuesta a echarme una mano a cualquier hora y con una excelente disposición.

Por último, quiero agradecer a Charly que sea mi compañero de vida; que en todo momento haya ajustado su vida profesional para que yo pudiera ir desarrollando la mía, como parte de un todo; y que haya aceptado la cantidad de horas que he tenido que pasar lejos de él para poder realizar este trabajo. Gracias, Charly, por tu paciencia y por la fuerza que me has dado cuando creía que me faltaba; y por tu apoyo en todas y cada una de las esferas de mi vida. Y a ti, Rocío, gracias por haberte portado tan bien cuando mamá te decía que tenía que escribir la tesis y papá te decía que era por el bien de la familia...

IX. Anexos



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE

Exm^a Senhora
Dr.^a Clara Menêndez
Centro de Investigação em Saúde da Manhica

Ref^o259/CNBS

Data 9 de Setembro de 2008

Assunto: Parecer sobre estudo etiologia of anemia.

Reunido no dia 28 de Agosto de 2008 o Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as respostas relativas ao protocolo com seguinte título: "**Etiology of anemia in children in a malaria endemic rural area of Mozambique**", Sobre o mesmo o CNBS teve 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 de momento as nossas cordiais saudações.

Presidente

Dr. João Manuel de Carvalho Fumane

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO - MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

Dña. Begoña Gómez Pérez , del Servicio de Farmacia del Hospital
Clínic de Barcelona y Secretaria del Comité Ético de Investigación
Clínica (CEIC)

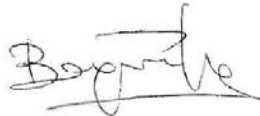
CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación Clínica, según consta en el acta
de la reunión celebrada en el día de hoy, ha analizado el proyecto de
investigación titulado:

Aetiology of anaemia in children in a rural area of Mozambique.

cuyo investigador principal es la Dra. **Aguilar Serrano, Ruth**
del Servicio de **Salud Internacional**
entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales
y criterios deontológicos que rigen en este Centro, y, por tanto, ha
decidido su aprobación.

Lo que firmo en Barcelona, a 27/03/2008



CIF: G-08431173

852



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE

Exm^a Senhora
Dr.^a Denise Naniche
Centro de Investigação em Saúde da Manhica

Ref^a 260/CNBS

Data 9 de Setembro de 2008

Assunto: Parecer sobre estudo avaliação de parâmetros imunológicos e indicadores de saúde durante o primeiro ano de vida em crianças.

Reunido no dia 28 de Agosto de 2008 o Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as respostas relativas ao protocolo com seguinte título: **"Avaliação de parâmetros imunológicos e indicadores de saúde durante o primeiro ano de vida em crianças sem infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) nascidas de mães VIH positivas em Manhica"**, Sobre o mesmo o CNBS chegou 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 de momento as nossas cordiais saudações.

O Presidente

Dr. João Manuel de Carvalho Fumane

ENDEREÇO:
MINISTÉRIO DA SAÚDE
C. POSTAL 264
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)
Telex: 6-239 MISAU MO
FAX: 258 (1) 426547
258 (1) 33320

Dña. Begoña Gómez Pérez , del Servicio de Farmacia del Hospital
Clínic de Barcelona y Secretaria del Comité Ético de Investigación
Clínica (CEIC)

CERTIFICA:

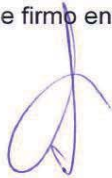
Que el Comité Ético de Investigación Clínica, según consta en el acta
de la reunión celebrada en el día de hoy, ha analizado el proyecto de
investigación titulado:

*Assessment of haematological and immunological parameter of HIV-
negative children born to HIV-positive mothers over the 1st year after
birth in breastfeeding women in Mozambique.*

cuyo investigador principal es la Dra. **Naniche, Denise**
del Servicio de **Salud Internacional**

entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales
y criterios deontológicos que rigen en este Centro, y, por tanto, ha
decidido su aprobación.

Lo que firmo en Barcelona, a 11/12/2006



CIF - G-08431173

852

