

Tesis Doctoral

**APLICACIÓN DE TESTS SEROLÓGICOS
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INFECCIONES RECIENTES
POR VIH EN CATALUÑA**

Memoria presentada por Anabel Romero Morales para optar al grado de Doctora por la
Universidad Autónoma de Barcelona

Doctoranda:

Anabel Romero Morales

Directora:

Dra. Anna Esteve Gómez

Tutor:

Dr. Jordi Casabona Barbarà

Programa de Doctorado en Salud Pública y Metodología de la investigación

Biomédica

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y Medicina Preventiva.

Facultad de Medicina - Universidad Autónoma de Barcelona



Barcelona, 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a la directora y el tutor de mi tesis por la oportunidad que me han ofrecido al poder realizar esta tesis: Anna Esteve y Jordi Casabona.

En segundo lugar debo dar las gracias al Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. En especial a Victoria González, por haber analizado las más de 5.000 muestras que han dado lugar a los trabajos que conforman esta tesis. Y también muchas gracias a Elisa Martró y Lurdes Matas.

Quiero dar las gracias de manera especial a José M^a Miró y a Tomás Pumarola, así como al resto del equipo del Hospital Clínic por su implicación en el proyecto AERI, especialmente en el trabajo de Resistencias, pero también en cada uno de los trabajos que conforman esta tesis. Muchas gracias Fernando, María y Christian. Y muchas gracias Omar, porque a pesar de estar al otro lado del océano fue muy fácil trabajar contigo.

El trabajo de resistencias no hubiera sido posible tampoco sin la colaboración de la Fundació IrsiCaixa. Muchas gracias Teresa por tu tiempo y dedicación al genotipado de las muestras del proyecto AERI, y por estar siempre disponible para resolver mis dudas sobre resistencias.

Debo dar las gracias a todo el grupo de estudio AERI, a los que participaron del 2003 al 2005 y también a los que siguieron participando de manera voluntaria a partir del 2006. Y muchas gracias también a las personas del CEEISCAT que trabajaron en los inicios del proyecto AERI: Cris, Xus, Diana, Meritxell, Vanessa.

Muchas gracias a Meritxell y Berta por confiar en mi desde el primer momento. Gracias también al resto de compañeras y compañeros con los que compartí mi tiempo en el CEEISCAT: Cinta, Laura, Cristina, Laia Ferrer, Eva Loureiro, Eva Puchol, Rossie, Evelin, Núria Murtra, Nuria Vives, Esteve, Lidia, Jordi Figuerola, Aitor, Joan, Alexandra, Laia Carrasco y Montse. Y mención especial para Rafa, por haberse encargado tan bien de llevar de un lado para otro las más de 5.000 muestras de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a María Sala y a Xavier Castells del Servicio de Epidemiología del Hospital del Mar, por abrirme las puertas de la investigación en cribado de cáncer de mama. Gracias a mis compañeras de despacho: Laia, Marta y Jordi, por formar un auténtico equipo, y por hacer del trabajo un lugar agradable. Y también muchas gracias al resto del personal del servicio, sobretodo a Esther y Mercè. Fue un auténtico placer trabajar con todos vosotros.

Muchísimas gracias a Mireia Espallargues y Joan Pons por acogerme en la Agencia de Calidad y Evaluación Santiarías de Cataluña. Muchas gracias Dolors Estrada por tu energía y ganas de enseñarme. Muchas gracias Noemí, por ser mi psicóloga particular y por compartir cafés y pizzas. Y muchas gracias al resto de compañeras de la agencia: Júlia, Dolors Benítez, Ana, Marta, Vicky, Marie. Realmente es estupendo trabajar con todas vosotras.

Muchas gracias a mis bellas amigas: Bea, Diana, Cris, Raquel, Gemma, Davinia, Carmen, Esther, Laura, Zulema, Sara, Noemí, Irene y Silvia. Y especialmente, gracias a Gemma Arnaiz, por haber creado una portada tan bonita. Gracias Marga por esos buenos ratos de costura y patronaje.

Muchas gracias Núria, por ofrecerme tu amistad, en el CEEISCAT, en el PRBB y más allá! Sería estupendo volver a coincidir como compañeras de trabajo.

Muchísimas gracias a mi familia: mis padres, mi hermana, mi sobrino,...Pero, sobretodo, gracias infinitas a mi madre, por demostrarme que todo es posible. Mamá, eres la mejor. Y muchas gracias a Ingrid y al resto del Servicio de Cardiología del Hospital Joan XXIII por hacerlo posible.

Vull donar les gràcies de manera molt especial al Llorenç, per ser tan bon nen i estimar-me tant. Gràcies Josep, perquè has viscut aquesta tesis amb mi des del minut 0 i en tot moment m'has recolzat i m'has ajudat a que arribés a bon port. I, per últim, gràcies a tu, Laia! Què bonica és la vida, ara que estàs a punt d'arribar al món. Aquesta tesis és per a tu.

PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral es el resultado de la aplicación de los tests serológicos para identificar infecciones recientes entre los nuevos diagnósticos de VIH, y está formada por cuatro trabajos que han dado lugar a cuatro publicaciones, dos de ellas publicadas en revistas internacionales. Los trabajos que se presentan han sido coordinados por el Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT), y han participado un total de 19 hospitales, 7 laboratorios de atención primaria, una clínica de infecciones de transmisión sexual (ITS) y 8 centros de cribado alternativos. La mayoría de centros participantes están ubicados en Cataluña, pero también han participado centros de Madrid, la Rioja, San Sebastián y Granada. El laboratorio responsable de analizar las muestras mediante los tests para identificar infecciones recientes fue el Servicio de Microbiología del Hospital Univesitari Germans Trias i Pujol.

En la introducción se describen brevemente los aspectos relacionados con la infección por VIH: la biología del virus, la historia natural, el diagnóstico, los tratamientos y las resistencias del VIH a los antirretrovirales. También se hace una revisión de la situación actual de la epidemia del VIH en el mundo, así como en España y Cataluña. En la tercera sección de la introducción, se presentan los tests serológicos para identificar infecciones recientes, se comentan sus fundamentos, los distintos tipos de tests existentes, y también se comentan sus limitaciones. En la última sección de la introducción se exponen algunas de las aplicaciones más frecuentes de estos tests en Salud Pública: expresar la proporción de infecciones recientes, describir las características de las personas infectadas recientemente y estimar la prevalencia de resistencias transmitidas entre los pacientes con infección reciente.

En el primer artículo se introduce el *Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversions* (STARHS) por primera vez en España. Este test permite identificar los pacientes con infección reciente por VIH. Aplicando este test se han descrito las características epidemiológicas de los pacientes con infección reciente por VIH. Este proyecto, conocido con el nombre de Algoritme Estandarditzat per la detecció de Recent Infectats pel VIH (AERI-VIH), fue financiado por la Fundació La Marató de TV3, y participaron centros situados en Cataluña, Madrid, San Sebastián, Granada y La Rioja.

A partir del mismo estudio AERI, realizado entre los años 2003 – 2005, los laboratorios del Hospital Clínic y de la Fundació IrsiCaixa realizaron el genotipado de las muestras

correspondientes a los pacientes identificados mediante el test STARHS como infecciones recientes. A partir de esos genotipados se estimó la prevalencia de resistencias transmitidas y de subtipos de VIH-1 no B. De este trabajo surgió el segundo artículo de esta tesis doctoral.

Después de estos dos trabajos realizados con muestras recogidas entre los años 2003 y 2005, se incorporó la identificación de infecciones recientes por VIH al Sistema Integrado de la Vigilancia Epidemiológica del SIDA/VIH/ITS (SIVES) de Cataluña. Para este nuevo periodo de estudio, debido a que el test usado en el primer estudio, el test Vironostika, dejó de estar disponible comercialmente, el laboratorio empezó a usar un nuevo test, el test BED-CEIA. Para asegurar que los resultados obtenidos por ambos tests eran comparables, se realizó un estudio de concordancia. El tercer capítulo de esta tesis doctoral presenta los resultados de este estudio de concordancia.

En el siguiente capítulo de la tesis doctoral, se presentan los resultados de la incorporación del test para identificar infecciones recientes en el sistema de vigilancia del VIH en Cataluña, durante el periodo 2006-2008. En este estudio participaron 14 hospitales y 8 centros de cribado alternativos situados en su mayoría en Barcelona y su ámbito metropolitano, y también en Lleida, Reus, Tortosa, Vilafranca, Vic y Palamós.

Como anexo de la tesis, se presenta un trabajo en el cual se utilizaron los tests serológicos para identificar infecciones recientes para obtener una estimación de la incidencia de VIH en nuestro medio. Se usó la información procedente de los nuevos diagnósticos de VIH identificados en los hospitales y centros de cribado alternativos que participaron en el estudio AERI, a lo largo del periodo 2003 - 2008.

FINANCIACIÓN

La Fundació La Marató de TV3 otorgó al CEEISCAT una beca para desarrollar el proyecto AERI-VIH, proyecto de investigación epidemiológica en SIDA aplicando el test STARHS (proyecto #022010). Este trabajo fue parcialmente financiado por la Direcció General de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya y por la Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España (FIPSE, Madrid, Plan Nacional del SIDA, Secretariado del Ministerio de Sanidad de España), el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de salud Carlos III y la Red Española de Investigación en SIDA (RIS; ISCIII-RETIC RD06/006).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
PRESENTACIÓN	V
FINANCIACIÓN	VII
ÍNDICE.....	IX
ABREVIATURAS.....	XI
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	XIII
INTRODUCCIÓN	1
1. La infección por VIH.....	2
1.1. Biología del VIH.....	2
1.2. Historia natural de la infección por VIH.....	5
1.3. Diagnóstico de la infección por VIH	6
1.4. Tratamientos Antirretrovirales	8
1.5. Resistencias del VIH-1 a los antirretrovirales.....	10
2. Epidemiología de la infección por VIH.....	13
2.1. La pandemia del VIH.....	13
2.2. Características de la epidemia de VIH en Cataluña y España.....	14
2.3. Inmigración y VIH en Cataluña y España.....	16
2.4. Epidemiología de las resistencias transmitidas	17
2.5. Distribución de los subtipos del VIH-1	19
3. Tests para la identificación de infecciones recientes por VIH-1.....	21
3.1. Antecedentes.....	21
3.2. <i>Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversions</i> y enzimoimmunoensayo de captura BED.....	22
3.3. Otros tests serológicos.....	25
3.4. Limitaciones	27
4. Aplicaciones de los tests serológicos para identificar infecciones recientes en Salud Pública.....	29
4.1. Terminología.....	29
4.2. Algoritmos para identificar infecciones recientes	29

4.3.	Epidemiología de las infecciones recientes.....	33
4.4.	Resistencias transmitidas en pacientes identificados con infección reciente	35
	JUSTIFICACIÓN.....	37
	OBJETIVOS.....	39
	MÉTODOS Y RESULTADOS.....	43
	ARTÍCULO I	45
	ARTÍCULO II.....	55
	ARTÍCULO III	67
	ARTÍCULO IV.....	75
	ANEXO.....	87
	DISCUSIÓN.....	109
	CONCLUSIONES.....	119
	RECOMENDACIONES.....	125
	BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribunucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

AZT: Zidovudina

BED-CEIA: Enzimoimmunoensayo de captura BED

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CEEISCAT: Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya

CRF: Forma Recombinante Circulante (*Circulating Recombinant Form*)

DO: Densidad Óptica

ECDC: *European Center for Disease Prevention and Control*

EIA: Enzimoimmunoensayo

FRR: Tasa de Falsos Positivos (*False Recent Rate*)

HSH: Hombres que tienen Sexo con Hombres

IAS: *International AIDS Society*

IP: Inhibidores de la Proteasa

ITIAN: Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósidos

ITINAN: Inhibidores de la Transcriptasa Inversa No Análogos de Nucleósidos

ITS: Infección de Transmisión Sexual

MAA: Algoritmo Multi-Ensayo (*Multi-Assay Algorithm*)

OMS /WHO: Organización Mundial de la Salud / *World Health Organization*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

RITA: Algoritmo para Identificar Infecciones Recientes (*Recent Infection Testing Algorithm*)

RT: Resistencias Transmitidas

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIVES: Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del SIDA/VIH/ITS

STARHS: *Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversions*

TARGA: Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad

TI: Transcriptasa Inversa

TRI: Test para detectar Infecciones Recientes (*Test for Recent Infection*)

UDVP: Usuarios de Droga por Vía Parenteral

ABREVIATURAS

UNAIDS: *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*

URF: Forma Recombinante Única (*Unique Recombinant Form*)

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

VIH-2: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura de la partícula de VIH y proteínas codificadas por el virus.....	2
Figura 2. Estructura codificante del genoma del VIH	2
Figura 3. Ciclo vital del VIH	3
Figura 4. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos durante la infección por VIH...6	
Figura 5. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos durante la infección aguda y reciente por VIH	7
Figura 6. Cronograma de las estrategias terapéuticas frente el VIH-1 desde los inicios de la epidemia	8
Tabla 1. Fármacos antirretrovirales por familias	9
Figura 7. Ejemplo de una secuencia genética de VIH en formato FASTA.....	12
Figura 8. Nomenclatura de las mutaciones.....	12
Figura 9. Prevalencia global de VIH, 2012	13
Figura 10. Evolución de los nuevos diagnósticos de VIH por vía de transmisión, Cataluña (2001 – 2011).....	15
Figura 11. Evolución del diagnóstico tardío y enfermedad avanzada en los nuevos diagnósticos de infección por VIH en la cohorte PISCIS (1998 – 2011).....	16
Figura 12. Distribución de subtipos y CRFs del VIH-1 en el mundo.....	20
Figura 13. Cinética de los marcadores virológicos y la respuesta inmunitaria usados para definir estados transitorios en las primeras fases de la infección por VIH	22
Figura 14. Fundamento del test STARHS.....	23
Fuente: Adaptado de. Murphy G, <i>et al.</i> 2008 (71)	23
Figura 15. Esquema de las diferentes etapas del test BED-CEIA.....	25
Tabla 2. Tests para la identificación de infecciones recientes por VIH	26
Figura 16. Principios que sustentan los tests serológicos para identificar infecciones recientes ...	28
Figura 17. Ejemplo de un RITA que sólo usa un TRI.....	30
Figura 18. Ejemplo de un RITA que usa un TRI e información clínica y de laboratorio	31
Figura 19. Ejemplo de un RITA, usando dos TRIs e información clínica y de laboratorio	32
Tabla 3 Prevalencias de infección reciente.....	34
Tabla 4. Prevalencias de resistencias transmitidas en pacientes con infección reciente por VIH...36	
Tabla 5. Estimaciones de incidencia de VIH, usando tests serológicos para identificar infecciones recientes	91

INTRODUCCIÓN

1. La infección por VIH

1.1. Biología del VIH

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, virus ARN que replican a través de un intermediario de ADN mediante una transcriptasa inversa. Dentro de los retrovirus, pertenece a la subfamilia *Lentiviridae*. Es una partícula esférica de 80 a 100 nm, estructurada en tres capas: la capa interna o nucleoide, que contiene ARN, la nucleoproteína y algunos enzimas, una cápside icosaédrica y un envoltorio derivado de la célula anfitriona, donde se insertan las glicoproteínas en 72 proyecciones externas y los antígenos de histocompatibilidad de clases I y II que derivan de la célula anfitriona. El genoma del virus es ARN de cadena única, formado por dos hebras idénticas, de polaridad positiva (Figura 1)(1).

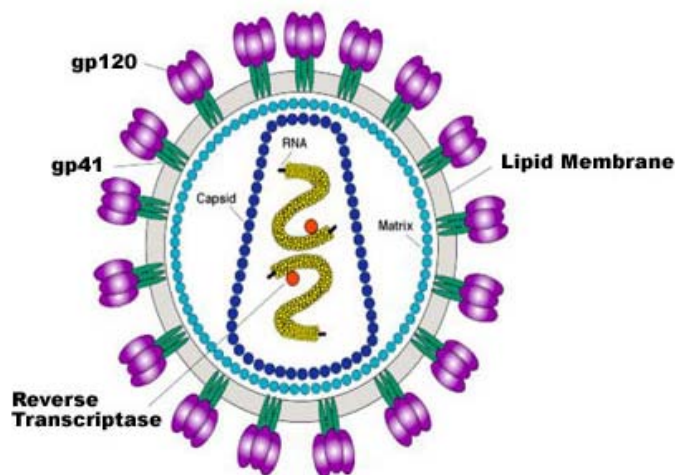


Figura 1. Estructura de la partícula de VIH y proteínas codificadas por el virus

Fuente: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Niaid-hiv-virion.jpg>

El virus del VIH (tipos 1 y 2) posee una gran variedad de genes y proteínas reguladoras (Figura 2), que condicionan la interacción virus-célula y, por tanto, la patogenia de la enfermedad. (1).

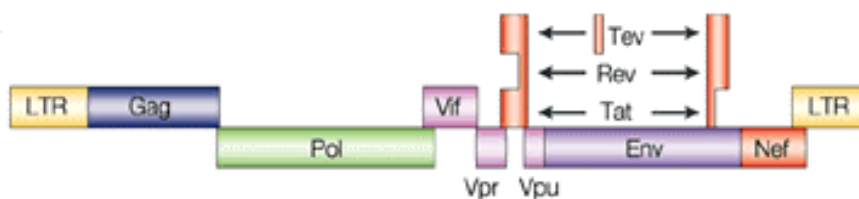


Figura 2. Estructura codificante del genoma del VIH

Fuente: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_genome.png?uselang=es

El ciclo vital del VIH consta de diferentes etapas. En primer lugar, el virus se une a su receptor celular, la proteína CD4 presente en la superficie de los linfocitos T. Esta unión no es suficiente para la fusión de las membranas, y es necesaria la participación del co-receptor CCR5 o CXCR4. La unión induce cambios estructurales que permiten la fusión de las membranas y es entonces cuando el material genético entra en la célula. A continuación la transcriptasa inversa cataliza la formación del provirus en forma de doble cadena de ADN, que se integra en el genoma de la célula anfitriona. A partir del provirus se transcriben los ARN mensajeros que codificarán las proteínas correspondientes, que se unirán al ARN genómico vírico, constituyendo la partícula que emerge por gemación a través de la membrana celular. (Figura 3)(1).

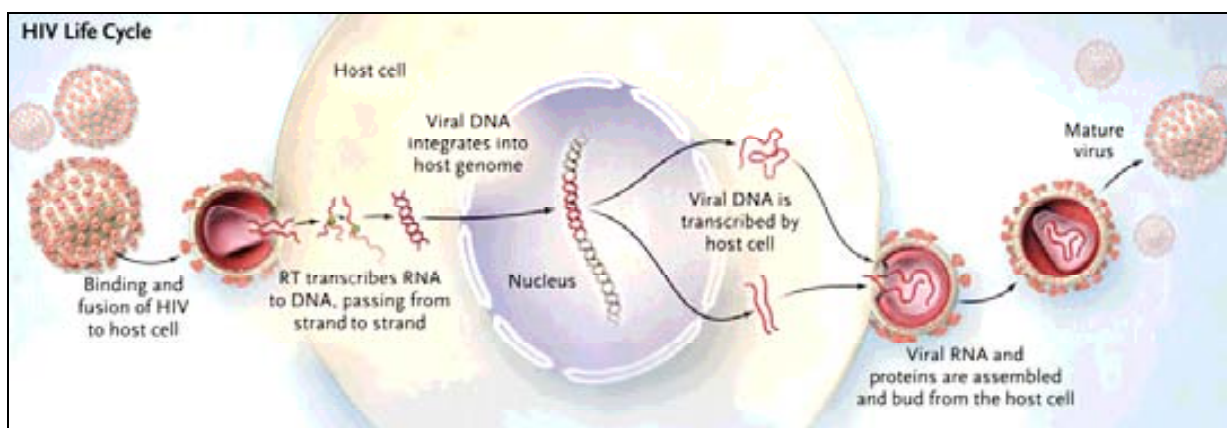


Figura 3. **Ciclo vital del VIH**
Fuente: Taylor BS, *et al.* 2008 (2).

Hay dos tipos de VIH: el VIH-1 y el VIH-2, siendo el VIH-1 el virus más extendido y virulento. Análisis filogenéticos sugieren que se produjeron tres eventos de transmisión independientes a principios del siglo XX, dando lugar a tres grupos de VIH-1: el grupo M (entre 1915 y 1941), el mayoritario en la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), el grupo O (outlier o marginal) del que se han descrito algunos cientos de casos, la mayoría procedentes de Camerún, y el grupo N (no mayoritario y no marginal), del que sólo hay 6 casos caracterizados en Camerún. Se especula en que el VIH-1 se extendió entre los humanos a lo largo del río Congo hasta Kinshasa, Zaire, donde se ha trazado el primer caso documentado de infección por VIH-1 (dentro del grupo M) en humanos en una muestra de sangre de 1959 (1). El VIH-2 es menos virulento y está extendido principalmente por África Occidental, aunque también en Portugal, Angola, Mozambique e India. (3). El grupo M es el grupo de VIH-1 circulante mayoritario. Se ha dividido en subtipos, llamados con letras, y sub-subtipos, llamados con números. Los subtipos A1, A2, A3, A4, B, C, D, F1, F2, G, H, J, y K son los subtipos de VIH-1 actualmente reconocidos (4).

Además de los distintos subtipos, también se pueden identificar Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) y Formas Recombinantes Únicas (URFs). Las CRFs y URFs son el resultado de la recombinación entre dos subtipos dentro de una persona infectada por dos subtipos, y a partir de la cual las formas recombinantes son transmitidas a otras personas. La progenie recombinante se clasifica como CRF si se identifican en tres o más personas que no tienen un vínculo epidemiológico directo; y si no es así, se describen como URFs (2).

La transmisión del virus del VIH se conoce que es posible a través de tres vías: por vía parenteral (transfusiones, uso de drogas por vía parenteral), por vía perinatal o maternoinfantil (transmisión transplacentaria, durante el parto o a través de la leche materna) o a través de las mucosas (relaciones sexuales) (1, 5). La eficiencia de la transmisión del virus mediante el acto de compartir el material de inyección entre los usuarios de droga por vía parenteral (UDVP) es mayor que la de las relaciones sexuales (6). Otras vías consideradas de contagio parenteral son los accidentes por pinchazo, aunque con un riesgo muy bajo de transmisión (7, 8); así como los casos esporádicos, descritos en la literatura, infectados a través de posibles heridas microscópicas en piel y por mordiscos (9, 10).

En cuanto a la transmisión sexual del virus, se conoce que la transmisión entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) es mayor que la heterosexual, debido a las características de su conducta sexual; en general, un mayor número de parejas, y prácticas con mayor potencial de lesionar las mucosas (11, 12). En cuanto a la transmisión heterosexual es más eficiente de hombre a mujer; debido a un mayor volumen y concentración de virus en el semen que en el fluido cérvico-vaginal, y mayor tiempo de exposición en el caso de la mujer (6). Otros factores que al margen de las características de la relación sexual pueden estar asociados a un mayor riesgo de transmisión del VIH son las co-infecciones con otras infecciones de transmisión sexual (ITS) (13). La presencia de úlceras genitales hace que la transmisión del virus sea más fácil (14).

La transmisión madre-hijo es posible en tres niveles: durante la gestación (transmisión placentaria), durante el parto y post-natal, mediante la leche materna (15). Entre los factores de riesgo que favorecen la transmisión se han descrito los siguientes:

- A) Relacionados con la madre: enfermedad avanzada, cargas víricas plasmáticas elevadas, tabaquismo, uso de drogas por vía parenteral.
- B) Relacionados con problemas obstétricos: ruptura de membranas prolongada durante más de 4 horas, presencia de corioamnionitis, parto vaginal.
- C) Relacionados con el feto o el recién nacido: ingesta de leche materna, prematuridad, baja edad gestacional.

1.2. Historia natural de la infección por VIH

El VIH es el agente causal de una enfermedad de curso más o menos prolongado que culmina con una destrucción prácticamente completa de los linfocitos CD4+. Una vez el virus ha entrado en el organismo, se inicia una infección en la que se pueden diferenciar distintas fases relativamente bien definidas, aunque no siempre se identifican clínicamente, y con una duración variable que depende de diferentes factores relacionados con el virus y con el hospedador (1). La historia natural de la infección puede diferenciarse en las siguientes fases: (i) fase aguda, desde el momento de la infección hasta que se produce la seroconversión; (ii) fase crónica, que puede ser más o menos sintomática y de duración variable; y (iii) fase final, a partir del diagnóstico de SIDA.

La fase aguda (también conocida como primoinfección, o infección primaria) comprende las primeras 2 – 4 semanas después de la entrada del virus en el organismo, y en más de un 50% de los casos se produce un cuadro clínico de infección aguda de intensidad variable y caracterizado normalmente por fiebre, cefalea, adenopatías, mialgias y *rash* denominado síndrome mononucleósido por su similitud con la mononucleosis infecciosa producida por el virus Epstein-Barr (16). A la semana del inicio de los síntomas se puede detectar en el plasma cargas víricas elevadas (entre 10^5 y 10^7 copias/ml) (17), y en un tiempo aproximado de 19 semanas se desencadena la respuesta inmunitaria específica (18), que reduce la carga vírica plasmática, de manera temporal, hasta alcanzar una situación de equilibrio a los 6 y 12 meses, y que situará la carga vírica plasmática entre 10^2 y 10^6 copias/ml (16) (Figura 4). A partir de este momento se inicia la fase crónica. En esta fase la carga vírica plasmática se reduce aproximadamente 100 veces con el desarrollo de la respuesta inmunitaria (19). La velocidad de progresión a SIDA no es la misma para todos los pacientes, siendo la carga vírica plasmática el principal factor pronóstico del tiempo de evolución. Se pueden definir tres grupos de velocidades de progresión: progresores rápidos (5 – 10%), progresores típicos (80 – 90%) y progresores lentos (también conocidos como *elite controllers* o *long-term non-progressors*) (5 – 10%) (1).

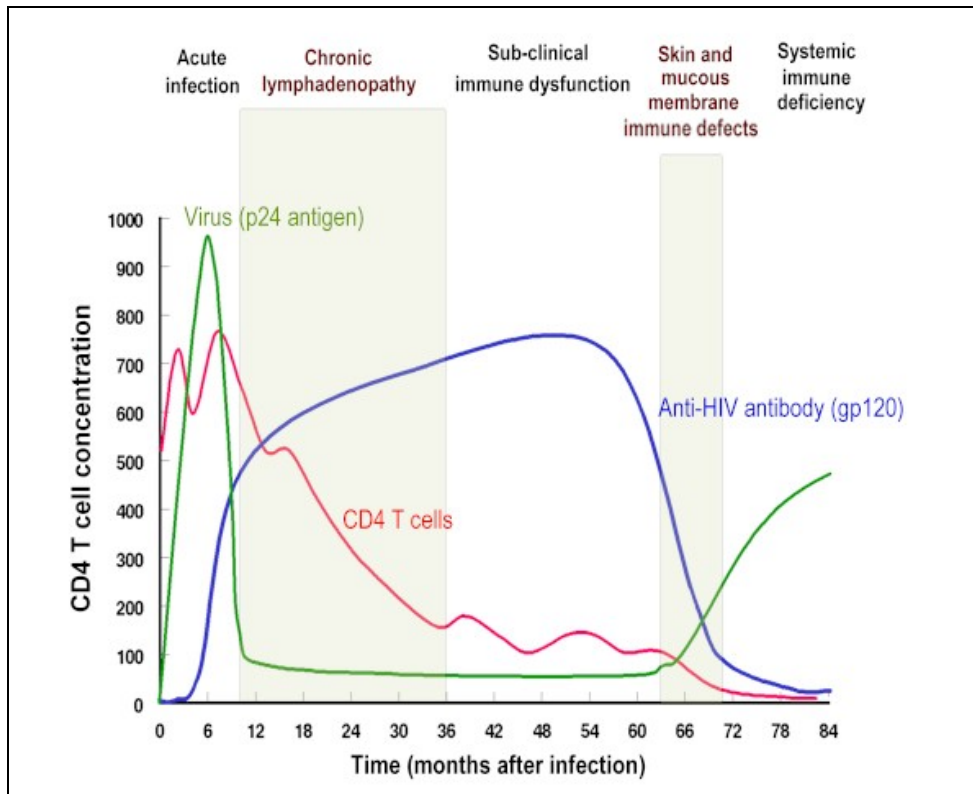


Figura 4. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos durante la infección por VIH

Fuente: <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/hiv3.htm>

La fase final de la infección o SIDA se caracteriza por ser una fase con recuentos de linfocitos CD4+ inferiores a 200 células/ μ l, aumento de la tasa de replicación vírica y descenso de la actividad de los linfocitos T citotóxicos anti-VIH (1). El deterioro del sistema inmunitario provocado por el VIH hace que el individuo sea susceptible a infecciones oportunistas (infección por *Pneumocystis jirovecii*, tuberculosis, entre otras) u otros signos o síntomas clínicos, así como cánceres definitorios de SIDA (Sarcoma de Kaposi, por ejemplo) (20).

1.3. Diagnóstico de la infección por VIH

El diagnóstico de la infección por VIH sólo puede establecerse de manera definitiva por métodos de laboratorio, ya que las manifestaciones clínicas son inespecíficas en cualquier estadio de la enfermedad (1). La seropositividad se define mediante la demostración de anticuerpos frente a las proteínas víricas, con reactividad repetida en las pruebas de cribado y además con las pruebas de confirmación (21).

El primer marcador biológico que podemos detectar es la viremia plasmática (presencia de ARN del virus en el plasma), que ocurre hacia el séptimo día después de la infección. El ARN del

virus se detecta mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas están basadas en las propiedades del ARN y del ADN, que es la complementariedad de la secuencia (22). Los tests que incorporan la detección de antígeno p24 son positivos 7 días después de observarse viremia, mientras que los basados en la identificación de anticuerpos son positivos de 21 a 28 días después del episodio de primoinfección (23). El resto de anticuerpos aparecen de manera progresiva en las siguientes semanas, siendo el dirigido frente a la proteína p31 el último en aparecer (Figura 5) (24).

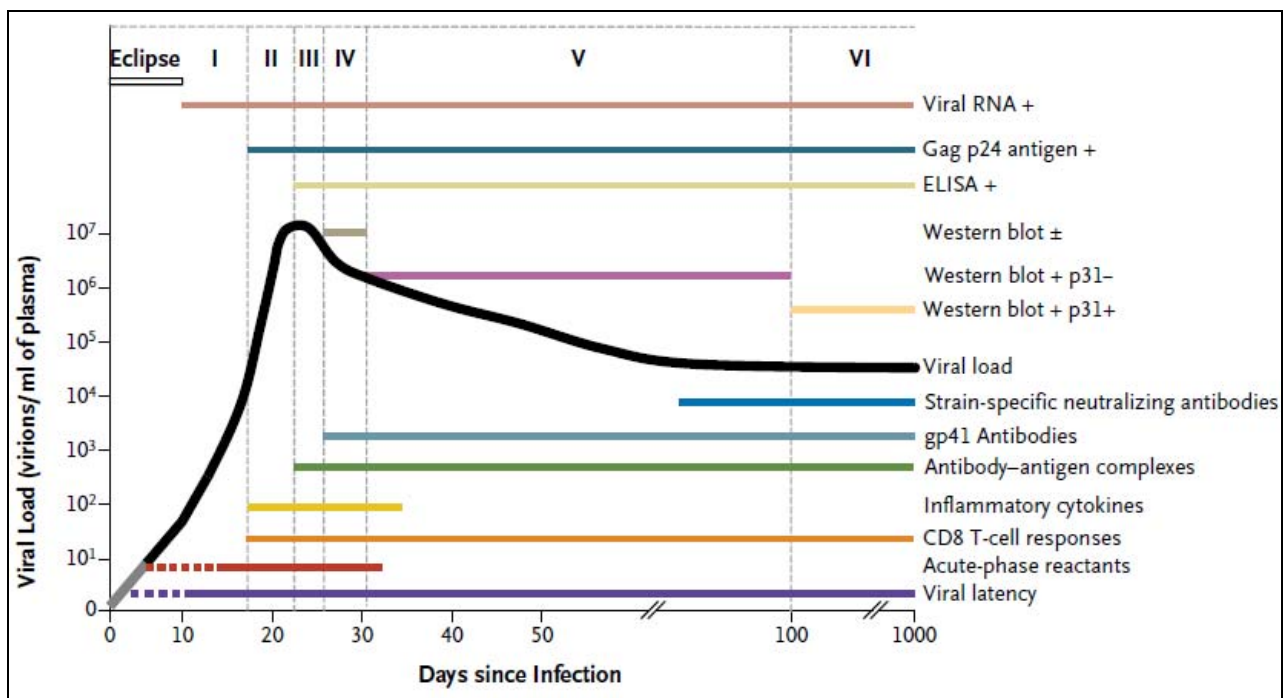


Figura 5. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos durante la infección aguda y reciente por VIH

Fuente: Cohen *et al.* 2011 (24)

La determinación de anticuerpos mediante ensayos de inmunoenzimología (EIA) es la metodología más utilizada para la identificación de individuos infectados por VIH, y es la estrategia que se utiliza como prueba de cribado. Un concepto importante en el diagnóstico del VIH es el de periodo ventana, que es el tiempo que transcurre entre la infección por VIH y la producción de un nivel de anticuerpos detectable por el EIA (24).

Una vez se obtiene un resultado positivo en el EIA de cribado, es necesario realizar la prueba confirmatoria. El Western blot o el Inno-lia son los métodos más utilizados para la confirmación de los resultados obtenidos con las pruebas de cribado. Estas técnicas detectan los antígenos víricos, es decir las proteínas que forman parte del virus (1).

1.4. Tratamientos Antirretrovirales

El primer ensayo clínico con un medicamento con actividad antirretroviral (la zidovudina, o AZT), un nucleósido análogo de la timidina que inhibe la transcriptasa inversa, se realizó en 1986 (25). Se incluyeron pacientes con una infección por el VIH-1 en fase muy avanzada y se demostró una reducción significativa de la mortalidad frente a la rama placebo, lo que obligó a interrumpir el ensayo clínico cuando la duración del seguimiento sólo era de 6 meses. Sin embargo, pronto se pondría en evidencia que se trataba de un efecto transitorio. Desde entonces, han tenido que pasar más de 20 años para que se llegaran a comercializar más de 20 medicamentos con actividad frente al VIH-1 (1). En la Figura 6 se representan las diferentes estrategias terapéuticas frente al VIH-1 a lo largo del tiempo.

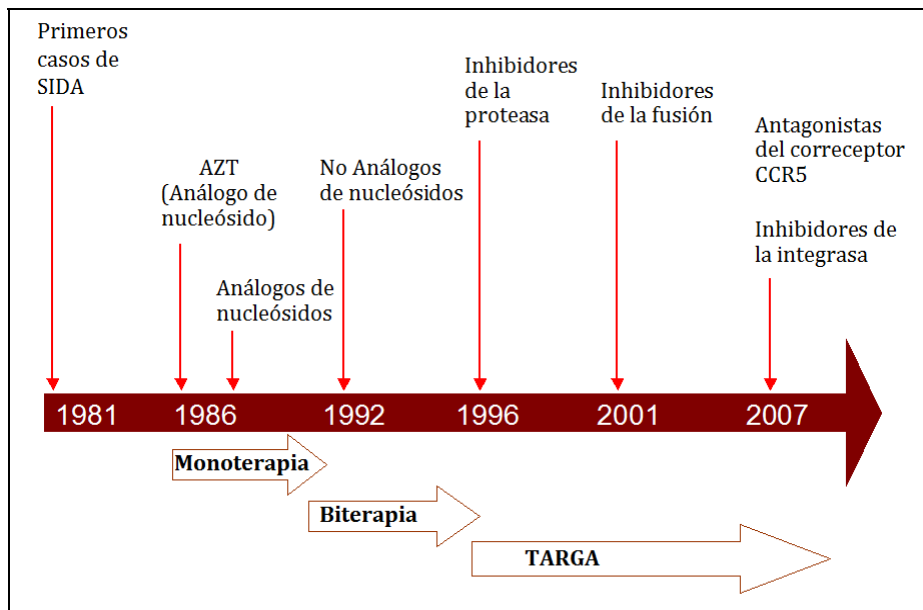


Figura 6. Cronograma de las estrategias terapéuticas frente el VIH-1 desde los inicios de la epidemia

Actualmente se dispone de más de 20 fármacos antirretrovirales comercializados en España, que se agrupan por familias en función de la diana terapéutica sobre la que actúan (Tabla 1) (1). Los fármacos antirretrovirales que inhiben la transcriptasa inversa del VIH-1 reciben el nombre de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos o no análogos de los nucleósidos (ITIAN o ITINAN) según sea su estructura química; y los que inhiben la actividad de la proteasa se conocen como inhibidores de la proteasa (IP). Los IP actúan de forma específica bloqueando el procesamiento por parte de la proteasa vírica de moléculas polipeptídicas, necesarias para la maduración completa del virus y la formación de partículas infecciosas. Los análogos de nucleósidos actúan compitiendo por el sustrato natural del enzima, los deoxinucleósidos. La

incorporación de un análogo de nucleósido al centro activo de la transcriptasa inversa bloquea la entrada de nuevos deoxinucleósidos y la elongación de la cadena de ADN en curso. En cambio, los no análogos de nucleósidos no compiten por el centro activo de la transcriptasa inversa, sino que interaccionan en un dominio próximo al centro activo, dificultando la movilidad de la transcriptasa inversa y bloqueando la polimerización del ADN. (26).

Familia	Fármaco
ITIAN	Zidovudina (AZT)
	Didanosina (ddl)
	Estavudina (d4T)
	Lamivudina (3TC)
	Emtricitabina (FTC)
	Abacavir (ABC)
	Tenofovir (TDF)
ITINAN	Nevirapina
	Efavirenz
	Etravirina
IP	Indinavir
	Ritonavir
	Saquinavir
	Fosamprenavir
	Lopinavir
	Atazanavir
	Darunavir
	Tipranavir
Inhibidores de la fusión	Enfuvirtida (T20)
Inhibidores de la integrasa	Raltegravir
Antagonistas del correceptor CCR5	Maraviroc

Tabla 1. Fármacos antirretrovirales por familias

Fuente: Gatell JM, *et al.* 2007 (1)

También se ha conseguido inhibir la replicación del VIH-1 mediante medicamentos dirigidos a otras dianas, como pueden ser los complejos procesos de adherencia vírica y fusión con las células del hospedador (inhibidores de la fusión), así como la integración del ADN provírico en el ADN celular (inhibidores de la integrasa) (27). Por último también se ha conseguido inhibir la entrada del VIH-1 al bloquear la entrada de uno de los co-receptores de quimiocinas (CCR5) (28).

En 1996 se empezaron a comercializar los inhibidores de la proteasa, y fue entonces cuando se propuso un cambio de estrategia consistente en combinar siempre tres o más medicamentos (Figura 6). Esta nueva estrategia se conoce como Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad

(TARGA), y supuso un aumento del tiempo de progresión a SIDA, así como la disminución de la mortalidad relacionada con infecciones oportunistas y las neoplasias asociadas al SIDA (29, 30) .

1.5. Resistencias del VIH-1 a los antirretrovirales

El desarrollo de resistencias es consecuencia, sobretodo, de la alta dinámica de replicación del VIH-1 que se produce durante todo el proceso de la enfermedad. Además, el VIH-1 no tiene la actividad correctora de las ADN-polimerasas que preservan la composición genética de los organismos de ADN de doble cadena (1). Estos factores conllevan a la alta diversidad genética de la población de virus VIH-1 que se encuentran en un individuo infectado. Este conjunto de cepas de VIH distintas genéticamente se conoce con el nombre de cuasiespecies (31).

Las mutaciones (cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN) en el genoma del virus pueden tener distintos efectos sobre el *fitness* (la capacidad replicativa del virus). Uno de ellos es el de provocar un efecto neutral, por lo que no afecta a la capacidad replicativa del virus. Otro sería un efecto deletéreo, esto quiere decir que las variantes víricas se replican con una menor eficiencia respecto la cepa sin mutaciones (o *wild type*). Finalmente, las mutaciones también pueden tener un efecto resistente, lo cual significa que las cepas son capaces de replicarse bajo presión farmacológica. Es importante destacar que las cepas con mutaciones con efecto resistente presentan un menor *fitness* que las cepas *wild type* (31).

La supresión incompleta de la replicación vírica en individuos que están recibiendo terapias subóptimas, que presentan baja adherencia al tratamiento o por fenómenos de mala absorción, es uno de los factores implicados en la emergencia y evolución de cepas resistentes a los antirretrovirales. Las mutaciones que surgen y se seleccionan bajo terapia antirretroviral permiten al virus resistente escapar del efecto inhibitorio del fármaco sobre su replicación (31).

Según el momento de adquisición de las resistencias podemos diferenciar entre resistencias transmitidas, detectadas en pacientes que no han recibido tratamiento antirretroviral, y resistencias adquiridas, detectadas en pacientes que han recibido tratamiento antirretroviral.

Las mutaciones también se pueden clasificar según el momento en que se desarrollan las resistencias, a partir de la presión farmacológica, dando lugar a dos definiciones:

- Mutaciones primarias: son aquellas mutaciones seleccionadas en el inicio del proceso del desarrollo de resistencias a un fármaco. Estas mutaciones pueden estar seleccionadas o favorecidas después de la aparición de mutaciones secundarias, y presentan un alto grado de especificidad por un tipo de fármaco que compromete significativamente la susceptibilidad del virus frente a ese fármaco.

- Mutaciones secundarias: son mutaciones que tienden a acumularse en el genoma vírico que ya contiene una o más mutaciones primarias previas. Estas mutaciones pueden tener un cierto efecto o ninguno sobre el nivel de resistencia. Algunas mutaciones secundarias pueden favorecer la replicación vírica aumentando la capacidad replicativa del virus.

Las mutaciones asociadas a resistencia también pueden clasificarse según la familia de fármaco antirretroviral que las ha seleccionado, y podemos hablar de mutaciones resistentes a los inhibidores de la transcriptasa inversa (análogos o no análogos) y mutaciones resistentes a los inhibidores de la proteasa (31). En relación con las familias de fármacos que se han introducido de manera más reciente, ya existen algunos estudios que reportan la presencia de cepas de VIH-1 con resistencias a los antagonistas del co-receptor CCR5 (Maraviroc) (32), a los inhibidores de la fusión (Enfuvirtida) (33) y también a los inhibidores de la integrasa (Raltegravir) (34).

La barrera genética es el número de mutaciones necesario para reducir la actividad antiviral de un fármaco, y se puede clasificar en baja (la pérdida de actividad antivírica se pierde por la aparición o selección de una única mutación) o alta (la pérdida de actividad antivírica se pierde después de la aparición o selección de múltiples mutaciones) (31).

En general, la resistencia a un determinado fármaco es el resultado de mutaciones en un número de posiciones determinadas en el gen que codifica la proteína sobre la que actúa dicho fármaco. Por lo tanto, determinando la composición de aminoácidos en un número de posiciones en el genoma del VIH-1, es posible deducir el nivel de resistencia. Los tests genotípicos determinan la secuencia genética, mediante técnicas de secuenciación de ADN, de una gran parte del gen *pol*, en la que se codifican la retrotranscriptasa inversa y la proteasa. Estas técnicas permiten obtener la secuencia de nucleótidos del virus en un formato conocido como secuencia FASTA. Este formato consiste en un fichero informático de texto que contiene la secuencia de nucleótidos del virus. Cada nucleótido está representado por una letra, y ocupa la misma posición que ocuparía en el gen (Figura 7).

Mediante un algoritmo de interpretación es posible obtener las mutaciones observadas en la secuencia de interés, con relación a una secuencia consenso de VIH-1. Estas mutaciones se expresan por la posición que ocupan en el gen, precedido por la letra correspondiente al aminoácido encontrado en el virus *wild-type*, y seguido por el aminoácido mutado (Figura 8). Actualmente existen numerosos algoritmos disponibles *on-line* para interpretar las secuencias en formato FASTA, y muchos de ellos son de libre acceso, como el proporcionado por la Universidad de Stanford (disponible en <http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>) (31).

```
>A012_2
.....
.....
.....GTA
TTTGCCATAAAGAAAAARAACAGTACTAGATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTT
AATAAAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGGTTA
AAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTCAATTCCCTTA
GATAAGGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAAACAACGAGACACCA
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAAGGATGGAAGGGATCACCAGCAATATTC
CAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAACAAAACCCAGACATAGTTATC
TATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAACA
AAAATAGAGGAACTGAGAGAACATCTGTTAAAAGTGGGGATTGTTACACCAGACCAAAAA
CATCAGAAAAGAACCTCCATTTCTTTGGATGGGYTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA
GTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAAGAC
```

Figura 7. **Ejemplo de una secuencia genética de VIH en formato FASTA**
Fuente: hivdb.stanford.edu

NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES			AMINOÁCIDOS
<u>Primera letra</u>	<u>Número</u>	<u>Última letra</u>	A Alanina
			R Arginina
			N Asparagina
			D Ácido aspártico
			C Cisteína
			Q Glutamina
			E Ácido glutámico
			G Glicina
			H Histidina
			I Isoleucina
			L Leucina
			K Lisina
			M Metionina
			F Fenilalanina
			P Prolina
			S Serina
			T Treonina
			W Triptófano
			Y Tirosina
			V Valina
Ejemplos:			
L90M	Cambio de leucina a metionina en el codón 90 del gen de la proteasa		
M184V	Cambio de metionina a valina en el codón 184 del gen de la retrotranscriptasa		

Figura 8. **Nomenclatura de las mutaciones**
Fuente: Clotet *et al.* 2008 (31)

2. Epidemiología de la infección por VIH

2.1. La pandemia del VIH

Los primeros casos de SIDA se describieron hace más de 30 años en las ciudades de Los Ángeles y Nueva York (35, 36). Desde entonces, la epidemia de la infección por VIH se ha propagado por todo el mundo, de manera que es posible hablar de pandemia del VIH (1). El programa de SIDA de las Naciones Unidas (UNAIDS) estima que hasta diciembre de 2012 el número de personas en el mundo que viven con VIH es de 35,3 millones, de las cuales 25,0 millones (71%) se encuentran en la región del África Subsahariana (Figura 9) (38).

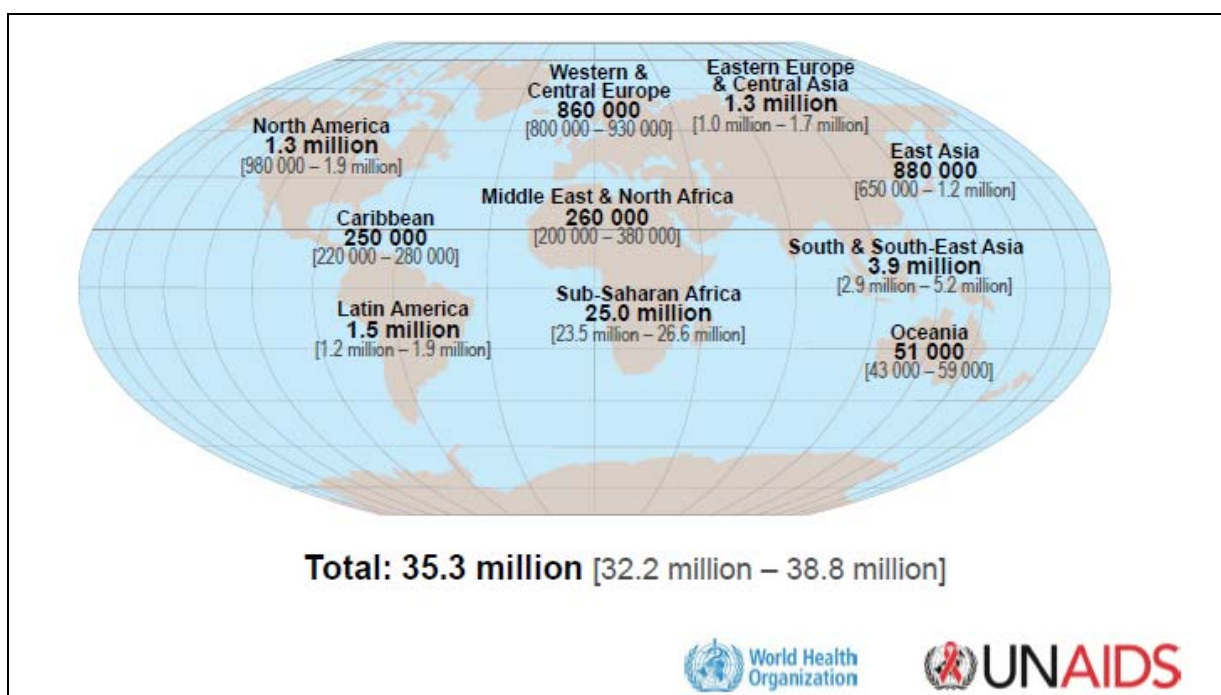


Figura 9. Prevalencia global de VIH, 2012

Fuente: Informe UNAIDS 2013 (38)

Globalmente, en el año 2012 el número anual de nuevas infecciones por VIH ha disminuido respecto años anteriores. En el año 2012 se estima que se produjeron 2,3 millones de nuevas infecciones, un valor inferior al del año 1999 (3,1 millones), y al del 1997 (3,2 millones). Aún así, a pesar de la disminución en el número de nuevas infecciones, la magnitud de las nuevas infecciones sigue siendo considerablemente alta. Este hecho, junto con la reducción de la mortalidad relacionada con el SIDA, hace que el número de personas que viven con VIH siga aumentando en todo el mundo (39).

En relación con la principal forma de transmisión del VIH, actualmente la mayoría de transmisiones se producen a través de las relaciones sexuales desprotegidas. En la región del África Subsahariana la transmisión del virus se produce principalmente por vía heterosexual, mientras que en los países desarrollados (Norte de América y Europa Occidental) la epidemia de VIH entre HSH está experimentando una resurgencia (40). En la región de Europa del Este el número de casos ha aumentado sustancialmente, principalmente debido a un aumento de los casos adquiridos por los UDVP, pero también se está observando un aumento de los casos adquiridos por vía heterosexual (41).

2.2. Características de la epidemia de VIH en Cataluña y España

En sus inicios, tanto en Cataluña como en España, la epidemia estuvo fuertemente ligada a los hábitos de inyección de drogas (42). Paulatinamente, la transmisión del virus se ha ido desplazando hacia la vía sexual, y actualmente la mayoría de nuevas infecciones se adquieren por esta vía. En España, en el año 2012 se notificaron 3.210 nuevos diagnósticos de VIH, representando una tasa de 8,5 por 100.000 habitantes. La mayoría de nuevos diagnósticos eran hombres (85%), tenían 36 años de mediana de edad, y en el 51% de los casos el virus se transmitió a través de relaciones entre HSH (43).

En Cataluña, la epidemia por VIH presenta características similares a las de la epidemia en el resto de España. En el registro de enfermedades de declaración individualizadas de Cataluña, el año 2011 se notificaron 609 diagnósticos de VIH, que representa una tasa global de 8,5 casos por 100.000 habitantes. La tasa de diagnósticos de VIH se ha mantenido prácticamente constante durante todo el periodo (44). Del total de nuevos diagnósticos notificados el año 2011, la mayoría eran hombres (85,9%), y en el 64,6% de los casos se habían declarado en personas entre los 20 y 39 años. En cuanto a la transmisión de la infección, las vías más probables de transmisión del virus fueron las relaciones entre HSH (61,5%), seguidas por las relaciones heterosexuales (25,4%), y la transmisión entre los UDVP (3,8%). En un 9,3% de los casos la vía de transmisión no pudo identificarse.

En el período 2001 - 2010 se ha observado un aumento del número de diagnósticos en HSH entre los nuevos diagnósticos de VIH, experimentando un incremento del 88%. En cambio, en las transmisiones heterosexuales se ha observado un descenso en el número de diagnósticos de VIH. Este descenso ha sido del 55% en los hombres heterosexuales, y del 43% en las mujeres heterosexuales. En la vía de transmisión a través del uso de drogas por vía parenteral se ha observado un importante descenso (86%) también para el mismo periodo (Figura 10) (44).

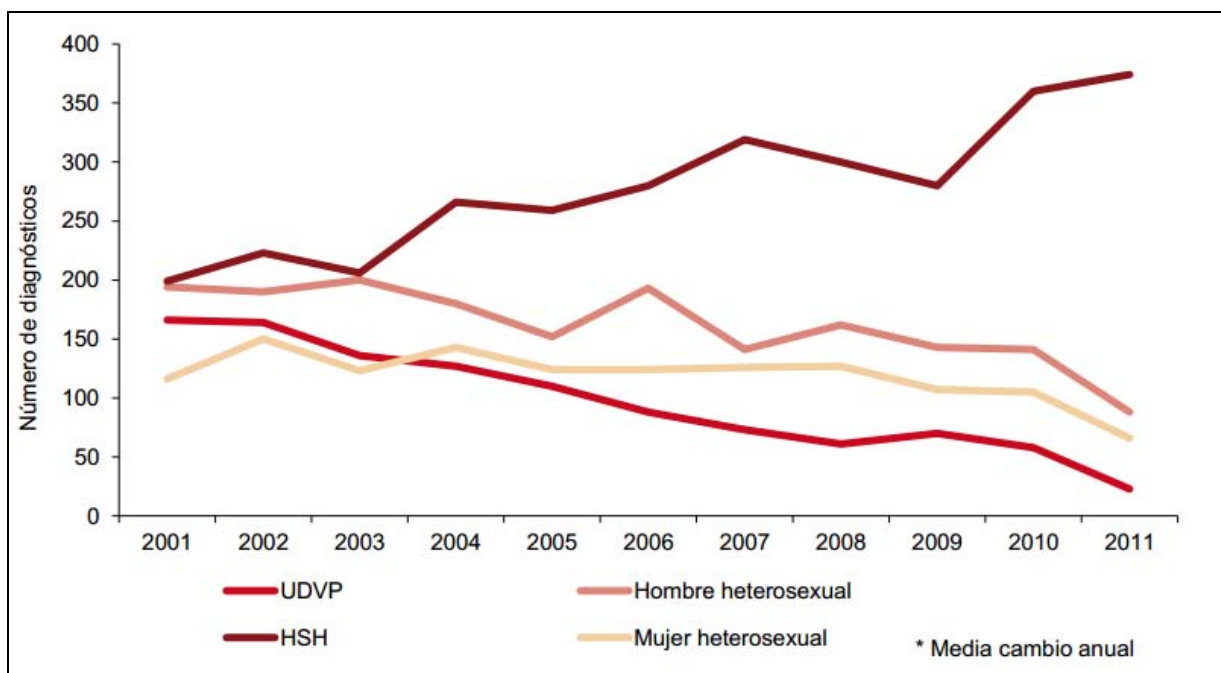


Figura 10. Evolución de los nuevos diagnósticos de VIH por vía de transmisión, Cataluña (2001 - 2011)

Fuente: Informe SIVES 2012 (44)

Otro indicador de la magnitud de la epidemia en Cataluña es el número de personas vivas con infección por VIH. Para el año 2011 se estimó que el número total de personas vivas con infección por VIH era de 33.000. Esta estimación nos indica que la prevalencia de la infección por VIH en el conjunto de la población general fue de 4,5 por cada 1.000 personas (44).

El retraso en el diagnóstico (o diagnóstico tardío) es un aspecto de especial interés en Salud Pública. A nivel individual, los pacientes que reciben el diagnóstico de VIH tardíamente presentan una peor respuesta al TARGA (45), y tienen un mayor riesgo de presentar SIDA o morir (46, 47), debido a su avanzada inmunosupresión. Por otro lado, cuanto más tiempo transcurre entre el momento de la infección y el diagnóstico, mayor probabilidad de transmitir el VIH; ya que, al no conocer que está infectado, es posible que el individuo no adopte medidas para evitar la transmisión del virus (48). Recientemente, el grupo de trabajo europeo para el consenso del diagnóstico tardío ha propuesto una nueva definición para identificar aquellos pacientes en los que el diagnóstico de VIH se produjo tardíamente: (i) presentación tardía, personas que en el momento del diagnóstico presentaron recuentos de células CD4+ inferiores a 350 células/ μ l; o (ii) presentación de enfermedad avanzada de VIH, personas que en el momento del diagnóstico presentaron recuentos de células CD4+ inferiores a 200 células/ μ l (49). En Cataluña, usando la información proporcionada por la cohorte PISCIS (una cohorte prospectiva, longitudinal y

multicéntrica de individuos infectados por el VIH en Cataluña y las Islas Baleares), se ha analizado el retraso diagnóstico teniendo en cuenta estas nuevas definiciones (49). Para el año 2010, entre los nuevos diagnósticos de VIH de la cohorte PISCIS el 41,8% presentaron diagnóstico tardío, y un 21,8% diagnóstico tardío con enfermedad avanzada de VIH. Se observó un descenso significativo en los casos de diagnóstico tardío, pasando del 57,5% en el 1998 al 44,4% en el 2010 y 38,3% en el 2011 (Figura 11) (44).

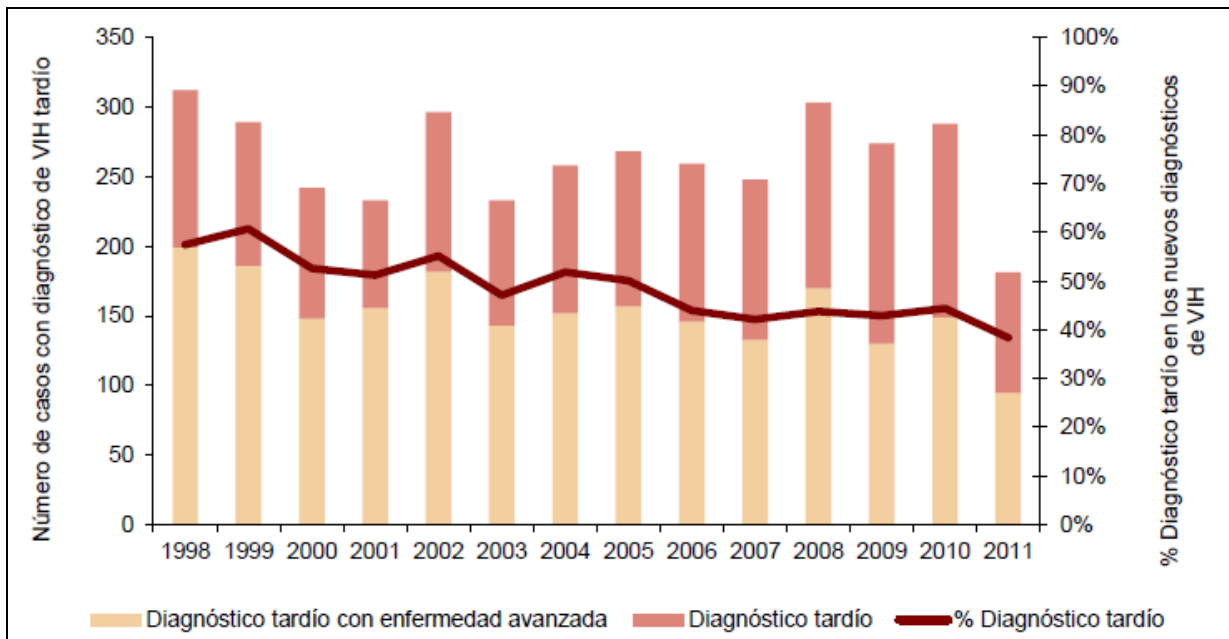


Figura 11. Evolución del diagnóstico tardío y enfermedad avanzada en los nuevos diagnósticos de infección por VIH en la cohorte PISCIS (1998 - 2011)

Fuente: Informe SIVES 2012 (44)

2.3. Inmigración y VIH en Cataluña y España

En España y Cataluña la proporción de inmigrantes entre los nuevos diagnósticos de VIH es creciente. Se ha pasado de tener en la década de los años 90 una epidemia de grandes proporciones, concentrada fundamentalmente en UDVP españoles, a una epidemia estabilizada en la que predomina la transmisión sexual, y en la que, debido a la disminución en el número de casos españoles y al fenómeno de la inmigración, los inmigrantes conforman una proporción cada vez mayor (43, 50).

A diferencia de otros países europeos, la inmigración en España es un fenómeno relativamente reciente, experimentando un fuerte aumento a partir de finales de la década de los 90. Entre 1998 y 2006 el número de extranjeros empadronados en España se multiplicó por más de 6,

representando en el año 2006 el 19,3% de la población total, y el 11% de la población de entre 15 y 64 años. Las procedencias más frecuentes han sido América del Sur, seguida de otros países de Europa Occidental, Europa del Este y Rusia y África del Norte. Las personas procedentes de África Subsahariana representan el 0,4% de los empadronados (51).

En una cohorte de 19 hospitales españoles, incluyendo nuevos diagnósticos de VIH entre 2004 y 2006 se describió el perfil clínico-epidemiológico de los pacientes en función del lugar de origen. Del total de pacientes incluidos en el estudio la tercera parte eran extranjeros, siendo América del Sur la procedencia más frecuente, representando un 56% de todos los inmigrantes. Las características epidemiológicas y sociodemográficas de los diferentes grupos reflejan la situación del VIH en sus lugares de origen. El número de sujetos procedentes del África Subsahariana fue proporcionalmente mayor respecto a la población general. Esto refleja probablemente las altas prevalencias de la infección en sus lugares de origen (51).

La proporción de inmigrantes entre los nuevos diagnósticos de VIH en Cataluña ha ido aumentando en el periodo 2001-2011, de un 24,7% en 2001 hasta un 46,1% en 2011. En global, el 62,3% procedían de América del Sur, el 14,6% de Europa Occidental y el 13,2% de África Subsahariana (44).

2.4. Epidemiología de las resistencias transmitidas

El fenómeno de las resistencias transmitidas aparece como una amenaza potencial al éxito de las terapias antirretrovirales. La transmisión de virus resistentes se produce por diferentes vías de transmisión, incluyendo contactos sexuales, mediante el uso de drogas por vía parenteral y también en la transmisión vertical (52).

En noviembre de 2005 un estudio publicado por Sax *et al.* (53) demostró que la determinación de resistencias transmitidas en los nuevos diagnósticos de VIH era coste-efectiva en poblaciones en las que la prevalencia de resistencias era superior al 1%. A partir de ese estudio, la determinación de resistencias transmitidas en los nuevos diagnósticos es una recomendación incluida en las principales guías de tratamiento antirretroviral (54-56).

Las estimaciones de prevalencia de resistencias transmitidas pueden variar en función del tipo de estudio, la localización geográfica y la población de estudio, así como los métodos usados para detectar resistencias. La eficacia de los tratamientos antirretrovirales influye de manera importante en las prevalencias de resistencias transmitidas. En un estudio se demostró que la prevalencia de resistencias transmitidas en los pacientes con infección reciente se correlacionaba

de manera inversa con la proporción de individuos con infección crónica que tenían cargas víricas indetectables (57).

Otra consideración importante en la interpretación de las estimaciones de prevalencia de resistencias transmitidas es el método usado para definir resistencia. Hasta hace relativamente poco tiempo, el enfoque más utilizado era el listado publicado por el panel de expertos de la *International AIDS Society* (58). Este listado proporciona una indicación de las mutaciones resistentes observadas bajo presión farmacológica y no está especialmente diseñado para la vigilancia de las resistencias transmitidas. Este listado se ha dejado de utilizar a favor del listado publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (59), ya que presenta un listado estandarizado de mutaciones que hace posible la comparación de prevalencias de resistencias transmitidas en diferentes momentos y regiones, facilitando el meta-análisis de los datos de vigilancia recogidos por diferentes grupos en diferentes momentos. Este listado cumple cuatro criterios para identificar las mutaciones asociadas a resistencias:

1. La mutación ha de causar o contribuir a la resistencia a un fármaco; ha de estar presente en tres o más de las cinco listas de mutaciones resistentes de paneles de expertos.
2. Las mutaciones no han de ser polimorfismos (variantes de la secuencia genética en un determinado lugar del ADN) y no se han de producir en posiciones altamente polimórficas.
3. El listado de mutaciones debe ser aplicable en los ocho subtipos más comunes de VIH-1.
4. El listado debe ser parsimonioso, excluyendo mutaciones que resultan extremadamente raras a partir de la presión farmacológica.

Estudios publicados entre el 2005 y 2006 reportan prevalencias de resistencias transmitidas entre 0% en Suecia y Chile, hasta 24,5% en San Diego (52). Inicialmente, las prevalencias más altas de resistencias transmitidas se observan en regiones y poblaciones con un uso bien establecido de las terapias antirretrovirales, incluyendo Europa Occidental, Norte de América y algunas regiones de América del Sur. En estas poblaciones, el uso de monoterapias y biterapias en la era pre-TARGA, los posteriores regímenes subóptimos en los inicios de la era TARGA y las dificultades con la adherencia y la tolerancia llevaron a la acumulación de resistencias en los pacientes con experiencia antirretroviral y, como consecuencia, a la expansión de resistencias transmitidas. Actualmente existe evidencia de una estabilización de las resistencias transmitidas en Europa (60), y en algunos casos, incluso se confirma una tendencia descendiente (61). En una reciente revisión, se estimó que la prevalencia global de resistencias transmitidas en España,

entre 1997 y 2008, fue del 10,6%, similar a la del resto de Europa (62). Por otro lado, en las áreas donde la introducción de los tratamientos antirretrovirales se ha producido recientemente, se está observando una emergencia de las resistencias. En una revisión sistemática publicada en 2011, incluyendo 38 estudios realizados en 23 países africanos, los valores observados de prevalencias de resistencias transmitidas oscilaban entre 0% y 8,6%. (63).

2.5. Distribución de los subtipos del VIH-1

El subtipo de VIH más prevalente en Europa Occidental, en el Norte de América, Australia y algunos países de América del Sur es el B. En cambio, el subtipo CRF01_AE domina el Sureste Asiático, mientras que en África Subsahariana existe una gran diversidad de subtipos y CRFs, (Figura 12) (2).

En España, el subtipo de VIH-1 más prevalente ha sido el B, aunque estudios recientes han descrito una progresión rápida de otros subtipos (64-66). Este hecho es resultado de movimientos poblacionales como la inmigración, los viajes internacionales y el contacto sexual con individuos infectados en países donde otros subtipos no-B son altamente prevalentes. En un estudio realizado en España entre los años 1995 y 2003, se demostró que un 43.2% de los pacientes sospechosos de estar infectados por un subtipo no-B (extranjeros, autóctonos que habían viajado a países donde variantes no-B son endémicas y que habían admitido mantener relaciones de riesgo, autóctonos que habían mantenido contactos sexuales con personas de estas áreas, o autóctonos que presentaban una reducción significativa de los niveles de CD4+ a pesar de tener cargas víricas bajas) realmente lo estaban. Estos investigadores encontraron una gran diversidad en las variantes y formas recombinantes del VIH-1 circulantes en España (66).

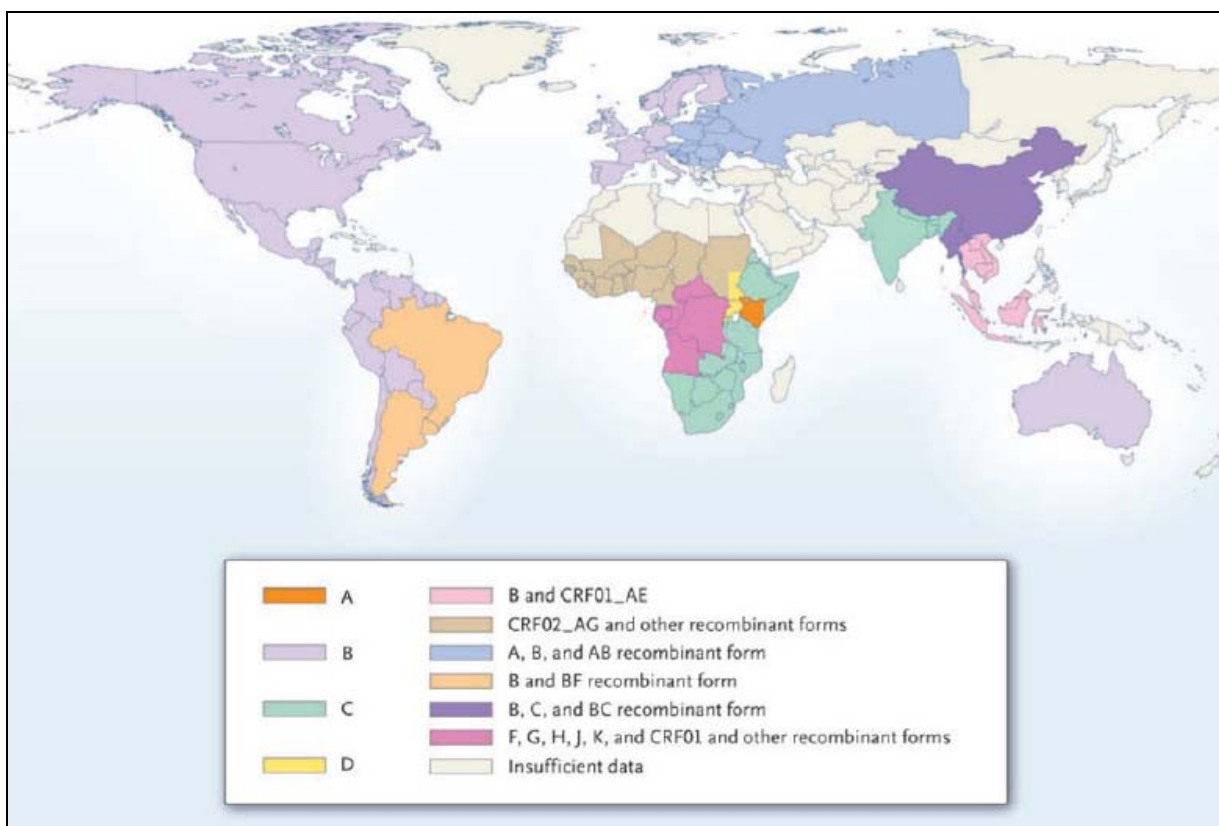


Figura 12. **Distribución de subtipos y CRFs del VIH-1 en el mundo**

Fuente: Taylor BS, *et al.* 2008 (2)

3. Tests para la identificación de infecciones recientes por VIH-1

3.1. Antecedentes

Puesto que el tiempo que transcurre entre el momento de la infección y el del diagnóstico puede ser extremadamente variable de unos individuos a otros, describir las características y tendencias de los nuevos diagnósticos de VIH, o los casos de SIDA, no revela necesariamente los patrones actuales de transmisión del virus. Es por ello que, desde el punto de vista de la Salud Pública y en el ámbito de la vigilancia epidemiológica del VIH, es especialmente relevante poder discernir de entre los pacientes que presentan un nuevo diagnóstico, las infecciones ocurridas recientemente de las establecidas o crónicas.

En 1995, Brookmeyer y Quinn presentaron una estrategia para identificar infecciones recientes, antes del momento de la seroconversión. A partir de una muestra de suero usaron un algoritmo de dos pasos combinando tests diagnósticos para la detección del antígeno p24 y anticuerpos frente al VIH. Usando este enfoque se considera que un paciente ha seroconvertido recientemente si se obtiene un resultado positivo en la detección del antígeno p24 y negativo en la detección de anticuerpos frente al VIH (67).

Posteriormente, se propuso el ARN vírico como otro marcador virológico para identificar infecciones recientes. El ARN vírico puede detectarse mediante PCR antes que el antígeno p24, y el uso mediante *pools* (analizar muestras procedentes de muchos pacientes en una misma alícuota) disminuye sustancialmente los costes (68, 69). La desventaja de este enfoque es que el tiempo durante el cual el antígeno p24 o el ARN vírico son detectables antes de la seroconversión es muy corto, menos de 50 días (Figura 13). En consecuencia, se requiere un gran volumen de muestras, o bien una elevada incidencia de VIH para identificar un número suficiente de individuos con antígeno p24 o ARN vírico detectable que no hayan seroconvertido (68).

Posteriormente, en 1998 Janssen *et al.* describieron otra estrategia para identificar infecciones recientes, el método conocido como STARHS (*Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion*). Siguiendo el mismo principio, se han desarrollado otros tests serológicos para identificar infecciones recientes a partir de estudios transversales (70, 71)

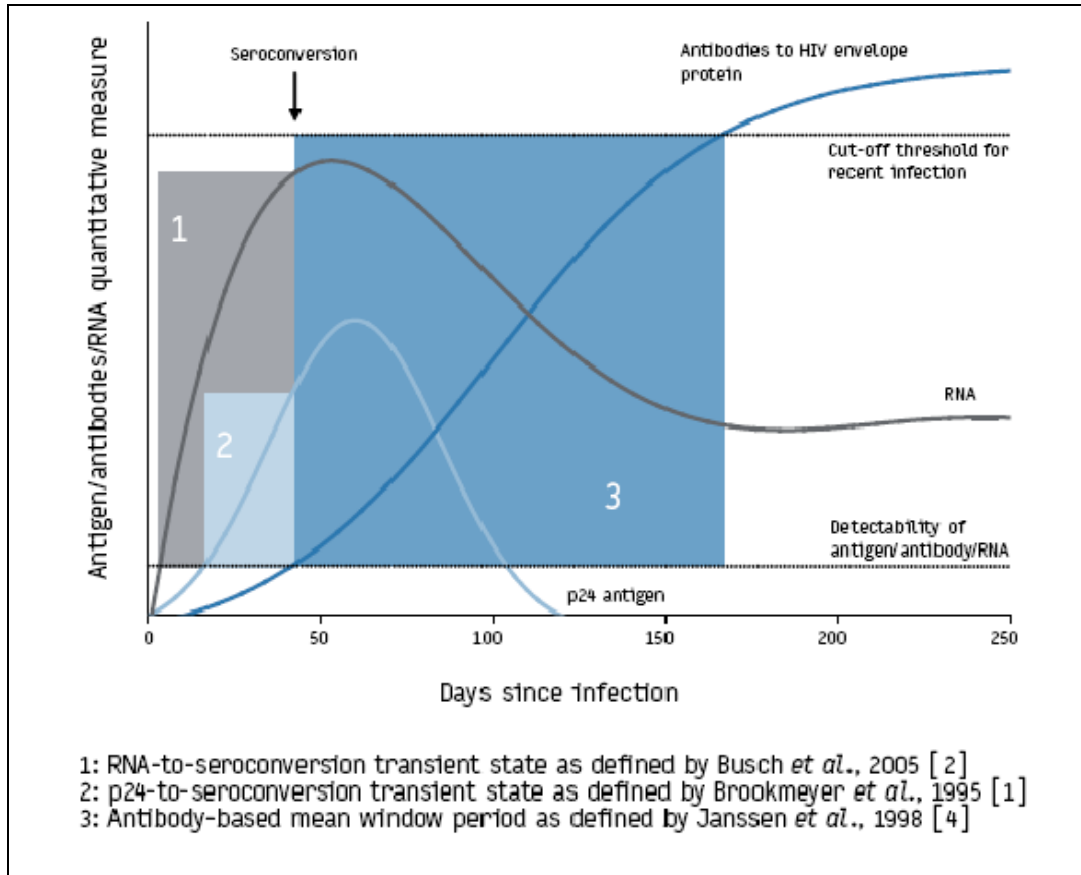


Figura 13. Cinética de los marcadores virológicos y la respuesta inmunitaria usados para definir estados transitorios en las primeras fases de la infección por VIH

Fuente: Le Vu S, *et al.* 2008 (70).

3.2. Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversions y enzimoimmunoensayo de captura BED

En relación al método propuesto por Brookmeyer *et al.*, el STARHS ofrecía la ventaja de testar sólo individuos VIH positivos y definir un periodo suficientemente corto para considerar infecciones recientes: 129 días (IC 95%: 109 -149) para un *cut off* (punto de corte) de 0,75 densidades ópticas (DO) (72). Los fundamentos del STARHS se basan en el aumento progresivo del nivel de anticuerpos IgG frente al VIH a partir del momento de la infección. Después de unos seis meses de producirse la infección, se llega a un nivel máximo de anticuerpos. El STARHS consiste en aplicar un algoritmo diagnóstico a una muestra de suero. En primer lugar se aplica un test estándar (test sensible) que resultará reactivo en cualquier paciente infectado por VIH. El segundo test se ha modificado para que sea menos sensible, de manera que un paciente con infección reciente no habrá alcanzado el nivel máximo de anticuerpos y dará un resultado no-

reactivo en ese segundo test. Por lo tanto, el STARHS considera que la muestra analizada corresponde a un individuo con infección reciente si se obtiene un resultado reactivo en el test sensible y no reactivo en el test menos sensible. (Figura 14).

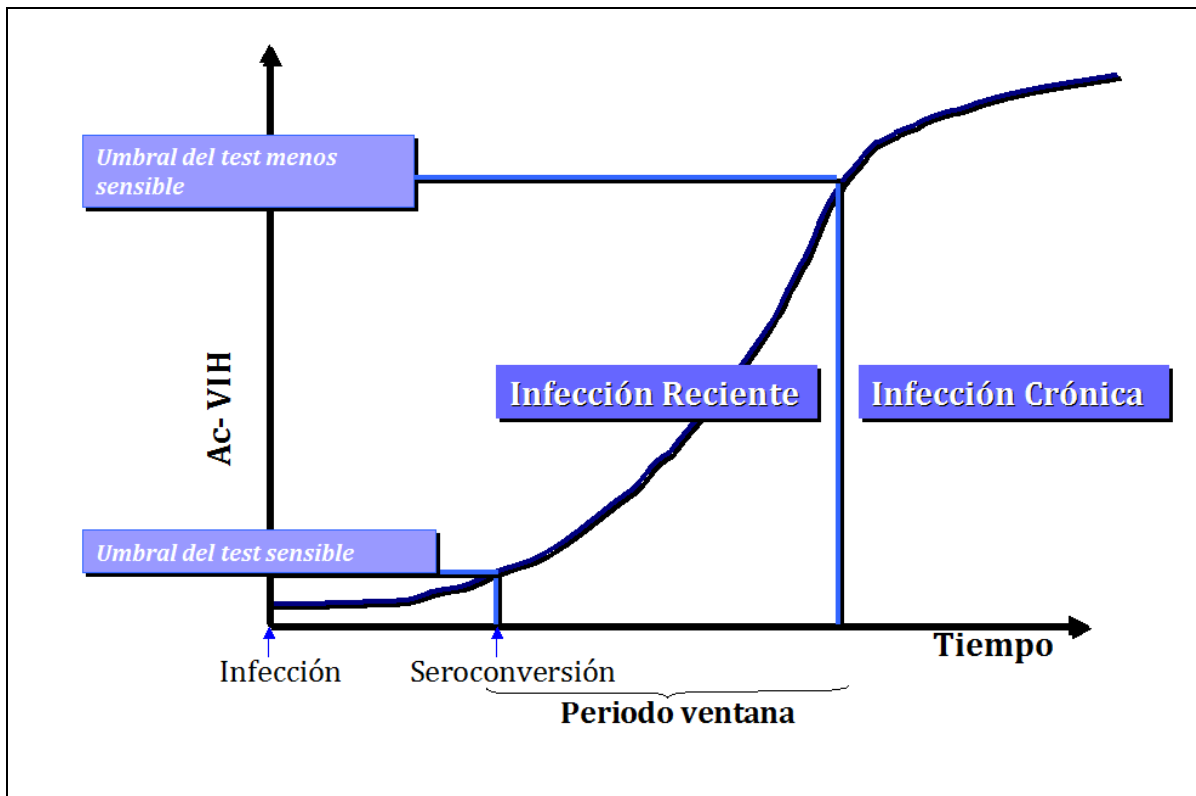


Figura 14. **Fundamento del test STARHS**
Fuente: Adaptado de. Murphy G, *et al.* 2008 (71)

La duración del periodo ventana entre la seroconversión en el test sensible, y la conversión (de reciente a crónica) en el test menos sensible, se calcula con paneles de muestras de individuos con fecha de seroconversión conocida (71).

El STARHS se usó por primera vez con el test Abbott HIV 3A11 assay (*Abbott Laboratories, Abbott Park, Chicago, Illinois, USA*)(72), y más tarde se sustituyó por el Vironostika-LS (Less Sensitive) HIV-1 Microelisa System (*bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France*)(73).

Vironostika-LS HIV-1 Microelisa System

En este test la dilución de la muestra, y los tiempos de incubación de la muestra y el conjugado se han modificado para que el test sea menos sensible: los tiempos de incubación se han reducido y la muestra se ha diluido hasta una proporción 1/20.000 (73). Las DO estándar se calculan de la siguiente manera: $(DO \text{ muestra} - DO \text{ mediana del control negativo}) / DO \text{ mediana}$

del calibrador – DO mediana del control negativo). Las muestras se testan con el primer test sensible, en el que cualquier muestra VIH positiva obtendría un resultado reactivo.

En el test menos sensible, las muestras con una DO estándar calculada inferior a 2,0 se vuelven a re-testar en triplicado. La duración de la infección se define como reciente para aquellas muestras re-testadas con una DO estándar inferior a 1,0 y no reciente para aquellas con una DO estándar superior o igual a 1,0. Los pacientes con infección reciente se estima que han seroconvertido dentro de los últimos 170 días (IC 95%: 144 – 200). El periodo ventana del test se define como el periodo de tiempo medio durante el cual las personas recién infectadas permanecen bajo el umbral del *cut off* del test (73). El test Vironostika dejó de comercializarse hacia el año 2007, por lo que actualmente no se encuentra disponible.

Enzimoimmunoensayo de Captura BED

El test BED-CEIA (Enzimoimmunoensayo de Captura BED) (*Calypte Biomedical Corporation, Portland, Oregon, USA*) fue descrito por Parekh *et al.* en 2002 (74). Utiliza un péptido que incluye la secuencia gp41 inmunodominante de diferentes subtipos de VIH-1 (B, E y D) estableciendo una detección similar de los anticuerpos específicos para VIH entre diferentes subtipos. En la Figura 15 se muestran las diferentes etapas del test. Al ser un EIA de captura, se observa un incremento gradual en la proporción de IgG específicas de VIH-1 respecto el total de IgG después de la seroconversión. Las DO normalizadas se calculan de la siguiente manera: DO muestra/DO calibrador. Los estudios iniciales indicaron que usando un *cut off* de 1,0 la duración del periodo ventana era de 160 días (74). Análisis posteriores usando paneles con virus de otros subtipos sugieren un *cut off* de 0,8, que corresponde con una duración del periodo ventana de 155 días (75).

Los CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) desarrollaron estos tests (Vironostika y BED-CEIA) con el propósito expreso de estimar incidencia de VIH a nivel poblacional, no para propósitos diagnósticos o clínicos. Su utilidad a nivel individual no ha sido determinada ni aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*), por lo que no recomiendan su uso para el diagnóstico individual (75).

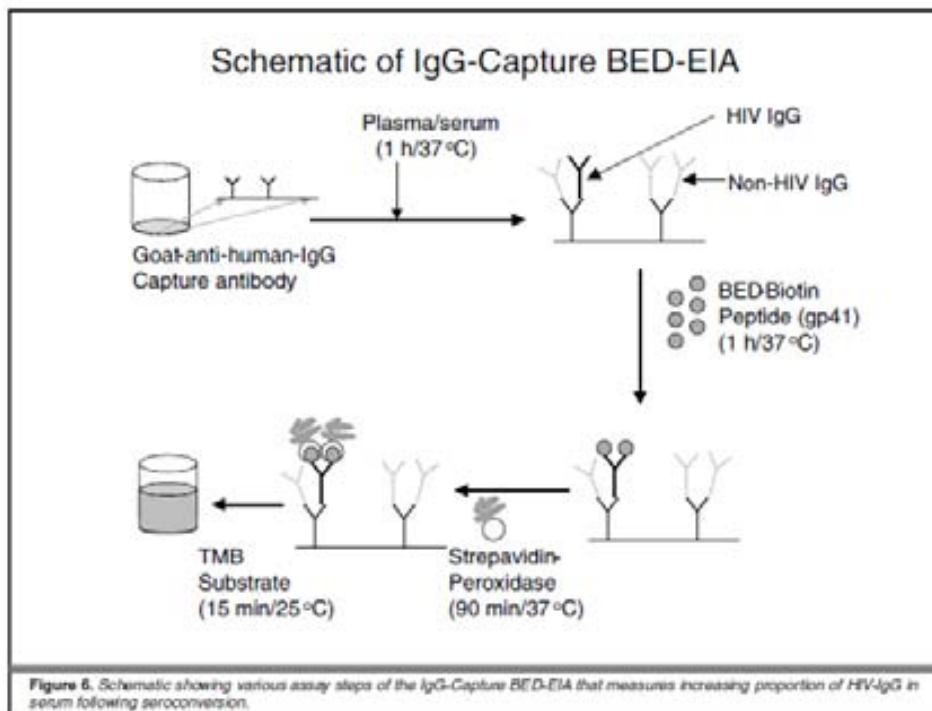


Figura 15. Esquema de las diferentes etapas del test BED-CEIA

Fuente: Parekh BS, *et al.* 2001. (76)

3.3. Otros tests serológicos

Además de los tests desarrollados por Janssen y Parekh, otros autores han descrito otros tests serológicos para identificar infecciones recientes (77). En Italia, Suligoi *et al.* desarrollaron un test que valoraba la respuesta de los anticuerpos frente al VIH investigando su avidéz (78). Los anticuerpos de baja avidéz son indicativos de infección reciente, mientras que los anticuerpos con mayor avidéz indican infección crónica. El método de Suligoi es una modificación de un test serológico anti-VIH-1/2 de tercera generación que usa el autoanalizador de Abbott AxSYM, por lo que es fácil de realizar. Utiliza un método donde la muestra se pre-incuba con el agente caotrópico (guanidina clorhidrato). El tratamiento con guanidina rompe los puentes de hidrógeno que ayudan a determinar la estructura secundaria del anticuerpo, por lo que puede tener un efecto en la subsecuente interacción anticuerpo-antígeno. El tratamiento tiene un mayor efecto sobre los anticuerpos generados al principio de la infección, por lo que se puede unir con menor intensidad a su antígeno, reduciendo así la señal. A medida que la respuesta madura, el sitio activo se hace más resistente a la ruptura (78). En un estudio se compararon el test de avidéz y el Vironostika, y los resultados obtenidos demostraron que ambos tests identificaban de manera

INTRODUCCIÓN

similar las infecciones recientes, aunque el Vironostika tendía a clasificar más pacientes con infección crónica como recientes (79).

En Francia Barin *et al.* diseñaron un test para identificar infecciones recientes por VIH-1 en muestras de sangre seca, conocido como IDE/V3 (80). Para diseñar el test, seleccionaron 3 antígenos que cumplieran cuatro criterios. (i) Los antígenos deben ser reconocidos por los anticuerpos presentes en todos los pacientes infectados por VIH. (ii) Deben estar altamente conservados independientemente del subtipo, (iii) obtenerse fácilmente sin que cambien sus propiedades y (iv) los anticuerpos de esos antígenos deben detectarse con algo de retraso después de la seroconversión. El epítipo inmunodominante de gp41 (IDE) y una mezcla de cinco péptidos V3 que representan secuencias consenso de los subtipos A, B, C, D y CRF01-AE resultaron ser los que mejor discriminaban entre los anticuerpos presentes en suero de los individuos infectados recientemente (≤ 6 meses) de aquellos con infección crónica (80).

En la Tabla 2 se muestran algunas de las características de cuatro tests para identificar infecciones recientes: STARHS, BED-CEIA, Avidex e IDE/V3.

	STARHS (Vironostika-LS HIV-1 Microelisa System)	BED-CEIA (Calypte© HIV-1 BED Incidence EIA)	Avidex (Abbott AxSYM HIV 1/2/gO)	IDE/V3
Factor				
Tipo de anticuerpo medido	Cantidad de anti-VIH	Cantidad de anti-VIH gp-41 (como proporción del total de IgG)	Calidad anti-VIH (avidez del anticuerpo)	Cantidad de anti-VIH gp41 y V3
Disponibilidad comercial	Sí (procedimiento modificado del prospecto del producto)	Sí	Sí (procedimiento modificado del prospecto del producto)	No (test <i>in-house</i> , los reactivos se pueden conseguir comercialmente)
Disponibilidad del test	Ya no está disponible	En todo el mundo	Europa, y algunos países no europeos	Los reactivos están generalmente disponibles – algunos componentes pueden tener disponibilidad limitada
Requerimiento de equipos especiales	No	No	Sí (Analizador AxSYM)	No
Dilución de trabajo	1:20,000	1:101	1:10	1:100
Automatización	Es posible una automatización parcial	Es posible una automatización parcial	Sí	No
Duración del test	90 minutos por placa	245 minutos por placa	Mínimo de 60 minutos; 2-3 minutos por cada muestra adicional por encima de 10	2 horas
Algoritmo confirmatorio	Sí, por triplicado	Sí, por triplicado	No	No
% casos de SIDA clasificados erróneamente como recientes	2,4%	2-3%	Desconocido	9%

Tabla 2. **Tests para la identificación de infecciones recientes por VIH**

Fuente: Mastro TD *et al.* J HIV AIDS Surveill Epidemiol 2010 (81)

3.4. Limitaciones

Las limitaciones de estos tests se enumeran a continuación.

Subtipo de VIH

La mayoría de tests se han desarrollado basándose en el uso del subtipo B. Puesto que los epítomos (región del antígeno reconocida específicamente por el anticuerpo) difieren entre los diferentes subtipos de VIH, es probable que la respuesta de los anticuerpos de pacientes infectados por subtipos no B pueda mostrar una menor afinidad por el antígeno, lo cual puede alterar al periodo ventana del test (en la mayoría de los casos extendiéndolo). Estudios realizados para evaluar las características de estos tests, en pacientes infectados con subtipos no B, han mostrado que el periodo durante el cual una infección se puede detectar como reciente es significativamente diferente según el subtipo estudiado. Concretamente, para el test Vironostika usando un *cut off* de 1,0 DO, el periodo ventana es de 170 días para los subtipos B, mientras que para la CRF_01 AE es de 356 días (82). En una reciente evaluación usando el test BED-CEIA, usando un *cut off* de 0,8 DO, se estimó que el periodo ventana para los subtipos no-B presentaban variaciones, desde 127 días en el subtipo AE tailandés, hasta 236 días en los subtipos AG y AD (83).

Bajo nivel de anticuerpos

1. Estadíos avanzados de la enfermedad

El deterioro del sistema inmunitario asociado a estadíos avanzados de la enfermedad está asociado a un descenso en los niveles de anticuerpos anti-VIH (84), y por lo tanto se espera que tenga un cierto impacto en la especificidad de aquellos tests que dependen de la cuantificación de los anticuerpos. Se ha reportado un porcentaje de falsos positivos de entre el 5% (para el Vironostika) (73) y de entre el 2-3% para el test BED-CEIA (75). Por otro lado, puesto que la avidéz del anticuerpo por el antígeno no está relacionada con la cantidad de anticuerpos, se espera que el test de avidéz no se vea tan afectado por este supuesto (71).

2. Terapia antirretroviral

El tratamiento antirretroviral suprime la replicación vírica hasta tal punto que el estímulo crónico de la respuesta inmunitaria se elimina, llevando a un descenso en el nivel de anticuerpos frente al VIH. El efecto es más pronunciado durante los primeros meses después del inicio del tratamiento. Por tanto, también puede llevar a una disminución en la especificidad (71).

3. Variabilidad interpersonal

La velocidad de progresión a SIDA es diferente para cada paciente, y en función de esa velocidad podemos definir tres tipos de pacientes: los progresores rápidos, los progresores típicos y los progresores lentos (también conocidos como *elite controllers* o *long-term non-*

progressors) (1). Los progresores lentos pueden presentar niveles de anticuerpos frente al VIH bajos, mucho tiempo después del momento de la infección (81).

Además, hay que tener en cuenta que el periodo ventana se determina mediante paneles de muestras pertenecientes a individuos cuya fecha de seroconversión es conocida. Modelando estos datos se obtiene la relación entre el momento de seroconversión y el promedio de la señal esperada en el test para detectar infecciones recientes. Este periodo está limitado por los efectos de la variación individual en la respuesta de los anticuerpos, existiendo individuos que desarrollan rápidamente la respuesta y otros individuos que responden de manera lenta (Figura 16) (71)

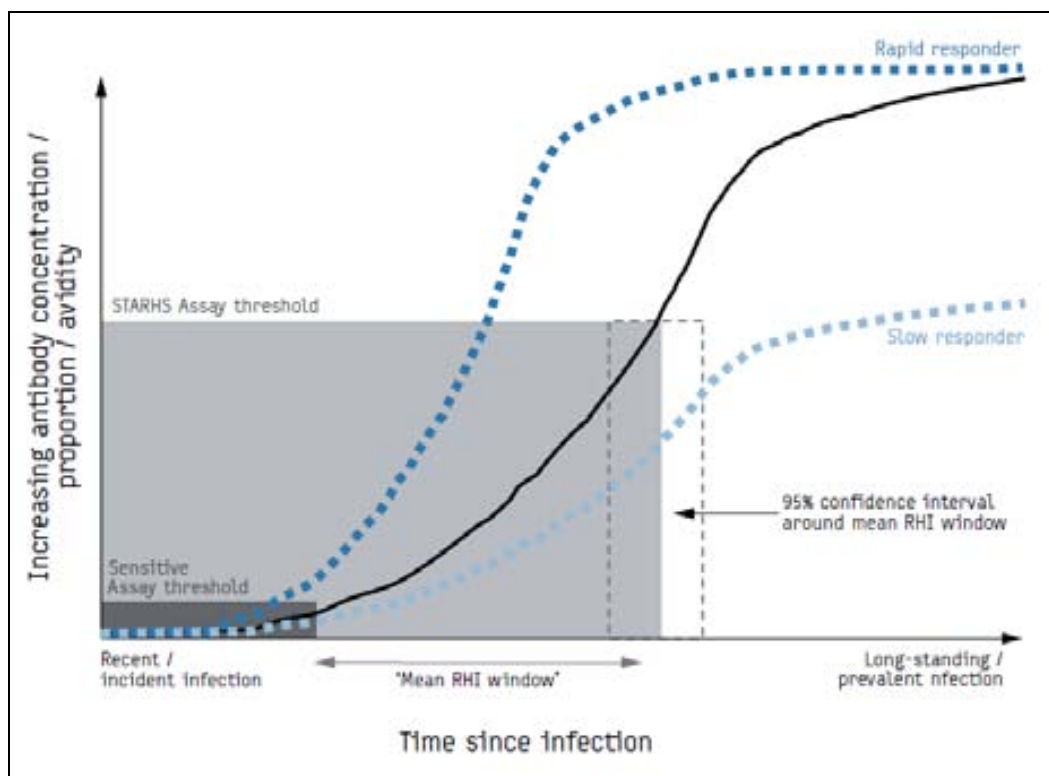


Figura 16. Principios que sustentan los tests serológicos para identificar infecciones recientes

Fuente: Murphy G, et al. 2008 . (71).

4. Aplicaciones de los tests serológicos para identificar infecciones recientes en Salud Pública

4.1. Terminología

En relación a la identificación de infecciones recientes por VIH mediante tests serológicos, podemos encontrar en la literatura diferentes términos. El término STARHS ha sido utilizado por algunos autores para hacer referencia a cualquier test de laboratorio usado para identificar infecciones recientes (71). Actualmente, el término STARHS sólo se utiliza para hacer referencia al método descrito por Janssen *et al.* en 1998, usando el test de Abbott (72) y también el test Vironostika (73). Algunos autores también hacen referencia al test descrito por Janssen como *Detuned* (85). En la literatura más reciente encontramos el término TRI, de *Test for Recent Infection*, para hacer referencia a cualquier test serológico utilizado para identificar infecciones recientes (81), o también el término *HIV incidence assays* (86).

El *WHO Technical Working Group on HIV Incidence* ha introducido recientemente el término HIV- RITA (*Recent Infection Testing Algorithm*) (89). Un RITA es un algoritmo que utiliza siempre un TRI, y, además, puede incluir también información clínica y/o de laboratorio para identificar las infecciones recientes. Como veremos a continuación, algunos RITA pueden usar dos TRIs distintos. Un RITA que usa dos TRIs también se conoce como *Multi Assay Algorithm (MAA)* (87, 88).

4.2. Algoritmos para identificar infecciones recientes

Antes de aplicar un RITA en una población de nuevos diagnósticos de VIH, es importante considerar la factibilidad logística y el coste que supone la aplicación de cada algoritmo, así como sus limitaciones. Tal y como se ha comentado anteriormente, los TRIs pueden usarse como herramienta única para identificar infecciones recientes (Figura 17), o también en combinación con información de biomarcadores (recuento de células CD4+, detección de antirretrovirales en el suero) o de la historia clínica del paciente (presencia de enfermedades definitorias de SIDA, realización de tests VIH con anterioridad al diagnóstico). El uso de biomarcadores adicionales asociados con la fase crónica de la infección por VIH, así como información de la historia clínica del paciente, mejora la especificidad, ya que así se minimiza el error de clasificación en los falsos positivos (pacientes con infección no reciente clasificados por el algoritmo como recientes) (81).

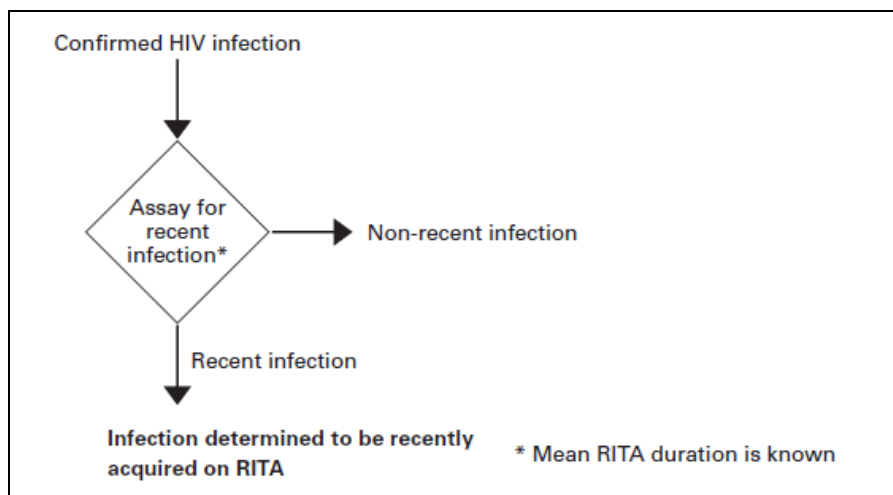


Figura 17. **Ejemplo de un RITA que sólo usa un TRI**

Fuente: UNAIDS/WHO Working group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance. 2011. (89)

También se ha propuesto el uso de más de un TRI, junto con la información de biomarcadores y clínica para identificar infecciones recientes. Concretamente, Laeyendecker *et al.* han propuesto usar un algoritmo con los tests BED-CEIA y Avidex, además de añadir marcadores virológicos y biológicos (carga vírica y CD4+), obteniendo una especificidad del 99,2% (88, 87, 90).

En la Figura 18, podemos ver un ejemplo de un RITA que usa un TRI junto con información sobre biomarcadores (recuento de células CD4+ y detección de antirretrovirales en el suero) e información de la historia clínica (enfermedades definatorias de SIDA y tests de VIH previos al diagnóstico). En este ejemplo, el primer paso del algoritmo es analizar la muestra del paciente VIH positivo con el TRI. En caso de obtener un resultado que indique infección reciente, se sigue el algoritmo teniendo en cuenta el resto de información. Con esta estrategia, es posible obtener la tasa de falsos positivos en la población de muestras analizadas, también conocida como *False Recent Rate*. Tal y como se comentará más adelante en el apartado 4.5, este parámetro es necesario para poder estimar la incidencia por VIH (89).

También sería posible considerar en primer lugar la información sobre tests previos de VIH, recuentos de CD4+ en el momento del diagnóstico o presencia de enfermedades definatorias de SIDA, por ejemplo, y posteriormente analizar la muestra mediante el TRI. De este modo sólo se analizarían las muestras de los pacientes que cumplen *a priori* las características de los pacientes con infección reciente:

- CD4+ > 200 células/ μ l
- Primer test VIH positivo <6 meses
- Ausencia de enfermedades definatorias de SIDA

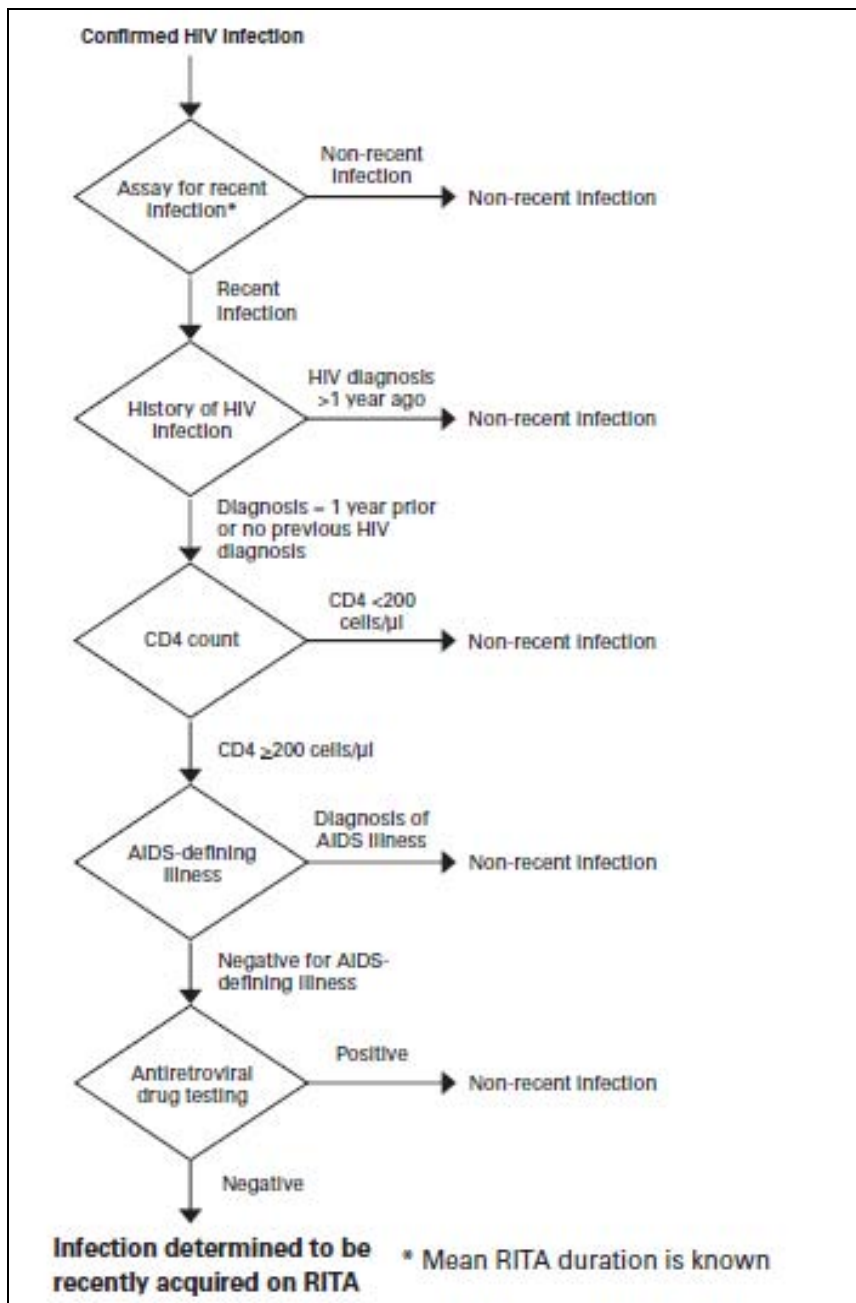


Figura 18. Ejemplo de un RITA que usa un TRI e información clínica y de laboratorio
 Fuente: UNAIDS/WHO Working group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance. 2011. (89)

En la Figura 19 podemos ver otro ejemplo de RITA que incorpora dos TRIs. En este caso, primero se excluyen todos los pacientes con un recuento de células CD4+ bajo (<200 células/μl). Después las muestras se analizan mediante el test BED-CEIA, como herramienta inicial de cribado para identificar aquellas muestras que corresponden a infecciones recientes. Posteriormente, aquellas en las que se obtiene un resultado de infección reciente, se vuelven a analizar con otro TRI más específico, que usa un principio biológico diferente al del TRI inicial (en este caso se utiliza el test Avidex). En aquellas muestras que también se identifican como infecciones recientes

usando este segundo TRI, se determina la presencia del ARN vírico. Aquellas muestras en que no se detecta ARN vírico se consideran como infecciones no recientes. A continuación, en esas mismas muestras correspondientes a infecciones no recientes se determina la presencia de antirretrovirales en el suero. En aquellos casos que no se detectan antirretrovirales, se considera que pueden tratarse de pacientes VIH positivos *elite controllers*. Y en las muestras que se detecta presencia de antirretrovirales, se considera que corresponden a pacientes con infección crónica que están recibiendo tratamiento antirretroviral. (81).

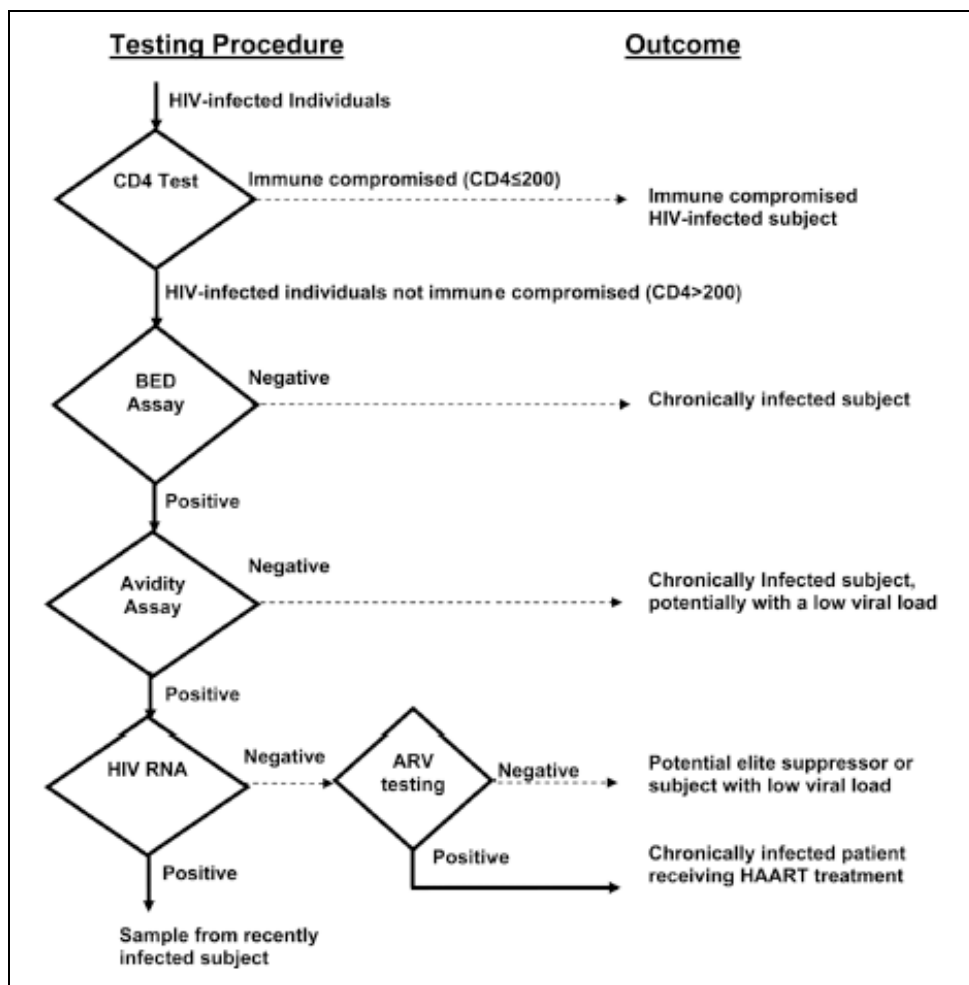


Figura 19. Ejemplo de un RITA, usando dos TRIs e información clínica y de laboratorio
Fuente: Mastro *et al.* 2010 (81)

Desde la perspectiva de Salud Pública, estos algoritmos se han utilizado con diferentes propósitos. Entre los más relevantes, podemos destacar los siguientes: (i) estimar la proporción de infecciones recientes entre los nuevos diagnósticos y describir epidemiológicamente los pacientes identificados con infección reciente, (ii) conocer la prevalencia de resistencias

transmitidas en la población de infectados recientemente y (iii) estimar la tasa de incidencia por VIH. A continuación describiremos cada una de estas aplicaciones.

4.3. Epidemiología de las infecciones recientes

Conocer las características epidemiológicas de los pacientes infectados recientemente es una información útil para mejorar los programas de prevención y control del VIH y las ITS, evitando así la transmisión de estas infecciones. Los diferentes TRIs se han utilizado en todo el mundo, con el objetivo de describir las características y la magnitud de las infecciones recientes e identificar los factores asociados a la infección reciente. Algunos países como Francia, Estados Unidos, o Alemania han implementado en sus sistemas de vigilancia la identificación de infecciones recientes entre los nuevos diagnósticos de VIH, mediante TRIs (91-95).

Los porcentajes de infecciones recientes (número de infecciones recientes / total nuevos diagnósticos de VIH) oscilan entre el 9,6% (en un estudio realizado en población general) (96) hasta el 51,9% (97) o el 54,0% (en estudios realizados en población de HSH) (91). Esta variación depende del lugar de realización del estudio, así como del tipo de población analizada (Tabla 3). En la interpretación de los resultados es importante tener en cuenta que la identificación de infecciones recientes va ligada al momento en que se realiza el diagnóstico de VIH. Aquellos individuos que se realizan el test del VIH de manera frecuente serán identificados como infectados recientemente con una mayor probabilidad, respecto aquellos individuos que sólo se hayan realizado la prueba en una ocasión (98).

En general, en los países europeos y en Estados Unidos, se encuentran las prevalencias de infección reciente más altas, y el factor de riesgo que se asocia con más frecuencia a la infección reciente es infectarse a través de relaciones sexuales entre HSH (91, 92, 99, 100). Además de este factor de riesgo, la edad también se identifica como uno de los factores asociados a la infección reciente por VIH (91, 101, 102). En un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil, encontraron que la edad era la única variable que mantenía su asociación significativa con la infección reciente en el análisis multivariable; siendo más frecuente entre los individuos menores de 25 años (102).

En la región del África Subsahariana también se han realizado diferentes estudios aplicando TRIs. En uno de esos estudios, el porcentaje de infección reciente fue del 9,6%, y encontraron que las mujeres jóvenes se infectaban a una edad más temprana que los hombres (96). En Uganda se realizó un estudio de ámbito nacional en el que se identificaron varios factores de riesgo para la infección reciente. Entre estos factores de riesgo encontraron los siguientes: ser mujer, el estado

civil (las personas viudas o divorciadas presentaban un mayor riesgo), el número de parejas en el año pasado (las personas que durante el año pasado tuvieron dos o más parejas sexuales tenían más riesgo de infección reciente) y la región (vivir en la región norte-centro se asociaba con un mayor riesgo de infección reciente) (103).

Lugar	Periodo	% Infección Reciente	Centros	Población	Técnica	Referencia
Bangkok	1996	19	Centros de Salud para UDVPs	UDVP	BED-CEIA	Hu DJ <i>et al.</i>
10 ciudades EEUU	1997-2001	20	Clínicas de VIH y Centros de cribado y consejo	Adultos	Vironostika	Schwarcz S <i>et al.</i>
Los Ángeles, EEUU	2002-2004	16,2	Clínicas de ITS y VIH	Hombres con sífilis primaria	Vironostika	Taylor MM <i>et al.</i>
Seattle, EEUU	2002 - 2005	51.9	Clínicas de ITS y VIH	HSH	Vironostika	Thiede H <i>et al.</i>
São Paulo, Brasil	2002-2004	12	Centros de cribado	Adultos	Vironostika	Bassichetto KC <i>et al.</i>
Kenya	2002-2003	9,6	Hospital y centro de testaje y consejo de VIH	Adultos	Vironostika	Oyugi JO <i>et al.</i>
Uganda	2005	17	Encuesta poblacional	Adultos	BED-CEIA	Mermin J <i>et al.</i>
Reino Unido	1996 - 2005	26,0	Hospitales	Adultos	Vironostika	Fisher M <i>et al.</i>
Francia	2003-2008	47,6	Registro de nuevos diagnósticos de VIH	HSH	IDE-V3	Semaille C <i>et al.</i>
Portugal, Lisboa	2004	28,6	Clínica de ITS	Adultos	Avidez	Cortes Martins H <i>et al.</i>
Berlín, Alemania	2005-2007	54,0* 16,0 [†]	Clínicas y consultas privadas de VIH	Adultos	BED-CEIA	Batzing-Feigenbaum J <i>et al.</i>
San Petersburgo, Rusia	2005 - 2008	19,5	Centros de Salud para UDVPs	UDVP	BED-CEIA	Niccolai LM <i>et al.</i>

Tabla 3 Prevalencias de infección reciente

*Porcentaje entre el grupo de HSH, †Porcentaje entre el grupo de heterosexuales

4.4. Resistencias transmitidas en pacientes identificados con infección reciente

Inicialmente los CDC no recomendaron el uso de los TRIs para el diagnóstico individual. Aún así, algunos autores han propuesto el uso de los TRIs para identificar infecciones recientes a nivel individual, ya sea para el manejo clínico del paciente, como herramienta en el estudio de contactos, o para estimar la prevalencia de resistencias transmitidas entre los pacientes identificados como recientes por el test (108, 70).

Las personas recién infectadas son una fuente importante de transmisores de virus, de manera que la prevalencia de resistencias transmitidas en estos individuos es un indicador importante en la vigilancia de la epidemia. Hay que tener presente que la prevalencia de resistencias transmitidas en pacientes con infección reciente normalmente es más alta que en aquellos pacientes con infección crónica (109). En los pacientes infectados con cepas resistentes, en ausencia de presión farmacológica, con el paso del tiempo, las cepas minoritarias *wild type*, llegarán a ser la cuasiespecie mayoritaria, ya que tienen un mayor *fitness* que las cepas con resistencias (52).

Las prevalencias de resistencias transmitidas en los pacientes con infección reciente (identificados mediante TRIs) oscilan entre el 21,0%, en un estudio realizado en Honduras entre los años 2004 y 2007, hasta el 6,25%, en un estudio realizado en una región de China durante el año 2006 (Tabla 4).

La presencia de niveles elevados de cepas VIH-1 con resistencias transmitidas en una población es un indicador sensible del éxito de las terapias antirretrovirales. Desde la perspectiva de Salud Pública, nos indica la presencia de pacientes que reciben tratamiento antirretroviral, y que no toman medidas preventivas efectivas para evitar la transmisión del virus. Por lo tanto, la vigilancia poblacional de las resistencias transmitidas en recién infectados es un elemento esencial en la evaluación global de las resistencias a los antirretrovirales (59).

Lugar	Periodo	Total VIH+	%IR	% RT - RECIENTES	%RT - CRÓNICAS	TRI	Referencia
Honduras	2004 - 2007	200	12,0	21,0	5,0	BED-CEIA	Murillo W <i>et al.</i>
Norht Carolina (EEUU)	1998 - 2007	253*	-	17,8	-	Vironostika y Aidez	Hurt CB <i>et al.</i>
Dehong (China)	2006	1048	6,1	6,25	-	BED-CEIA	Wang MJ <i>et al.</i>
Canadá	2000 - 2001	715	30,9	12,2	6,1	Vironostika	Jayaraman GC <i>et al.</i>

Tabla 4. Prevalencias de resistencias transmitidas en pacientes con infección reciente por VIH

*Pacientes identificados con infección aguda (Anticuerpos negativos + ARN positivo) e infección reciente (último VIH negativo, Vironostika o Aidez). IR: Infección Reciente, RT: Resistencias Transmitidas-

JUSTIFICACIÓN

La infección por VIH sigue siendo un problema importante de Salud Pública en nuestro entorno. Para el año 2011, en Cataluña, se estimó que, aproximadamente, el número total de personas vivas con infección por VIH era de 33.000. La estimación de la incidencia de VIH en población general en Cataluña, calculada utilizando técnicas de modelización matemática, mostró una tasa de incidencia de 0,2 nuevos casos por cada 1.000 personas en el año 2011. Por tanto, es importante seguir trabajando en las políticas de prevención de la infección por VIH para evitar que se produzcan nuevas infecciones. Para detener el avance de la epidemia es esencial conocer en qué poblaciones se está transmitiendo la infección, y así poder diseñar acciones preventivas más efectivas.

En los inicios de la epidemia, conocer la incidencia de casos de SIDA permitió, a través de los registros de SIDA, la descripción epidemiológica de la enfermedad y de las personas infectadas en los países desarrollados. En ausencia de tratamientos efectivos, el periodo medio entre el momento de la infección por VIH y el diagnóstico de SIDA era aproximadamente de diez años, lo que hacía posible estimar la incidencia de VIH extrapoliándola de la incidencia de SIDA, y así describir la epidemiología de la enfermedad y de los infectados. La introducción del TARGA en 1996 modificó la historia natural de la infección por VIH, aumentando tanto el tiempo desde el momento de la infección hasta el diagnóstico de SIDA, así como reduciendo drásticamente la incidencia de las comorbilidades y la mortalidad asociada al VIH. El impacto de los tratamientos evidenció las limitaciones de los sistemas de vigilancia basados en los casos de sida y favoreció las recomendaciones orientadas a incorporar la notificación de nuevos diagnósticos de VIH en los sistemas de vigilancia de la epidemia en los países con acceso universal al tratamiento. Siguiendo estas recomendaciones, en Cataluña, la notificación de casos de VIH se introdujo en el Sistema de Vigilancia de manera voluntaria y anónima en el año 2001, y a partir del 2010 de manera obligatoria.

En Europa, en el año 2011 se notificaron 53.974 diagnósticos de VIH, lo que supone una tasa de nuevos diagnósticos de VIH de 7,6 casos por cada 100.000 habitantes. Entre el total de nuevos diagnósticos de VIH podemos encontrar pacientes que se infectaron mucho tiempo atrás y han sido diagnosticados tardíamente (cuando la cifra de linfocitos CD4+ más cercana al momento del diagnóstico es inferior a 350 células/ μ l y/o presenta una enfermedad definitoria de SIDA). Por lo

tanto, la tasa de nuevos diagnósticos no refleja de manera exacta la magnitud ni las características de las infecciones que se están produciendo en el momento actual.

El hecho de identificar entre los nuevos diagnósticos de VIH qué infecciones se han producido recientemente sí que proporcionaría una descripción más precisa de los patrones actuales de la epidemia, y con esta información se podrían diseñar intervenciones preventivas adecuadas para evitar nuevas infecciones de VIH. Además, en el caso de los pacientes infectados por el VIH de origen inmigrante, si se conoce la fecha de llegada al país, la aplicación de estos tests puede ayudar a conocer si adquirieron la infección localmente, o, por el contrario, la adquirieron cuando todavía se encontraban en su país de origen.

Mediante el uso de estos tests serológicos, además de describir las características epidemiológicas y conocer la magnitud de las infecciones recientes por VIH, es posible conocer la prevalencia de resistencias transmitidas en los pacientes identificados como recién infectados. Esta información es muy útil, tanto desde la perspectiva de Salud Pública como la clínica, ya que la transmisión de virus resistentes puede tener un impacto negativo en la respuesta a los tratamientos antirretrovirales. Además, disponer de esta información en los pacientes recién infectados, respecto a tenerla en los nuevos diagnósticos, presenta una ventaja importante, ya que en el conjunto de nuevos diagnósticos la prevalencia de resistencias transmitidas no refleja los patrones actuales de transmisión de resistencias. Por lo tanto, desde el punto de vista de Salud Pública es importante poder monitorizar este indicador en la población de recién infectados por VIH.

Finalmente, mediante la aplicación de los tests serológicos para identificar infecciones recientes es posible estimar la incidencia de VIH en una población. Hasta el momento, el método considerado como gold estándar para estimar incidencia ha sido a través del seguimiento de cohortes de personas VIH negativas que se realizan de manera periódica el test de cribado del VIH. Este método presenta ciertas dificultades logísticas, y, además, estas cohortes suelen no ser representativas de una gran población. De modo que los tests serológicos aparecen como una alternativa menos costosa para poder conocer el número de nuevas infecciones producidas durante un periodo de tiempo, en el contexto de un estudio transversal. Por otro lado, si se aplican dentro de un sistema de vigilancia de nuevos diagnósticos de VIH, sería posible estimar la incidencia de VIH poblacional.

Por tanto, la aplicación de los tests serológicos para identificar infecciones recientes por VIH proporcionará información precisa sobre cómo se está transmitiendo la infección por VIH en el momento actual, cuál es la magnitud de la transmisión de cepas de VIH resistentes y cual es la tasa de incidencia de VIH en nuestro medio.

OBJETIVOS

Objetivos generales y específicos

Objetivo general 1: Estimar la viabilidad y aplicabilidad de la introducción de los tests serológicos para identificar infecciones recientes por VIH-1 en nuestro medio

Objetivos específicos

- 1.1) Estimar la prevalencia de infección reciente entre una muestra de nuevos diagnósticos de VIH
- 1.2) Describir las características epidemiológicas de los pacientes con infección reciente
- 1.3) Identificar los determinantes asociados a la infección reciente por VIH

Objetivo general 2: Estudiar las resistencias transmitidas a los antirretrovirales y la distribución de subtipos de VIH-1 en los pacientes identificados con infección reciente

Objetivos específicos

- 2.1) Estimar la prevalencia de resistencias transmitidas y de subtipos no B entre los pacientes recién infectados
- 2.2) Identificar factores asociados a las resistencias transmitidas y a la infección por subtipo no B

Objetivo general 3: Evaluar los tests serológicos para detectar infecciones recientes utilizados en nuestro medio: Vironostika-LS y BED-CEIA.

Objetivos específicos

- 3.1) Comparar los tests mediante un estudio de concordancia.
- 3.2) Estimar la sensibilidad y especificidad de los tests.

Trabajos que conforman la tesis, y relación de objetivos a los que dan respuesta

Objetivo

1.1	Artículo I: Recently Acquired HIV Infection in Spain (2003-2005). Introduction of the Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion	Artículo IV: Identification of recent HIV-1 infection among newly diagnosed cases in Catalonia, Spain (2006-2008)
1.2		
1.3		
2.1	Artículo II: Prevalence of Transmitted HIV-1 Drug Resistance and Distribution of HIV-1 Subtypes Among Patients With Recent Infection in Catalonia (Spain) Between 2003 and 2005	
2.2		
3.1	Artículo III: Comparison of Two Serological Tests for the Identification of Recent HIV Infection: Vironostika HIV-1 Microelisa and BED-CEIA Capture Enzyme Immunoassay	
3.2		

MÉTODOS Y RESULTADOS

A continuación se presentan los cuatro trabajos que conforman esta tesis:

ARTÍCULO I: Recently Acquired HIV Infection in Spain (2003-2005). Introduction of the Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion

ARTÍCULO II: Prevalence of Transmitted HIV-1 Drug Resistance and Distribution of HIV-1 Subtypes Among Patients With Recent Infection in Catalonia (Spain) Between 2003 and 2005

ARTÍCULO III: Comparison of Two Serological Tests for the Identification of Recent HIV Infection: Vironostika HIV-1 Microelisa and BED-CEIA Capture Enzyme Immunoassay

ARTÍCULO IV: Identification of recent HIV-1 infection among newly diagnosed cases in Catalonia, Spain (2006-2008)

ARTÍCULO I

Recently Acquired HIV Infection in Spain (2003-2005). Introduction of the Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion

Anabel Romero, Victoria González, Meritxell Granell, Lurdes Matas, Anna Esteve, Elisa Martró, Isabel Rodrigo, Tomàs Pumarola, José M. Miró, Aurora Casanova, Elena Ferrer, Cristina Tural, Jorge del Romero, Carmen Rodríguez, Estrella Caballero, Esteve Ribera, Jordi Casabona
and the Standardized Algorithm for Recent HIV Infections (AERIVIH) study group

Sex Transm Infect. 2009 Apr;85(2):106-10.

RESUMEN

El estudio que se presenta a continuación muestra la primera aplicación del test STARHS en España. A través de la aplicación del test STARHS, es posible identificar aquellas infecciones que se han producido recientemente, y de ese modo, describir las características de los pacientes con infección reciente. Esta descripción proporciona información precisa sobre los patrones actuales de transmisión del VIH y, en consecuencia, puede ayudar a diseñar intervenciones preventivas adecuadas.

El objetivo de este estudio fue estimar la viabilidad de la introducción del test STARHS en nuestro medio y describir la frecuencia y las características epidemiológicas de las personas infectadas recientemente.

Se diseñó un estudio transversal, y se incluyeron individuos diagnosticados con VIH entre los años 2003 y 2005. De todos los pacientes incluidos en el estudio, se recuperaron muestras de suero que habían sido extraídas con propósitos diagnósticos. Las muestras de pacientes con una prueba de VIH positiva anterior a 6 meses (desde la fecha de extracción de la muestra recuperada) y edad inferior a 18 años fueron excluidas del análisis. Las muestras correspondientes a pacientes con recuentos inferiores a 200 células CD4+/ μ l, o criterios clínicos de SIDA se consideraron como infecciones no recientes.

Participaron diferentes tipos de centros: 19 hospitales, 7 laboratorios de atención primaria, una clínica de infecciones de transmisión sexual y 8 centros de cribado alternativos.

Se analizaron un total de 3.444 muestras usando el test STARHS. El test identificó como infecciones recientes (ocurridas en los últimos 170 días) 660 (19,2%) muestras. Según el lugar donde el paciente fue diagnosticado, se observó que el porcentaje de infecciones reciente fue mayor en los centros de atención primaria (21,5%), en la clínica de ITS (23,4%) y en los centros de cribado alternativos (21,3%); respecto al porcentaje de infecciones recientes estimado en los hospitales (16,5%). La mayoría de personas identificadas con infección reciente eran hombres (79,8%) con una mediana de edad de 33,1 años, y el 62,5% se transmitieron entre HSH. Entre los individuos con infección reciente, el 26,5% eran de origen inmigrante, siendo un 48,7% procedentes de América del Sur. Además, en algunos casos se pudo obtener información sobre la fecha de llegada a nuestro país. La mayoría de inmigrantes identificados con infección reciente (y con información sobre la fecha de llegada a España) llevaban en España más de un año cuando recibieron el diagnóstico de VIH, y por tanto, adquirieron la infección de VIH en nuestro país. En relación a la presencia de otras ITS durante el año previo al diagnóstico, se observó que, como

mínimo, un 16,5% de los pacientes con infección reciente habían declarado tener otra ITS durante el año previo al diagnóstico de VIH.

El estudio ha demostrado que la implementación del test STARHS en nuestro medio es factible. Gracias a la aplicación de este test ha sido posible identificar entre los nuevos diagnósticos de VIH aquellas infecciones que se produjeron en los últimos seis meses, y se han podido describir las características de las personas que adquirieron la infección por VIH recientemente. Esa descripción ha permitido poner de manifiesto importantes características de la epidemia local de VIH, como la propagación activa del VIH entre los HSH, el papel importante de las ITS, y la vulnerabilidad de los inmigrantes como una nueva población diana.

Recently acquired HIV infection in Spain (2003–2005): introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion

A Romero,^{1,2,3} V González,^{1,2,4} M Granell,¹ L Matas,^{2,4} A Esteve,^{1,2} E Martró,^{2,4} I Rodrigo,⁵ T Pumarola,⁶ J M Miró,⁶ A Casanova,⁷ E Ferrer,⁷ C Tural,⁸ J del Romero,⁹ C Rodríguez,⁹ E Caballero,¹⁰ E Ribera,¹⁰ J Casabona^{1,2,3} and the Standardized Algorithm for Recent HIV Infections (AERIVIH) study group

¹ Center for Epidemiological Studies on HIV/AIDS and STI of Catalonia (CEEISCAT), Institut Català d'Oncologia/Health Department, Generalitat de Catalunya, Spain; ² CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain; ³ Department of Paediatrics, Obstetrics and Gynaecology, and Preventive Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴ Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; ⁵ Laboratori Clínic Manso, Barcelona, Spain; ⁶ Hospital Clínic – IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷ Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL, l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁸ Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; ⁹ Centro Sanitario Sandoval, Madrid, Spain; ¹⁰ Hospital Universitari Vall Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence to:
Jordi Casabona, Center for Epidemiological Studies on HIV/AIDS and STI of Catalonia (CEEISCAT), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain; jcb.ceescat.germanstrias@gencat.cat

Accepted 10 October 2008
Published Online First
5 November 2008

ABSTRACT

Background: Identification of recent HIV infections provides a description of the current pattern of HIV transmission and, consequently, can help to design better preventive interventions. Our study shows the first implementation in Spain of the Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS) strategy. We assess the viability of introducing STARHS in our setting and describe the frequency and epidemiological characteristics of recent infections (RIs).

Methods: Between 2003 and 2005, HIV-positive blood samples drawn for diagnostic purposes were collected from 28 Spanish laboratories to be tested using STARHS. Samples from patients with a previous HIV diagnosis, age <18 years, <200 CD4 cells/μL or clinical AIDS criteria were excluded from the analysis.

Results: A total of 660 (19.2%) samples were classified as RI. Most people identified with RI were male (79.8%) with a median age of 33.1 years, and 62.5% occurred among men who have sex with men (MSM). Immigrants made up 26.5% of individuals identified with RIs, with 48.7% coming from South America. Among the individuals with RI, at least 16.5% had reported another sexually transmitted infection (STI) during the year before the HIV diagnosis.

Conclusion: The study shows that the implementation of STARHS in our setting is feasible and has highlighted important features of the local HIV epidemic, such as the ongoing spread of HIV among MSM, the potential role of STIs in RIs and the vulnerability of immigrants as a new target population.

HIV infection remains a major public health problem in Europe and there is evidence of increasing transmission among vulnerable populations in different countries.¹ Spain has the fifth highest incidence rate of AIDS in Europe, with 36.0 cases per million people.² Since the introduction and widespread use of highly active antiretroviral therapy (HAART) in 1996, both the incidence of AIDS and HIV-related mortality rates have decreased dramatically. Therefore, AIDS data are less indicative of the underlying trends in HIV infection and many European countries have introduced HIV reporting as part of their surveillance systems. Data from eight Spanish regions with HIV reporting systems show a shift from parenteral to sexual transmission of HIV infection.³ In Catalonia, Spain, data generated by the Integrated AIDS/HIV/STI Surveillance System

(SIVES) suggest an increase in the incidence of HIV among men who have sex with men (MSM) and immigrants.⁴ Nevertheless, since new diagnoses of HIV can include infections that occurred many years ago, they may not reflect the magnitude or characteristics of recent infections (RIs). Identification of RIs provides an accurate description of current epidemic patterns and enables us to better tailor preventive interventions. The Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS) was first described in 1998 as a tool to differentiate RIs from long-standing infection (LSI).⁵ STARHS has been used in different settings to estimate incidence^{6–11} and describe RIs.^{12–13} In Spain, HIV testing is offered free at national health hospitals, primary health centres (PHC), sexually transmitted infection (STI) units and several community-based voluntary counselling and testing sites (CBVCTS), which offer free anonymous counselling and testing services regardless of the user's health insurance or residence status. Current policies promote testing in vulnerable populations and young adults on a voluntary basis. The objectives of this study are to assess the viability of introducing STARHS in our setting and to describe the frequency and epidemiological characteristics of people with RI.

METHODS

Study design

Three-year cross-sectional study (2003–2005).

Inclusion criteria

Confirmed HIV-positive test samples from patients aged 18 years or over without a previous confirmed HIV diagnosis during the 6 months before extraction.

Settings

Samples were collected from 28 laboratories: 19 at hospital outpatient clinics, one from a STI clinic, 7 laboratories covering 163 PHCs and 1 STI unit, and 1 laboratory collecting samples from 8 CBVCTS. Centres were selected on a voluntary basis. Twenty-two of these laboratories were from Catalonia, three from Madrid and three from Andalusia, La Rioja, and the Basque Country.

Specimen collection

Residual volumes of serum specimens collected for diagnostic purposes were sent by the participating laboratories to the coordinating centre (Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i la Sida de Catalunya, CEEISCAT). All personal identifiers were removed from the samples, which were sent to the coordinating centre with a study number. Only the recruitment centre had access to personal identifiers. Specific testing was performed at the Microbiology Service of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

Laboratory methods

Samples were additionally tested for HIV by a conventional sensitive enzyme immunoassay (EIA) (Anti-HIV TETRA Elisa, Biotest, Dreieich, Germany) to double-check that all the samples were HIV positive. Positive specimens were then tested using a modified version of the Vironostika HIV-1 EIA (bioMérieux, Durham, North Carolina, USA) in which sample dilution and sample and conjugate incubation times were modified to render it less sensitive. Standard optical density (OD) was calculated as follows:

$$\text{sample OD} - \text{median negative control OD} / \text{median calibrator OD} - \text{median negative control OD}$$

Specimens with a standard OD <2.0 were retested in triplicate. Duration of infection was defined as recent for retested specimens with a standard OD <1.0 and longstanding for those with a standard OD ≥1.0. People with RI can be presumed to have seroconverted within the past 170 days (95% CI 144 to 200).¹⁴

Since 2000, CEEISCAT and the microbiology service of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol have been participating in an international STARHS quality control programme established by the Centers for Disease Control and Prevention (FDA BB-IND # 8193).

Interpretation of results

An infection was considered recent if the sample reacted with the sensitive EIA but not with the modified less sensitive EIA (that is, had low HIV antibody titres). Since antibody titres may fall in advanced stages of HIV infection, patients whose samples did not react and who presented clinical criteria for AIDS or a CD4+ T cell count <200 cells/μL were considered as having LSI.

Data collection

A data collection form, including CD4+ T cell counts, HIV viral loads and previous HIV testing, was filled out by the laboratory staff. A second data collection form, compiled by the patient's physician or a designated person, with demographical and clinical-epidemiological variables (sex, date of birth, country of origin, date of arrival in Spain, sexual orientation, use of injected drugs,

STI diagnoses, HIV infection status at the time of diagnosis and use of antiretrovirals) was used only for diagnosis of RI.

The total number of HIV tests performed and the positive results were recorded for each centre.

Statistical analysis

The normal approximation 95% CI was calculated, as was the exact CI when appropriate. Differences in the distribution of several characteristics between diagnosis sites were assessed using Pearson's χ^2 test with a Bonferroni correction for multiple comparisons.

RESULTS

The number of HIV tests performed at recruitment sites was higher in hospitals, but STI clinic and CBVCTSs had the highest prevalence of HIV. We studied 59% of all the positive samples from each centre between January 2003 and December 2005. The samples studied as a percentage of all positive samples per type of centre were distributed as follows: hospitals 50%; PHCs 71%; STI clinic 77%; CBVCTSs 89% (table 1).

We collected 4172 samples, of which 728 did not meet the inclusion criteria and were excluded from the analysis. Out of the remaining 3444 specimens, 713 were non-reactive by the less sensitive assay, but 53 samples were from patients with <200 CD4+ T cells/μL or clinical criteria for AIDS and were considered to be LSIs. Therefore, 660 (19.2%) samples were considered RIs (fig 1).

Of the samples, 50.2% (n = 1728) were from hospitals, 37.3% (n = 1285) from PHCs, 10.2% (n = 351) from STI clinic and 2.3% (n = 80) from CBVCTSs. The RI percentage differed with the type of centre: 16.5% (n = 285; 95% CI 14.7 to 18.2) at hospitals, 21.5% (n = 276; 95% CI 19.2 to 23.7) at PHCs, 23.4% (n = 82; 95% CI 18.9 to 27.8) at STI clinic and 21.3% (n = 17; 95% CI 12.9 to 31.8) at CBVCTSs. The percentage of RI in hospitals was significantly lower than in PHC and STI clinic ($p \leq 0.001$) (table 1).

The characteristics of individuals with RI are shown in Table 2. Most were male (79.8%), median age was 33.1, MSM was the main HIV transmission group (62.5%) and 38.8% reported at least one STI within the 12 months before HIV diagnosis. Country of origin was known in 426 cases and 26.5% were immigrants, mainly from South America (48.7%). The date of arrival in Spain was collected in only 71 cases; 59 (83%) of which arrived more than 12 months before the time of HIV diagnosis (median 39 months; interquartile range 21–60). We found statistically significant differences by gender, origin, transmission group and coinfection with other STIs according to the site of diagnosis.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first time the STARHS technique has been used in Spain. The percentages of HIV diagnosis vary between the centres. The number of samples from Catalanian

Table 1 Distribution of HIV tests performed by centre (2003–2005)

	Total	Hospitals	PHCs	STI clinic	CBVCTSs
HIV tests performed*	478 932	250 398	210 359	14 962	3213
Positive HIV tests†	5800 (1.2%)	3455 (1.4%)	1805 (0.9%)	451 (3.0%)	89 (2.8%)
Samples collected*	4172	2305	1404	374	89
Samples studied‡	3444 (59.4%)	1728 (50.0%)	1285 (71.2%)	351 (77.8%)	80 (89.9%)
Recent infections¶	660 (19.2%)	285 (16.5%)	276 (21.5%)	82 (23.4%)	17 (21.3%)

*Number—this number does not represent single persons; †number of positive HIV tests performed and prevalence (percentage) of positive HIV tests—this number does not represent single persons. Out of 5800 positive HIV tests, 1628 were not collected for the study (mostly because of insufficient volume). Prevalence was calculated as follows: number of HIV tests performed divided by the total number of HIV tests performed; ‡number of samples included in the study and percentage of studied samples over the total of positive HIV tests by each centre—this number represents single persons; ¶number and percentage of recent infections—this number represents single persons. Percentages of recent infections by site of diagnosis were computed over the total number of samples with the inclusion criteria studied from each centre. CBVCTSs, community-based voluntary counselling and testing sites; PHCs, primary health centres; STI, sexually transmitted infection.

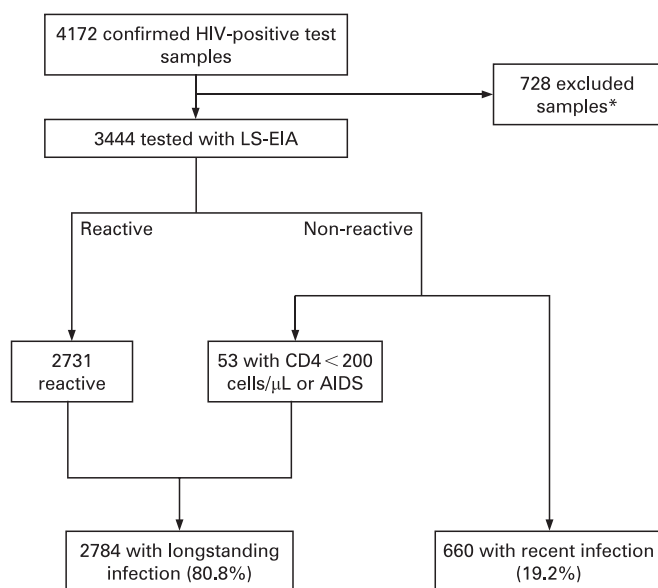


Figure 1 Algorithm for the identification of recently infected samples. *Of the 728 samples excluded, 75.0% belonged to patients whose HIV infection was diagnosed more than 6 months before sample collection, 11.1% were duplicate samples, 9.2% were HIV-negative samples, 2.7% did not have enough volume, 1.4% were negative by Western blot and 0.5% were from patients aged under 18 years.

centres—when compared with the HIV reporting system of Catalonia—represents 74% of all HIV cases reported during the same period. Therefore, although not representative, we consider the diagnoses of HIV in the study population to be indicative of those currently made in our setting. According to our results, 19.2% of new diagnoses had acquired the infection during the 6 months before the test and this is consistent with the results of a recently published study from 10 United States cities.¹² The percentage of RIs varied according to the type of recruitment centre and the differences were statistically significant. Although a lower percentage of positive samples from hospitals were included in the study, the fact that this group had the lowest percentage of RIs suggests that PHCs, STI clinic and CBVCTSs receive a high number of RIs because they are the first line of referral and, therefore, much closer to the community. Given the increasing evidence that people who are diagnosed with HIV reduce risk behaviour and, thus, HIV transmission,^{15 16} this finding clearly supports the need to improve the offer of HIV testing and reinforce the activity of CBVCTSs, including implementation of rapid HIV testing.¹⁷

Data from regional HIV reporting systems in Spain show that 46% and 31% of all new diagnoses correspond to heterosexual individuals and MSM, respectively.³ The high proportion of MSM among RIs in our study (62.5%) may be attributable to several factors. Although a potential selection bias may have occurred because the STI clinic in Madrid, which also has a voluntary counselling and testing service, attends a high proportion of patients who are MSM, even if this centre is removed from the analysis, MSM account for 56% of all individuals identified as having RI. Therefore, other factors should be considered. First, concern among the gay community about infection means that they test more often and sooner after a potential exposure. In Spain, 39.4% of the general population had taken an HIV test once,¹⁸ whereas for MSM this percentage was 81.0%.⁴ Accordingly, MSM is the group with the lowest percentage of diagnoses made with <200 CD4 cells/μL.⁴ Second, the incidence

of sexual risk practices and STIs are increasing among MSM in our setting,^{4 19–21} suggesting that the incidence of HIV is higher among this group and that the likelihood of diagnosing infection at an earlier stage could increase. Our results also support that the HIV epidemic is growing again among the local gay community.

Almost 39% of all individuals with RI reported at least one STI diagnosed over the previous 12 months, the highest percentage being at PHCs (75%). This finding should be interpreted with caution because of the high number of missing values for this variable. While there was information on co-infection for all RIs identified at STI clinics, this was available for only 53.0%, 13.0% and 70.6% of RIs from hospitals, PHCs and CBVCTSs, respectively. Moreover, one laboratory receiving samples from PHCs in Barcelona also serves as a STI unit and this may contribute to the high percentage of co-infection at this site. However, even assuming that all patients from whom we have no information on STI co-infection were not infected, the percentage of patients with a RI and a STI during the year before HIV diagnosis would be 17% (table 2). Consistent with those of other studies,^{4 20 21} our results suggest that STI may play a role in the transmission of HIV in our setting.

Although we only had information on the country of origin for 65% of the individuals with RI, more than a quarter of those infected were immigrants. The proportion of immigrants with RI was much higher (78.6%) at CBVCTSs than at the other sites. Since we have no information on LSI, it is difficult to interpret this data; however, if we assume a similar proportion of immigrants among the LSI, it may reflect a preference for non-official sites that offer anonymous voluntary counselling and testing to this population. Otherwise, it could reflect a higher incidence of HIV infection among this group. To ascertain whether these infections were imported or locally acquired, we recorded the date of arrival in Spain. Of 71 immigrants with RI for whom this variable was available, 59 (83%) arrived in Spain more than 1 year before they were diagnosed with HIV. Although the finding cannot be extrapolated, it does suggest that in Spain most HIV infections among immigrants are locally acquired. This is consistent with the fact that in our setting, unlike the UK, immigrants come mainly from countries with a low prevalence HIV, such as Morocco, Romania and Latin America.²²

A possible limitation of our study was the difficulty in retrieving clinical-epidemiological data from all the patients whose samples were studied. On the one hand, we could not systematise the collection of additional data from the samples studied and had to limit it to RI. On the other, samples from laboratories corresponding to outside clinics could not be linked to clinical records because of confidentiality issues. Therefore, the characteristics of individuals with RI were not compared with the characteristics of individuals with LSI and this has resulted in a relatively high percentage of missing values in some variables from patients with RI. Another limitation was the differences in sample recruitment between the different centres. Whereas some centres collected 90% of all positive samples, others collected 50%. Nevertheless, our results are consistent with other studies and with the epidemiological trends identified using other information sources.⁴

The limitations of STARHS are well-known, especially misclassification of advanced disease stage, AIDS or patients on antiretroviral treatment as RIs. Nevertheless, access to clinical and laboratory information allowed us to detect and exclude misclassifications.²³ The Vironostika HIV-1 EIA is based on subtype B antigens. Therefore, when used to detect RI, this assay performs differently on B and non-B subtypes,²⁴ with a longer window period on non-B subtypes. Although few studies

Table 2 Characteristics of people with recent infection (2003–2005) by site of diagnosis

	Total n (%)	Hospitals n (%)	PHCs n (%)	STI clinic n (%)	CBVCTSs n (%)	p Value§
Gender (n = 639)*						<0.001**
Men	510 (79.8)	227 (80.2)	188 (73.2)	78 (95.1)	17 (100.0)	
Origin (n = 426)*						<0.001††
Spain	313 (73.5)	180 (73.2)	73 (83.0)	57 (73.1)	3 (21.4)	
Immigrants	113 (26.5)	66 (26.8)	15 (17.0)	21 (26.9)	11 (78.6)	
South and Central America	62 (54.9)	33 (50.0)	8 (60.0)	13 (61.9)	7 (63.6)	
Western and Central Europe	18 (15.9)	7 (10.6)	4 (26.7)	7 (33.3)	0 (0.0)	
Middle East and North Africa	11 (9.7)	6 (9.1)	1 (6.7)	1 (4.8)	3 (27.3)	
Sub-Saharan Africa	10 (8.8)	9 (13.6)	1 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Eastern Europe and Central Asia	8 (7.1)	7 (10.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (9.1)	
Other	4 (3.5)	4 (6.1)	1 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Age, y† (n = 623)*	32.9	33.2	33.0	31.8	30.1	0.741
<30	225 (36.1)	105 (38.2)	83 (33.1)	29 (36.3)	8 (47.1)	
30–40	274 (44.0)	113 (41.1)	116 (46.2)	38 (47.5)	7 (41.2)	
40–50	93 (14.9)	40 (14.5)	42 (16.7)	10 (12.5)	1 (5.9)	
>50	31 (5.0)	17 (6.2)	10 (4.0)	3 (3.8)	1 (5.9)	
Transmission group (n = 389)*						<0.001‡‡
MSM	243 (62.5)	125 (54.8)	41 (62.1)	73 (90.1)	7 (50.0)	
Heterosexual	90 (23.1)	64 (28.1)	15 (22.7)	7 (8.6)	1 (7.1)	
Injection drug users	56 (14.4)	39 (17.1)	10 (15.2)	1 (1.2)	6 (42.9)	
STI‡ (n = 281)*	109 (38.8)	54 (35.8%)	27 (75%)	27 (32.9%)	1 (8.3%)	<0.001§§
Non-specified syphilis¶	52 (47.7)	27 (50.0)	18 (66.7)	7 (25.9)	0 (0.0)	
Gonococci	10 (9.2)	4 (7.4)	3 (11.1)	3 (11.1)	0 (0.0)	
Herpes	5 (4.6)	2 (3.7)	1 (3.7)	2 (7.4)	0 (0.0)	
Chlamydia	3 (2.7)	2 (3.7)	0 (0.0)	1 (3.7)	0 (0.0)	
Other/non-specified	39 (35.8)	19 (35.2)	5 (18.5)	14 (51.9)	1 (100.0)	

*The number of samples with available information for each variable. Stratified subtotals may not match the total number of RI because missing values were excluded from each variable; †median; ‡having a diagnosis of a sexually transmitted infection (STI) within 12 months before study inclusion; §p value, Pearson's χ^2 test; ¶the diagnosis of syphilis was self-reported by the patient, during the last 12 months, before study inclusion; **differences between hospitals and STI clinic and primary health centres (PHC); ††differences between community-based voluntary counselling and testing sites (CBVCTSs) and each of the other sites; ‡‡differences between STI clinics and each of the other sites; §§differences between PHCs and each of the other sites.

have analysed the distribution of HIV subtypes in Spain, only 7.6% of all clinically diagnosed acute HIV infections may be non-B subtypes.²⁵ However, given that most immigrants come from South America,²² it is unlikely that non-B HIV subtypes have significantly affected the results of this study. In any case, they would have produced a slight overestimation of the percentage of RI. Nevertheless, since 2008 our laboratory has been using the BED assay, which has a similar window period for HIV subtypes A to E^{26, 27} and better reproducibility since it is based on the HIV IgG to non-HIV IgG ratio and uses a simple 1:100 dilution, which performs better in subtypes B, E and D.^{26, 27}

In summary, the study showed that implementing STARHS in our setting is feasible and, more importantly, that in order to improve the use of the data collected, it is necessary to implement these studies in settings where more complete clinical-epidemiological data are available. Consequently, since 2006, STARHS has been included in the Integrated AIDS/HIV/STI Surveillance System in Catalonia by systematically testing all new HIV diagnoses made in 14 hospitals, nine of them participating in an

open cohort (PISCIS) of people who are HIV positive,^{28, 29} as well as throughout the CBVCTS network of the region.⁴ Eventually, this should enable us to collect data from patients with LSI and to estimate incidence rates. This study highlights important epidemiological features of local HIV infection, such as the ongoing spread of HIV among MSM, the potential role of STIs in new HIV infections and the vulnerability of immigrants as a new target population, which should be taken into account in national HIV and STI prevention strategies.

Acknowledgements: We thank Joanne V Mei (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA) for technical assistance and advice.

Funding: "La Marató de TV3" Foundation awarded the CEEISCAT a grant for the development of the AERI-HIV (Algoritme Estandartitzat per la detecció de Recent Infectats pel VIH) project for epidemiological research on AIDS by applying the STARHS technique (project #022010). This work was partially funded by the Direcció General de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya and by the Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE, Madrid Spain, National AIDS Plan Secretariat of the Spanish Ministry of Health), the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III and the Spanish Network for AIDS Research (RIS; ISCIII-RETIC RD06/006). JMM was a recipient of a research grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and the Conselleria de Salut de la Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain. The Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) has provided the samples for the quality control programme (FDA BB-IND # 8193).

Competing interests: None.

Ethics approval: The protocol was approved by the ethics committees of all the participating centres.

Contributors: Project concept, design, interpretation of results: J Casabona, J Masip, N Vives, B Ortiga, A Alquézar, A Romero, M Granel, D Puente, M^a J Casado, À Jaen. Quality control programme: J Almeda. Statistical analysis: A Esteve, A Montoliu, N Ortega. Computer support: E Puchol. Management and storage of specimens: R Muñoz. Technical support: V Espurz.

Key messages

- ▶ Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS) is feasible and it helps to identify local epidemiological features.
- ▶ Since 2006, STARHS is included in the HIV/STI Integrated Surveillance System of Catalonia, Spain.

STARHS Laboratory (Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol): V González, E Martró, L Matas, V Ausina.

Acquisition of data: D Puente, M Granell, A Romero, I Rodrigo, À Bosch, R López, E Dopico, J Ros, R Navarro, C Rovira, T Pumarola, A Casanova, E Martró, L Matas, V González, V Ausina, E Caballero, N Margall, J Farré, C Toro, M Sauca, X Ortín, M Armengual, J M^a Prats, J M^a Eurás, M Navarro, J Ramón Blanco, J M^a Simó, M^a C Villà, E Márquez, J M Miró, F Agüero, O Sued, M López-Diequez, L Zamora, J M Gatell, E Ferrer, D Podzamczar, C Tural, B Clotet, E Ribera, J Altès, J Manuel Guadarrama, P Domingo, T Puig, V Soriano, C Bernal, P Barrufet, L Force, C Gutiérrez, A Ortí, G Navarro, F Segura, À Masabeu, J Vilaró, J A Iribarren, J A Oteo, B Coll, C A Villaverde, S Montull, I Garcia, J del Romero, C Rodríguez, R Sala, O Díaz, K Zaragoza, F Pujol, J Saz, M Meroño, J Becerra, R Ros, A Avellaneda, M Sité, A Rafel.

Drafting of the manuscript: A Romero, V González, M I Granell, L Matas, A Esteve, E Martró, I Rodrigo, T Pumarola, J M Miró, A Casanova, E Ferrer, C Tural, J del Romero, C Rodríguez, E Caballero, E Ribera, J Casabona.

Final Approval: J Casabona, J Masip, N Vives, B Ortiga, A Alquézar, A Romero, M Granell, D Puente, M^a J Casado, À Jaen, J Almeda, A Esteve, A Montoliu, N Ortega, E Puchol, R Muñoz, V Espurz, I Rodrigo, À Bosch, R López, E Dopico, J Ros, R Navarro, C Rovira, T Pumarola, A Casanova, E Martró, L Matas, V González, V Ausina, E Caballero, N Margall, J Farré, C Toro, M Sauca, X Ortín, M Armengual, J M^a Prats, J M^a Eurás, M Navarro, J Ramón Blanco, J M^a Simó, M^a C Villà, E Márquez, J M Miró, F Agüero, O Sued, M López-Diequez, L Zamora, J M Gatell, E Ferrer, D Podzamczar, C Tural, B Clotet, E Ribera, J Altès, J M Guadarrama, P Domingo, T Puig, V Soriano, C Bernal, P Barrufet, L Force, C Gutiérrez, A Ortí, G Navarro, F Segura, À Masabeu, J Vilaró, J A Iribarren, J A Oteo, B Coll, C A Villaverde, S Montull, I Garcia, J del Romero, C Rodríguez, R Sala, O Díaz, K Zaragoza, F Pujol, J Saz, M Meroño, J Becerra, R Ros, A Avellaneda, M Sité, A Rafel.

Composition of the Standardized Algorithm for Recent HIV Infections (AERIVIH) Study Group:

The Coordinating Center (CEEISCAT): J Casabona, J Masip, N Vives, B Ortiga, A Alquézar, A Romero, M Granell, D Puente, M^a Casado, À Jaen, J Almeda, A Esteve, A Montoliu, N Ortega, E Puchol, R Muñoz, V Espurz.

The STARHS Laboratory (Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol): V González, E Martró, L Matas, V Ausina.

The Peripheral Centers—Primary Health Center Laboratories: I Rodrigo (Laboratori Clínic Manso, Barcelona), À Bosch (Laboratori Intercomarcal de l'Alt Penedès, l'Anoia i el Garraf, Igualada), R López (Laboratori Clínic Bon Pastor, Barcelona), E Dopico (Laboratori Clínic l'Hospitalet de Llobregat, l'Hospitalet de Llobregat), J Ros (Laboratori Clínic Barcelonès Nord i Maresme, Badalona), R Navarro (Laboratori Clínic Cornellà de Llobregat, Cornellà de Llobregat), C Rovira (Laboratori Clínic El Maresme, Mataró). Laboratory staff: T Pumarola (Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona); A Casanova (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat); E Martró, L Matas, V González, V Ausina (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona); E Caballero (Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona); N Margall (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); J Farré (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida); C Toro (Hospital Carlos III, Madrid); M Sauca (Hospital de Mataró); X Ortín (Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa); M^a José Armengual (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell); J M^a Prats (Hospital de Palamós); J M^a Eurás (Hospital General de Vic); José Ramón Blanco (Complejo San Millán-San Pedro de La Rioja); J M^a Simó (Hospital Universitari de Sant Joan de Reus); M^a C Villà (Hospital General de Granollers); E Márquez (Hospital General de l'Hospitalet, Hospitalet de Llobregat). Clinical staff: J M Miró, F Agüero, O Sued, M López-Diequez, J M Gatell, L Zamora (Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona); E Ferrer, D Podzamczar (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat); C Tural, B Clotet (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona); E Ribera (Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona); J Altès, J M Guadarrama (Hospital Alt Penedès, Vilafranca); P Domingo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); T Puig (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida); V Soriano (Hospital Carlos III, Madrid); C Bernal (Hospital Universitari San Cecilio, Granada); P Barrufet, L Force (Hospital de Mataró); C Gutiérrez (Hospital Ramón y Cajal, Madrid); A Ortí (Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa); G Navarro, F Segura (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell); À Masabeu (Hospital de Palamós); J Vilaró (Hospital General de Vic); J A Iribarren (Hospital de Donostia, San Sebastián); J A Oteo (Complejo San Millán-San Pedro de La Rioja); B Coll, C A Villaverde (Hospital Universitari de Sant Joan de Reus); S Montull (Hospital General de Granollers); I Garcia (Hospital General de l'Hospitalet, Hospitalet de Llobregat).

Sexually transmitted infections clinic: J del Romero, C Rodríguez (Centro Sanitario Sandoval, Madrid).

Community-based testing sites: R Sala (Laboratori Sabater Tobella, Barcelona); O Díaz (Servei d'Atenció i Prevenció Sociosanitària: SAPS - Creu Roja, Barcelona); K Zaragoza (Stop Sida, Barcelona); F Pujol, J Saz (Projecte dels Noms – Joves positius, Barcelona); M Meroño (Àmbit Prevenció, Barcelona); J Becerra (Associació Ciutadana Antisida de Catalunya – ACASC, Barcelona); R Ros (Centre Jove d'Anticoncepció i Sexualitat – CJAS, Barcelona); A Avellaneda, M Sité (Actua Vallès, Sabadell); A Rafel (Associació Antisida de Lleida).

REFERENCES

1. **Hamers FF**, Downs AM. The changing face of the HIV epidemic in Western Europe: what are the implications for public health policies? *Lancet* 2004;**364**:83–94.
2. **EuroHIV**. HIV/AIDS Surveillance in Europe. End-year report 2005. Saint-Maurice: Institut de Veille Sanitaire, 2006:73.
3. Vigilancia epidemiológica del VIH en España: Valoración de la Epidemia de VIH en España a partir de los sistemas de notificación de casos de las CCAA. Madrid: Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología, 2007.
4. **Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT)**. *SIVES 2005: Sistema integrat de vigilància epidemiològica del SIDA/VIH/ITS a Catalunya (SIVES): Informe anual CEEISCAT*. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut, 2005:140.
5. **Janssen RS**, Satten GA, Stramer SL, *et al*. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 1998;**280**:42–8.
6. **Vignoles M**, Avila MM, Osmani ML, *et al*. HIV seroincidence estimates among at-risk populations in Buenos Aires and Montevideo: use of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;**42**:494–500.
7. **Nash D**, Bennani Y, Ramaswamy C, *et al*. Estimates of HIV incidence among persons testing for HIV using the sensitive/less sensitive enzyme immunoassay, New York City, 2001. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;**39**:102–11.
8. **Alves K**, Shafer KP, Caseiro M, *et al*. Risk factors for incident HIV infection among anonymous HIV testing site clients in Santos, Brazil: 1996–1999. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;**32**:551–9.
9. **Gouws E**, Williams BG, Sheppard HW, *et al*. High incidence of HIV-1 in South Africa using a standardized algorithm for recent HIV seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;**29**:531–5.
10. **Murphy G**, Parry JV, Gupta SB, *et al*. Test of HIV incidence shows continuing HIV transmission in homosexual/bisexual men in England and Wales. *Commun Dis Public Health* 2001;**4**:33–7.
11. **Gupta P**, Kingsley L, Sheppard HW, *et al*. High incidence and prevalence of HIV-1 infection in high risk population in Calcutta, India. *Int J STD AIDS* 2003;**14**:463–8.
12. **Schwarcz S**, Weinstock H, Louie B, *et al*. Characteristics of persons with recently acquired HIV infection: application of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion in 10 US cities. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;**44**:112–5.
13. **Kallas EG**, Bassichetto KC, Oliveira SM, *et al*. Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (STARHS) strategy in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004;**8**:399–406.
14. **Kothe D**, Byers RH, Caudill SP, *et al*. Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroincidence. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;**33**:625–34.
15. **King-Spooner S**. HIV prevention and the positive population. *Int J STD AIDS* 1999;**9**:1387–88.
16. **Wolitski RJ**, Bailey CJ, O'Leary A, *et al*. Self-perceived responsibility of HIV-seropositive men who have sex with men for preventing HIV transmission. *AIDS Behav* 2003;**7**:363–72.
17. **Fernández L**, Rifà B, Muñoz R, *et al*. Impact of rapid HIV test introduction in voluntary counseling and testing sites in Catalonia [abstract]. XVII International AIDS Conference. Mexico: 3–8 August, 2008.
18. **Encuesta de salud y hábitos sexuales**. INE y Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida. Madrid: 2003.
19. **Folch C**, Casabona J, Muñoz R, *et al*. Evolución de la prevalencia de infección por el VIH y de las conductas de riesgo en varones homo/bisexuales. *Gaceta Sanit* 2005;**19**:294–301.
20. **Vall-Mayans M**, Casals M, Vives A, *et al*. Reemergencia de la sífilis infecciosa en varones homosexuales y coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana en Barcelona, 2002–2003. *Med Clin (Barc)* 2006;**126**:94–6.
21. **Casabona J**, Binefa G, Folch C, *et al*. Sexually acquired HIV infections on the rise in Catalonia, Spain. *Eurosurveill* 2006;**11**:7.
22. **Instituto Nacional de Estadística**. *Avance del Padrón Municipal a 1 de enero de 2006: datos provisionales* [electronic resource]. Madrid: INE, 2006. <http://www.ine.es/prensa/prensa.htm> (accessed 13 November 2008).
23. **Fisher M**, Pao D, Murphy G, *et al*. Serological testing algorithm shows rising HIV incidence in a UK cohort of men who have sex with men: 10 years application. *AIDS* 2007;**21**:2309–14.
24. **Young CL**, Hu DJ, Byers R, *et al*. Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMérieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;**19**:481–6.
25. **de Mendoza C**, Rodriguez C, Colomina J, *et al*. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis* 2005;**41**:1350–4.
26. **Dobbs T**, Kennedy S, Pau C-P, *et al*. Performance characteristics of the Immunoglobulin G-Capture BED-Enzyme Immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:2623–8.
27. **Parekh BS**, Kennedy MS, Dobbs T, *et al*. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;**18**:295–307.
28. **Jaen A**, Esteve A, Miró JM, *et al*. Determinants of HIV progression and assessment of the optimal time to initiate highly active antiretroviral therapy: PISCIS Cohort (Spain). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;**47**:212–20.
29. **Jaén A**, Casabona J, Esteve A, *et al*. Clinical-epidemiological characteristics and antiretroviral treatment trends in a cohort of HIV infected patients. The PISCIS Project. *Med Clin (Barc)* 2005;**124**:525–31.

ARTÍCULO II

Prevalence of Transmitted HIV-1 Drug Resistance and Distribution of HIV-1 Subtypes Among Patients With Recent Infection in Catalonia (Spain) Between 2003 and 2005

Anabel Romero, Omar Sued, Teresa Puig, Anna Esteve, Tomàs Pumarola, Jordi Casabona, Victoria González, Lurdes Matas, Cristina Tural, Isabel Rodrigo, Núria Margall, Pere Domingo, Aurora Casanova, Elena Ferrer, Estrella Caballero, Esteve Ribera, Joan Farré, Teresa Puig, M^a José Armengual, Gemma Navarro, Josep M^a Prat, Àngels Masabeu, Josep M^a Simó, Carlos A. Villaverde, Pilar Barrufet, M^a Goretti Sauca, Xavier Ortin, Amat Ortí, Rosa Navarro, Josep M^a Euras, Josep Vilaró, M^a Carme Villà, Santiago Montull, Conrad Vilanova, Ferran Pujol, Olga Díaz, Jose M. Miró and the AERI study Group.

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011 Aug-Sep;29(7):482-9.

RESUMEN

La vigilancia de las resistencias transmitidas entre los pacientes que todavía no han recibido tratamiento antirretroviral proporciona una información necesaria para considerar la terapia antirretroviral de elección. En los pacientes con infección reciente, además, conocer la prevalencia de resistencias transmitidas es un indicador sensible para monitorizar la evolución de las cepas de VIH-1 resistentes en una población.

Los movimientos poblacionales, resultado de los fenómenos de inmigración o viajes internacionales, y los contactos sexuales con individuos de países donde los subtipos no B son más prevalentes han dado lugar a un aumento de los subtipos no B en algunos países desarrollados, donde el subtipo más prevalente había sido el B.

Los objetivos de este estudio han sido estimar la prevalencia de cepas de VIH-1 con resistencias transmitidas a los antirretrovirales y describir los subtipos de VIH-1 entre una muestra de pacientes con infección reciente en Cataluña, entre los años 2003 y 2005. Además, también se propuso describir las características de estos pacientes en función de la presencia o ausencia de resistencias y según el subtipo de VIH-1.

Después de identificar las muestras de pacientes con infección reciente a través del test STARHS en un estudio previo, se recuperaron aquellas que correspondían a los pacientes identificados con infección reciente, y que no habían recibido tratamiento antirretroviral. Una vez recuperadas, se realizó el genotipado de las muestras y se obtuvo la secuencia FASTA de cada una. Las secuencias FASTA se analizaron usando el programa disponible en la web de Stanford (HIVDB Program). Para estimar la prevalencia de resistencias transmitidas se usó el listado de mutaciones publicado por la OMS en el año 2009.

Entre un total de 182 pacientes con infección reciente, 14 (7,7%) presentaron resistencias transmitidas. Siete (3,8%) tenían resistencias transmitidas frente a los ITINANs, 6 (3,3%) frente a los ITIANs, 3 (1,6%) frente a los IPs, y sólo dos individuos (1,1%) presentaban resistencias frente a más de una familia de fármacos. No se encontraron diferencias entre los pacientes infectados por cepas con resistencias y los pacientes infectados por cepas sin resistencias. Un total de 35 pacientes (19,2%) estaban infectados por un subtipo de VIH-1 no B. Los pacientes infectados por subtipos no B eran mayores (35,9 vs 32,8 años), con mayor frecuencia habían adquirido la infección a través del uso de drogas por vía parenteral, y se habían diagnosticado con mayor frecuencia en áreas de fuera de Barcelona y su área metropolitana. Un 17,2% de los pacientes de origen autóctono estaban infectados por subtipos de VIH-1 no B.

Este estudio es el primero en estimar la prevalencia de resistencias transmitidas en pacientes con infección reciente por VIH-1 en Cataluña, y los resultados son muy similares a otros estudios realizados en otras regiones de España. La alta prevalencia de subtipos no B entre los pacientes autóctonos sugiere que éstos se encuentran circulando entre nuestra población. Para el seguimiento adecuado de estos parámetros es necesaria la vigilancia epidemiológica sistemática de las resistencias transmitidas.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Prevalence of Transmitted Antiretroviral Resistance and Distribution of HIV-1 Subtypes Among Patients with Recent Infection in Catalonia (Spain) between 2003 and 2005

Anabel Romero^{a,b,c,◇}, Omar Sued^{d,◇}, Teresa Puig^e, Anna Esteve^{a,b}, Tomàs Pumarola^d, Jordi Casabona^{a,b,c}, Victoria González^{a,b,f}, Lurdes Matas^f, Cristina Tural^g, Isabel Rodrigo^h, Núria Margallⁱ, Pere Domingoⁱ, Aurora Casanova^j, Elena Ferrer^j, Estrella Caballero^k, Esteve Ribera^k, Joan Farré^l, Teresa Puig^l, M. José Amengual^m, Gemma Navarro^m, Josep M. Pratⁿ, Àngels Masabeuⁿ, Josep M. Simó^o, Carlos A. Villaverde^o, Pilar Barrufet^p, M. Goretti Sauca^p, Xavier Ortin^q, Amat Ortí^q, Rosa Navarro^r, Josep M. Euras^s, Josep Vilaró^s, M. Carme Villà^t, Santiago Montull^t, Conrad Vilanova^u, Ferran Pujol^v, Olga Díaz^w, Jose M. Miró^{d,*}, the AERI study Group

^a Center for Epidemiology on HIV/AIDS and STI of Catalonia (CEEISCAT), Institut Català d'Oncologia/Health Department, Generalitat de Catalunya, Spain

^b CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

^c Department of Epidemiology and Evaluation, IMIM-Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain, Department of Paediatrics, Obstetrics and Gynaecology, and Preventive Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Hospital Clínic – IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^e Institut de Recerca de la SIDA-irsiCaixa, Badalona, Spain, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^f Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

^g Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

^h Laboratori Clínic Manso, Barcelona, Spain

ⁱ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^j Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL, l'Hospitalet de Llobregat, Spain

^k Hospital Universitari Vall d'Hebron, UBELL, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^l Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

^m Corporació Sanitària i Universitària Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Spain

ⁿ Hospital de Palamòs, Palamòs, Spain

^o Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Reus, Spain

^p Hospital de Mataró, Mataró, Spain

^q Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa, Spain

^r Laboratori Clínic Cornellà de Llobregat, Cornellà de Llobregat, Spain

^s Hospital General de Vic, Vic, Spain

^t Hospital General de Granollers, Granollers, Spain

^u Laboratori Clínic El Maresme, Mataró, Spain

^v Projecte dels Noms – Hispanosida, Barcelona, Spain

^w Servei d'Atenció i Prevenció Socio sanitària: SAPS – Creu Roja, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2010

Accepted 3 March 2011

Available online 2 May 2011

Keywords:

Transmitted resistance

Recent infections

HIV-1 subtypes

ABSTRACT

Objectives: The objectives of this study were to assess the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistances (TDR) and HIV-1 subtypes in recently infected patients in Catalonia between 2003 and 2005 and to describe the characteristics of these patients according to the presence or absence of TDR and HIV-1 subtype.

Methods: After application of the Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS), residual aliquots of serum samples from recently infected antiretroviral-naïve individuals were genotyped. FASTA sequences were analyzed using the HIVDB Program. The World Health Organization 2009 List of Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug Resistant HIV Strains was used to estimate the prevalence of TDR.

* Corresponding author.

E-mail address: jmmiro@ub.edu (J.M. Miró).

◇ Omar Sued and Anabel Romero have contributed equally in the design, analysis, and writing of the manuscript.

Results: Of 182 recently infected patients, 14 (7.7%) presented TDR. Seven (3.8%) had genotypic evidence of TDR against non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, 6 (3.3%) against nucleoside reverse transcriptase inhibitors, 3 (1.6%) against protease inhibitors (PIs), and only 2 individuals (1.1%) presented TDR against more than one class of drugs. Thirty-two (19.2%) patients were infected with a non-B HIV-1 subtype.

Conclusion: This is the first study to estimate the prevalence of TDR in recently infected patients in Catalonia. The results are similar to those of studies performed in other Spanish regions. Correct monitoring of these parameters requires systematic epidemiologic surveillance of transmitted resistance.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Prevalencia de resistencias primarias transmitidas y distribución de subtipos VIH-1 en pacientes con infección reciente en Cataluña (2003-2005)

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la prevalencia de las resistencias primarias transmitidas (RPT) y de subtipos de VIH-1 en pacientes recientemente infectados en Cataluña entre 2003 y 2005, y describir las características de estos pacientes según la presencia o ausencia de RPT y el subtipo de VIH-1.

Métodos: Después de la aplicación del algoritmo de suero serológico para la seroconversión reciente al VIH (STARHS), alícuotas residuales de las muestras de suero de individuos recientemente infectados no tratados previamente con antirretrovirales fueron genotipados. Las secuencias FASTA se analizaron con el programa HIVdb. Se utilizó el listado de mutaciones de la Organización Mundial de la Salud del 2009 para estimar la prevalencia de resistencias transmitidas.

Resultados: De 182 pacientes recientemente infectados, 14 (7,7%) presentaron RPT. Siete personas (3,8%) presentaban evidencias genotípicas de RPT a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos a nucleósidos, 6 (3,3%) frente a inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, 3 (1,6%) frente a los inhibidores de la proteasa, y solo 2 personas (1,1%) presentaron RPT a más de una familia de medicamentos. Treinta y cinco (19,2%) pacientes estaban infectados con un subtipo no-B del VIH-1.

Conclusión: Este es el primer estudio que estima la prevalencia de RPT en pacientes recientemente infectados en Cataluña, y los resultados son similares a los de estudios realizados en otras regiones españolas. Para el adecuado seguimiento de estos parámetros es necesaria la vigilancia epidemiológica sistemática de las RPT.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

OBJETIVOS

Palabras clave:

Resistencias transmitidas

Infecciones recientes

Subtipo de VIH-1

Introduction

Emergence of transmitted HIV-1 drug resistance is well documented almost everywhere combined antiretroviral treatment (cART) is available. Global resistance estimates vary between 5% and 25% in primary infection, depending on study population, definition of resistance, cART strategy, infection status (recent or chronic), and year of evaluation.^{1,2} In Spain, the rate of transmitted HIV-1 drug resistance has been reported to be between 7.1 and 12.1%.^{3,4}

Continued surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance provides useful information on cART as a first-line regimen. Baseline resistance has been shown to impair the response to highly active antiretroviral therapy (HAART),⁵ although a genotype-guided cART regimen can prove just as effective in patients with primary drug resistance as in patients with wild-type virus.⁶

In addition, increased population movements resulting from immigration, international travel, and sexual contact with individuals from countries where non-B subtypes are endemic have led to increased prevalence of these strains in developed countries.⁷ The presence of circulating non-B subtypes complicates the interpretation of tests (viral load or resistance testing) that have been developed mainly for B subtypes. Many reported minor mutations associated with resistance by B subtypes are natural polymorphisms in some non-B subtypes, although their impact on the susceptibility of antiretroviral drugs has not been clarified to date.

The objectives of this study were to report the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and HIV-1 subtypes in patients with recent HIV-1 infection in the area of Catalonia (Spain) between 2003 and 2005 and to describe the characteristics of these patients

according to the presence or absence of transmitted HIV-1 drug resistance and HIV-1 subtype.

Patients and methods

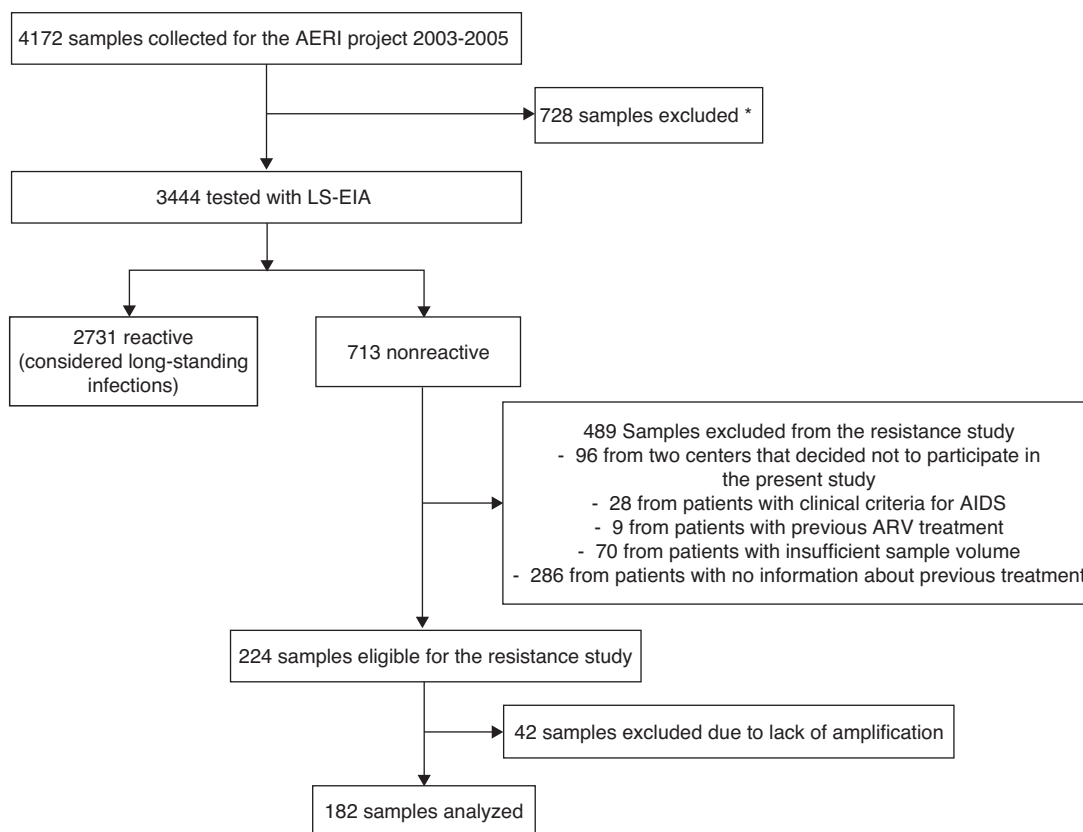
Patients

The study population was composed of new HIV-1 diagnoses, antiretroviral-naïve individuals who were identified as having newly diagnosed with recent HIV-1 infection between 2003 and 2005 at 26 of the 28 laboratories participating in the AERI project.⁸ We were only able to include samples from 17 of the 26 laboratories (1 each from Badalona, L Hospitalet de Llobregat, Lleida, Sabadell, Palamòs, Reus, Tortosa, Cornellà, Granollers, and Vic, as well as 5 from Barcelona and 2 from Mataró).

The protocol was approved by the ethics committees of all the participating centers. An infection was considered recent if the sample reacted with the sensitive enzyme immunoassay (EIA) but not with the modified less sensitive EIA (LS-EIA (ie, had low HIV-1 antibody titers). Since antibody titers can fall in advanced stages of HIV-1 infection, patients whose samples did not react and who presented clinical criteria for AIDS were not considered recently infected. All patients who had initiated cART before sampling were excluded from this analysis.

Specimen collection

Residual aliquots of serum collected for diagnostic purposes were frozen and sent by the participating laboratories to the coordinating center (*Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i la Sida de Catalunya*, CEEISCAT). After application of Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion (STARHS) samples were



*Of the 728 samples excluded, 75.0% belonged to patients whose HIV infection was diagnosed more than 6 months before sample collection, 11.1% were duplicate samples, 9.2% were HIV-negative samples, 2.7% did had insufficient volume, 1.4% were negative by WB, and 0.5% were from patients aged under 18 years.

Figure 1. Flowchart of samples included in our study. *Of the 728 samples excluded, 75.0% belonged to patients whose HIV infection was diagnosed more than 6 months before sample collection, 11.1% were duplicate samples, 9.2% were HIV-negative samples, 2.7% did had insufficient volume, 1.4% were negative by WB, and 0.5% were from patients aged under 18 years.

stored at -70°C . The residual volumes of serum specimens from recently infected treatment-naïve patients were sent to the two laboratories responsible for genotyping (IrsiCaixa Foundation and Hospital Clínic).

Data collection

Laboratory staff completed a data collection form to record CD4⁺ T-cell count, HIV-1 viral load, and previous HIV-1 test results. An additional data collection form was required for each recently infected case. This form was completed by the patient's physician or a designated person and contained demographic and clinical-epidemiological variables (sex, date of birth, country of origin, date of arrival in Spain, HIV-1 risk category, sexually transmitted infections, known HIV-1 status at the time of current testing, and use of cART).

Quality control

Extensive control procedures were implemented to ensure the quality of the data. In procedures identified as recent infections, their identification study numbers were sent to each participant centre to ensure that each included patient had not received antiretroviral treatment. Patients for whom no information on previous cART was available were excluded from the analysis.

Identification of recent infections

HIV-1 positive specimens were tested at the Microbiology Service of *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* using a modified version of the *Vironostika HIV-1 EIA* (bioMérieux, Durham, North Carolina, USA), in which sample dilution times and sample and conjugate incubation times were modified to render it less sensitive. Recent infection was defined as occurring within the past 170 days (95% confidence interval [CI], 144–200).⁹ Since 2000, *CEEISCAT* (Center for Epidemiological Studies on STIs/HIV/AIDS of Catalonia) and the Microbiology Service of the *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol* have been participating in an international STARHS quality control program established by the Centers for Disease Control and Prevention (FDA BB-IND # 8193).

Genotyping

HIV-1 reverse transcriptase and protease genes were genotyped using the *TruGene HIV-1 Genotyping Kit*, (Siemens Healthcare Diagnostics, Barcelona, Spain) at the IrsiCaixa laboratory and the *ViroSeq HIV-1 Genotyping System* (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA) at the Hospital Clínic laboratory. *TruGene* amplifies from codon 4 to 99 in the protease gene and from codon 37 to 247 in the reverse transcriptase gene. *ViroSeq* amplifies codons 1 to 99 in the protease gene and codons 1 to 335 in the reverse transcriptase gene.

In order to homogenize the sequence analyses, all FASTA sequences were analyzed using the HIVDB Program (available from <http://hivdb.stanford.edu>, August 2008) and summarized. However, to calculate the prevalence of mutations associated with reduced drug susceptibility, we used the World Health Organization (WHO) 2009 List of Mutations for Surveillance of Transmitted Drug Resistant HIV Strains.¹⁰ Viral subtypes were assessed on the basis of the pol region using the REGA HIV-1 subtyping tool, version 2 (available from <http://www.bioafrica.net/subtypingtool/html/>, July 2009). In cases where the REGA HIV-1 subtyping tool did not assign a valid subtype, we used phylogenetic analysis. Genetic distances and evolutionary rates were computed using a Kimura 2-parameter model. Neighbour-joining phylogenetic trees of each subject's pol sequences were constructed using MEGA4.1. The reliability of phylogram clustering was assessed by bootstrapping analyses.

Statistical analysis

We calculated the proportion of the presence or absence of transmitted HIV-1 drug resistance and B and non-B HIV-1 subtypes. We provided the 95% CI using the normal approximation or the exact method when appropriate. Patients with or without resistant profiles and with B or non-B HIV-1 subtypes were compared using the Pearson chi square test or Fisher exact test. The Mann-Whitney test was performed for quantitative variables. The variables examined were gender, age at diagnosis, route of transmission, origin, year of diagnosis, CD4⁺ T-cell count, HIV-1 viral load, co-infection with a sexually transmitted infection, and geographic area. Univariate and multivariate logistic regression models were constructed to identify the characteristics associated with infection by a non-B HIV-1 subtype.

Results

We collected 4,172 samples between 2003 and 2005. After excluding duplicates and patients with a previously known HIV-1 infection, we used LS-EIA to analyze 3,444 samples, of which 713 were nonreactive. Of these, 489 were excluded for various reasons (lack of information about previous treatment, samples from 2 centers that did not participate in the study, AIDS, previous antiretroviral treatment, or insufficient sample volume); therefore, 224 samples were eligible, and, of these, 182 were successfully genotyped (Fig. 1). Age, gender, origin, and HIV-1 risk were similar for the study patients and those who were excluded (data not shown). Most of the patients were male (80.8%), natives of Spain (76.2%), and the median age was 33.3 years. The main route of HIV-1 acquisition was sexual relations between men who have sex with men (48.3%), followed by heterosexual relations (22.5%), and intravenous drug use (13.2%). Median (interquartile range (IQR)) viral load (log₁₀) was 5.0 (4.5–5.5) and median (IQR) CD4 lymphocyte count was 541 cells/mm³ (357–698).

According to the WHO 2009 list, 7.7% (95% CI, 4.3–12.6) of individuals with recent infections (14 cases) presented mutations associated with resistance. Seven patients (3.8%; 95% CI, 1.6%–7.8%) had evidence of resistance against non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), 6 (3.3%; 95% CI, 1.2%–7.0%) had genotypic evidence of primary drug resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), 3 (1.6%; 95% CI, 0.3%–4.7%) against protease inhibitors (PIs), and only 2 (1.1%; 95% CI, 0.1%–3.9%) presented mutations associated with resistance against more than 1 class of drugs. The prevalence of resistance was 10.0% (95% CI, 3.8–20.5) for 2003, 6.5% (95% CI, 2.1–14.5) for 2004, and 6.7% (95% CI, 1.4–18.3) for 2005.

Table 1

Prevalence of Mutations in the Protease and Reverse Transcriptase Genes.

Mutations	Frequency N (%)
PR gene	
L10F/I/V	19 (10.4)
A71T/V	19 (10.4)
D30N	1 (0.5)
K43T	1 (0.5)
I47V	1 (0.5)
Q58E	1 (0.5)
V82L	1 (0.5)
L90S	1 (0.5)
RT gene	
NRTIs	
A62V	5 (2.7)
V118I	5 (2.7)
M41L	3 (1.6)
G333E	3 (1.6)
D67N/E	2 (1.1)
L210M	2 (1.1)
L210W	1 (0.5)
T215D	2 (1.1)
T215F	1 (0.5)
K219Q/E	2 (1.1)
T69N	1 (0.5)
K70R	1 (0.5)
V75A/I/T/V	1 (0.5)
Y115C	1 (0.5)
E44A	1 (0.5)
NNRTIs	
E138A	10 (5.5)
V179E/D/C	7 (3.8)
K103N	5 (2.7)
K103R	4 (2.2)
A98T/G	2 (1.1)
Y188L/H	2 (1.1)
F227L/S	2 (1.1)
V106A	1 (0.5)
V108I	1 (0.5)
V90I	2 (1.1)
V106I	2 (1.1)

Mutations in bold are considered to be associated with resistance according to the list for surveillance by WHO.

According to the WHO list, the most prevalent resistance mutations K103N (2.7%), and M41L (1.6%) were in the reverse transcriptase gene. In addition, considering mutations reported by the HIVDB, minor mutations were common in the protein gene (L10F/I/V and A71T/V; 10.44% each), as were NNRTI-related mutations, such as E138A (5.49%), V179E/D/C (3.85%), and K103R (2.2%). A list with all the mutations observed is presented in Table 1.

Patients with all the mutations observed in the reverse transcriptase gene (WHO 2009 List of Mutations) are shown in Table 2. Patients with transmitted HIV-1 drug resistance were men (100.0%) with a median age of 33.6 years. Men who have sex with men accounted for 57.1%, and 57.1% were from Spain. An STI was diagnosed in 75%, 71.4% were subtype B, 85.7% were from the area of Barcelona, the median viral load (log₁₀) was 4.7 and the median CD4 lymphocyte count was 476 cells/mm³. There were no statistically significant differences between resistant and nonresistant groups. However, immigrants (15.0%), men (9.5%), and patients with a diagnosis of a sexually transmitted infection (8.3%) showed a higher prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance.

Of the 182 successfully genotyped samples, 147 (80.8%) were labeled as subtype B and 35 (19.2%) were classified as other subtypes. A total of 39 sequences were not ascribed by the REGA subtyping tool and the remaining 29 were assigned by phylogenetic analysis. The distribution of non-B subtypes was CRF02_AG (n=11), CRF01_AE (n=9), G (n=3), A (n=3), F/B (n=2), G/B (n=2), D (n=1), H/B (n=1), J/K (n=1), K/G (n=1) and C (n=1). The characteristics of patients according to HIV-1 subtype are shown in Table 3. Most of the patients

Table 2
 Characteristics of patients according to the presence or absence of transmitted HIV-1 drug resistance, according to the World Health Organization 2009 List of Mutations for Surveillance of Transmitted Drug Resistant HIV Strains.

	Total	Non resistant	Resistant	P
	182	168 (92.3) 95% CI: (87.4-95.7)	14 (7.7) 95% CI: 4.3-12.6	
Sex*				.075
Male	147 (80.8)	133 (79.2)	14 (100.0)	
Female	35 (19.2)	35 (20.8)	0 (0.0)	
Age (years) (N=181)**	33.3 (27.2–37.9)	33.3 (27.2–37.8)	33.6 (28.2–42.7)	.500
<30	69 (38.1)	65 (38.9)	4 (28.5)	.677
30–40	78 (43.1)	72 (43.1)	6 (42.9)	
40–50	21 (11.6)	19 (11.4)	2 (14.3)	
>50	13 (7.2)	11 (6.6)	2 (14.3)	
Route of transmission*				.404
Men who have sex with men	88 (48.3)	80 (47.6)	8 (57.1)	
Heterosexual	41 (22.5)	37 (22.0)	4 (28.6)	
Intravenous drug use	24 (13.3)	22 (13.1)	2 (14.3)	
Others/unknown	29 (15.9)	29 (17.3)	0 (0.0)	
Origin* (N=168)***				.101
Natives	128 (70.3)	120 (77.9)	8 (57.1)	
Immigrant	40 (29.7)	34 (22.1)	6 (42.9)	
Plasma RNA-HIV-1 (log₁₀) (N=162)**	5.0 (4.5–5.5)	5.1 (4.5–5.6)	4.7 (4.2–5.3)	.093
<5.0	81 (50.0)	73 (48.3)	8 (72.7)	.210
>5.0	81 (50.0)	78 (51.7)	3 (27.3)	
CD4 cell count /mm³ (N=154)**	541 (357–698)	541 (358–6999)	476 (194–714)	.582
<350	36 (23.4)	33 (23.0)	3 (30.0)	.540
350–500	31 (20.1)	28 (19.4)	3 (30.0)	
>500	87 (56.5)	83 (57.6)	4 (40.0)	
STI co-infection (N=96)*				.147
Yes	36 (37.5)	33 (35.9)	3 (75.0)	
No	60 (62.5)	59 (64.1)	1 (25.0)	
HIV subtype*				.477
B	147 (80.8)	137 (81.5)	10 (71.4)	
Non B	35 (19.2)	31 (18.5)	4 (28.6)	
Geographic area*				.624
Barcelona	165 (90.7)	153 (91.1)	12 (85.7)	
Outside Barcelona	17 (9.3)	15 (9.1)	2 (14.3)	

*N (%); **Median and interquartile range; ***P value calculated for 168 patients with available information.

STI co-infection: Having a diagnosis of an sexually transmitted infection within 12 months before inclusion.

Barcelona: Includes Barcelona city and its metropolitan area.

Outside Barcelona: Includes Lleida, Tortosa, Reus, Vic and Palamòs.

with a non-B subtype were male (71.4%) with a median age of 35.9 years. Spanish patients accounted for 64.7% and 80% were from the area of Barcelona. Median viral load was 5.1, median CD4 cell count was 471 cells/mm³, 20% reported a diagnosis of STI, and 11.4% presented transmitted HIV-1 drug resistances. Among the patients infected by a non-B subtype, the percentage of men who have sex with men, heterosexual individuals, and intravenous drug users was the same for the 3 groups (28.6%). Twelve (34%) of these patients infected by a non-B subtype were immigrants: 5 were from South America, 4 from Sub-Saharan Africa, 2 from Eastern Europe, and 1 from North Africa. The date of arrival in Spain was known in 8 cases: 6 had arrived in Spain more than 2 years previously, 1 had arrived 7 months before the HIV diagnosis, and 1 patient had arrived just 1 month before the HIV diagnosis. When comparing individuals carrying the B subtype with those carrying the non-B subtype, individuals with non-B subtypes were older (35.9 vs 32.8 years), more frequently intravenous drug users (41.7% vs 32.8%), and frequently from areas outside Barcelona (41.2 vs. 17.0%). These differences were statistically significant (Table 3). They also presented a lower CD4 lymphocyte count than patients carrying the B subtype. The variables entered in the logistic regression model were age, CD4 count, transmission group, and transmitted HIV-1 drug resistance. In the multivariate analysis, being over 40 years of age was the only factor associated with infection by a non-B HIV-1 subtype.

Discussion

This is the first prospective study to evaluate the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistances in recently infected patients in the Autonomous Region of Catalonia, Spain. Using the 2009 WHO HIV mutations list, we were able to demonstrate a rate of drug resistance (7.7%) similar to that of previous studies in other Spanish and European regions.^{2–4,11–13} In a recent meta-analysis including 26 studies performed in Spain, the global transmitted HIV-1 drug resistance prevalence was estimated to be 10.6% between 1997 – 2008.¹⁴ Although this result is quite similar to ours, the revised studies have used different lists of transmitted HIV-1 drug resistance and none of them have used the WHO 2009 list, making difficult any comparison.

We observed that prevalence was higher in 2003 than in following years (10.0 vs 6.5% in 2004 and 6.7% in 2005). Although not statistically significant, this finding is consistent with those of other authors, who report a decreasing temporal trend in the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistances.²

The main difficulty in analyzing genotypic information to provide prevalence rates is to establish a comparable definition of resistance.^{1,12} The IAS-USA 2009¹⁵ list is commonly used to report resistance and has been developed to analyze mutations selected by the HIV-1 B subtype. This is particularly relevant in persons infected

Table 3
Characteristics of patients according to HIV-1 subtype.

	Total	B subtype	Non B subtype	P
	182	147 (80.8) 95% CI: (74.3-86.2)	35 (19.2) 95% CI: (13.8-25.7)	
Sex*				.151
Male	147 (80.8)	122 (83.0)	25 (71.4)	
Female	35 (19.2)	25 (17.0)	10 (28.6)	
Age (years) (N=181)**	33.3 (27.2–37.9)	32.8 (26.9-37.2)	35.9 (29.2-43.1)	.017
<30*	69 (38.1)	60 (41.1)	9 (25.7)	.004
30–40	78 (43.1)	66 (45.2)	12 (34.3)	
40–50	21 (11.6)	11 (7.5)	10 (28.6)	
>50	13 (7.2)	9 (6.1)	4 (11.4)	
Route of transmission*				.009
Men who have sex with men	88 (48.3)	78 (53.1)	10 (28.6)	
Heterosexual	41 (22.5)	31 (21.1)	10 (28.6)	
Intravenous drug use	24 (13.3)	14 (9.5)	10 (28.6)	
Others/unknown	29 (15.9)	24 (16.3)	5 (14.3)	
Origin* (N=168)***				.113
Natives	128 (70.3)	106 (79.1)	22 (64.7)	
Immigrant	40 (29.7)	28 (20.9)	12 (34.3)	
Plasma RNA-HIV-1 (log₁₀) (N=162)**	5.0 (4.5–5.5)	5.0 (4.5–5.5)	5.1 (4.2–5.7)	.935
<5.0*	81 (50.0)	67 (50.8)	14 (46.7)	.840
>5.0	81 (50.0)	65 (49.2)	16 (53.3)	
CD4 cell count /mm³ (N=154)**	541 (357–698)	553 (390–712)	471 (281–581)	.063
<350*	36 (23.4)	25 (19.8)	11 (31.9)	.059
350–500	31 (20.1)	25 (19.8)	6 (21.4)	
>500	87 (56.5)	76 (60.3)	11 (39.3)	
STI co-infection (N=96)*				.127
Yes	36 (37.5)	33 (40.7)	3 (20.0)	
No	60 (62.5)	48 (59.3)	12 (80.0)	
Transmitted HIV-Drug Resistances*				.477
Yes	14 (7.7)	10 (6.8)	4 (11.4)	
No	168 (92.3)	137 (93.2)	31 (88.6)	
Geographic area*				.024
Barcelona	165 (90.7)	137 (93.2)	28 (80.0)	
Outside Barcelona	17 (9.3)	10 (6.8)	7 (20.0)	

*N (%); **Median and interquartile range; ***P value calculated for 168 patients with available information.

STI co-infection: Having a diagnosis of an sexually transmitted infection within 12 months before inclusion.

Barcelona: Includes Barcelona city and its metropolitan area.

Outside Barcelona: Includes Lleida, Tortosa, Reus, Vic and Palamòs.

with subtypes other than B, which shows many more polymorphisms than the reference subtype B virus.

As in previous reports,⁴ the NNRTI mutation K103N was common in our study (5 cases). This mutation is the result of a single-nucleotide polymorphism from wild-type K103. It is associated with a high level of resistance to nevirapine and efavirenz, although it does not affect the activity of etravirine.^{16,17} The polymorphism K103R is not associated with the emergence of K103N; however, in combination with V179, it significantly reduces the susceptibility of the virus to nevirapine and efavirenz.

Minor or secondary mutations to new-generation NNRTIs (mutations associated with reduced activity to etravirine) were common in our study. The virological response to etravirine is a function of the number and weight of the baseline mutations. In NNRTI-experienced patients who started etravirine, darunavir, and a background regimen in the DUET studies, weighted mutation scores of 0–2, 2.5–3.5, and 4 were associated with a response of 74%, 52%, and 38%, respectively.¹⁶

As in other series,^{1,2} thymidine analog mutations (eg, M41L, D67N/E, L210W, T215F, K219Q/E) were less common than NNRTI mutations.

Major PI mutations were rare (<0.5%). Although minor PI mutations were relatively common in our sample (>10% for L10F/I/V and for D71T/V/A), they are not included in the WHO list because they are often reported in almost all non-B subtypes.

The proportion of immigrants in our sample was 23.3% in 2003, 18.2% in 2004, and 26.7% in 2005. In Catalonia, the number of immigrants accounting for HIV infection during the study period (31.3% in 2003, 34.0% in 2004, and 39.1% in 2005).¹⁸ Nearly 20% of our patients had non-B subtypes, and although the highest prevalence was seen in 2005 (28.9%), there were no significant trends during the 3 years of the study. In areas outside Barcelona (Lleida, Tortosa, Reus, Vic, and Palamòs), subtypes other than B were more frequent than in the metropolitan area of Barcelona (41.2 vs. 17.0%). In our population of recently HIV-infected patients, the percentage of immigrants was higher in areas outside Barcelona (47.1 vs. 19.6%). The prevalence of non-B subtypes among autochthonous patients was 17.2%. This high prevalence would suggest that non-B subtypes are already circulating in our population. Several authors have reported an increase in the frequency of non-B subtypes in different Spanish regions. In Madrid, the prevalence of non-B subtypes increased from 9% in 2000 to 32% in 2007; the number of autochthonous patients increased also during the same period (from 4% to 10%).¹⁹ In Galicia, the prevalence was 22.3% between 2000 and 2002,²⁰ and in Gran Canaria it was 22.4% between 2002 and 2005.¹³

Little is known about the clinical and biological consequences of infections by non-B subtypes. Differences in pathogenicity, transmissibility, or susceptibility to antiretroviral drugs among HIV-1 subtypes have been proposed,^{21,22} and there is evidence

that similar outcomes can be found in almost all the subtypes after conventional anti-HIV-1 treatment.²³ We observed resistance mutations to be more frequent in patients with the non-B subtype, although this difference it is not statistically significant. In the multivariate analysis, the only factor associated with infection by a non-B HIV-1 subtype was being over 40 years old. However, we are not able to offer a clear explanation for this finding, probably due to the small sample size and the constraints of our current data.

Given the limitations of our study, the results should be interpreted with caution. First, we only analyzed 182 of the 713 potentially recent HIV-1 infections. The lack of data on antiretroviral therapy was the most frequent cause of exclusion,⁹ although a comparison of the baseline characteristics of patients with and without a resistance test result suggests that our data are representative of the original study sample. Second, 21% of the samples identified could not be amplified. This was probably because samples were residual aliquots from serological testing and, therefore, were not optimally stored for PCR analysis. Third, the LS-EIA used to identify recent infections was validated in the B subtype. The results of this assay vary depending on the HIV-1 subtype, with a longer window period in non-B subtypes than in B subtypes. For circulating recombinant forms (CRF01_AE in particular), the mean window period was 356 days (95% CI, 318–402).²⁴ These data, would suggest that non-B subtypes identified as recent infections are presumed to have seroconverted within the past 12 months. And fourth, we used conventional sequencing, which underestimates minority HIV-1 variants.

Despite its limitations, our approach does have certain strengths. First, it focused on recent infections, which demonstrated a higher rate of resistance than chronic infections, thus reflecting, at least in part, the gradual disappearance of the dominant quasispecies over time. Second, analyzing all samples for recent infection and resistance avoids the bias of recruiting persons who seek more frequent testing (usually white men who have sex with men), thus preventing extrapolation to the general HIV-1-infected population. Third, the robustness of our data and the characteristics of the Catalanian health system (unrestricted free access to HIV care and treatment) mean that there is little risk of including patients with little exposure to therapy.

In conclusion, we observed a prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance of 7.7% (95% CI, 4.3–12.6), which is consistent with results from other parts of Europe. Furthermore, a high prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance driven mainly by K103N and NRTI mutations was found in Catalonia. We also showed the feasibility of monitoring both transmitted HIV-1 drug resistance and HIV subtypes in our setting, and the logistical pitfalls identified will be crucial if we are to improve monitoring of these parameters. Although not significant, the prevalence of non-B subtypes among recently infected patients is increasing, and this group has the highest prevalence of resistance. Although we could not establish a spatial or temporal relationship between immigration patterns, our data suggest that the non-B subtypes are already circulating in our setting. Long-term monitoring of recent infection will allow us to better describe the relationship between transmitted HIV-1 drug resistance and subtypes with imported and locally acquired HIV infection, as well as its clinical implications.

Funding

La Marató de TV3 Foundation awarded the CEEISCAT a grant for the development of the AERI-HIV (Algoritme Estandartitzat per la detecció de Recent Infectats pel HIV) project for epidemiological research on AIDS using the STARHS technique (project #022010). The project was also partially funded by the *Departament de Salut de*

la Generalitat de Catalunya (Department of Health of the Catalanian Government), Spain, and by the *Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España* (Spanish Foundation for Prevention and Research in AIDS; FIPSE) of the National AIDS Plan Secretariat (Spanish Ministry of Health). Funding was also received from the Carlos III Health Institute (Madrid, Spain), the Spanish Network for AIDS Research (RIS; ISCIII-RETIC RD06/006) and the Spanish Health Intensity Cation Research Grant (I3SNS & PRICS programs) from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain) and the *Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya*, Barcelona (Spain).

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest related to this study.

Acknowledgments

We are indebted to the study participants and we thank Judith Dalmau and Lidia Ruiz for providing technical assistance and advice.

Appendix A.

The Recent HIV Infections (AERIVIH) study group includes the following:

Coordinating Center (CEEISCAT): Jordi Casabona, Anna Esteve, Anabel Munoz, Núria Ortega, Alexandra Montoliu, Eva Puchol, Rafael Romero, Joan Masip, Núria Vives, Berta Ortiga, Meritxell Granell, Diana Puente, M. Jesús Casado, Àngels Jaen, Jesús Almeda, Vanessa Espurz.

STARHS Laboratory (Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol): Victoria González, Elisa Martró, Lurdes Matas and Vicenç Ausina.

A.1. Peripheral Centers

Primary Health Care Laboratories: Isabel Rodrigo (Laboratori Clínic Manso, Barcelona), Àngels Bosch (Laboratori Intercomarcal de l'Alt Penedès, l'Anoia i el Garraf, Igualada), Rosa López (Laboratori Clínic Bon Pastor, Barcelona), Eva Dopico (Laboratori Clínic l'Hospitalet de Llobregat), Josep Ros (Laboratori Clínic Barcelonès Nord i Maresme, Badalona), Rosa Navarro (Laboratori Clínic Cornellà de Llobregat), Conrad Vilanova (Laboratori Clínic El Maresme, Mataró)

A.2. Hospitals

Laboratory Staff: Tomàs Pumarola (Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona), Aurora Casanova (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat); Elisa Martro, Lurdes Matas, Victoria González and Vicenç Ausina (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona); Estrella Caballero (Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona); Núria Farré (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); Joan Farré (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida); M. Goretti Sauca (Hospital de Mataró); Xavier Ortín (Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa); M. José Amengual (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell); Josep M. Prat (Hospital de Palamós); Josep M. Euras (Hospital General de Vic); José Ramón Blanco (Complejo San Millán-San Pedro de La Rioja); Josep M. Simó (Hospital Universitari de Sant Joan de Reus); M. Carme Villà (Hospital General de Granollers); Eugenia Márquez (Hospital General de l'Hospitalet, Hospitalet de Llobregat).

Clinical Staff: Josep M. Miró, Fernando Agüero, Omar Sued, Maria López-Diéguez and José M. Gatell (Hospital Clínic-IDIBAPS,

University of Barcelona, Barcelona); Elena Ferrer and Daniel Podzamcz (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat); Cristina Tural and Bonaventura Clotet (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona); Esteve Ribera (Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona); Jordi Altès and José Manuel Guadarrama (Hospital Alt Penedès, Vilafranca); Pere Domingo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); Teresa Puig (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida); Pilar Barrufet and Lluís Force (Hospital de Mataró); Carolina Gutiérrez (Hospital Ramón y Cajal, Madrid); Amat Ortí (Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa); Gemma Navarro and Ferran Segura (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell); Àngels Masabeu (Hospital de Palamós); Josep Vilaró (Hospital General de Vic); José Antonio Iribarren (Hospital de Donostia, San Sebastián); José Antonio Oteo (Complejo San Millán-San Pedro de La Rioja); Blai Coll and Carlos Alonso Villaverde; (Hospital General de Sant Joan de Reus); Santiago Montell (Hospital General de Granollers) and Isabel Garcia (Hospital de l Hospitalet, Hospitalet de Llobregat).

Site-testing nongovernmental organizations: Roser Sala (Laboratori Sabater Tobella, Barcelona); Olga Díaz (Servei d Atenció i Prevenció Sociosanitària: SAPS - Creu Roja, Barcelona); Kati Zaragoza (Stop Sida, Barcelona); Ferran Pujol and Jorge Saz (Projecte dels Noms – Joves positius, Barcelona); Mercè Merono (Àmbit Prevenció, Barcelona); Jasmina Becerra (Associació Ciutadana Antisida de Catalunya – ACASC, Barcelona); Rosa Ros (Centre Jove d Anticoncepció i Sexualitat – CJAS, Barcelona); Anna Avellaneda and Montse Sité (Actua Vallès, Sabadell) and Anna Rafel (Associació Antisida de Lleida).

References

- Booth CL, Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1047–56.
- Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical management. *J Infect Dis.* 2005;192:958–66.
- Palacios R, Viciano I, Perez de Pedro I, de la Torre J, Ropero F, Fernandez S, et al. Prevalence of primary resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection in the province of Malaga (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:141–5.
- de Mendoza C, Rodriguez C, Colomina J, Tuset C, Garcia F, Eiros JM, et al. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1350–4.
- Chaix ML, Desquilbet L, Descamps D, Costagliola D, Deveau C, Galimand J, et al. Response to HAART in French patients with resistant HIV-1 treated at primary infection: ANRS resistance network. *Antivir Ther.* 2007;12:1305–10.
- Oette M, Kaiser R, Daumer M, Petch R, Fatkenheuer G, Carls H, et al. Primary HIV drug resistance and ef⁺ cacy of “rst-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune De⁺ c Syndr.* 2006;41:573–81.
- Lospitao E, Alvarez A, Soriano V, Holguin A. HIV-1 subtypes in Spain: A retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV Med.* 2005;6:313–20.
- Romero A, González V, Granel M, Matas L, Esteve A, Martró E, et al. Recently acquired HIV infections in Spain (2003–2005). Introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect.* 2009;85:106–10.
- Kothe D, Byers RH, Caudill SP, Satten GA, Janssen RS, Hannon WH, et al. Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroincidence. *J Acquir Immune De⁺ c Syndr.* 2003;33:625–34.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *Plos One.* 2009;4:e4724.
- SPREAD programme. Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS.* 2008;22:625–36.
- Fox J, Hill S, Kaye S, Dustan S, McClure M, Fidler S, et al. Prevalence of primary genotypic resistance in a UK centre: Comparison of primary HIV-1 and newly diagnosed treatment-naïve individuals. *AIDS.* 2007;21:237–9.
- Sánchez Onoro M, López MJ, Santana MA, Andes JM, Campelo FA. Primary antiretroviral drug resistance among patients diagnosed with HIV infection in Gran Canaria (Spain) between 2002 and 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:437–40.
- Yebrá G, Holguin A. Epidemiology of drug-resistant HIV-1 transmission in naive patients in Spain. *Med Clin (Barc).* 2010;135:561–7.
- Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med.* 2008;16:138–45.
- Vingerhoets JA. An update of the list of NNRTI mutations associated with decreased virologic response to eftravirine (ETR): Multivariate analyses on the pooled DUET-1 and DUET-2 clinical trial data, in XVIIth international drug resistance workshop, Sitges, Spain, 2008.
- Parkin NT, Gupta S, Chappey C, Petropoulos CJ. The K101P and K103R/V179D mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:351–4.
- Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i la SIDA de Catalunya. (SIVESA). Informe. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut, Direcció General de Salut Pública; 2008. Report No.: 19.
- Holguin A, de Mulder M, Yebrá G, Lopez M, Soriano V. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res.* 2008;6:327–34.
- Perez-Alvarez L, Carmona R, Munoz M, Delgado E, Thomson MM, Contreras G, et al. High incidence of non-B and recombinant HIV-1 strains in newly diagnosed patients in Galicia, Spain: Study of genotypic resistance. *Antivir Ther.* 2003;8:355–60.
- Chohan B, Lang D, Sagar M, Korber B, Lavreys L, Richardson B, et al. Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J Virol.* 2005;79:6528–31.
- Marozsan AJ, Moore DM, Lobritz MA, Fraundorf E, Abrahá A, Reeves JD, et al. Differences in the “tness of two diverse wild-type human immunodeficiency virus type 1 isolates are related to the ef⁺ cency of cell binding and entry. *J Virol.* 2005;79:7121–34.
- Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, Fearnhill E, et al. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1296–305.
- Young CL, Hu DJ, Byers R, Vanichseni S, Young NL, Nelson R, et al. Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMérieux vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B or E infection in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19:481–6.

ARTÍCULO III

Comparison of Two Serological Tests for the Identification of Recent HIV Infection: Vironostika HIV-1 Microelisa and BED Capture Enzyme Immunoassay

Anabel Romero, Elisa Martró, Victoria González, Lurdes Matas and the AERI study group

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011 Aug-Sep;29(7):553-5

RESUMEN

A lo largo de los últimos años se han desarrollado diferentes tests serológicos para detectar infecciones recientes. A partir del año 2007, uno de estos tests, el test Vironostika, dejó de estar disponible comercialmente. Por ese motivo, nuestro laboratorio, que hasta ese momento había estado utilizando el test Vironostika, empezó a usar un nuevo test para identificar infecciones recientes. El test escogido por nuestro laboratorio fue el BED-CEIA. El estudio que se presenta a continuación se diseñó para validar que los resultados obtenidos por ambos tests (Vironostika y BED-CEIA) eran comparables en nuestro medio.

Para valorar la concordancia entre los dos tests, se seleccionaron 101 muestras de sueros de individuos VIH-1 positivos y fueron analizadas por ambos tests. Esta muestra estaba formada por 15 pacientes con infección reciente, 45 pacientes con diagnóstico de SIDA (por criterios clínicos o por recuentos de células CD4+ inferiores a 200 células/ μ l), 3 pacientes con infección crónica (pacientes infectados desde hacía más de 12 meses), y en 38 casos no se pudo establecer si pertenecían a individuos con infección reciente, crónica o SIDA.

Los resultados obtenidos indicaron que el acuerdo entre los tests Vironostika y BED-CEIA era bueno (índice kappa = 0,738, $p < 0,005$). Ambos tests clasificaron 29 muestras como infecciones recientes y 60 como infecciones crónicas, mientras que los resultados discordantes se obtuvieron en 12 muestras. La sensibilidad para detectar infecciones recientes fue del 93,3% para ambos tests, mientras que la especificidad para detectar infecciones crónicas fue del 75,0% para el test Vironostika, y del 81,3% para el test BED-CEIA. Los valores predictivos positivos fueron 60,9% usando el test BED-CEIA y 53,8% usando el Vironostika.

Los resultados obtenidos demuestran que ambos tests identificaron las infecciones recientes igual de bien. Sin embargo, el test Vironostika tiende a clasificar erróneamente más individuos con SIDA como recién infectados. Por tanto, el test BED-CEIA ofrece una buena alternativa al test Vironostika.

A literature search with no date limits in PubMed using the keywords "lymphomatoid granulomatosis" and "larynx" found only two reported cases where LG affects the larynx, but in both of them, laryngeal disease was associated with pulmonary involvement.^{2,3} The larynx has its own lymphatic structure called larynx-associated lymphoid tissue (LALT). In the subglottis, LALT is replaced throughout life by a diffuse infiltration of strong intensity consisting predominantly of CD3-positive T lymphocytes with scattered CD20-positive B cells,⁴ therefore LG could be originated in subglottic tissues.

LG pathogenesis is unclear, but it has been linked to EBV and immunodeficiency. As regards the close to 100% EBV association with LG and the presumed wide expression of EBV latent encoded proteins, it has been strongly inferred that EBV is not just an innocent bystander in the pathogenesis of LG.⁵ When dealing with immunodeficiency, it has been proven that most patients with LG have defects in cytotoxic T cell function. That would explain how LG is less rare in many immunodeficiency states.⁶ In our case, CD4 count cell was 124 cell/ μ l due to a good treatment compliance with discordant response.

Many studies have analyzed the connection between LG and AIDS. HIV infection is associated with an increased risk of lymphomas by 60-165 fold even in the combined antiretroviral therapy era. Excellent outcomes with infusion therapy and concurrent rituximab have been reported in the treatment of some of them.⁷

We report that laryngeal LG can mimic Reinke's edema in its early stages. In our own experience, Reinke's edema should not be treated as a casual finding in patients with fever of unknown origin or immunodeficiency.

Our current case was classified as grade III of LG, which is histologically considered as diffuse large B-cell malignant lymphoma,⁸ but the first biopsy was reported as polymorphous lymphoid disorder (PTLD), which can simulate a lower grade of LG. LG and PTLD are associated with immunodeficiency and are driven by EBV. Histopathologically, they present a morphological spectrum spanning polymorphic through monomorphic lymphoid proliferations.⁹ The distinctness of LG and PTLD has been emphasized by the difference in the immune response. While LG has a large population of background T-cells, PTLD is recognized by a poor T-cell environment.⁵

A better awareness of LG in recent years is at present allowing new therapeutic tools for this disease to be developed. Rituximab, a

new monoclonal antibody anti-CD20 has shown promising results in some cases of LG with pulmonary involvement.¹⁰

Bibliografía

1. Liebow AA, Carrington CR, Friedman PJ. Lymphomatoid granulomatosis. *Hum Pathol.* 1972;3:457-558.
2. Schmalz F, Gasser RW, Weiser G, Zur Nedden D. Lymphomatoid granulomatosis with primary lymphatic involvement in the skeletal muscular system. *Klin Wochenschr.* 1982;60:311-6.
3. Cohen SR, Landing BH, Siegel S, Shen S, Heuser E, Isaacs H. Lymphomatoid granulomatosis in a child with acute lymphatic leukemia in remission. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1978;87(5 Pt 2 Suppl 52):5-10.
4. Kutta H, Steven P, Tillmann BN, Tsokos M, Paulsen FP. Region-specific immunological response of the different laryngeal compartments: significance of larynx-associated lymphoid tissue. *Cell Tissue Res.* 2003;311:365-71.
5. Wilson WH, Kingma DW, Raffeld M, Wittes RE, Jaffe ES. Association of lymphomatoid granulomatosis with Epstein-Barr viral infection of B lymphocytes and response to interferon-alpha 2b. *Blood.* 1996;87:4531-7.
6. Jaffe ES, Wilson WH. Lymphomatoid granulomatosis: pathogenesis, pathology and clinical implications. *Cancer Surv.* 1997;30:233-48.
7. Gucalp A, Noy A. Spectrum of HIV lymphoma 2009. *Curr Opin Hematol.* 2010;17:362-7.
8. Guinee Jr DG, Perkins SL, Travis WD, Holden JA, Tripp SR, Koss MN. Proliferation and cellular phenotype in lymphomatoid granulomatosis: implications of a higher proliferation index in B cells. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:1093-100.
9. Saxena A, Dyker KM, Angel S, Moshynska O, Dharampaul S, Cockcroft DW. Post-transplant diffuse large B-cell lymphoma of "lymphomatoid granulomatosis" type. *Virchows Arch.* 2002;441:622-8.
10. Moudir-Thomas C, Foulet-Roge A, Plat M, Kaswin R, Lepic P, Solal-Celigny P, et al. Efficacy of rituximab in lymphomatoid granulomatosis. *Rev Mal Respir.* 2004;21(6Pt1):1157-61.

Emilio Domínguez-Durán^{a,*}, Rafael Luque-Márquez^b,
María Fontillón-Alberdi^c, Antonio Abrante-Jiménez^a

^a *Departamento de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España*

^b *Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España*

^c *Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España*

* Autor para correspondencia.

E-mail address: emiliodominguezorl@gmail.com
(E. Domínguez-Durán).

doi:10.1016/j.eimc.2011.02.017

Comparison of Two Serological Tests for the Identification of Recent HIV Infection: Vironostika HIV-1 Microelisa and BED Capture Enzyme Immunoassay

Comparación de dos tests serológicos para la identificación de infecciones recientes por VIH-1: microelisa Vironostika HIV-1 y enzoinmunoensayo de captura BED

To the Editor:

Identification of recent human immunodeficiency virus (HIV) infection is an important tool for monitoring HIV transmission. During the last few years, several serological assays have been developed for this purpose and used in cross-sectional studies.¹ The serological testing algorithm for recent HIV seroconversion (STARHS) was developed in 1998² and used with the Abbott HIVAB 3A11 assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, Chicago, Illinois,

USA) and with the Vironostika HIV-1 Microelisa System (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). The sensitivity of both assays was lowered in order to obtain a negative result in specimens with low antibody titers, such as those from individuals with a recent infection. These assays are no longer available, and laboratories have turned to new methods. The BED assay (Calypte Biomedical Corporation, Portland, Oregon, USA) measures anti-HIV IgG titers³ and includes a calibrator to ensure comparability of results. Furthermore, the BED assay is included in an external quality program offered by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, Georgia, USA).

In Catalonia, the STARHS was introduced using the Vironostika assay as part of the enhanced HIV/STI surveillance program in 2003. As the Vironostika assay has no longer been available since 2007, our laboratory changed to the BED assay in 2008. Our aim was to assess whether the results obtained by both techniques were comparable.

Table 1
Performance of both assays according to clinical information.

Group	Total no. of patients	No. of recent infections according to assay		
		Vironostika	BED	Both assays
Known recent HIV infection	15	14	14	13
AIDS	45	12	9	7
Long-standing HIV infection	3	0	0	0
Unclassified ^a	38	9	11	9
Total	101	35	35	29

^a Patients with no clinical criteria for AIDS, without evidence of recent infection, neither long-standing infection.

A total of 101 serum specimens from HIV-1-positive individuals were selected from a previous study.⁴ The selection criteria were sufficient sample volume and minimum available clinical and laboratory information (CD4⁺ T-cell count, HIV viral load, HIV infection stage, previous antiretroviral treatment). Patients were classified into three groups. The first group included 15 recently infected individuals (sera were drawn no more than 6 months after seroconversion in nine patients, and the rest had a diagnosis of acute HIV infection). The second group included three patients with long-standing infection (subjects infected for >12 months) and 45 patients with a diagnosis of AIDS (clinical criteria or CD4⁺ T-cell count under 200 cells/ μ l). Finally, 38 specimens were unable to be classified as either recent infections, long-standing infections, or AIDS.

The agreement between Vironostika and BED assays was good ($\kappa=0.738$, $P<.005$), which is consistent with the results of two published studies.^{5,6} Sensitivity to detect recent infection was 93.3% (95% CI: 68.1 – 99.8) for both the Vironostika and the BED assays. Specificity for detecting long-term infections was 75.0% (95% CI: 60.4 – 86.4) using the Vironostika, and 81.3% (95% CI: 67.4 – 91.1) using the BED. Positive predictive values were 60.9% (95% CI: 38.5 – 80.3) using the BED, and 53.8% (95% CI: 33.4 – 73.4) using the Vironostika. Negative predictive values were 97.5% (95% CI: 86.8 – 99.9) using the BED, and 97.3% (95% CI: 85.8 – 99.9) using the Vironostika. Table 1 shows the samples identified as recent infections by both BED and Vironostika according to their clinical characteristics and laboratory information.

The BED assay correctly classified a greater proportion of recent infections and patients with AIDS than Vironostika. These results are similar to those of a previous study,⁶ in which the Vironostika kit also tended to misclassify more individuals with long-standing infections or AIDS as recently infected in a comparison with the avidity index method.⁷ The misclassification of patients with AIDS or CD4⁺ T-cell counts ≤ 200 cells/ μ l is explained by the low anti-HIV IgG titers. Hence the importance of excluding those samples belonging to patients fulfilling these criteria from STARHS testing when this information is available.

The BED assay offers several advantages over the Vironostika: i) it has been reported to have better reproducibility, since it is based on the HIV IgG/non-HIV IgG ratio and uses a simple 1:100 dilution;⁸ ii) the BED assay can also be automated providing more precise results than the Vironostika assay, which is performed manually; and iii) the window period of the Vironostika assay differs for B and non-B HIV-1 subtypes, whereas these differences are less pronounced with the BED.⁹ For all those reasons, the BED assay offers a good alternative to the discontinued Vironostika assay.

Funding

This work was supported by the “La Marató de TV3” Foundation grant for the development of the AERI-HIV (Algoritme Estandarditzat per la detecció de Recent Infectats pel VIH) project for epidemiological research on AIDS by applying the STARHS technique (project #022010). This work was partially funded by the Direcció General de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya and by the Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE, Madrid, Spain, National AIDS Plan Secretariat of the Spanish Ministry of Health) and grant CD05/00258 (EM) (post-doctoral training contracts) from the “Ministerio de Sanidad y Consumo”, within the “Plan Nacional de Investigación científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I)”.

The authors acknowledge partial funding of this research from the CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain”.

Acknowledgements

We thank Joanne V Mei (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA) for technical assistance and advice. We would also like to thank Thomas O’Boyle for his assistance with the English version of the manuscript.

Appendix.

The Recent HIV Infections (AERIVIH) study group includes the following:

Coordinating Center (CEEISCAT): Jordi Casabona, Anna Esteve, Anabel Romero, Núria Ortega, Alexandra Montoliu, Eva Puchol, Rafael Muñoz, Joan Masip, Núria Vives, Berta Arlet, Meritx Grana, Diana Puente, M. Jesús Casado, Àngels Jaen, Jesús Almeda, Vanessa Espurz.

STARHS Laboratory (Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol): Victoria González, Elisa Martró, Lurdes Matas and Vicenç Ausina

Peripheral Centers

Primary Health Care Laboratories: Isabel Rodrigo (Laboratori Clínic Manso, Barcelona), Àngels Bosch (Laboratori Intercomarcal de l’Alt Penedès, l’Anoia i el Garraf, Igualada), Rosa López (Laboratori Clínic Bon Pastor, Barcelona), Eva Dopico (Laboratori Clínic l’Hospitalet de Llobregat,), Josep Ros (Laboratori Clínic Barcelonès Nord i Maresme, Badalona), Rosa Navarro (Laboratori Clínic Cornellà de Llobregat), Conrad Vilanova (Laboratori Clínic El Maresme, Mataró)

Hospitals

Laboratory Staff: Tomàs Pumarola (Hospital Clínic-IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona), Aurora Casanova (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat); Elisa Martró, Lurdes Matas, Victoria González and Vicenç Ausina (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona); Estrella Caballero (Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona); Núria Margall (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); Joan Farré (Hospital Universitari Anna de Vilanova, Lleida); M. Goretti Sauca (Hospital de Mataró); Xavier Ortín (Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa); M. José Amengual (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell); Josep M. Prat (Hospital de Palamós); Josep M. Euras (Hospital General de Vic); José Ramón Blanco (Hospital San Pedro - CIBIR La Rioja); Josep M. Simó (Hospital Universitari de Sant Joan de Reus); Carlos Toro (Hospital Carlos III, Madrid); Carme Villà (Hospital General de Granollers); Eugenia Márquez (Hospital General de l’Hospitalet, Hospitalet de Llobregat).

Clinical Staff: Josep M. Miró, Fernando Agüero, Omar Sued, María López-Diéguez and José M. Gatell (Hospital Clínic-IDIBAPS,

University of Barcelona, Barcelona); Elena Ferrer and Daniel Podzamczar (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat); Cristina Tural and Bonaventura Clotet (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona); Esteve Ribera (Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona); Jordi Altès and José Manuel Guadarrama (Hospital Alt Penedès, Vilafranca); Pere Domingo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); Teresa Puig (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida); Pilar Barrufet and Lluís Force (Hospital de Mataró); Carolina Gutiérrez (Hospital Ramón y Cajal, Madrid); Amat Ortí (Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Tortosa); Gemma Navarro and Ferran Segura (Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell); Àngels Masabeu (Hospital de Palamós); Vicente Soriano (Hospital Carlos III, Madrid); Josep Vilaró (Hospital General de Vic); José Antonio Iribarren (Hospital de Donostia, San Sebastián); José Antonio Oteo (Hospital San Pedro - CIBIR La Rioja); Blai Joan de Reus; Santiago Montull (Hospital Universitari de Granollers) and Isabel Garcia (Hospital General de l'Hospitalet, Hospitalet de Llobregat).

Sexually transmitted infections clinic: Carmen Rodríguez and Jorge del Romero (Centro Sanitario Sandoval, Madrid)

Site-testing nongovernmental organizations: Roser Sala (Laboratori Sabater Tobella, Barcelona); Olga Díaz (Servei d'Atenció i Prevenció Sociosanitària: SAPS - Creu Roja, Barcelona); Kati Zaragoza (Stop Sida, Barcelona); Ferran Pujol and Jorge Saz (Projecte dels Noms - Joves positius, Barcelona); Mercè Meroño (Àmbit Prevenció, Barcelona); Jasmina Becerra (Associació Ciutadana Antisida de Catalunya - ACASC, Barcelona); Rosa Ros (Centre Jove d'Anticoncepció i Sexualitat - CJAS, Barcelona); Anna Avellaneda and Montse Sité (Actua Vallès, Sabadell) and Anna Rafel (Associació Antisida de Lleida).

Bibliografía

1. Guy R, Gold J, Calleja JM, Kim AA, Parekh B, Busch M, et al. Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: A systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:747-59.
2. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA.* 1998;280:42-8.
3. Rawal BD, Degula A, Lebedeva L, Janssen RS, Hecht FM, Sheppard HW, et al. Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;33:349-55.

4. Romero A, González V, Granell M, Matas L, Esteve A, Martro E, et al. Recently acquired HIV infections in Spain (2003-2005). introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect.* 2009;85:106-10.
5. Truong HM, Kellogg T, Louie B, Klausner J, Dille J, McFarland W. Recent HIV-1 infection detection: Comparison of incidence estimates derived by laboratory assays and repeat testing data. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;51:502-5.
6. Gupta SB, Murphy G, Koenig E, Adon C, Beyrer C, Celentano D, et al. Comparison of methods to detect recent HIV type 1 infection in cross-sectionally collected specimens from a cohort of female sex workers in the Dominican Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007;23:1475-80.
7. Martro E, Suligoi B, Gonzalez V, Bossi V, Esteve A, Mei J, et al. Comparison of the avidity index method and the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion, two methods using a single serum sample for identification of recent HIV infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6197-9.
8. Suligoi B, Massi M, Galli C, Sciandra M, Di Sora F, Pezzotti P, et al. Identifying recent HIV infections using the avidity index and an automated enzyme immunoassay. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;32:424-8.
9. Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, McDougal JS, Parekh BS. Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2623-8.

Anabel Romero^{a,b,c,d,*}, Elisa Martró^{c,e,2},
Victoria González^{a,c,e}, Lurdes Matas^{c,e}, the AERI Study group[◇]

^a Center for Epidemiological Studies on HIV/AIDS and STI of Catalonia (CEEISCAT), Institut Català d'Oncologia/Health Department, Generalitat de Catalunya, Spain

^b Department of Epidemiology and Evaluation, IMIM-Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

^c CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

^d Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, and Preventive Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Microbiology Service, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: romero@imim.es (A. Romero).

◇ See Appendix.

² AR and EM are equal contributors.

doi:10.1016/j.eimc.2011.02.016

Enfermedad meningocócica invasiva por *Neisseria meningitidis* del serogrupo Y

Invasive meningococcal disease due to Neisseria meningitidis serogroup Y

Sr. Editor:

Los aislados de *Neisseria meningitidis* del serogrupo Y son muy poco frecuentes en nuestro medio. Se presenta un caso de bacteriemia y neumonía causado por este microorganismo.

Varon de 17 años, natural de Bolivia con residencia en España desde hace 5 años, que acude a urgencias en Marzo de 2010. Al ingreso presentó cefalea, congestión nasal, rinorrea verdosa y fiebre de hasta 38,8°C de tres días de evolución. En la exploración física el paciente estaba bien orientado, sin signos meníngeos ni lesiones cutáneas. La presión arterial era de 100/66 mmHg, no presentaba afectación cardiocirculatoria y la radiografía de torax inicial no mostró nódulos ni consolidaciones. El hemograma de urgencia

mostraba 16800 leucocitos/mm³; el 90,3% neutrófilos, 3,5% linfocitos, 0, 2% eosinófilos y 323000 plaquetas/mm³. La PCR era de 3.27 mg/L. Como antecedentes personales destacaba haber sido sometido a una amigdalectomía un mes antes del ingreso.

Se realizó una punción lumbar que dio salida a un líquido claro y acelular, con tinción de Gram en la que no se observaban ni células ni bacterias, cuyo cultivo finalmente resultó negativo.

A su llegada a planta, unas horas más tarde, el paciente se encuentra estable, y se procede a la extracción de hemocultivos. El paciente presentaba tos productiva y esputo herrumbroso, objetivándose en una nueva radiografía y esputo de tórax agrietado, parenquimatoso de tipo alveolar en el lóbulo inferior izquierdo. Por lo que se inició antibioterapia con levofloxacino.

A las 28 horas de incubación, en los hemocultivos se aisló *N. meningitidis* serogrupo Y, genosubtipo VR1:5-1; VR2: 10-4, sensible a cefotaxima (concentración inhibitoria mínima 0,003 mg/l), meropepenem, ciprofloxacino, levofloxacino, cloranfenicol y rifampicina.

Tras interrogar a la familia se confirma que el paciente había completado el calendario vacunal de la Comunidad Autónoma de Madrid, incluida la vacuna frente a meningococo C.

ARTÍCULO IV

Identification of recent HIV-1 infection among newly diagnosed cases in Catalonia, Spain (2006-2008)

*Anabel Romero, Victoria González, Anna Esteve, Elisa Martró, Lurdes Matas, Cristina Tural,
Tomàs Pumarola, Aurora Casanova, Elena Ferrer, Estrella Caballero, Esteve Ribera,
Núria Margall, Pere Domingo, Joan Farré, Tera Puig, M^a Goretti Sauca,
Pilar Barrufet, M^a José Amengual, Gemma Navarro, Maria Navarro, Josep Vilaró,
Xavier Ortín, Amat Ortí, Ferran Pujol, Josep M^a Prat, Àngels Massabeu, Josep M^a Simó,
Carlos A Villaverde, Miguel Ángel Benítez, Isabel Garcia, Olga Díaz, Jassmina Becerra,
Rosa Ros, Roser Sala, Isabel Rodrigo, Josep M^a Miró, Jordi Casabona
and the AERI Studygroup.*

Eur J Public Health. 2012 Dec;22(6):802-8

RESUMEN

En la mayoría de países europeos, la vigilancia de la epidemia de VIH/SIDA se basa en la declaración de los nuevos diagnósticos de VIH. Cataluña dispone de un sistema voluntario de notificación de nuevos diagnósticos de VIH, implementado desde el año 2001 y obligatorio a partir del año 2010. Sin embargo, la información que proporciona el registro de nuevos diagnósticos de VIH no refleja los patrones actuales de transmisión del VIH, ya que entre los nuevos diagnósticos se pueden encontrar infecciones que ocurrieron hace mucho tiempo.

La cuantificación y descripción de los pacientes con infección reciente por VIH puede proporcionar una estimación precisa de la dinámica de transmisión del virus. En este sentido, los tests serológicos para identificar infecciones recientes (TRIs) han demostrado su utilidad en la descripción de las características de las personas con infección reciente por VIH. A partir del año 2006, se ha incorporado la identificación de las infecciones recientes mediante TRIs entre los nuevos diagnósticos de VIH de un grupo de hospitales y centros de cribado alternativos situados en Cataluña, como parte del Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del SIDA/VIH/ITS (SIVES).

En el estudio que se presenta a continuación, se comparan las características de los pacientes identificados con infección reciente con aquellos que presentaban infección crónica, para determinar los factores asociados con la infección reciente.

El TRI se aplicó en muestras de suero de pacientes que recibieron el diagnóstico de VIH entre los años 2006 y 2008. Las muestras se obtuvieron durante los primeros seis meses después del diagnóstico de VIH. Las muestras de pacientes con criterios clínicos de SIDA o recuentos de células CD4+ inferiores a 200 células/ μ l no se analizaron con el TRI, ya que correspondían a pacientes con enfermedad avanzada. Las muestras de suero no fueron extraídas expresamente para el estudio, sino que se recuperaron las alícuotas sobrantes que habían sido extraídas con propósitos diagnósticos en los laboratorios participantes.

Del total de nuevos diagnósticos de VIH, el 79,9% eran hombres (mediana de edad 35,4 años), el 38,7% eran de origen inmigrante, el 48,9% de las transmisiones se produjeron entre HSH, y el 10,6% presentaron otra ITS durante el año previo al diagnóstico de VIH. El porcentaje global de infección reciente fue del 23,0%, y se observó un aumento significativo durante el periodo de estudio. En el año 2006 el porcentaje de infecciones reciente fue del 18,1%, mientras que en el año 2008 el porcentaje de infecciones recientes aumentó hasta el 26,2%. Entre los pacientes originarios de América del Sur, el porcentaje de infecciones recientes fue más alto (27,6%). En el

grupo de pacientes de origen inmigrante identificados con infección reciente, y cuya fecha de llegada a España era conocida, se observó que el 80% llevaban en nuestro país más de un año.

Los factores que se asociaron a la infección reciente fue la adquisición de la infección a través del contrato sexual entre HSH (Odds ratio[OR]: 2,0), en comparación con adquirir la infección a través de relaciones heterosexuales, y tener menos de 30 años de edad (OR: 5,9), en comparación con tener más de 50 años.

En este estudio se ha observado el mayor porcentaje de infecciones recientes entre los HSH (31%), sugiriendo una mayor incidencia o, tal vez, una mayor demanda de pruebas de cribado de VIH. Los resultados sugieren que muchas de las infecciones por VIH en la población inmigrante podrían haber sido adquiridas localmente. Otro resultado relevante del estudio es el aumento significativo del porcentaje de infecciones recientes a lo largo del periodo de estudio. Conocer la información sobre el número de pruebas de VIH realizadas para cada individuo sería muy útil para interpretar correctamente los datos de los individuos con infección reciente. Por tanto, los sistemas para la monitorización de la epidemia de VIH deberían incluir ambos parámetros: infecciones recientes y número de pruebas VIH realizadas.

Identification of recent HIV-1 infection among newly diagnosed cases in Catalonia, Spain (2006–08)

Anabel Romero^{1,2,3,4}, Victoria González^{1,2,5}, Anna Esteve^{1,2}, Elisa Martró^{2,5}, Lurdes Matas^{2,5}, Cristina Tural⁶, Tomàs Pumarola⁷, Aurora Casanova⁸, Elena Ferrer⁸, Estrella Caballero⁹, Esteve Ribera⁹, Núria Margall¹⁰, Pere Domingo¹⁰, Joan Farré¹¹, Teresa Puig¹¹, M^aGoretti Sauca¹², Pilar Barrufet¹², M^aJosé Amengual¹³, Gemma Navarro¹³, Maria Navarro¹⁴, Josep Vilaró¹⁴, Xavier Ortín¹⁵, Amat Ortí¹⁵, Ferran Pujol¹⁶, Josep M Prat¹⁷, Àngels Massabeu¹⁷, Josep M Simó¹⁸, Carlos Alonso Villaverde¹⁸, Miguel Ángel Benítez¹⁹, Isabel García²⁰, Olga Díaz²¹, Jasmina Becerra²², Rosa Ros²³, Roser Sala²⁴, Isabel Rodrigo²⁵, José M Miró²⁶, Jordi Casabona^{1,2,3}, the AERI Study group*

1 Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT), Institut Català d'Oncologia, Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Badalona, Spain

2 CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

3 Department of Paediatrics, Obstetrics and Gynaecology, and Preventive Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

4 Department of Epidemiology and Evaluation, IMIM- Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

5 Departament de Genètica i Microbiologia, Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

6 Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

7 Hospital Clínic – CRESIB, University of Barcelona, Barcelona, Spain

8 Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL, l'Hospitalet de Llobregat, Spain

9 Hospital Universitari Vall Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

10 Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

11 Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

12 Hospital de Mataró, Mataró, Spain

13 Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Spain

14 Hospital General de Vic, Vic, Spain

15 Hospital Verge de la Cinta, Tortosa, Spain

16 Projecte dels NOMS-Hispanosida, Barcelona, Spain

17 Hospital de Palamós, Palamós, Spain

18 Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Reus, Spain

19 Hospital de Vilafranca, Vilafranca del Penedés, Spain

20 Hospital General de l'Hospitalet, l'Hospitalet de Llobregat, Spain

21 SAPS, Barcelona, Spain

22 ACASC, Barcelona, Spain

23 CJAS, Barcelona, Spain

24 Laboratori Sabater Tobella, Barcelona, Spain

25 Laboratori Clínic Manso, Barcelona, Spain

26 Hospital Clínic- IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

*The members of the AERI Study group are included in the Acknowledgements section.

Correspondence: Anabel Romero, Department of Epidemiology and Evaluation, IMIM- Parc de Salut Mar, Barcelona, Passeig Marítim 25-29, Barcelona 08003, Spain, tel: +34 93 248 3636, fax: +34 93 248 3496, e-mail: aromero@imim.es

Received 11 May 2011, accepted 5 November 2011

Background: Quantification and description of patients recently infected by HIV can provide an accurate estimate of the dynamics of HIV transmission. Between 2006 and 2008 in Catalonia, we estimated the prevalence of recent HIV infection among newly diagnosed cases, described the epidemiological characteristics of the infection according to whether it was recent, long-standing or advanced, and identified factors associated with recent infection. **Methods:** A Test for Recent Infection (TRI) was performed in serum samples from patients newly diagnosed with HIV. Two different TRI were used: the Vironostika-LS assay (January 2006–May 2007) and the BED-CEIA CEIA (June 2007 onwards). Samples were obtained within the first 6 months of diagnosis. Patients whose samples tested positive in the TRI were considered recently infected. **Results:** Of 1125 newly diagnosed patients, 79.9% were men (median age, 35.4 years), 38.7% were born outside Spain, 48.9% were men who have sex with men (MSM) and 10.6% presented other sexually transmitted infections. The overall percentage of recent infection was 23.0%, which increased significantly, from 18.1% in 2006 to 26.2% in 2008. This percentage was higher for patients from South America (27.6%). Factors associated with recent infection were acquiring infection through sexual contact between MSM [odds ratio (OR) 2.0; 95% confidence interval (95% CI) 1.1–3.9], compared with acquiring infection through heterosexual relations and being under 30 years of age (OR 5.9; 95% CI 1.9–17.4), compared with being over 50 years of age. **Conclusion:** The highest percentage of recent infection was identified in MSM, suggesting either a higher incidence or a greater frequency of HIV testing. Information regarding testing patterns is necessary to correctly interpret data from recently infected individuals. Systems to monitor the HIV epidemic should include both parameters.

Introduction

In most European countries, HIV/AIDS surveillance is based on reporting new diagnoses of HIV infection. In Spain, 15 autonomous regions report new cases to the Newly Diagnosed HIV-infected Individuals Information System, which is currently being implemented.¹ In one of these regions, Catalonia, voluntary reporting of newly diagnosed HIV infections was implemented in January 2001 and became mandatory in 2010.² Given the varying and often long delays between HIV infection and diagnosis, information systems based on new diagnoses do not reflect current patterns of HIV transmission dynamics.

For over a decade, laboratory-based methods have been applied for the identification of recent HIV infections.^{3,4} Several countries have begun to monitor recent infections using Tests for Recent Infection (TRI). These assays are based on the principle that the antibody response to HIV infection matures over time and that immunological biomarkers of HIV disease progression can be used to distinguish recent from non-recent HIV infection. In France, recent infection has been routinely monitored at national level since 2003 by applying a TRI to all new HIV diagnoses.⁵ Other European countries have also included this approach as a part of their surveillance system.⁶ Using TRI, the Centers for Diseases Control and Prevention provided the first direct estimates of the incidence of HIV in the USA.⁷ In 2003, the Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion was introduced in Catalonia as a feasibility study⁸ and since 2006, has been applied in all newly identified cases of HIV infection in a network of centres as part of the Integrated Surveillance System of Catalonia (SIVES).

The aims of this study were to estimate the prevalence of recent HIV infection among newly diagnosed cases, to describe the epidemiological characteristics of the infection according to whether it was recent, long-standing or advanced, and to identify the factors associated with recent infection in 14 hospitals and 8 voluntary and counselling testing sites (VCTS) in Catalonia.

Methods

Study period

From January 2006 to December 2008.

Study population

Newly identified cases of HIV infection in the participating centres, which represent ~50% of all the new HIV notifications collected by the voluntary reporting system.

Settings

Samples were collected from 16 laboratories: 14 in hospital outpatient clinics and 2 other laboratories which collected samples from the 8 VCTS. All the laboratories are in Catalonia (5 in Barcelona, 5 in the metropolitan area of Barcelona and 6 in other cities in Catalonia) and all volunteered to participate.

Inclusion criteria

All patients newly diagnosed with HIV at the participating centres were included. Serum samples had to be obtained within the first 6 months of newly diagnosed HIV infection. All patients were aged ≥ 16 years and gave their written informed consent to participate.

Specimen collection

Residual volumes of serum specimens collected for diagnostic purposes were sent by the participating laboratories to the coordinating centre (Centre for Epidemiological Studies on HIV/

AIDS and STI of Catalonia (CEEISCAT)). Aliquots were identified by a study number (no personal identifiers were used).

Laboratory methods

Samples were analysed at the Microbiology Service of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. First, samples were analysed to detect the presence of HIV-specific antibodies using a conventional sensitive enzyme immunoassay (EIA) (Anti-HIV TETRA Elisa, Biotest, Dreieich, Germany) to ensure that they were all from HIV-positive patients. Samples from patients with a CD4⁺ T-cell count < 200 cells/ μ l and/or clinical criteria for AIDS (patients with advanced HIV disease) were not tested. We designed a specific recent infection testing algorithm to identify cases of recent infection (figure 1).

During the study period, our laboratory used two different TRIs: the Vironostika-LS assay (January 2006–May 2007) and the BED-CEIA (June 2007 onwards). The performance characteristics of Vironostika-LS and BED-CEIA have been described elsewhere,^{9,10} and both techniques showed good consistency.¹¹ Moreover, in order to assess whether the results obtained by each assay were comparable in our setting, we performed a local study, which provided consistent results. In that study we found that the agreement among both assays was good ($\kappa = 0.738$, $P < 0.005$). Both techniques identified recent infection equally well.¹² However, Vironostika-LS is based on subtype B antigens and, consequently, performs differently with B and non-B subtypes.¹³

Ethics

The ethics committees of the participating centres approved the protocol. All personal identifiers were removed from the samples that were sent to the coordinating centre with a study number. Only the recruitment centre had access to personal identifiers.

Interpretation of results

Recent infection: patients whose samples were positive in the TRI.

Long-standing infection: patients whose samples were negative in the TRI.

Advanced HIV disease: patients with a CD4⁺ T-cell count < 200 cells/ μ l and/or clinical criteria for AIDS.

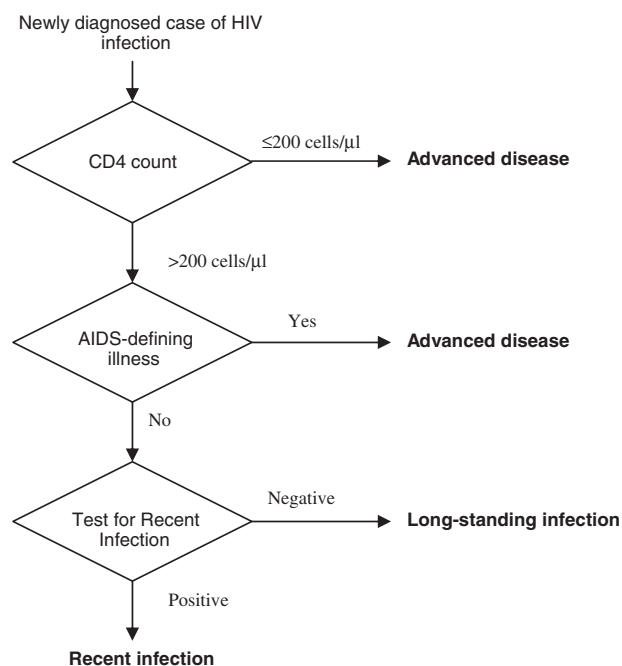


Figure 1 Algorithm for the application of the TRI

Data collection

Laboratory staff completed a data collection form to record CD4⁺ T-cell counts, HIV viral load and previous HIV serological testing results. The patient's physician or a person designated by the physician completed a second data collection form to record demographic and clinical–epidemiological variables (sex, date of birth, country of origin, date of arrival in Spain, sexual orientation, use of injected drugs, sexually transmitted infections (STI), HIV serologic status at the time of diagnosis and use of antiretrovirals). Patients born outside Spain were considered immigrants. Clinical and laboratory data from the closest date to the HIV diagnosis were reported.

In order to ascertain whether the immigrants were infected in Spain, or whether they had acquired the infection before their arrival in Spain, the date of arrival was collected whenever possible. If patients were identified as recently infected and had been in Spain for >12 months (from the date of the HIV diagnosis), they were considered to have acquired the infection in Spain. On the contrary, if they were identified as recently infected and had been in Spain for <6 months, they were considered to have acquired the infection before arrival in Spain. If patients with advanced HIV disease or long-standing infection had arrived <12 months (from the date of HIV diagnosis), they were considered to have acquired the infection outside Spain.

Statistical analysis

The percentage of recent infection was calculated as the number of samples identified as recent by the TRI divided by the total number of new diagnoses and the 95% confidence interval (95% CI) was estimated using the exact method. The Mantel test was applied to assess the presence of any significant trend during the study period. The Pearson's χ^2 test or the Fisher's exact test were applied as

appropriate to compare demographic characteristics, such as sex, country of origin, transmission group and presence of other STIs between the three study groups (recent infection, long-standing infection and advanced HIV disease). Moreover, quantitative variables were compared using the Mann–Whitney U test. In order to identify risk factors associated with recent infection, univariate and multivariate and logistic regression models were constructed adjusting for the type of centre and the geographic area. The odds ratio (OR) and its 95% CI were calculated. The statistical analysis was performed using SPSS 17.0.

Results

We collected 1456 samples, of which 331 did not meet the inclusion criteria and were excluded from the study. Out of the 1125 specimens, 1047 (93.1%) were obtained from hospitals and the remainder were from the VCTS (6.9%). The characteristics of patients with newly diagnosed HIV infection are shown in table 1. Most of them were male (79.9%), with a median age of 35.4 years [interquartile range (IQR): 29.5–43.4], 48.9% were men who have sex with men (MSM), 38.7% were immigrants, mostly from South America (50.8%) and 10.6% had reported an STI diagnosis during the 12 months before HIV diagnosis. Most of STI reported were reported as non-specified syphilis (55.5%).

Patients with advanced HIV disease accounted for 29.7% of the samples and, after performing the TRI in 791 samples, we obtained a prevalence of recent infection of 23.0% (95% CI 20.6–25.6) (figure 2). The percentage of recent infection increased year by year: 18.1% (95% CI 14.1–22.8) in 2006, 23.8% (95% CI 19.8–28.2) in 2007 and 26.2% (95% CI 21.9–30.9) in 2008 ($P=0.012$ for linear trend).

In patients with newly diagnosed HIV infection, characteristics such as sex, age and transmission group differ significantly for patients identified as having recent infection, long-standing

Table 1 Characteristics of newly diagnosed cases of HIV infection stratified by type of infection (Catalonia, 2006–08)

	Newly diagnosed cases, N (%) 1125 (100.0)	Recent, N (%) 259 (23.0)	Long-standing, N (%) 532 (47.3)	Advanced, N (%) 334 (29.7)	P-value ^a
Sex ($n=1125$) ^c					0.042
Men	899 (79.9)	221 (24.6)	417 (46.4)	261 (29.0)	
Women	226 (20.1)	38 (16.8)	115 (50.9)	73 (32.3)	
Age ^b ($n=1125$) ^c (years)	35.4 (29.5–43.4)	32.5 (28.1–38.6)	33.9 (29.1–41.4)	40.1 (32.3–48.1)	<0.001
<30	310 (27.6)	88 (28.4)	160 (51.6)	62 (20.0)	
30–40	443 (39.4)	121 (27.3)	218 (49.2)	104 (23.5)	
40–50	243 (21.6)	40 (16.5)	108 (44.6)	95 (39.3)	
>50	129 (11.5)	10 (7.8)	46 (35.7)	73 (56.6)	
Place of birth ($N=1067$) ^c					0.443
Spanish-born	654 (61.3)	150 (22.9)	357 (46.9)	197 (30.1)	
Immigrants	413 (38.7)	92 (22.3)	195 (47.2)	126 (30.5)	
South America	210 (50.8)	58 (27.6)	100 (47.6)	52 (24.8)	
Sub-Saharan Africa	84 (20.3)	10 (11.9)	38 (45.2)	36 (42.9)	
Central and western Europe	32 (7.7)	6 (18.8)	19 (59.4)	7 (21.9)	
North Africa and Middle East	18 (4.4)	4 (22.2)	11 (61.1)	3 (16.7)	
Eastern Europe and Russia	24 (5.8)	6 (25.0)	7 (29.2)	11 (45.8)	
Asia	7 (1.7)	1 (14.3)	4 (57.3)	2 (28.6)	
North America	6 (1.5)	3 (50.0)	2 (33.3)	1 (16.7)	
Unknown	32 (7.7)	4 (12.5)	14 (43.8)	14 (43.8)	
Transmission group ($n=1117$) ^c					<0.001
Men who have sex with men	550 (48.9)	171 (31.1)	282 (51.3)	97 (17.6)	
Heterosexual relations	436 (38.8)	67 (15.4)	185 (42.4)	184 (42.2)	
Injecting drug users	53 (4.7)	7 (13.2)	25 (47.2)	21 (39.6)	
Others/non-qualified risk	78 (6.9)	13 (16.7)	35 (44.9)	30 (38.5)	
Sexually transmitted infections ^d ($n=940$) ^c					0.113
Yes	119 (10.6)	33 (27.2)	62 (52.1)	24 (20.2)	
No	821 (73.0)	191 (23.3)	390 (47.6)	240 (29.3)	

a: P-value: Pearson's or Fisher's exact test, except for median age, where the Mann–Whitney U test was used.

b: Median and interquartile range.

c: Number of samples with available information for each variable.

d: Sexually transmitted infection diagnosed during the 12 months before inclusion.

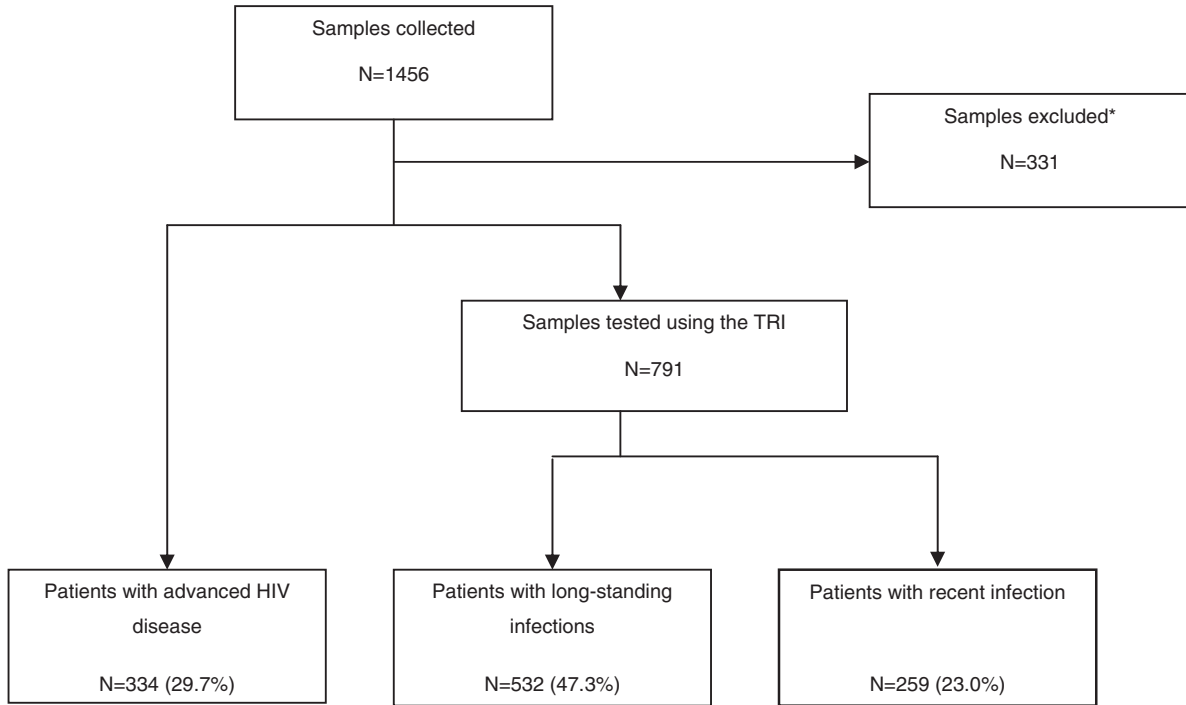


Figure 2 Study flowchart. *: Patients whose HIV infection was diagnosed >6 months before sample collection (78.2%), insufficient sample volume (9.1%), duplicate samples (5.4%), no informed consent (3.6%), infected by HIV type 2 (0.9%), HIV-negative samples (0.6%) and age <16 years (0.3%)

infection or advanced disease (table 1). Recent infection was more frequent in men than in women (24.6% vs. 16.8%), and median age was 32.5 years for patients with recent infection, 33.9 years for patients with long-standing infection and 40.1 years for patients with advanced HIV disease ($P < 0.001$). In MSM, 31.1% of infections were identified as recent, whereas in the other transmission groups the percentage ranges from 13.2% to 16.7%. Patients with an STI diagnosed within the 12 months before the HIV diagnosis tended to present recent infection more frequently than those without (27.2% vs. 23.3%).

Of the 413 immigrants, the date of their arrival in Spain was collected in 238 cases: median time from arrival to HIV diagnosis was 36.4 months (IQR 11.9–77.6). Among these 238 patients, 60 were recently infected, 120 had long-standing infection and 58 had advanced HIV disease. Of the 60 recently infected patients, 48 (80%) had arrived in Spain over 12 months before their HIV diagnosis. Of the 58 patients with advanced HIV disease and the 120 patients with long-standing infection, 24.1 and 29.1%, respectively, had arrived in Spain <12 months before. The percentage of recent infection was different according to origin, namely, higher among patients from South America than for Spanish-born patients (27.6% vs. 22.9%). In contrast, this percentage was much lower for Sub-Saharan patients (11.9%).

The factors associated with recent infection were described using univariate and multivariate logistic regression models (table 2). In the univariate model, two factors were found to be associated with recent infection—age and transmission group—and both remained in the multivariate model. Transmission between MSM was associated with recent infection (OR 2.0; 95% CI 1.1–3.9), compared with acquiring infection through heterosexual relations. Recent infection was less frequent among patients >50 years, with an OR of 0.2 (95% CI 0.1–0.5), compared with patients aged <30 years.

Discussion

The percentage of recent infections among newly diagnosed cases of HIV infection in Catalonia grew during the study period from 18.1% (58 out of 320) in 2006 to 26.2% (103 out of 393) in 2008.

The factors associated with recent infection were acquiring infection through sexual contact between MSM and aged <30 years.

A previous study, performed during 2003–05 in several centres in Spain, reported the prevalence of recent infection to be 19.2%,⁸ which is lower than the overall prevalence of recent infections reported in the present study (23.0%). As some of the centres involved in the two studies are not the same, the results are not directly comparable; however, when recent infections in the Catalonian centres participating in both studies were taken into account, the percentage of recent infections was 19.5% in 2003–05. Therefore, our results indicate that the percentage of recent infection increased in our study population and that the difference was statistically significant ($P < 0.01$). This increase is consistent with the decrease in the percentage of patients identified with advanced HIV disease in the PISCIS cohort (a prospective cohort study of HIV-infected patients) and the voluntary reporting of newly diagnosed HIV infection.²

In France, reporting of newly diagnosed HIV infection has been mandatory since 2003, and serology testing for recent infection has been applied at the population level since then. Le Vu *et al.*¹³ recently reported percentages of recent infection of 24.8% in 2006, 26.4% in 2007 and 27.0% in 2008. Although our percentages of recent infection obtained were slightly lower, the increasing trend is similar in both studies.

Our study population represents ~50% of all the new HIV notifications collected by the regional surveillance system during the same period.² Data from this surveillance information system show that the characteristics of our study population are quite similar to those of all new diagnoses of HIV infection in Catalonia. However, it appears that MSM might have been slightly overrepresented in our study (48.9%), since in the HIV reporting system, the percentage of MSM among newly diagnosed cases between 2006 and 2008 was 42.7%. On the contrary, the percentage of immigrants in our study (38.7%) was lower than that observed in the HIV reporting system (43.1%). Therefore, since the HIV reporting system was not mandatory during the study period, these data are not representative of the population of newly diagnosed cases of HIV infection in Catalonia.

Table 2 Factors associated with recent infection (univariate and multivariate logistic regression models)

	Univariate		Multivariate ^a	
	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI) ^a	P-value
Sex (n = 1125) ^b				
Male	1.6 (1.1–2.4)	0.014		
Female				
Place of birth (n = 1067) ^b				
Spanish-born	1.0 (0.8–1.4)	0.802		
Immigrants				
Age (n = 1125) ^b (years)		<0.001		<0.001
<30				
30–40	0.9 (0.7–1.3)	0.746	1.0 (0.7–1.3)	0.811
40–50	0.5 (0.3–0.7)	0.001	0.5 (0.4–0.8)	0.005
>50	0.2 (0.1–0.4)	<0.001	0.2 (0.1–0.5)	<0.001
Transmission group (n = 1117) ^b		<0.001		<0.001
Heterosexual relations				
Men who have sex with men	2.5 (1.8–3.4)	<0.001	2.0 (1.1–3.9)	0.027
Injection drug users	0.8 (0.4–1.9)	0.679	0.9 (0.5–1.8)	0.805
Others/non-qualified risk	1.1 (0.6–2.1)	0.771	0.8 (0.3–2.1)	0.575
Sexually transmitted infections ^c (n = 940) ^b				
Yes	1.3 (0.8–2.0)	0.286		
No				

a: The multivariate logistic regression model was adjusted for the type of centre and the geographic area. The OR and its 95% CI were calculated.

b: Number of samples with available information for each variable.

c: Sexually transmitted infection diagnosed during the 12 months before inclusion.

The highest percentage of recent infection was found in MSM, a variable identified by logistic regression as being associated with recent infection. There are several explanations for this finding. First, it is known that MSM undergo testing more often than other groups. A survey by our research team in a population of patients newly diagnosed with HIV infection revealed that 65.0% of MSM had been tested at least once before diagnosis, whereas this percentage was lower for patients who became infected through heterosexual relations (28.3%). Moreover, the median number of HIV tests taken was 3.0 for MSM and 1.0 for patients who acquired the infection through heterosexual relations (PISCIS Cohort Study). This behaviour may be due to a higher self-perception of risk for HIV infection in this group, but also to public health interventions, such as those performed in venues where information and rapid testing for HIV are provided to MSM.¹⁴ These patients are referred to hospital if they test positive. In addition, the introduction of rapid tests in VCTS represents an improvement in access to testing facilities and, consequently, has enabled more people to be tested¹⁵ and referred to hospital if they test positive. In our area, community-based testing services specifically targeting MSM are more common than in the general population. As these patients are tested more frequently, the probability of being identified as recently infected increases. Second, several studies have recently reported an increase in risk behaviour among MSM.^{16–18} Third, the recent increase in the prevalence of STI is yet another indicator of risk behaviour, pointing to an increased likelihood of HIV transmission.^{19,20} Fourth, it is noteworthy that MSM is the only transmission group that experienced a significant increase (>5%) in the number of HIV diagnoses in the reporting system.² Taken together, these findings—increase in risk behaviour and STI and a high percentage of recent infection—suggest that the incidence of HIV may actually be rising among MSM.

Our results show that age is associated with recent infection: recently infected individuals are younger than those with advanced HIV disease. The probability of being identified as recently infected is higher for younger patients, as the time from infection to diagnosis is usually shorter in younger people.

Percentages of recent infection in patients who became infected through heterosexual relations (15.4%) and in injecting drug users (13.2%) were lower than those observed in MSM (31.1%), although, noticeably, the prevalence of recent infection in the

first two groups increased during the study period, especially in 2008. This increase could reflect an increase in the incidence of HIV in those groups. However, when the time trend was analysed by transmission group, the differences were not statistically significant.

A comparison of percentages of recent infection in immigrant and Spanish-born patients revealed that the percentage of recent infections was similar among immigrants. The percentage of recent infections differed significantly according to the country of origin. For patients from South America (50.8% of our immigrant population), the prevalence of recent infection was higher than in patients from Sub-Saharan Africa (20.3% of our immigrant population). This difference between the two populations lies in the transmission group. The percentage of MSM was higher in South American patients, whereas heterosexual transmission was more prevalent in Sub-Saharan patients. In our study population, the percentage of MSM among the newly diagnosed cases of HIV was 67.6% for patients from South America and 0% for Sub-Saharan patients. These data are consistent with epidemiological data reported in both areas.²¹ As mentioned above, MSM undergo testing more often than heterosexual individuals, thus making it more likely that they will be identified as recently infected. Although age was also associated with recent infection, we did not find significant differences between the two groups (sub-Saharan and South American patients): median age was 31.1 years in patients from South America and 31.4 years in those from Sub-Saharan Africa. Nonetheless, other factors may have affected our results.

To ascertain whether recent infections were imported or acquired locally, we recorded the date of arrival in Spain. This information was available for 60 patients identified as recently infected and 48 (80%) had arrived in Spain more than 1 year before they were diagnosed with HIV, suggesting that a substantial number of the recent HIV infections observed among immigrants are locally acquired. On the other hand, among the 58 patients with advanced HIV disease for whom the arrival date was recorded, 14 (24%) had arrived in Spain <1 year before they were diagnosed with HIV, suggesting that these patients were already infected when they first arrived in Spain. However, the finding cannot be extrapolated, given the limited information about the arrival date.

Our study has several limitations. First, the small number of participating centres means that our findings cannot be extrapolated to the general HIV-positive population. Whereas our sample size represents nearly 50% of all HIV-positive patients in Catalonia and the characteristics of these patients are quite similar, it cannot be assumed to be representative.

The limitations of the serological assays for recent infections are well known. These tests have reasonable sensitivity for the detection of recent HIV infection, but can misclassify established infections as recent.²² However, by excluding patients with advanced HIV disease from testing, we avoided misclassifying them as recently infected. In addition, we used two different tests: the Vironostika-LS assay and the BED-CEIA. Although seemingly a limitation, the results for both tests were consistent.¹² The Vironostika assay has a longer window period in samples from patients with non-B subtypes.²³ Despite the increasing prevalence of non-B subtypes in our setting,^{24,25} we do not believe that this limitation has greatly affected our results, given that the percentage of samples identified by the Vironostika assay as recent is small (only 4%). The BED assay has a similar window period for HIV subtypes A–E.^{10,26}

In Catalonia, the Recent Infection Testing Algorithm has been incorporated into the surveillance system. Identification of factors associated with recent infection provides useful information about current transmission patterns. In order to improve programmes for prevention and control of HIV and STI, data from recent infection surveillance should be included. In the light of our findings, prevention campaigns targeting MSM should reinforce the need to reduce sexual risk behaviours, however, the representativeness of the samples available to be analysed using the TRI, additional information about testing patterns is needed to enable a more accurate interpretation of these data. We suggest that surveillance systems should include information about testing patterns and recent infections.

Acknowledgements

The Recent HIV Infections (AERIVIH) Study Group includes the following: Coordinating Centre (CEEISCAT): Anabel Romero, Rafael Muñoz, Núria Ortega, Alexandra Montoliu, Anna Esteve and Jordi Casabona; STARHS Laboratory (Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol): Victoria González, Elisa Martró and Lurdes Matas; Peripheral centres: Josep M^a Miró, Tomàs Pumarola and María López-Diéguez (H. Clínic i Provincial de Barcelona); Aurora Casanova and Elena Ferrer (H. Bellvitge Prínceps d'Espanya—Barcelona); Cristina Tural (H. Universitari Germans Trias i Pujol—Badalona); Estrella Caballero, Esteve Ribera (H. General Vall Hebron—Barcelona); Núria Margall, Pere Domingo (H. De la Santa Creu i Sant Pau—Barcelona); Joan Farré and Teresa Puig (H. Universitari Arnau de Vilanova—Lleida); M^a Goretti Sauca and M^a Pilar Barrufet (H. De Mataró); Xavier Ortín and Amat Ortí (H. Verge de la Cinta—Tortosa); M^a José Armengual, Gemma Navarro and Ferran Segura (Consorti Hospitalari del Parc Taulí—Sabadell); Josep M^a Prat and Àngels Masabeu (H. de Palamós); Marian Navarro and Josep Vilaró (H. General de Vic); Josep M^a Simó, Carlos Alonso Villaverde and Blai Coll (H. Universitari Sant Joan de Reus), Eugenia Márquez and Isabel Garcia (Hospital general de L'Hospitalet); Miguel Àngel Benítez, Alba Cebollero and Manuel Guadarrama (H. De Vilafranca) Voluntary and Counseling Testing Sites; Isabel Rodrigo (Lab. Clínic de Manso), Roser Sala (Lab. Sabater Tobella), Olga Díaz (SAPS), Kati Zaragoza (Stop Sida), Mercè Meroño (Àmbit Dona), Jorge Saz and Ferran Pujol (Projecte dels Noms—Hispanosida), Jasmina Becerra (ACASC), Rosa Ros (CJAS), Anna Avellaneda, Montse Sité (Actua Vallès), Anna Rafel (Associació Antisida Lleida).

Dr Miró was a recipient of an INT10/219 Intensification Research Grant (I3SNS & PRICS programs) from the Instituto

de Salud Carlos III, Madrid, Spain, and the Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain. Hospital Clinic of Barcelona (Spain) data were supported in part by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, and the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), Madrid, Spain

Funding

Direcció General de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya (in part); the Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE, Madrid, Spain, National AIDS Plan Secretariat of the Spanish Ministry of Health, in part); the Centres for Diseases Control and Prevention (CDC) provided the samples for the quality control programme (FDA BB-IND #8193).

Conflicts of interest: None declared.

Key points

- Percentage of recent infections increased from 18.1% in 2006 to 26.1% in 2008. This increase may also reflect an increase in the incidence of HIV infection.
- The highest percentage of recent infections was identified in MSM (31.1%), suggesting that the incidence of HIV is higher in this group or the demand for diagnostic tests is higher.
- Many HIV infections among immigrants may be locally acquired.

References

- 1 Oliva J, Galindo S, Vives N, et al. Delayed diagnosis of HIV infection in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:583–9.
- 2 Centre for Epidemiological Studies on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS of Catalonia. d Estudis. *SIVES 2010: Integrated AIDS/HIV/STI Surveillance System of Catalonia (SIVES): biennial epidemiological report*. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut, 2011, (Technical document CEEISCAT: 20).
- 3 Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 1998;280:42–8.
- 4 Murphy G, Parry JV. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Euro Surveill* 2008;13:18966.
- 5 Semaille C, Cazein F, Pillonel J, et al. Four years of surveillance of recent HIV infections at country level, France, mid 2003 - 2006: Experience and perspectives. *Euro Surveill* 2008;13:18968.
- 6 Health Protect Agency. Identification of recent HIV infection, UK. Available at: <http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&Page&HPAwebAutoListName/Page/1201094588911> (6 December 2011, date last accessed).
- 7 Hall HI, Song R, Rhodes P, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA* 2008;300:520–9.
- 8 Romero A, Gonzalez V, Granell M, et al. Recently acquired HIV infection in Spain (2003-2005): Introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect* 2009;85:106–10.
- 9 Kothe D, Byers RH, Caudill SP, et al. Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroincidence. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:625–34.
- 10 Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, et al. Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol* 2004;42:2623–8.
- 11 Gupta SB, Murphy G, Koenig E, et al. Comparison of methods to detect recent HIV type 1 infection in cross-sectionally collected specimens from a cohort of

- female sex workers in the Dominican Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:1475–80.
- 12 Romero A, Martro E, González V, et al. Comparison of two serological tests for the identification of recent HIV infection: Vironostika HIV-1 microelisa and BED capture enzyme immunoassay. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:553–5.
 - 13 Le Vu S, Le Strat Y, Barin F, et al. Population-based HIV-1 incidence in France, 2003–08: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:682–7.
 - 14 Hurtado I, Alastrue I, Garcia de Olalla P, et al. Preventive intervention in venues for interaction used by men who have sex with men. *Gac Sanit* 2010;24:78–80.
 - 15 Fernandez-Lopez L, Rifa B, Pujol F, et al. Impact of the introduction of rapid HIV testing in the voluntary counselling and testing sites network of Catalonia, Spain. *Int J STD AIDS* 2010;21:388–91.
 - 16 Folch C, Casabona J, Munoz R, et al. Increase in the prevalence of HIV and in associated risk behaviors in men who have sex with men: 12 years of behavioral surveillance surveys in Catalonia (Spain). *Gac Sanit* 2010;24:40–6.
 - 17 Folch C, Munoz R, Zaragoza K, Casabona J. Sexual risk behaviour and its determinants among men who have sex with men in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* 2009;14:19415.
 - 18 Sullivan PS, Hamouda O, Delpuch V, et al. Reemergence of the HIV epidemic among men who have sex with men in North America, western Europe, and Australia, 1996–2005. *Ann Epidemiol* 2009;19:423–31.
 - 19 Vall-Mayans M, Caballero E, Sanz B. The emergence of lymphogranuloma venereum in Europe. *Lancet* 2009;374:356.
 - 20 Casabona Barbara J, Binefa i Rodriguez G, Folch Toda C, et al. Sexually acquired HIV infections on the rise in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* 2006;11:E060720.5.
 - 21 UNAIDS. Global Report UNAIDS on the global AIDS epidemic: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Geneva, Switzerland, 2010.
 - 22 Guy R, Gold J, Calleja JM, et al. Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2009;9:747–59.
 - 23 Young CL, Hu DJ, Byers R, et al. Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMerieux vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:481–6.
 - 24 Romero A, Sued O, Puig T, et al. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and distribution of HIV-1 subtypes among patients with recent infection in Catalonia (Spain) between 2003 and 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:482–9.
 - 25 Lospitao E, Alvarez A, Soriano V, Holguin A. HIV-1 subtypes in Spain: a retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV Med* 2005;6:313–20.
 - 26 Parekh BS, McDougal JS. New approaches for detecting recent HIV-1 infection. *AIDS Rev* 2001;3:183–93.

ANEXO

Estimación de la incidencia mediante el uso de tests serológicos para identificar infecciones recientes

A pesar de la importancia de la incidencia como un indicador en Salud Pública, la mayoría de programas preventivos y sistemas de vigilancia se centran en medir la prevalencia de VIH en una población, es decir, la proporción actual de personas que viven con la infección por VIH. Aunque la prevalencia es un índice útil en Salud Pública, no refleja de manera directa la tasa de la transmisión actual de VIH, ya que puede estar confundida por otros factores como son la supervivencia de los pacientes, los patrones de migración y las tasas de nacimiento. Hay que enfatizar además que el efecto de la supervivencia sobre la prevalencia se ha visto fuertemente incrementado con el éxito de las terapias antirretrovirales en los países con acceso al tratamiento (113).

La estimación de la tasa de incidencia en una determinada población requiere el seguimiento a lo largo del tiempo de individuos que no están infectados por el VIH pero que se consideran a riesgo de adquirir la infección. No obstante, la implementación de este tipo de estudios, denominados cohortes de pacientes seronegativos, presenta dificultades y limitaciones. Por un lado requieren importantes recursos logísticos para asegurar que se minimizan las pérdidas de seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio. A su vez, este intenso seguimiento, a menudo implica consejos para reducir conductas de riesgo u otras medidas preventivas lo que limita la validez de las estimaciones de incidencia o su extrapolación a la población general.

En este contexto, la ventaja de la utilización de los TRIs para obtener estimaciones de incidencia del VIH radica, precisamente, en dos aspectos claves, como son la población a la que se accede y el diseño del estudio que se lleva a cabo en ella. Estas características determinan que su aplicación habitual sea en poblaciones a riesgo definidas en el contexto de vigilancia centinela, en sistemas de vigilancia basados en los nuevos diagnósticos de VIH e incluso en población general (94, 95, 114, 115). En cualquiera de estos dos contextos anteriores, el diseño del estudio es de tipo transversal.

Janssen basándose en la relación epidemiológica que existe entre la prevalencia (p) la incidencia (I) y el tiempo de duración de la infección (T),

$$p = I \times T, \quad (1)$$

formula la estrategia a seguir para la estimación de la incidencia del VIH aplicando los resultados de clasificación del test STARHS en muestras procedentes de un estudio transversal (72). En su formulación la estimación de la incidencia consiste en dividir el número de individuos identificados como infecciones recientes (R) por el número de individuos susceptibles, es decir, el número de individuos con un resultado negativo del EIA convencional (N) más el número de

infecciones recientes (R). Esta cantidad se anualiza mediante un factor constante que tiene en cuenta el período ventana medio del test (w):

$$I = R / (N + R) \times 365/w. \quad (2)$$

Asimismo, se propone cómo estimar el intervalo de confianza asociado a la incidencia así como una modificación de la fórmula (1) para tener en cuenta la existencia de múltiples muestras procedentes de un mismo individuo.

Desde esta primera aproximación hasta la fecha encontramos en la literatura numerosos estudios evaluando la precisión de las estimaciones de incidencia obtenidas mediante la fórmula de Janssen (98, 116). La motivación de estos trabajos ha sido siempre cuantificar el impacto en las estimaciones del error de clasificación (ϵ) que, en mayor o menor magnitud, existe siempre al considerar un test de identificación de infección reciente. Este debate ha conducido a la publicación de propuestas alternativas a la fórmula (1), como son la de Hargrove (117), McDougal (118) y McWalter (119). En definitiva, todas estas propuestas pretenden corregir el número de individuos considerados como recientes entre el total de muestras positivas (P). Las guías actuales, no obstante, recomiendan utilizar la aproximación de McWalter:

$$I = (R - \epsilon \times P) / (1 - \epsilon) \times w \times N, \quad (3)$$

que expresa la incidencia (I) como la tasa instantánea, o su expresión como riesgo anual de infección con la siguiente fórmula de conversión:

$$I_a = 1 - \exp(-I). \quad (4)$$

Los primeros estudios que usaron los TRIs para estimar incidencia se realizaron en poblaciones centinela, reclutando los participantes en clínicas de ITS (120, 121), o bien en centros que ofrecen la prueba del VIH de manera anónima (122). Las incidencias estimadas oscilaban entre 1,1 y 3,0 infecciones /100 personas-año, encontrándose las incidencias más altas entre la población de hombres que practican sexo con hombres. Posteriormente, también se centraron en otras poblaciones como los UDVP o las mujeres embarazadas (114, 123). En el estudio realizado en Atlanta entre mujeres embarazadas la incidencia estimada fue inferior, tan sólo de 0,24 infecciones/ 100 personas-año (123). Por otro lado, en el estudio realizado entre población UDVP, en el primer periodo del estudio, de 1990 a 1995 la incidencia estimada fue 3,1 infecciones/ 100 personas-año, mientras que en el siguiente periodo, de 1996 a 2002, la incidencia disminuyó hasta 0,9 infecciones/ 100 personas-año.

En los países africanos de la región Subsahariana se han realizado numerosos estudios estimando incidencia, usando TRIs. Las estimaciones obtenidas oscilan entre 2,0 y 17,0% infecciones/personas-año (124). En general, también se observa un descenso en el tiempo en las tasas de incidencia (Tabla 5).

En Estados Unidos, en el año 2008 publicaron un estudio en el que proporcionaban la primera estimación directa de incidencia de VIH, a nivel poblacional, usando la información sobre infecciones recientes obtenida mediante el test BED-CEIA. Para el año 2006 estimaron que 39.400 personas fueron diagnosticadas de VIH. De entre todas ellas, analizaron 6.864 muestras con el test BED-CEIA, y obtuvieron 2.133 casos de infecciones recientes (31%). A partir de estos datos, extrapolaron que el número total de nuevas infecciones producidas en el año 2006 fue de 56.300, suponiendo una tasa de incidencia de 22,8 nuevas infecciones por cada 100.000 personas (94).

En Francia, también han calculado la incidencia de VIH a nivel poblacional usando la información obtenida a partir de la aplicación del test IDE-V3. En el año 2008 estimaron un total de 6.480 nuevos diagnósticos de VIH y 6.940 nuevas infecciones de VIH. La incidencia estimada fue de 17 nuevas infecciones por cada 100.000 personas (95).

Lugar	Técnica	Población	Tipo de centro	Periodo	Incidencia*	Referencia
Amsterdam	Abbott	HSH	Clínica ITS	1991 - 2001	3,00	Dukers NH <i>et al.</i>
Reino Unido	Abbott/ Vironostika	HSH	Clínica ITS	1995 - 2001	2,45	Murphy G <i>et al.</i>
San Francisco	Abbott/ Vironostika	Población que acude a los centros anónimos de cribado	Centros anónimos de cribado de VIH	1996-1998	1,1 y 1,9 en HSH	McFarland W <i>et al.</i>
Lisboa	Avidez	Población heterosexual	Clínica ITS	2004	3,3	Cortes Martins H <i>et al.</i>
San Petesburgo	BED-CEIA	UDVP	Centros de salud	2005-2008	18,7	Niccolai LM <i>et al.</i>
Atlanta	BED-CEIA	Mujeres embarazadas	Clínica prenatal	1991-1998	0,24	Nesheim S <i>et al.</i>
New York	Vironostika	UDVP	Centro de desintoxicación	1990-1995	3,1	Des Jarlais DC <i>et al.</i>
				1996-2002	0,9	
Adis Abeba (Etiopía)	BED-CEIA	Mujeres embarazadas	Clínica Prenatal	1995 - 2003	7,7 (1995) 2,0 (2003)	Wolday D <i>et al.</i>
Sur África	BED-CEIA	Población general	Poblacional	2003 - 2006	3,03 - 3,19	Bärnighausen T <i>et al.</i>
EEUU	BED-CEIA	Población general	Poblacional	2006	0,0228	Hall I <i>et al.</i>
Francia	IDE-V3	Población general	Poblacional	2008	0,017	Le Vu S <i>et al.</i>

Tabla 5. **Estimaciones de incidencia de VIH, usando tests serológicos para identificar infecciones recientes** *% personas-año

A continuación, se presenta el trabajo que tiene como objetivo utilizar los tests serológicos para identificar infecciones recientes para obtener estimaciones de la incidencia de VIH en nuestro medio. Este trabajo está pendiente de publicación, y se presenta como parte no fundamental de esta tesis.

Approximation to HIV incidence using tests for recent infection in the HIV Surveillance System of Catalonia, Spain.

A Esteve^{1,2,3,4}, A Romero^{4,5}, V González^{1,2,3}, C N J Campbell¹, L Fernández-López¹, J Casabona^{1,2,3,4} and the AERI Study Group.

¹ Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT). Institut Català d'Oncologia (ICO). Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT), Espanya

² CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Espanya

³ Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Espanya

⁴ Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Espanya

⁵ Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya (AQuAS), Espanya

Running head: HIV incidence in Catalonia, Spain (2003-2008)

Words in Abstract: 310

Words in the manuscript: 2,924

Tables: 2 **Figures:** 0 **Key words:** Recent infection, HIV; Incidence; Test for recent infection

This study was presented in part at the Congress of the Sociedad Española de Epidemiología (SEE), Madrid, Spain; October 6-8, 2011.

Corresponding author:

Anna Esteve

Center for Epidemiological Studies on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS of Catalonia (CEEISCAT- ICO).

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Ctra. de Canyet, s/n. 08916 Badalona, SPAIN

aesteve@iconcologia.net

phone: +34 934 978 891; fax +34 934 978 889

Competing interests: None declared

Data: 27/05/2014

RESUMEN

Introducción: En Cataluña, desde el año 2003, en el contexto del Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del VIH, se realiza la identificación de infecciones recientes entre los nuevos diagnósticos de VIH mediante el uso de los algoritmos para identificar infecciones recientes. Identificar las infecciones recientes basándose en la aplicación de tests serológicos permite estimar la incidencia a partir de fórmulas diseñadas específicamente para ese propósito.

El objetivo de este trabajo fue estimar la incidencia de VIH entre los nuevos diagnósticos de VIH identificados en una red de hospitales y centros de cribado alternativos situados en Cataluña, entre los años 2003 y 2008.

Métodos: Se incluyeron muestras de nuevos diagnósticos de VIH procedentes de 11 hospitales y 6 centros de cribado alternativos. Durante el periodo de estudio se utilizaron dos tests diferentes. Desde el año 2003 hasta el 2006 se usó el Vironostika, y a partir del año 2007, debido a que el test Vironostika dejó de estar disponible comercialmente, se usó el test BED-CEIA. Los resultados de un estudio previo, nos indicaron que la concordancia entre ambos tests era buena. En el algoritmo diseñado para identificar infecciones recientes, las muestras correspondientes a pacientes con enfermedad avanzada de VIH (pacientes con criterios clínicos de SIDA o recuentos de células CD4+ inferiores a 200 células/ μ l) se consideraron que correspondían a infecciones no recientes. Para estimar la incidencia de VIH se usó el método propuesto por McWalter. Este método consiste en dividir el número de infecciones recientes (IR) por el número de muestras con un resultado negativo en un test VIH estándar, de esta manera: $I = (IR - \epsilon \times P) / (1 - \epsilon) \times w \times N$, donde ϵ representa la tasa de falsos positivos del algoritmo para identificar infecciones recientes, la P es el número total de personas VIH positivas, la w es el periodo ventana del test para detectar infecciones recientes, y la N es el número de personas VIH negativas.

Resultados: En el periodo de estudio, se analizaron un total de 2.642 muestras de pacientes que fueron diagnosticados por VIH entre los años 2003 y 2008. De estas 2.642 muestras, después de aplicar el algoritmo para identificar infecciones recientes, 518 (19,6%) se identificaron como infecciones recientes. La incidencia de VIH estimada para el periodo 2003 – 2008 fue de 0,46 casos de nuevas infecciones por cada 100 personas/año. Se observó un aumento de la incidencia durante el periodo de estudio global, aumentando significativamente de 0,31 nuevas infecciones por cada 100 personas/año en el año 2005, a 0,73 por cada 100 personas/año en el año 2008.

Conclusiones: Estimar la incidencia es necesario para conocer la evolución de la epidemia por VIH en nuestro medio. Este trabajo supone la primera estimación de incidencia de VIH, usando los algoritmos para identificar infecciones recientes en Cataluña. Los resultados obtenidos sugieren que la incidencia de VIH está aumentando en nuestro medio.

ABSTRACT

Background: In Catalonia (Spain) since year 2003 recent infection testing algorithms (RITA) have been incorporated to the Integrated Surveillance System on AIDS, HIV and Sexually Transmitted Infections in Catalonia. This approach, based on a laboratory assay able to identify recent infections (RI) among HIV diagnoses, allows us to infer HIV incidence from a cross-sectional survey testing. We aim to estimate the HIV incidence in the subpopulation tested for HIV in Catalonia (Spain) from 2003 to 2008 by using data from the HIV Surveillance system and RITAs.

Methods: We evaluated with RITA all the samples with a new HIV diagnosis from a network of 11 hospitals and 6 voluntary counselling testing sites during 2003-2008 (AERI Study). The HIV Testing Surveillance System of Catalonia provided as aggregated data the number of diagnostic tests with positive or negative result performed by the participating centres. We approximate HIV incidence using a modification of the McWalter's approach taking into account the misclassification rate and other calibration parameters. Comparison of HIV incidence between times periods were evaluated using the incidence ratio (IR) and their 95% confidence interval (CI).

Results: Out of the 2,642 new HIV diagnoses, 518 were classified as RI (19.6%). By year, this percentage increases from 17.4% to 26.0% ($p < 0.05$). The FRR of the recent infection algorithm was locally estimated in 3.8% (coefficient of variation of 15.7%). The HIV incidence was estimated in 0.46 cases of new infections per 100/year during the study period 2003-2008 (95% CI: 0.39-0.53). Annually, the HIV incidence varied increasing significantly from 0.31 (95% CI: 0.22-0.51) new infections per 100/year in 2005 to 0.73 (95% CI: 0.55-0.90) per 100/year in 2008 (IR=2.34, 95% CI [1.51-3.18]).

Conclusions: Our data suggest that HIV incidence might be increasing from 2006 to 2008 in our setting. However, at a population level these results should be confirmed taking into account information on HIV testing patterns.

INTRODUCTION

A key component of an HIV surveillance system is to estimate the rate of occurrence of new infections in a given population. Since the beginning of the epidemic, several approaches and methods have been proposed to estimate HIV incidence, each one presenting specific methodological challenges. Approaches developed during the last fifteen years based upon laboratory assays to identify recent infection (RI) have become particularly useful from the public health perspective (1 - 4). With this assay approach to identify RI among HIV diagnoses from a single cross-sectional survey, it is possible to estimate HIV incidence using formulae specifically devised for this purpose based on the classic epidemiological principle of Incidence = prevalence x duration (1, 2).

Serological assays used as tests for recent HIV infection (TRIs) are based on the principle that immune responses to HIV develop over time in such a way that a *mean* response could be derived (4). Variation in individual immune responses, however, leads the currently available TRIs to misclassify a proportion of people with long-standing HIV infection as *recent* (5). In order to minimize the impact of this phenomenon, it is recommended that individual information about the diagnosis of AIDS, CD4+ T cell count and antiretroviral treatment (ART) be collected and this information be combined with TRI assay results into a recent infection testing algorithm (RITA) (6). However, since a proportion of long-standing individuals could be still be misclassified as recent, guidelines (6) recommend estimating the false recent rate (FRR) and using the FRR in the calculation of incidence using McWalter's formulae (7).

In Europe many countries have already incorporated TRIs into their HIV surveillance systems (8 - 11). In France routine national incidence testing with serologic testing methods has been done since 2003 as a part of national HIV case surveillance (12). Similarly, in the United States, the Centers for Disease Control (CDC) and Prevention implemented a National HIV Incidence Surveillance System in 2007 (13, 14). Recently, in the region of Lazio in Italy, similar methods (15) have been adopted in order to report HIV incidence (16).

Spain is the western European country with the eighth highest rate of HIV infections newly diagnosed after Portugal and Ireland, representing an annual rate of 7.9 cases per 100,000 population (17). In Catalonia, the dynamics and incidence rates are similar to the rest of Spain, where the epidemic was initially driven by intravenous drug users and subsequently spread due to sexual transmission. Between 2001 and 2008, 5,506 newly diagnosed cases of HIV were reported, with an annual global rate of 12 cases per 100,000 population, predominantly in heterosexuals (43.3%), followed by men who have sex with men (MSM) (36.1%) and injecting drug users (14.6%) (18).

The implementation of the laboratory procedures led us to design a study in 2001 aimed at assessing the viability of introducing recent infection testing algorithms (RITAs) to distinguish between recent and long-standing infections among new HIV diagnoses in our setting (ref: Romero 2009). Since the study demonstrated the viability of RITA implementation, a broader sentinel surveillance system for RI was established in 2006, applying RITA to newly identified cases of HIV infection from a network of 11 hospitals and 6 voluntary counselling testing sites (VCTS) (19, 20) as part of the Integrated Surveillance System on AIDS, HIV and Sexually Transmitted Infections in Catalonia (18).

The objective of the present study is to provide an approximation to HIV incidence in the subpopulation tested for HIV by combining data from the HIV surveillance system and TRI in Catalonia (Spain).

METHODS

Study period

From January 2003 to December 2008.

Study population

The population tested for HIV in Catalonia .

Settings

All patients newly diagnosed of HIV infection in a network of 11 hospitals and 6 voluntary counselling testing sites (VCTS) participating in the AERI Study, a multicentre study which started in 2003. Characteristics and methods of the study have been previously described (19, 20). All the laboratories are in Catalonia (10 within in the metropolitan area of Barcelona, and 3 in other cities in Catalonia) and all volunteered to participate. Serum samples were to be obtained within the first 6 months of newly diagnosed HIV infection and all patients were ≥ 16 years old . Patients gave their written informed consent to participate from 2006 onwards. Newly identified cases of HIV infection in the participating centres represented approximately 50% of all new HIV notifications to the Catalan HIV reporting system.

Specimen collection

Residual volumes of serum specimens collected for diagnostic purposes were sent by the participating laboratories to the coordinating centre (Centre for Epidemiological Studies on HIV/AIDS and STI of Catalonia [CEEISCAT]). Aliquots were identified by a unique study number (no personal identifiers were used).

Recent infection testing algorithm (RITA)

Samples were analysed at the Microbiology Service of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. First, samples were analysed to detect the presence of HIV-specific antibodies using a conventional sensitive enzyme immunoassay (EIA) (Anti-HIV TETRA Elisa, Biotest, Dreieich, Germany) to ensure that they were all from HIV-positive patients. During the period 2003-2005 we used a specific RITA in which all specimens meeting the inclusion criteria were tested with the TRI. Conversely, during the following period of 2006-2008, those samples from patients with a CD4+ T cell count <200 cells/ μ L and/or clinical criteria for AIDS were not tested with the TRI but were directly classified as patients with advanced HIV disease. Moreover, during the study period the laboratory used 2 different TRI: the Vironostika-LS assay (January 2003 to May 2007) and the BED-CEIA (June 2007 onwards). The performance characteristics of Vironostika-LS and BED-CEIA have been described elsewhere (21, 22), and both techniques showed good consistency in our setting (23). The mean window period of both techniques was 170 days for the Vironostika assay and 155 days for the BED-CEIA. Quality control was assured by participation as national representatives in the international program of quality control for the Serological Testing Algorithm for Seroconversions (STARHS) established by the CDC (FDA/BB-IND #8193) since 1999.

Data Collection

Data collection occurred as a two-stage process. Laboratory staff identified newly diagnosed individuals and completed a data collection form to record CD4+ T-cell counts, HIV viral load and previous HIV serological testing results. Once the person was under the care of a physician, a second data collection round to record demographic and clinical-epidemiological variables at the time of diagnosis (or the closest available date) was undertaken. For centres participating in the PISCIS cohort, this second dataset was extracted from the centre's clinical database, whereas for centres not participating in PISCIS, a form was completed by the clinician or designated person from the clinical record. The HIV Testing Surveillance System of Catalonia provided the annual number of diagnostic tests with positive or negative result performed and reported by the participating centres (18).

Statistical analysis

The percentage of recent infection was calculated as the number of samples identified as recent by the TRI divided by the total number of new diagnoses, and their 95% confidence interval (CI) was estimated using the exact method. The Mantel test was applied to assess the presence of any significant trend during the study period. To estimate HIV incidence from RITA we applied McWalter's approach (7) which essentially divides the number of samples identified as RI by the

number of samples with a negative result in the conventional EIA test (N), as follows: HIV Incidence = $(RI - \epsilon \times P) / (1 - \epsilon) \times w \times N$, where w is the mean RITA duration in units of years, ϵ is the false recent rate (FRR) of the RITA, a calibration parameter which corrects for the number of misclassified samples, and P is the number of HIV-positive cases. Since the number newly diagnosed HIV-infections tested with RITA (P) represented 40-50% of the number of HIV-positive samples (P*) reported to the HIV Testing Surveillance System, we rescaled the counts of negative HIV tests used in the incidence calculation (N) proportionally from the total number of negative test reported (N*) using the expression $N = N^* \times (P/P^*)$. The (FRR) was estimated as the proportion of specimens classified by the RITA as RI among those known to be long-standing or advanced infections. Since two different TRI were used during year 2007, it was calculated using the mean RITA duration as the average of the window periods of the two assays (162.5 days). Incidence ratio (IR) and its 95% CI were reported to compare the HIV incidence between different time periods. The calculations of incidence were done using the spreadsheet ABIE v1.0 available at the SACEMA's web site.

Ethics

The ethics committees of the participating centres approved the protocol. All personal identifiers were removed from the samples, which were sent to the coordinating centre with a study number. Only the recruitment centre had access to personal identifiers in order to enable record linkage for subsequent epidemiological and clinical data collection.

RESULTS

Between 2003 and 2008, the total number of patients participating in the centre's network study (AERI project) was 2,853. Of these, 211 (8%) were excluded from the study mainly because they did not meet inclusion criteria (19, 20). Out of the remaining 2,642 new HIV diagnosis, 518 were classified as RI with the RITA (19.6%). The percentage of RI increased significantly ($p < 0.05$) from 17.4% in 2003 to 26.0% in 2008 (Table 1).

Overall, the total number of tests reported by participating centres to the HIV Testing Surveillance System of Catalonia during 2003-2008 was 458,443, of which 5,648 (1.23%) were positive. The number of tests with a negative result increased from 53,073 in 2003 up to 91,566 in 2008 and, conversely, the percentage of positive tests during the study period varied from a high of 1.42% in 2003 through a low of 1.08% in 2006 to 1.39% in 2008 (Table 1).

Characteristics of the participants by study period are described in Table 2. Most of samples included were collected in hospitals, from male patients infected through MSM relations, with ages between 30 and 50. In both study periods percentages of immigrants were quite similar.

Estimates of the FRR corresponding to the study period 2003-2005 are based on 430 samples. Fifteen were classified as RI resulting in a FRR of 3.5% (coefficient of variation=25.4%). Estimates of the FRR derived during the study period 2006-2008 were similar; out of the 593 long-standing infections 24 were classified as RI, giving a FRR of 4.0% (coefficient of variation=20.0%). A final FRR estimate was obtained from pooling data of the two time periods, resulting in a FRR=3.8% (coefficient of variation=15.7%).

HIV incidence for the period 2003-2008 was estimated to be 0.46 new infections per 100/year (95% CI: 0.39-0.53). HIV incidence varied during this period, increasing significantly from 0.31 (95% CI: 0.22-0.41) new infections per 100/year in 2005 to 0.73 (95% CI: 0.55-0.90) per 100/year in 2008 (Table 1), (IR=2.34, 95% CI [1.51-3.18]). When stratified by study period, the HIV incidence was estimated to be 0.40% (95% CI: 0.32-0.47%) and 0.55% (95% CI: 0.45-0.65%) new infections per year during 2003-2005 and 2006-2008, respectively. Incidence was significantly higher in the last period (IR=1.39, 95% CI [1.10-1.69]).

DISCUSSION

The present study estimates the incidence of new HIV infections among a population of people who undergo HIV testing in a network of voluntary counselling and testing services and hospitals in Catalonia (Spain) for the period 2003 to 2008. These estimates are derived from serological tests for recent infection, individual clinical data and information provided from the HIV Testing Surveillance System of Catalonia. HIV incidence in this population was estimated at 0.5 new HIV infections per 100 persons/year.

During the study period a trend toward an increase in the annual HIV incidence was found between 2005 and 2008. This rise is driven by an increase in the percentage of recent infections over the number of negative tests. Several possible reasons could explain this increment. First of all, the ratio of new diagnosis tested by the RITA to the total number of HIV positive tests oscillates over the study period which might have an impact on the accuracy of the incidence estimates and cannot be lightly dismissed. Secondly, changes in the algorithm used during the study may have resulted in altered classification of recent or long-standing infection. Nevertheless, estimated FRRs during the two study periods were similar and previous studies conducted in our setting reported that the Vironostika and BED-CEIA assays showed good agreement and similar sensitivity (23). Thirdly, changes in testing behaviour may affect the proportion of people with recent infection during the study period. A rise in the demand for tests was seen during the study period in the testing surveillance data coinciding with the widespread introduction into VCTs of rapid HIV tests (the probability of identifying recent increases) (24).

Coupled with a rise in a demand for tests, we see that MSM are more likely to be repeat testers (mainly through VCTs), with a median number of tests prior to diagnosis of 4 as compared to 1.5 in MSM (25).

Finally, these results may reflect real increases in risk behaviours among MSM (26, 27). This observation would be consistent with observed increases in primary and secondary syphilis diagnoses from 2000-2005 (28) and other studies from around Europe (29, 30) showing rises in both directly measured risk behaviour and STIs indicating high risk behaviour. Moreover, it is consistent with results of the ITACA Cohort, a prospective longitudinal study of HIV negative MSM recruited among clients of a Community Based HIV and other STI detection centre in Barcelona, where preliminary results showed that directly measured HIV incidence has a trend toward increase (3 per 100/year in 2006-2008 and 4.35% in 2009-2010) (31). Furthermore, estimates derived from the Estimation and Projection Package (EPP) and Spectrum developed by the UNAIDS (32, 33) also disclose an increase of the HIV incidence in the general population aged more than 15 years old in Catalonia, rising from 0.1 per 1,000/year in 2003-2005 to 0.2 per 1,000/year in 2006-2008 (18, 34), although this model relies on many similar inputs.

Limitations in this study centre on changes in methods during the study period and the completeness of surveillance data available to estimate incidence. The use of two different algorithms and laboratory assays has been discussed above with the exception of our adoption of a mean window period. While there is no guidance in the literature on combining different assays sequentially in a single study, we feel that this pragmatic approach is reasonable given the comparability otherwise discussed above. Estimates of the FRR could be improved in our setting with the adoption a new TRI (Avidity index) as recommended by some authors (5) and by systematic and periodic estimation of the FRR in a sufficiently large sample, including in subgroups.

Data on negative tests required for estimating incidence is in aggregate form. The principal implications of this are that we are unable to provide estimates of incidence by age, sex or risk group and we cannot eliminate repeat testers from the denominator. About half of all new diagnoses are not tested with RITA and these we have considered to be randomly distributed. Another limitation is that changes in the prevalence of non-B subtypes were not measured which may impact upon the FRR, since the performance of incidence assays has not been widely assessed in non-B subtypes (35).

Recently a new estimator has been proposed (36). Using this formulae we found slightly higher rates of HIV incidence (data not shown), but consistent with the reported trends.

Caution should be exercised in extrapolating these results to the general population given that the frequency of testing of some over-represented groups in our study (e.g. MSM) is known to be higher, increasing the likelihood of identifying RI in comparison to other groups (37). In fact, despite the insufficient sample size to reliably report HIV incidence estimates from VCTS alone, the observed data suggest higher rates of recent infection, consistent with the high proportion of VCTS users who are MSM. In considering the applicability of these sentinel surveillance results to the HIV-tested subpopulation, however, we conclude that since the number of new HIV diagnoses tested with RITA in our study represented approximately 50% of all new HIV notifications collected by the HIV Reporting System, and that their epidemiological characteristics did not differ from those presented by the new HIV diagnosis in Catalonia, the estimated rate of might be reliably indicative of the real rate in this subpopulation.

In order to improve the generalisability of our incidence estimates, we would need to be able to estimate the probability of testing for HIV in the year after infection but the aggregate testing data in the current surveillance system precludes this at present. Moreover, having available individual information about testing behaviour would allow us to estimate HIV incidence at regional level using models that account for the effect of testing practices (15, 16).

In conclusion, estimates of HIV incidence derived from RITA have proved a useful tool to analyse the current dynamic of the epidemic in Catalonia, and are being routinely used to enhance the HIV Surveillance System. To our knowledge, this is the first application of the RITA technique to estimate HIV incidence in Spain, contributing to establish the magnitude of new infection during the study period and reporting data suggesting that HIV incidence is increasing in our setting. To fully experience the benefit of using TRI in the HIV Surveillance System of Catalonia would be advisable to have information about the testing practices of newly diagnosed individuals, so HIV incidence estimates could be obtained at a regional level.

Funding

“La Marató de TV3” Foundation awarded the CEEISCAT a grant for the development of the AERI-HIV (Algoritme Estandarditzat per la detecció de Recent Infectats pel VIH) project for epidemiological research on AIDS by applying the STARHS technique (project #022010). This work was partially funded by the Direcció General de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya and by the Fundación para la Investigación y Prevención del Sida en España (FIPSE, Madrid, Spain, National AIDS Plan Secretariat of the Spanish Ministry of Health). The Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) provided the samples for the quality control programme (FDA BB-IND #8193).

The Recent HIV Infections (AERIVIH) Study Group includes the following:

Coordinating Center (CEEISCAT):

Anabel Romero, Colin Campbell, Rafael Muñoz, Núria Ortega, Alexandra Montoliu, Anna Esteve, and Jordi Casabona

STARHS Laboratory (Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol):

Victoria González, Elisa Martró, and Lurdes Matas

Peripheral centres: Josep M^a Miró, Tomàs Pumarola and María López-Diéguez (H. Clínic i Provincial de Barcelona); Aurora Casanova and Elena Ferrer (H. Bellvitge Prínceps d'Espanya - Barcelona); Cristina Tural (H. Universitari Germans Trias i Pujol - Badalona); Estrella Caballero, Esteve Ribera (H. General Vall Hebron - Barcelona); Núria Margall, Pere Domingo (H. De la Santa Creu i Sant Pau - Barcelona); Joan Farré and Teresa Puig (H. Universitari Arnau de Vilanova-Lleida); M^a Goretti Sauca and M^aPilar Barrufet (H. De Mataró); Xavier Ortín and Amat Ortí (H. Verge de la Cinta - Tortosa); M^a José Armengual, Gemma Navarro and Ferran Segura (Consorti Hospitalari del Parc Taulí - Sabadell); Josep M^a Prat and Àngels Masabeu (H. de Palamós); Marian Navarro and Josep Vilaró (H. General de Vic); Josep M^a Simó, Carlos Alonso Villaverde and Blai Coll (H. Universitari Sant Joan de Reus), Eugenia Màrquez and Isabel Garcia (Hospital general de L'Hospitalet); Miguel Ángel Benítez, Alba Cebollero and Manuel Guadarrama (H. De Vilafranca).

Voluntary and Counseling Testing Sites: Isabel Rodrigo (Lab. Clínic de Manso), Roser Sala (Lab. Sabater Tobella), Olga Díaz (SAPS), Kati Zaragoza (Stop Sida), Mercè Meroño (Àmbit Dona), Jorge Saz and Ferran Pujol (Projecte dels Noms - Hispanosida), Jasmina Becerra (ACASC), Rosa Ros (CIAS), Anna Avellaneda, Montse Sité (Actua Vallès), Anna Rafel (Associació Antisida Lleida).

REFERENCES

1. Brookmeyer R, Quinn TC. Estimation of current human immunodeficiency virus incidence rates from a cross-sectional survey using early diagnostic tests. *Am J Epidemiol.* 1995;141(2):166–172.
2. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, Hecht FM, Jack N, Cleghorn FR, Kahn JO, Chesney MA, Busch MP. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 1998; 280(1):42-8
3. Busch MP, Pilcher CD, Mastro TD, et al. Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. *AIDS.* 2010;24(18):2763-2771.
4. Murphy G, Parry JV. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Euro Surveill* 2008; 13:pii:18966
5. Mastro TD, Kim AA, Hallett T, Rehle T, Welte A, Laeyendecker O, et al. Estimating HIV incidence in populations using tests for recent infection: Issues, challenges and the way forward. - *J HIV AIDS Surveill Epidemiol.* 2010 Jan 1;2(1):1-14.(1930-6768 (Electronic)).
6. UNAIDS/WHO Working group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. Geneva: WHO Press; 2011.
7. McWalter TA, Welte A. Relating recent infection prevalence to incidence with a sub-population of assay non-progressors. *J Math Biol.* 2010;60(5):687–710.
8. Health Protection Agency. HIV in the United Kingdom: 2011 Report. London: Health Protection Services, Colindale. November 2011.
9. Cortes Martins H, Paixao M. Settings for identifying recent HIV infections: the Portuguese experience. *EuroSurveill* [Internet]. 2008 Sept. 4 [cited 2010 Jul. 20];13(36). pii:18974.
10. Bätzing-Feigenbaum J, Loschen S, Gohlke-Micknis S, Zimmermann R, Herrmann A, Kamga Wambo O, et al. Country-wide HIV incidence study complementing HIV surveillance in Germany. *Euro Surveill* 2008; 13:pii:18971.
11. Semaille C, Cazein F, Pillonel J, Lot F, Le Vu S, Pinget R, Desenclos J, Barin F. Four years of surveillance of recent HIV infections at country level, France, mid 2003 - 2006: experience and perspectives. *Euro Surveill.* 2008 Sep 4;13(36). pii: 18968.
12. Le Vu S, Le Strat Y, Barin F, Pillonel J, Cazein F, Bousquet V, et al. Population-based HIV-1 incidence in France, 2003-08: A modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010 Oct;10(10):682-7.
13. Lee LM, McKenna MT. Monitoring the incidence of HIV infection in the United States. *Public Health Rep.* 2007;122 Suppl 1:72-9.
14. Hall HI, Song R, Rhodes P, Prejean J, An Q, Lee LM, et al. Estimation of HIV incidence in the United States. *JAMA* 2008; 300:520-9.
15. Karon JM, Song R, Brookmeyer R, Kaplan EH, Hall HI. Estimating HIV incidence in the United States from HIV/AIDS surveillance data and biomarker HIV test results. *Stat Med.* 2008 Oct 15;27(23):4617-33.
16. Mammone et al. HIV incidence estimate combining HIV/AIDS surveillance, testing history information and HIV test to identify recent infections in Lazio, Italy. *BMC Infectious Diseases* 2012; 12:65.

17. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Mapping of HIV/STI behavioural surveillance in Europe. ECDC technical report. Stockholm: ECDC; 2009.
18. Centre for Epidemiological Studies on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS of Catalonia. d'Estudis. SIVES 2010: Integrated AIDS/HIV/STI Surveillance System of Catalonia (SIVES): biennial epidemiological report. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut; 2011. (Technical document CEEISCAT: 20). Available at http://www.ceescat.org/Index_Ing.htm.
19. Romero A, Gonzalez V, Granell M, Matas L, Esteve A, Martro E, et al. Recently acquired HIV infection in Spain (2003-2005): Introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect.* 2009 Apr;85(2):106-10.
20. Romero A, González V, Esteve A, Martró E, Matas L, Tural C, et al. Identification of recent HIV-1 infection among newly diagnosed cases in Catalonia, Spain (2006-08). *Eur J Public Health.* 2012 Dec;22(6):802-8.
21. Kothe D, Byers RH, Caudill SP, Satten GA, Janssen RS, Hannon WH, et al. Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroincidence. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Aug 15;33(5):625-34.
22. Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau CP, Byers R, Green T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002; 18:295-307.
23. Romero A, Martro E, González V, Matas L, AERI Study Group. Comparison of two serological tests for the identification of recent HIV infection: Vironostika-LS HIV-1 microelisa and BED capture enzyme immunoassay. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Aug-Sep;29(7):553-5.
24. Fernández-Lopez L, Rifà B, Pujol F, Becerra J, Pérez M, Meroño M, Zaragoza K, Rafel A, Díaz O, Avellaneda A, Casado MJ, Giménez A, Casabona J. Impact of the introduction of rapid HIV testing in the Voluntary Counselling and Testing sites network of Catalonia, Spain. *Int J STD AIDS.* 2010 Jun;21(6):388-91.
25. Campbell C, Esteve A, and Casabona J on behalf of the PISCIS Cohort Study Group. Development of a composite behaviour risk score to assess behaviour change associated with HIV diagnosis. Poster presentation at the 18th International Workshop on HIV Observational Databases. Sitges, Spain 27th-29th March 2014.
26. Folch C, Munoz R, Zaragoza K, Casabona J. Sexual risk behaviour and its determinants among men who have sex with men in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* 2009;14:19415.
27. Folch C, Casabona J, Munoz R, et al. Increase in the prevalence of HIV and in 5 associated risk behaviors in men who have sex with men: 12 years of behavioral surveillance surveys in Catalonia (Spain). *Gac Sanit* 2010;24:40-6.
28. Sullivan PS, Hamouda O, Delpech V, Geduld JE, Prejean J, Semaille C, et al. Reemergence of the HIV epidemic among men who have sex with men in North America, western Europe, and Australia, 1996-2005. *Ann Epidemiol.* 2009 Jun;19(6):423-31.
29. Van de Laar MJ. HIV/AIDS and other STI in men who have sex with men--a continuous challenge for public health. *Euro Surveill* 2009 ;14(47):19423

30. European Centre for Disease Prevention and Control. STI and HIV prevention in men who have sex with men in Europe. Stockholm: ECDC; 2013.
31. Ferrer L, Esteve A, Meulbroek M, Loureiro E, Ditzel E, Folch C, Pujol F, Saz J, Taboada H, Casabona J. High incidence among MSM in Barcelona, Catalonia: The ITACA Cohort. FEMP 2011: The Future of European Prevention among MSM. 10 & 11 November 2011 Stockholm, Sweden.
32. Stover J, Johnson P, Hallett T, Marston M, Becquet R, Timaeus IM. The Spectrum projection package: improvements in estimating incidence by age and sex, mother-to-child transmission, HIV progression in children and double orphans. *Sex Transm Infect.* 2010 Dec;86 Suppl 2:ii16-21.
33. Brown T, Bao L, Raftery AE, Salomon JA, Baggaley RF, Stover J, Gerland P. Modelling HIV epidemics in the antiretroviral era: the UNAIDS Estimation and Projection package 2009. *Sex Transm Infect.* 2010 Dec;86 Suppl 2:ii3-10. doi: 10.1136/sti.2010.044784. Epub 2010 Oct 6.
34. Campbell C, Esteve A, and Casabona J on behalf of the PISCIS Cohort Study Group. Reconstruction of the HIV epidemic in Catalonia and projection for the years 2012-2017. Poster presentation at the XI International AIDS Impact. Barcelona, Spain September 29th-October 2nd 2013.
35. Young CL, Hu DJ, Byers R, et al. Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMerieux vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:481-6.
36. Kassanjee R, McWalter TA, Bärnighausen T, Welte A. A new general biomarker-based incidence estimator. *Epidemiology.* 2012; in press.
37. M Takano, M Okada, S Oka, and Y Wagatsuma. The relationship between HIV testing and CD4 counts at HIV diagnosis among newly diagnosed HIV-1 patients in Japan. *Int J STD AIDS* April 2012 23:262—266.

Table 1. Annual HIV incidence estimates Catalonia, 2003-2008.

Year	HIV incidence per 100/year	New HIV diagnoses RITA tested ⁽¹⁾	Identified Recent infections ⁽¹⁾ N (%)	HIV Negative tests ⁽²⁾	HIV positive tests ⁽²⁾ N (%)	RITA tested/HIV+ (%)
2003	0.46 (0.31-0.61)	373	65 (17.4)	53,073	766 (1.42)	0.49
2004	0.44 (0.32-0.55)	568	106 (18.7)	69,707	882 (1.25)	0.64
2005	0.31 (0.22-0.41)	577	89 (15.4)	74,913	866 (1.14)	0.67
2006	0.37 (0.24-0.49)	320	58 (18.1)	78,334	857 (1.08)	0.37
2007	0.54 (0.40-0.68)	412	98 (23.8)	85,202	990 (1.15)	0.42
2008	0.73 (0.55-0.90)	392	102 (26.0)	91,566	1,287 (1.39)	0.30
Total	0.46 (0.39-0.53)	2,642	518 (19.6)	452,795	5,648 (1.23)	0.46

⁽¹⁾ Data from the AERI project

⁽²⁾ Aggregated data reported to the HIV testing surveillance system in Catalonia

Table 2. Characteristics of the samples included in the AERI Study by period and the HIV positive samples reported to the HIV Testing surveillance System.

	2003-2005			2006-2008		
	Identified Recent infections ⁽¹⁾	New HIV diagnoses RITA tested ⁽¹⁾	HIV positive tests ⁽²⁾	Identified Recent infections ⁽¹⁾	New HIV diagnoses RITA tested ⁽¹⁾	HIV positive tests ⁽²⁾
Type of centre						
Hospitals	243 (92.5)	1,483 (94.7)	2,425 (96.5)	236 (91.5)	1,046 (93.0)	2,906 (92.7)
VCTS	17 (7.5)	80 (6.0)	89 (3.5)	22 (8.5)	78 (7.0)	228 (7.3)
Gender						
Female	41 (15.2)	NA	666 (26.5)	38 (14.7)	226 (20.1)	724 (23.1)
Male	219 (84.8)	NA	1,848 (73.5)	221 (85.3)	898 (79.9)	2,410 (76.9)
Risk group						
Homosexual	120 (49.7)	NA	NA	171 (69.8)	550 (52.9)	NA
Heterosexual	76 (31.5)	NA	NA	67 (27.3)	436 (42.0)	NA
IDU	45 (18.6)	NA	NA	7 (2.9)	53 (5.1)	NA
Age						
<30	96 (37.5)	NA	618 (24.6)	88 (34.0)	310 (27.6)	807 (25.7)
30-50	142 (55.5)	NA	1,692 (67.3)	160 (62.2)	686 (61.0)	2,038 (65.0)
>50	18 (7.0)	NA	204 (8.1)	10 (3.8)	129 (11.4)	288 (9.3)
Origin						
Spanish-born	164 (72.9)	NA	NA	150 (62.0)	654 (61.3)	NA
Immigrants	61 (27.1)	NA	NA	92 (38.0)	413 (38.7)	NA
Total	260	1,518	2,514	258	1,124	3,134

⁽¹⁾ Data from the AERI project; ⁽²⁾ Aggregated data reported to the HIV testing surveillance system in Catalonia;

NA: not available

IDU: injection drug users

Data presented are N and percentages in brackets (%)

DISCUSIÓN

1. Resumen global de los resultados

Los resultados principales de los trabajos presentados en esta tesis son los siguientes:

1. La aplicación de los tests serológicos para la identificación de infecciones recientes es factible en nuestro medio.

2. Gracias a la aplicación de estos tests, ha sido posible describir las características epidemiológicas de las personas con infección reciente por VIH.

3. Desde el año 2006 la identificación de infecciones recientes mediante tests serológicos está incorporada en el Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del VIH en Cataluña.

4. La prevalencia de infección reciente presentó una tendencia al aumento a lo largo del periodo 2003 – 2008.

5. Los factores asociados a la infección reciente fueron la transmisión a través de relaciones entre HSH y tener menos de 30 años de edad.

6. Es probable que la mayoría de las infecciones en los pacientes de origen inmigrante se hayan producido localmente.

7. Por primera vez se ha estimado la prevalencia de resistencias transmitidas y de subtipos no B en pacientes con infección reciente por VIH-1 en Cataluña.

8. No se observaron diferencias en las características clínico-epidemiológicas de los pacientes recientemente infectados por VIH-1 según la presencia o ausencia de resistencias transmitidas.

9. Los pacientes recientemente infectados por subtipos de VIH-1 no B eran mayores, con más frecuencia se habían infectado por transmisión parenteral y habían sido diagnosticado en áreas de fuera de Barcelona.

10. Los tests serológicos para identificar infecciones recientes utilizados en los trabajos que conforman esta tesis, el Vironostika-LS y el BED-CEIA, presentan una concordancia buena.

11. Ambos tests presentaron la misma sensibilidad, mientras que el test Vironostika-LS presentó una especificidad menor que el BED-CEIA.

12. Se ha realizado la primera estimación de incidencia de VIH usando los tests serológicos para identificar infecciones recientes en Cataluña.

13. Se observó un aumento de la incidencia de VIH durante el periodo de estudio 2003 – 2008.

2. Discusión global

Ya que la discusión específica para cada uno de los trabajos que conforman esta tesis se encuentra en los artículos presentados previamente, a continuación, se presenta la discusión global de los resultados obtenidos en los trabajos de esta tesis. Dentro de esta discusión global también se incluyen los resultados presentados en el trabajo anexo de esta tesis.

A través del proyecto AERI, la identificación de infecciones recientes mediante el test STARHS se introdujo por primera vez en España en el año 2003. Este proyecto demostró la viabilidad de implementar este test en nuestro medio, y permitió cuantificar la magnitud de las infecciones recientes, así como describir las características de los pacientes recién infectados por VIH entre los años 2003 y 2005. Además de poner de relieve el perfil de la población entre la cual el VIH se está transmitiendo, se observó que las infecciones recientes se detectaban en una mayor proporción en los centros de atención primaria (21,5%), los centros alternativos de cribado (21,3%) y las clínicas de ITS (23,4%), respecto a los hospitales (16,5%). Este hallazgo indica que los pacientes acuden con mayor frecuencia a primaria, clínicas de ITS o centros de cribado alternativo, poco tiempo después de producirse la infección, motivados por una percepción de riesgo o, tal vez, por síntomas relacionados con la primoinfección. Estos resultados han contribuido a aportar evidencia científica, al cuantificar la magnitud de las infecciones recientes, según su distribución en cada ámbito asistencial. Esta información está contribuyendo actualmente a orientar las políticas sanitarias sobre el diagnóstico precoz del VIH en el Departament de Salut de Catalunya, ayudando a diseñar intervenciones preventivas adecuadas y proporcionadas, de acuerdo con la evidencia científica reportada (125).

Gracias a la experiencia del proyecto AERI 2003 – 2005, fue posible consolidar los circuitos de recogida de información clínica y de muestras de suero de los pacientes identificados como nuevos diagnósticos de VIH. Este hecho, junto a la estrecha colaboración del CEEISCAT con el laboratorio de microbiología del Hospital Germans Trias i Pujol en la aplicación de los tests serológicos para identificar recién infectados, permitió incorporar los algoritmos de identificación de infecciones recientes en el Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del VIH en Catalunya a partir del año 2006.

La aplicación rutinaria en el sistema de vigilancia epidemiológica del VIH ha permitido identificar cuales son los factores de riesgo asociados a la infección reciente entre los nuevos diagnósticos de VIH. En el período 2006 - 2008, se identificaron como factores asociados a la infección reciente infectarse a través de relaciones sexuales entre HSH y tener menos de 30 años de edad. La transmisión entre HSH presentó una OR de 2,0, respecto a la transmisión

heterosexual. El mayor riesgo de ser identificado como recién infectado en la población HSH puede explicarse por distintos motivos. En primer lugar, se ha observado una mayor frecuencia de realización del test de cribado de VIH en la población HSH (44). Esta mayor frecuencia puede ser debida a una mayor percepción de riesgo por parte de esta población, pero también a intervenciones preventivas de salud pública dirigidas específicamente a esta población (126), así como a la introducción de la prueba rápida del VIH (127). Pero, por otro lado, en los últimos años también se ha observado un aumento de las conductas de riesgo entre los HSH (128-130), lo cual podría hacer aumentar la incidencia de VIH en este colectivo.

La edad también se asoció con la infección reciente. La infección reciente fue menos frecuente entre los pacientes mayores de 50 años, con una OR de 0,2, en comparación con los pacientes de edad inferior a 30 años. Los individuos más jóvenes tienen una mayor probabilidad de ser identificados como recién infectados, ya que el tiempo que ocurre desde el momento de la infección hasta el diagnóstico es más corto cuanto más joven es el paciente. Por otro lado, se ha observado que los HSH más jóvenes tienen más conductas de riesgo que los HSH de más edad (128), por lo que la mayor frecuencia de infección reciente podría corresponderse también con una mayor incidencia entre los individuos más jóvenes.

La prevalencia de infección reciente presentó una tendencia creciente a lo largo de todo el periodo estudiado, pasando de 19,2% en el periodo 2003 – 2005 a 23,0% en el periodo 2006 – 2008. En el último informe epidemiológico del Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica de la SIDA/VIH/ITS de Cataluña, el porcentaje de infecciones recientes aumentó hasta el 32,4% en el año 2009 (44). Esta tendencia creciente es consistente con la disminución del porcentaje de diagnóstico tardío entre los nuevos diagnósticos de VIH en Cataluña: el porcentaje de pacientes diagnosticados tardíamente disminuyó del 57,5% en el 1998 al 44,4% en el 2010 y al 38,3% en el 2011 (44). Por otro lado, esta tendencia creciente de la prevalencia de infección reciente también se ha observado en un estudio realizado en Francia (95), pasando del 24,8% en el 2006 al 27,0% en el 2008.

La prevalencia de infección reciente fue similar en los pacientes de origen inmigrante (22,3%) y en los de origen autóctono (22,9%). Sin embargo, la prevalencia de infección reciente, observada según los distintos lugares de origen, fue mayor en los pacientes procedentes de América del Sur (27,6%) que en los pacientes autóctonos (22,9%). En cambio, en los pacientes procedentes de África Subsahariana el porcentaje de infecciones recientes fue mucho menor (11,9%). Estas diferencias radican en el modo de transmisión del VIH, ya que entre los pacientes procedentes de América del Sur el porcentaje de HSH fue mucho mayor (67,6%) que en los pacientes de África Subsahariana, en los que no se identificó ninguna transmisión entre HSH.

Estos datos son consistentes con la información reportada sobre la epidemiología de la infección por VIH en ambas áreas (38).

La aplicación de los tests serológicos para identificar infecciones recientes puede ayudar a establecer si la infección por VIH en los pacientes de origen inmigrante fue importada o bien fue contraída localmente. Para los pacientes de origen inmigrante se recogió la fecha de llegada a España. Aunque esta información no se pudo obtener en todos los casos, los resultados sugieren que la mayoría de inmigrantes identificados como recién infectados adquirieron la infección en nuestro país, ya que llevaban en él más de 12 meses cuando recibieron el diagnóstico de VIH.

Gracias a la utilización de los tests serológicos para la identificación de infecciones recientes por VIH, para el periodo 2003 – 2005, fue posible realizar el primer estudio de resistencias transmitidas en pacientes con infección reciente por VIH en Cataluña. El valor estimado de la prevalencia (7,7%) fue similar al de otros estudios europeos (60, 131, 132) y españoles (133-135). Es importante destacar que este tipo de estudios habitualmente se realizan en pacientes que se acaban de diagnosticar y que no han recibido tratamiento previo, pero existen muy pocos en los que la infección se haya adquirido recientemente (131, 134). Este hecho le añade valor al estudio, ya que la medida de la prevalencia de resistencias transmitidas en una población es más precisa si se realiza en pacientes con infección reciente. En los pacientes infectados con cepas de VIH resistentes al tratamiento antirretroviral, en ausencia de presión farmacológica, con el paso del tiempo, las cepas minoritarias *wild type*, llegarán a ser la cuasiespecie mayoritaria, ya que tienen un mayor *fitness* que las cepas con resistencias (31).

La prevalencia de resistencias transmitidas fue más alta en el año 2003 (10,0%) que en los siguientes años del estudio (6,5% en el 2004 y 6,7% en el 2005). Este descenso, aunque no mostró ser estadísticamente significativo, es consistente con los resultados de otros estudios europeos que muestran una tendencia temporal decreciente (131).

En el mismo periodo 2003 – 2005, también se describieron por primera vez en Cataluña los subtipos de VIH-1 circulantes entre los pacientes recién infectados. La prevalencia de subtipos no B (19,2%) fue similar a los valores reportados en otros estudios españoles (65, 135, 136), y ligeramente superior al valor reportado en un estudio de la cohorte española CoRIS (15,2%) (61). Se observó un elevado porcentaje de subtipos no B entre los pacientes recién infectados de origen autóctono. Este hallazgo indica que los subtipos no B se encuentran actualmente circulando entre nuestra población de recién infectados por VIH. Aunque no fue estadísticamente significativo, también se observó un aumento de la prevalencia de subtipos no B a lo largo del periodo estudiado, que podría estar relacionado con el aumento de la población inmigrante en nuestro medio durante este período (44).

En el periodo de estudio 2003 – 2005 se usó el algoritmo STARHS para identificar infecciones recientes, mediante el test Vironostika-LS (73). El test Vironostika-LS dejó de estar disponible comercialmente en el año 2007, y fue sustituido por test BED-CEIA (74). Ambos tests han demostrado tener una concordancia buena ($\kappa=0,738$), por lo que se puede afirmar que los resultados obtenidos a lo largo de los dos periodos de estudio (2003 – 2005 y 2006 – 2008) son comparables. Aunque el test Vironostika clasificaba más pacientes con SIDA como recién infectados, el hecho de incluir información clínica (diagnóstico de SIDA y recuento de células CD4+) al algoritmo de identificación de infecciones recientes permitió aumentar la especificidad, obteniéndose una tasa de error del 3,8%, un valor aceptable según las guías recientemente publicadas por el ECDC (137) y la OMS (89).

El uso de algoritmos serológicos para la identificación de infecciones recientes en un sistema poblacional de vigilancia epidemiológica del VIH permite estimar la incidencia de manera menos costosa, respecto los estudios de cohortes en pacientes seronegativos. En nuestro medio, se estimó la incidencia de VIH para el periodo 2003 – 2008 y el valor obtenido fue de 0,46 nuevas infecciones por cada 100 personas/año. Se observó que la incidencia se mantenía estable en el periodo 2003 – 2005, y presentó una ligera tendencia al aumento durante el periodo 2006 – 2008; pasando de 0,31, en el año 2005, a 0,73, en el año 2008. Este aumento es consistente con los resultados de otros estudios realizados en nuestro contexto (44), aunque debería confirmarse con estimaciones que tengan en cuenta el patrón de realización de la prueba del VIH de las personas identificadas como recién infectadas.

3. Limitaciones

Los estudios que conforman esta tesis doctoral presentan ciertas limitaciones. En relación con las limitaciones propias de los TRIs, (comentadas en el apartado correspondiente de la introducción), se ha intentado minimizar el posible error de clasificación de muestras correspondientes a pacientes con infección avanzada como infecciones recientes usando la información clínica y de laboratorio disponible.

El circuito del diagnóstico de VIH frecuentemente se inicia en el centro de cribado alternativo, y, en caso de resultado positivo en la prueba de cribado, el paciente es derivado al hospital para confirmar el diagnóstico. En nuestro estudio han participado centros de cribado y hospitales, de manera que es posible haber reclutado un mismo paciente a través del centro de cribado alternativo y también a través del hospital. Para evitar tener pacientes duplicados en los análisis, se realizaron búsqueda de duplicados por sexo y fecha de nacimiento, y en aquellos casos detectados como posibles duplicados se consultó con el hospital para confirmar que se trataba realmente de un duplicado y, en ese caso, se excluía del análisis.

En el primer artículo, no se pudo obtener información clínico-epidemiológica de los pacientes identificados con infección crónica, por lo que no se pudieron identificar los factores asociados a la infección reciente. Por otro lado, de las muestras recogidas por los laboratorios de atención primaria fue muy difícil recuperar información epidemiológica. A partir de esa experiencia, para el siguiente estudio, se limitó la participación a los centros en los que se podía asegurar la obtención de la información clínico-epidemiológica del paciente. Aún así, fue difícil de obtener algunas de las variables de la encuesta clínico-epidemiológica, como la fecha de llegada a nuestro país, en el caso de los pacientes inmigrantes, o el diagnóstico previo de infecciones de transmisión sexual.

En el segundo artículo, a pesar de haber identificado un número considerable de infecciones recientes, sólo se pudo obtener el genotipado de menos de la mitad de éstas. Esto es debido a que en muchos casos no se pudo asegurar que el paciente no había recibido tratamiento antirretroviral previo, y se tuvieron que excluir del estudio. En relación al genotipado de las muestras, se usaron técnicas convencionales de secuenciación, que pueden infraestimar las variantes de VIH-1 minoritarias.

Para el estudio de la comparación de los dos TRIs, hubiera sido deseable poder disponer de más muestras con información clínica y de laboratorio que nos aseguraran su clasificación como infecciones recientes, crónicas o enfermedad avanzada.

Una limitación común a todos los estudios, es la representatividad de la muestra. Para poder extrapolar con total confianza los resultados a toda la población de nuevos diagnósticos, se debería poder asegurar que los pacientes incluidos en los estudios son representativos de todos los nuevos diagnósticos de VIH de Cataluña. Para ello se debería diseñar un muestreo asegurando que sea representativo de toda la población de nuevos diagnósticos. La recogida de muestras fue realizada por los laboratorios que decidieron, de manera voluntaria, participar en nuestros estudios. Aunque no es posible asegurar que la muestra sea representativa de toda la población de nuevos diagnósticos de VIH, sí se puede decir que en el estudio AERI 2003-2005 participaron diferentes tipos de centros (atención primaria, hospitales, centros de cribado alternativos y una clínica de ITS), y en el AERI 2006-2008 el número de pacientes incluidos representa aproximadamente un 50% del total de nuevos diagnósticos reportados en Cataluña para el periodo estudio. Además, aunque la mayoría de pacientes incluidos provienen de los centros situados en Barcelona y su ámbito metropolitano, también participan algunos centros situados en distintos puntos de Cataluña.

4. Conclusión final

Después de más de 30 años desde los primeros casos de SIDA, la investigación clínica y biológica ha logrado el desarrollo de fármacos que han reducido la mortalidad y mejorado la calidad de vida de las personas infectadas por VIH. Aún así, hay que tener presente que las personas infectadas por VIH necesitan seguir los tratamientos a lo largo de toda su vida, por lo que puede ser considerada como una enfermedad crónica. Además de los posibles efectos adversos de los tratamientos, es importante tener en consideración el elevado coste de los mismos, por lo que la prevención de la transmisión del VIH debe ser considerada como parte fundamental en la deseable erradicación de la epidemia. En este sentido, el diseño de las actividades preventivas debe ser apropiado para incidir en aquellas poblaciones en las que el virus se está transmitiendo actualmente. La identificación de infecciones recientes mediante TRIs permite obtener una descripción precisa de los patrones de transmisión actual del virus. Esta información, una vez incorporada a las estrategias de prevención, puede evitar que se produzcan nuevas infecciones.

La monitorización de las infecciones recientes por VIH en Cataluña, mediante la aplicación de los algoritmos para identificar infecciones recientes, ha permitido entender los patrones de transmisión del VIH actuales. Esta información debe contribuir a dirigir los esfuerzos en prevención de un modo más efectivo, con el objetivo final de disminuir la transmisión del VIH. Por tanto, es necesario mantener y consolidar la monitorización de las infecciones recientes en los sistemas de vigilancia del VIH, siguiendo las recomendaciones técnicas proporcionadas por el ECDC (137) y la OMS (89), para poder ofrecer resultados válidos y comparables a nivel europeo y mundial.

CONCLUSIONES

- Los resultados de la aplicación de algoritmos de identificación de infecciones recientes basados en técnicas de laboratorio en los nuevos diagnósticos de VIH han mostrado la viabilidad y utilidad de la introducción de esta técnica en nuestro medio, y constituyen la primera experiencia realizada en España desde su introducción en el año 2003.
- El estudio piloto realizado en centros españoles durante el período 2003-2005 estableció que la prevalencia de infección reciente era del 19,2%, una estimación muy similar a la reportada en otros estudios realizados en Francia o Estados Unidos.
- Este estudio también permitió describir el perfil epidemiológico de las personas recién infectadas, siendo éstas mayoritariamente hombres (79,8%), de origen español (73,5%), del grupo de hombres que tienen sexo con hombres (62,5%) y con una edad mediana de 33 años.
- Las diferencias observadas en la prevalencia de infección reciente según el tipo de centro, sugirieron que los individuos infectados recientemente acuden a atención primaria (21,5%), clínicas de infecciones de Transmisión Sexual (23,4%) y centros de cribado alternativos (21,3%) con mayor frecuencia que a los hospitales (16,5%), motivados por una percepción de riesgo o, tal vez, por presentar síntomas relacionados con la primoinfección.
- El diseño y consolidación de circuitos de recogida de información y de muestras de los nuevos diagnósticos de VIH que se estableció entre los centros participantes y los laboratorios ha permitido incorporar los algoritmos de identificación de infecciones recientes en el Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica del VIH en Cataluña a partir del año 2006.
- Su aplicación rutinaria en un sistema nacional de vigilancia epidemiológica del VIH permite, entre otros aspectos, identificar cuales son los factores de riesgo asociados a la infección reciente entre los nuevos diagnósticos de VIH.
- En el período 2006-2008, entre los hombres que tienen sexo con hombres, el 31,1% se identificaron como infecciones recientes, siendo este porcentaje mayor que en grupo de las transmisiones heterosexuales (15,4%) y en el de las producidas a través del uso de drogas por vía parenteral (13,2%).
- La adquisición de la infección entre los hombres que tienen sexo con hombres se identificó como un factor asociado a la infección reciente, presentando un riesgo dos veces mayor respecto al grupo de transmisión heterosexual.

CONCLUSIONES

- La asociación observada entre infección reciente y transmisión entre los hombres que tienen sexo con hombres sugiere que la incidencia de VIH es mayor en este grupo, aunque también puede explicarse por una mayor frecuencia de realización del test de cribado para la detección de la infección por VIH.
- La prevalencia de infección reciente en el periodo 2006-2008 fue del 23,0%, siendo el aumento observado respecto al periodo anterior consistente con la disminución del porcentaje de diagnóstico tardío entre los nuevos diagnósticos de VIH en Cataluña para el mismo periodo.
- La infección reciente fue más frecuente en hombres que en mujeres (24,6% vs. 16,8%), y mucho mayor en los individuos menores de 30 años (28,4%) que en los individuos de más de 50 años (7,8%).
- La prevalencia de infección reciente fue mayor en los pacientes procedentes de América del Sur (27,6%) que en los pacientes de origen autóctono (22,9%). En cambio, en los pacientes procedentes de África Sub-sahariana la prevalencia de infección reciente fue mucho menor (11,9%).
- Las diferencias en las prevalencias de infección reciente observadas, según el origen, radican en el grupo de transmisión, ya que el porcentaje de HSH fue mayor en los pacientes de América del Sur (67,6%) que en los pacientes de África Subsahariana (0,0%).
- La aplicación de los tests serológicos para identificar infecciones recientes por VIH combinada con la información epidemiológica adecuada permite esclarecer si la infección por VIH en los pacientes de origen inmigrante fue importada o bien fue contraída localmente.
- Los resultados sugieren que la mayoría de inmigrantes identificados como recién infectados adquirieron la infección en nuestro país, ya que llevaban en él más de 12 meses cuando recibieron el diagnóstico de VIH, poniendo de manifiesto la vulnerabilidad de la población inmigrante frente la infección por VIH en nuestro medio.
- El uso de algoritmos serológicos para la identificación de infecciones recientes en un sistema nacional de vigilancia epidemiológica del VIH permite estimar la incidencia de VIH de manera menos costosa logística y económicamente, respecto los estudios de cohortes en pacientes seronegativos.

- La aproximación a la incidencia de VIH mediante tests serológicos para identificar infecciones recientes presentó una ligera tendencia al aumento durante el período 2006-2008.
- Este aumento, aunque es consistente con los resultados de otros estudios realizados en nuestro contexto, debería confirmarse con estimaciones que tengan en cuenta el patrón de realización de la prueba del VIH de las infecciones recientes.
- La utilización de tests serológicos para la identificación de infecciones recientes ha permitido obtener estimaciones de la prevalencia de resistencias transmitidas en Cataluña en la población de pacientes con infección reciente, una información más precisa que en el conjunto de nuevos diagnósticos de VIH.
- En Cataluña, para el periodo 2003-2005, la prevalencia de resistencias transmitidas entre los pacientes con infección reciente fue 7,7%, un valor similar al de otros estudios realizados en España y en Europa.
- La prevalencia de resistencias transmitidas mostró una tendencia al descenso, de 10,0% en el año 2003 a 6,7% en el año 2005, siendo este hallazgo consistente con los resultados de otros estudios europeos que muestran una tendencia temporal decreciente.
- Además, la prevalencia de subtipos de VIH-1 no B entre los pacientes con infección reciente fue del 19,2%, un valor superior al reportado en un estudio de la cohorte española (12,2%), pero similar al de otros estudios realizados en Galicia (22,3%) y Gran Canaria (22,4%).
- El elevado porcentaje de subtipos no B entre los pacientes recién infectados de origen autóctono (17,2%) sugiere que los subtipos no B se encuentran actualmente circulando entre nuestra población de recién infectados por VIH.
- Además, el aumento de este porcentaje a lo largo del periodo de estudio podría estar relacionado con el aumento de la población inmigrante en nuestro medio durante este período.
- Los resultados de la evaluación de los tests Vironostika y BED-CEIA, utilizados en nuestro medio a lo largo de los años 2003 - 2008, indican que el grado de acuerdo entre ambos tests es bueno y, por tanto, los resultados obtenidos por ambas técnicas a lo largo de los dos períodos de estudio son comparables.

CONCLUSIONES

- Los dos tests identifican con la misma sensibilidad las infecciones recientes, aunque el Vironostika presenta una menor especificidad que el BED-CEIA, ya que clasifica con mayor frecuencia pacientes con SIDA como infectados recientemente.
- Esta menor especificidad no debe haber afectado los resultados obtenidos al aplicar nuestro algoritmo de identificación de infecciones recientes, ya que las muestras de pacientes con SIDA no son analizadas mediante el test.
- El uso combinado de un test serológico para identificar infecciones recientes junto con la información clínica (diagnóstico de SIDA y recuento de células CD4+) dio lugar a un algoritmo de clasificación que presentó una tasa de error del 3,8% (coeficiente de variación 15,7%), un valor aceptable según las guías publicadas por el ECDC y la OMS.
- La monitorización de las infecciones recientes por VIH en Cataluña permite entender los patrones de transmisión del VIH actuales contribuyendo a dirigir los esfuerzos en prevención de un modo más efectivo con el objetivo final de disminuir la transmisión del VIH.

RECOMENDACIONES

- Los sistemas de vigilancia de nuevos diagnósticos de VIH deberían incorporar la identificación de infecciones recientes mediante tests serológicos como una técnica de rutina, por ser una herramienta que, distinguiendo las infecciones recientes de las antiguas, permite conocer cuales son los patrones de transmisión del VIH actuales.
- La identificación de infecciones recientes mediante tests serológicos debe hacerse siguiendo las recomendaciones técnicas proporcionadas por el ECDC y la OMS, para poder ofrecer resultados válidos y comparables a nivel europeo y mundial.
- En Cataluña, el Departament de Salut debe mantener la participación de los centros que actualmente están colaborando en el sistema de identificación de infecciones recientes mediante tests serológicos, así como promover la participación de nuevos centros, lo que permitirá aumentar la representatividad de este sistema.
- Para mejorar la interpretación de los resultados obtenidos de la aplicación de los tests serológicos para la identificación de infecciones recientes basada en nuevos diagnósticos de VIH, así como obtener estimaciones de incidencia de VIH poblacional, se debería incorporar al sistema la recogida rutinaria de información sobre el patrón de testaje individual de los pacientes diagnosticados.
- Debido a la mayor prevalencia de infección reciente en atención primaria, clínicas de ITS y los centros de cribado alternativos, es necesario promover la realización del test de cribado del VIH en atención primaria y clínicas de ITS, así como reforzar y mantener la actividad de los centros de cribado alternativos, para aumentar el diagnóstico precoz del VIH.
- La mayor prevalencia de infección reciente entre las personas que se han infectado a través de relaciones entre HSH sugiere que la incidencia podría estar aumentando en ese grupo, tal y como también se observa en los datos de una cohorte de HSH seronegativos a riesgo de contraer la infección reclutados en base comunitaria en Barcelona, por lo que se evidencia la necesidad reforzar los programas de prevención dirigidos a este colectivo.
- La mayoría de inmigrantes identificados como recién infectados por VIH han adquirido la infección localmente. Esta información debería incorporarse a las campañas de prevención para evitar que se produzcan nuevas infecciones en esta nueva población vulnerable.

RECOMENDACIONES

- Para conocer la evolución de la prevalencia de resistencias transmitidas y de subtipos no B en nuestro medio es necesario que los sistemas de vigilancia incorporen la monitorización de las resistencias transmitidas en los pacientes infectados recientemente por VIH, tal y como recomienda la OMS.
- Para aumentar la especificidad del actual algoritmo de identificación de infecciones recientes basado en el test BED, es recomendable incorporar un segundo test serológico, preferiblemente el test de avidéz, tal y como recomiendan las guías más recientes de la OMS y el ECDC.
- A pesar de que los tests serológicos para identificar infecciones recientes fueron diseñados para usarse a nivel poblacional, si se aumenta la especificidad del algoritmo se podría plantear la posibilidad de proporcionar el resultado a los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gatell JM, Clotet B, Podzamczar D, Miro JM, Mallolas J. Guía práctica del sida. clínica, diagnóstico y tratamiento. 9th ed. Elsevier Doyma, editor. Barcelona: Masson; 2007.
2. Taylor BS, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med.* 2008 Oct 30;359(18):1965-6.
3. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science.* 2000 Jan 28;287(5453):607-14.
4. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS.* 2006 Oct 24;20(16):W13-23.
5. Casabona J. Epidemiologic aspects of the transmission of HIV. *Rev Clin Esp.* 1988 Oct;183(6):313-7.
6. Osmond DH. Epidemiology and transmission. In: Cohen PT, Sande MA, Volberding P, editor. *The AIDS knowledge base.* Third ed. San Francisco: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
7. Lifson AR, Castro KG, McCray E, Jaffe HW. National surveillance of AIDS in health care workers. *JAMA.* 1986 Dec 19;256(23):3231-4.
8. McCray E. Occupational risk of the acquired immunodeficiency syndrome among health care workers. *N Engl J Med.* 1986 Apr 24;314(17):1127-32.
9. Centers for Disease Control (CDC). Apparent transmission of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus from a child to a mother providing health care. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1986 Feb 7;35(5):76-9.
10. Wahn V, Kramer HH, Voit T, Bruster HT, Scrampical B, Scheid A. Horizontal transmission of HIV infection between two siblings. *Lancet.* 1986 Sep 20;2(8508):694.
11. Winkelstein W, Jr, Lyman DM, Padian N, Grant R, Samuel M, Wiley JA, et al. Sexual practices and risk of infection by the human immunodeficiency virus. the san francisco men's health study. *JAMA.* 1987 Jan 16;257(3):321-5.
12. Moss AR, Osmond D, Bacchetti P, Chermann JC, et al. Risk factors for AIDS and HIV seropositivity in homosexual men. - *Am J Epidemiol.* 1987 Jun;125(6):1035-47.
13. Ward H, Ronn M. Contribution of sexually transmitted infections to the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010 Jul;5(4):305-10.
14. Latif AS, Katzenstein DA, Bassett MT, Houston S, Emmanuel JC, Marowa E. Genital ulcers and transmission of HIV among couples in zimbabwe. *AIDS.* 1989 Aug;3(8):519-23.
15. Bertolli J, St Louis ME, Simonds RJ, Nieburg P, et al. Estimating the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a breast-feeding population in kinshasa, zaire. - *J Infect Dis.* 1996 Oct;174(4):722-6.
16. Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med.* 1996 Aug 15;125(4):257-64.

17. Piatak M, Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1749-54.
18. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994 Jul;68(7):4650-5.
19. Lee JC, Boechat MI, Belzer M, Church JA, De Ville J, Nielsen K, et al. Thymic volume, T-cell populations, and parameters of thymopoiesis in adolescent and adult survivors of HIV infection acquired in infancy. *AIDS*. 2006 Mar 21;20(5):667-74.
20. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992 Dec 18;41(RR-17):1-19.
21. Soriano V, Gutierrez M, Bravo R. Serological diagnosis of HIV-1 infection]. *Rev Clin Esp*. 1994 Jul;194(7):558-67.
22. Damond F, Gueudin M, Pueyo S, Farfara I, Robertson DL, Descamps D, et al. Plasma RNA viral load in human immunodeficiency virus type 2 subtype A and subtype B infections. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct;40(10):3654-9.
23. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: Implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*. 2003 Sep 5;17(13):1871-9.
24. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. MEDICAL PROGRESS acute HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2011 MAY 19;364(20):1943-54.
25. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, et al. The efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987 Jul 23;317(4):185-91.
26. S.J. Flint, L.W. Enquist, V.R. Racaniello, A.M. Skalka. *Principles of virology*. 3rd ed. US: American Society for Microbiology; 2009.
27. Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JS, Piliro PJ, Trottier B, et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in north and south america. *N Engl J Med*. 2003 May 29;348(22):2175-85.
28. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Nov;49(11):4721-32.
29. Detels R, Munoz A, McFarlane G, Kingsley LA, et al. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. multicenter AIDS cohort study investigators. - *JAMA*. 1998 Nov 4;280(17):1497-503.
30. Jacobson LP, Li R, Phair J, Margolick JB, et al. Evaluation of the effectiveness of highly active antiretroviral therapy in persons with human immunodeficiency virus using biomarker-based equivalence of disease progression. - *Am J Epidemiol*. 2002 Apr 15;155(8):760-70.

31. Clotet B, Menéndez-Arias L, Schapiro JM, Kuritzkes DR, Burger D, Telenti A, et al. Guide to management of HIV drug resistance, antiretrovirals pharmacokinetics and viral hepatitis in HIV infected subjects. 8th ed. Fundació Lluita contra la SIDA, editor. Spain: ; 2008.
32. Alencar CS, Nishiya AS, Ferreira S, Giret MT, Diaz RS, Sabino EC. Evaluation of primary resistance to HIV entry inhibitors among brazilian patients failing reverse transcriptase/protease inhibitors treatment reveal high prevalence of maraviroc resistance-related mutations. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Dec;26(12):1267-71.
33. Leung PH, Chen JH, Wong KH, Chan KC, Lam HY, Cheng VC, et al. High prevalence of primary enfuvirtide (ENF) resistance-associated mutations in HIV-1-infected patients in hong kong. *J Clin Virol*. 2010 Mar;47(3):273-5.
34. Mantovani NP, Azevedo RG, Rabelato JT, Sanabani S, Diaz RS, Komninakis SC. Analyses of transmitted resistance and selective pressure in HIV-1 naive patients to raltegravir and failure HAART in sao paulo, brazil. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar 7.
35. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia--los angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1981 Jun 5;30(21):250-2.
36. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1425-31.
37. Geneve: ONUSIDA O. AIDS epidemia update: December 2009.
38. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). GLOBAL REPORT UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC | 2013. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2013.
39. Quinn TC. HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. *AIDS*. 2008 Sep;22 Suppl 3:S7-12.
40. Sullivan PS, Hamouda O, Delpech V, Geduld JE, Prejean J, Semaille C, et al. Reemergence of the HIV epidemic among men who have sex with men in north america, western europe, and australia, 1996-2005. *Ann Epidemiol*. 2009 Jun;19(6):423-31.
41. van de Laar MJ, Likatavicius G, Stengaard AR, Donoghoe MC. HIV/AIDS surveillance in europe: Update 2007. *Euro Surveill*. 2008 Dec 11;13(50):19066.
42. Houweling H, Wiessing LG, Hamers FF, Termorshuizen F, et al. An age-period-cohort analysis of 50,875 AIDS cases among injecting drug users in europe. *Int J Epidemiol*. 1999 Dec;28(6):1141-8.
43. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia epidemiológica del VIH en España. Nuevos Diagnósticos de VIH en España. Periodo 2003 -2009. Instituto de Salud Carlos iii: Actualización 30 de junio de 2010 Noviembre, 2010.
44. Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i la SIDA de Catalunya. Sistema integrat de vigilància epidemiològica del SIDA/VIH/ITS a catalunya (SIVES). Informe. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut, Direcció General de Salut Pública; 2013. Report No.: 21.
45. Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: A collaborative analysis of prospective studies. - *Lancet*. 2002 Jul 13;360(9327):119-29.

46. Phillips A, Pezzotti P. Short-term risk of AIDS according to current CD4 cell count and viral load in antiretroviral drug-naive individuals and those treated in the monotherapy era. - *AIDS*.2004 Jan 2;18(1):51-8.
47. Jaen A, Esteve A, Miro JM, Tural C, Montoliu A, Ferrer E, et al. Determinants of HIV progression and assessment of the optimal time to initiate highly active antiretroviral therapy: PISCIS cohort (Spain). *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 Feb 1;47(2):212-20.
48. Marks G, Crepaz N, Senterfitt JW, Janssen RS, et al. Meta-analysis of high-risk sexual behavior in persons aware and unaware they are infected with HIV in the united states: Implications for HIV prevention programs. - *J Acquir Immune Defic Syndr*.2005 Aug 1;39(4):446-53.
49. Antinori A, Coenen T, Costagiola D, Dedes N, et al. Late presentation of HIV infection: A consensus definition. - *HIV Med*.2011 Jan;12(1):61-4.
50. Registros Autonómicos de Casos de SIDA. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica del SIDA en España. Registro Nacional de casos de SIDA. Actualización a 30 de junio de 2010.
51. Caro-Murillo AM, Gutierrez F, Manuel Ramos J, Sobrino P, Miro JM, Lopez-Cortes LF, et al. HIV infection in immigrants in Spain: Epidemiological characteristics and clinical presentation in the CoRIS cohort (2004-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Aug-Sep;27(7):380-8.
52. Booth CL, Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jun;59(6):1047-56.
53. Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, et al. Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. - *Clin Infect Dis*.2005 Nov 1;41(9):1316-23.
54. Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JSG, et al. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the international AIDS society-USA panel. - *JAMA*.2006 Aug 16;296(7):827-43.
55. Rockstroh JK, Bhagani S, Benhamou Y, Bruno R, et al. European AIDS clinical society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of chronic hepatitis B and C coinfection in HIV-infected adults. - *HIV Med*.2008 Feb;9(2):82-8.
56. [National consensus document by GESIDA/National aids plan on antiretroviral treatment in adults infected by the human immunodeficiency virus (January 2011 update)]. - *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2011 Mar;29(3):209.e1-103.
57. de Mendoza C, Rodriguez C, Eiros JM, Colomina J, Garcia F, Leiva P, et al. Antiretroviral recommendations may influence the rate of transmission of drug-resistant HIV type 1. *Clin Infect Dis*. 2005 Jul 15;41(2):227-32.
58. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med*. 2008 Dec;16(5):138-45.
59. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009;4(3):e4724.
60. SPREAD programme. Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS*. 2008 Mar 12;22(5):625-35.

61. Garcia F, Perez-Cachafeiro S, Guillot V, Alvarez M, et al. Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the spanish cohort of antiretroviral treatment naive HIV-infected individuals (CoRIS). - *Antiviral Res.* 2011 Aug;91(2):150-3.
62. Yebra G, Holguin A. Epidemiology of drug-resistant HIV-1 transmission in naive patients in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2010 Oct 16;135(12):561-7.
63. Hamers RL, Wallis CL, Kityo C, Siwale M, et al. HIV-1 drug resistance in antiretroviral-naive individuals in sub-Saharan Africa after rollout of antiretroviral therapy: A multicentre observational study. - *Lancet Infect Dis.* 2011 Oct;11(10):750-9.
64. de Mendoza C, Rodriguez C, Colomina J, Gutierrez F, Aguilera A, Garcia F, et al. HIV-1 non-B subtypes are increasing in native recent seroconverters in Spain while transmission of drug resistance mutations is dropping. 7th European HIVDrugResistanceWorkshop. 2009 Mar 25 - 27, Stockholm, Sweden.
65. Holguin A, de Mulder M, Yebra G, Lopez M, Soriano V. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res.* 2008 Jun;6(4):327-34.
66. Lospitao E, Alvarez A, Soriano V, Holguin A. HIV-1 subtypes in Spain: A retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV Med.* 2005 Sep;6(5):313-20.
67. Brookmeyer R, Quinn TC. Estimation of current human-immunodeficiency-virus incidence rates from a cross-sectional survey using early diagnostic-tests. *Am J Epidemiol.* 1995 JAN 15;141(2):166-72.
68. Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion.* 2005 FEB;45(2):254-64.
69. Pilcher CD, Fiscus SA, Nguyen TQ, Foust E, Wolf L, Williams D, et al. Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. *N Engl J Med.* 2005 MAY 5;352(18):1873-83.
70. Le Vu S, Pillonel J, Semaille C, Bernillon P, Le Strat Y, Meyer L, et al. Principles and uses of HIV incidence estimation from recent infection testing--a review. *Euro Surveill.* 2008 Sep 4;13(36):18969.
71. Murphy G, Parry JV. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Euro Surveill.* 2008 Sep 4;13(36):18966.
72. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA.* 1998 Jul 1;280(1):42-8.
73. Kothe D, Byers RH, Caudill SP, Satten GA, Janssen RS, Hannon WH, et al. Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroprevalence. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Aug 15;33(5):625-34.
74. Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau CP, Byers R, Green T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: A simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002 Mar 1;18(4):295-307.
75. Calypte Biomedical Corporation. Product insert for: Calypte(R) HIV-1 BED incidence EIA. enzyme immunoassay for population estimates of HIV-1 incidence. In press 2004.

76. Parekh BS, McDougal JS. New approaches for detecting recent HIV-1 infection. *AIDS Rev.* 2001 2001;3:183-93.
77. Guy R, Gold J, Calleja JM, Kim AA, Parekh B, Busch M, et al. Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: A systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2009 Dec;9(12):747-59.
78. Suligoi B, Massi M, Galli C, Sciandra M, Di Sora F, Pezzotti P, et al. Identifying recent HIV infections using the avidity index and an automated enzyme immunoassay. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Apr 1;32(4):424-8.
79. Martro E, Suligoi B, Gonzalez V, Bossi V, Esteve A, Mei J, et al. Comparison of the avidity index method and the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion, two methods using a single serum sample for identification of recent HIV infections. *J Clin Microbiol.* 2005 Dec;43(12):6197-9.
80. Barin F, Meyer L, Lancar R, Deveau C, Gharib M, Laporte A, et al. Development and validation of an immunoassay for identification of recent human immunodeficiency virus type 1 infections and its use on dried serum spots. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4441-7.
81. Mastro TD, Kim AA, Hallett T, Rehle T, Welte A, Laeyendecker O, et al. Estimating HIV incidence in populations using tests for recent infection: Issues, challenges and the way forward. - *J HIV AIDS Surveill Epidemiol.* 2010 Jan 1;2(1):1-14.
82. Young CL, Hu DJ, Byers R, Vanichseni S, Young NL, Nelson R, et al. Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMerieux vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B' or E infection in thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003 Jun;19(6):481-6.
83. Parekh BS, Hanson DL, Hargrove J, Branson B, et al. Determination of mean recency period for estimation of HIV type 1 incidence with the BED-capture EIA in persons infected with diverse subtypes. - *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011 Mar;27(3):265-73.
84. Lange JM, Paul DA, Huisman HG, de Wolf F, et al. Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986 Dec 6;293(6560):1459-62.
85. Gupta SB, Murphy G, Koenig E, Adon C, Beyrer C, Celentano D, et al. Comparison of methods to detect recent HIV type 1 infection in cross-sectionally collected specimens from a cohort of female sex workers in the dominican republic. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Dec;23(12):1475-80.
86. Incidence Assay Critical Path, Working Group. More and better information to tackle HIV epidemics: Towards improved HIV incidence assays. *PLoS Med.* 2011 06/14;8(6):e1001045.
87. Laeyendecker O, Oliver M, Owen S, Kirk G, Mehta S, Koblin B, et al. Improved precision of cross-sectional HIV incidence testing using a multi-assay algorithm that includes BED and an avidity assay with modified assay cut-offs. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco. 2010;Poster #935.
88. Laeyendecker O, Brookmeyer R, Mullis C, Donnell D, Lingappa J, Celum C, et al. Specificity of four laboratory approaches for cross-sectional HIV incidence determination: Analysis of samples from adults with known non-recent HIV infection from five african countries. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012 Oct;28(10):1177-83.
89. UNAIDS/WHO Working group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. Geneva: WHO Press; 2011.

90. Braunstein SL, Nash D, Kim AA, Ford K, et al. Dual testing algorithm of BED-CEIA and AxSYM avidity index assays performs best in identifying recent HIV infection in a sample of rwandan sex workers. *PLoS One*.2011 Apr 12;6(4):e18402.
91. Batzing-Feigenbaum J, Loschen S, Gohlke-Micknis S, Hintsche B, Rausch M, Hillenbrand H, et al. Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: Results from a pilot study in berlin, germany, in 2005-2007. *HIV Med*. 2009 Apr;10(4):209-18.
92. Semaille C, Cazein F, Pillonel J, Lot F, Le Vu S, Pinget R, et al. Four years of surveillance of recent HIV infections at country level, france, mid 2003 - 2006: Experience and perspectives. *Euro Surveill*. 2008 Sep 4;13(36):18968.
93. Karon JM, Song R, Brookmeyer R, Kaplan EH, Hall HI. Estimating HIV incidence in the united states from HIV/AIDS surveillance data and biomarker HIV test results. *Stat Med*. 2008 Oct 15;27(23):4617-33.
94. Hall HI, Song R, Rhodes P, Prejean J, An Q, Lee LM, et al. Estimation of HIV incidence in the united states. *JAMA*. 2008 Aug 6;300(5):520-9.
95. Le Vu S, Le Strat Y, Barin F, Pillonel J, Cazein F, Bousquet V, et al. Population-based HIV-1 incidence in france, 2003-08: A modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010 Oct;10(10):682-7.
96. Oyugi JO, Oyugi FJ, Otieno CA, Jaoko W, Bwayo JJ, Anzala O. Serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion in estimating incidence of HIV-1 among adults visiting a VCT centre at a kenyan tertiary health institution. *East Afr Med J*. 2009 May;86(5):212-8.
97. Thiede H, Jenkins RA, Carey JW, Hutcheson R, Thomas KK, Stall RD, et al. Determinants of recent HIV infection among seattle-area men who have sex with men. *Am J Public Health*. 2008 May 29.
98. White E, Goldbaum G, Goodreau S, Lumley T, et al. Interpopulation variation in HIV testing promptness may introduce bias in HIV incidence estimates using the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion. - *Sex Transm Infect*.2010 Aug;86(4):254-7.
99. Schwarcz S, Weinstock H, Louie B, Kellogg T, Douglas J, Lalota M, et al. Characteristics of persons with recently acquired HIV infection: Application of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion in 10 US cities. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007 Jan 1;44(1):112-5.
100. Fisher M, Pao D, Murphy G, Dean G, McElborough D, Homer G, et al. Serological testing algorithm shows rising HIV incidence in a UK cohort of men who have sex with men: 10 years application. *AIDS*. 2007 Nov 12;21(17):2309-14.
101. Semaille C, Cazein F, Lot F, Pillonel J, Le Vu S, Le Strat Y, et al. Recently acquired HIV infection in men who have sex with men (MSM) in france, 2003-2008. *Euro Surveill*. 2009 Dec 3;14(48):19425.
102. Bassichetto KC, Bergamaschi DP, Oliveira SM, Deienno MC, Bortolato R, de Rezende HV, et al. Elevated risk for HIV-1 infection in adolescents and young adults in sao paulo, brazil. *PLoS ONE*. 2008 Jan 9;3(1):e1423.
103. Mermin J, Musinguzi J, Opio A, Kirungi W, Ekwaru JP, Hladik W, et al. Risk factors for recent HIV infection in uganda. *JAMA*. 2008 Aug 6;300(5):540-9.
104. Hu DJ, Vanichseni S, Mock PA, Young NL, Dobbs T, Byers RH,Jr, et al. HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in bangkok: Use of the IgG capture BED enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003 Sep;19(9):727-30.

105. Taylor MM, Hawkins K, Gonzalez A, Buchacz K, Aynalem G, Smith LV, et al. Use of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion (STARHS) to identify recently acquired HIV infections in men with early syphilis in Los Angeles county. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Apr 15;38(5):505-8.
106. Cortes Martins H, Paixao M. Settings for identifying recent HIV infections: The portuguese experience. *Euro Surveill.* 2008 Sep 4;13(36):18974.
107. Niccolai LM, Verevockin SV, Toussova OV, White E, et al. Estimates of HIV incidence among drug users in St. Petersburg, Russia: Continued growth of a rapidly expanding epidemic. *Eur J Public Health.* 2011 Oct;21(5):613-9.
108. Garrett N, Lattimore S, Gilbert V, Aghaizu A, Mensah G, Tosswill J, et al. The recent infection testing algorithm (RITA) in clinical practice: A survey of HIV clinicians in England and Northern Ireland. *HIV Med.* 2012 Aug;13(7):444-7.
109. Jayaraman GC, Archibald CP, Kim J, Rekart ML, Singh AE, Harmen S, et al. A population-based approach to determine the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among recent versus established HIV infections: Results from the canadian HIV strain and drug resistance surveillance program. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 May;42(1):86-90.
110. Murillo W, Paz-Bailey G, Morales S, Monterroso E, et al. Transmitted drug resistance and type of infection in newly diagnosed HIV-1 individuals in honduras. *J Clin Virol.* 2010 Dec;49(4):239-44.
111. Hurt CB, McCoy SI, Kuruc J, Nelson JA, et al. Transmitted antiretroviral drug resistance among acute and recent HIV infections in North Carolina from 1998 to 2007. - *Antivir Ther.* 2009;14(5):673-8.
112. Wang MJ, Duan S, Xiang LF, Yang Y, et al. [Study on the drug resistance situation among recently infected HIV-1 patients in dehong]. - *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2008 Sep;29(9):905-8.
113. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: A collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet.* 2008 Jul 26;372(9635):293-9.
114. Des Jarlais DC, Perlis T, Arasteh K, Torian LV, Beatrice S, Milliken J, et al. HIV incidence among injection drug users in New York city, 1990 to 2002: Use of serologic test algorithm to assess expansion of HIV prevention services. *Am J Public Health.* 2005 Aug;95(8):1439-44.
115. Kim AA, Hallett T, Stover J, Gouws E, et al. Estimating HIV incidence among adults in Kenya and Uganda: A systematic comparison of multiple methods. - *PLoS One.* 2011 Mar 7;6(3):e17535.
116. Kellogg TA, Loeb L, Dilley J, Adler B, Louie BT, McFarland W. Comparison of three methods to measure HIV incidence among persons seeking voluntary, anonymous counseling and testing. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 May 1;39(1):112-20.
117. Hargrove JW, Humphrey JH, Mutasa K, Parekh BS, McDougal JS, Ntozini R, et al. Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay. *AIDS.* 2008 Feb 19;22(4):511-8.
118. McDougal JS. BED estimates of HIV incidence must be adjusted. *AIDS.* 2009 Sep 24;23(15):2064,5; author reply 2066-8.
119. McWalter TA, Welte A. Relating recent infection prevalence to incidence with a sub-population of assay non-progressors. - *J Math Biol.* 2010 May;60(5):687-710.

120. Dukers NH, Spaargaren J, Geskus RB, Beijnen J, et al. HIV incidence on the increase among homosexual men attending an amsterdam sexually transmitted disease clinic: Using a novel approach for detecting recent infections. - *AIDS*.2002 Jul 5;16(10):F19-24.
121. Murphy G, Charlett A, Jordan LF, Osner N, Gill ON, Parry JV. HIV incidence appears constant in men who have sex with men despite widespread use of effective antiretroviral therapy. *AIDS*. 2004 Jan 23;18(2):265-72.
122. McFarland W, Busch MP, Kellogg TA, Rawal BD, et al. Detection of early HIV infection and estimation of incidence using a sensitive/less-sensitive enzyme immunoassay testing strategy at anonymous counseling and testing sites in san francisco. *J Acquir Immune Defic Syndr*.1999 Dec 15;22(5):484-9.
123. Nesheim S, Parekh B, Sullivan K, Bulterys M, Dobbs T, Lindsay M, et al. Temporal trends in HIV type 1 incidence among inner-city childbearing women in Atlanta: Use of the IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005 Jun;21(6):537-44.
124. Braunstein SL, van de Wijgert, Janneke H.H.M., Nash D. HIV incidence in Sub-saharan Africa: A review of available data with implications for surveillance and prevention planning. - *AIDS Rev*.2009 Jul-Sep;11(3):140-56.
125. L'Agència de Salut Pública promourà el diagnòstic precoç del VIH en l'àmbit assistencial [Nota de premsa]. Barcelona: Generalitat de Catalunya. 29-11-2013. Disponible a:http://premsa.gencat.cat/pres_fsvp/AppJava/notapremsavw/detall.do?id=233369
126. Hurtado I, Alastrue I, García de Olalla P, et al. Preventive intervention in venues for interaction used by men who have sex with men. *Gac Sanit* 2010; 24: 78-80.
127. Fernandez-Lopez L, Rifa B, Pujol F, et al. Impact of the introduction of rapid HIV testing in the voluntary counselling and testing sites network of Catalonia, Spain. *Int J STD AIDS* 2010;21:388-91.
128. Folch C, Casabona J, Munoz R, et al. Increase in the prevalence of HIV and in associated risk behaviors in men who have sex with men: 12 years of behavioral surveillance surveys in Catalonia (Spain). *Gac Sanit* 2010;24:40-6.
129. Folch C, Munoz R, Zaragoza K, Casabona J. Sexual risk behaviour and its determinants among men who have sex with men in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* 2009;14:19415.
130. Sullivan PS, Hamouda O, Delpech V, et al. Reemergence of the HIV epidemic among men who have sex with men in North America, western Europe, and Australia, 1996-2005. *Ann Epidemiol* 2009;19:423-31.
131. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in europe: Implications for clinical management. *J Infect Dis*. 2005;192:958-66
132. Fox J, Hill S, Kaye S, Dustan S, McClure M, Fidler S, et al. Prevalence of primary genotypic resistance in a UK centre: Comparison of primary HIV-1 and newly diagnosed treatment-naive individuals. *AIDS*. 2007;21:237-9.
133. Palacios R, Viciano I, Perez de Pedro I, de la Torre J, Ropero F, Fernandez S, et al. Prevalence of primary resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection in the province of Malaga (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2008;26:141-5.
134. de Mendoza C, Rodriguez C, Colomina J, Tuset C, Garcia F, Eiros JM, et al. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1350-4.

135. Sánchez Onoro M, López MJ, Santana MA, Andes JM, Campelo FA. Primary antiretroviral drug resistance among patients diagnosed with HIV infection in Gran Canaria (Spain) between 2002 and 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:437–40.
136. Perez-Alvarez L, Carmona R, Munoz M, Delgado E, Thomson MM, Contreras G, et al. High incidence of non-B and recombinant HIV-1 strains in newly diagnosed patients in Galicia, Spain: Study of genotypic resistance. *Antivir Ther.* 2003;8:355–60.
137. European Centre for Disease Prevention and Control. Monitoring recently acquired HIV infections in the European context. Stockholm: ECDC; 2013