



INFORME BREVE

Sensibilidad del equipo Cobas AmpliScreen™ HIV-1 Test, v1.5, para la detección de HIV-1

Lucía P. Gomez^{a, b*}, Marcos C. Balangero^{a, b}, Gonzalo Castro^{a, c}, Silvia Kademian^c, Arnaldo Mangeaud^d, María G. Barbas^c, Analía Cudolá^c, Juan F. de León^{b, c}, Horacio Carrizo^b, Sandra V. Gallego^{a, b, c}

^a Laboratorio Virus Linfotrópicos Humanos. Retrovirus: HIV y HTLV, Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Córdoba, Argentina

^b Fundación Banco Central de Sangre, Laboratorio de Biología Molecular, Córdoba, Argentina

^c Laboratorio Central de la provincia de Córdoba, Biología Molecular, Ministerio de Salud, Córdoba, Argentina.

^d Cátedra de Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC, Córdoba, Argentina

Recibido el 27 de agosto de 2013; aceptado el 14 de agosto de 2014

PALABRAS CLAVE

NAT
HIV-1
COBAS AmpliScreen

Resumen

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) se incorporaron en los bancos de sangre para reducir el riesgo residual de transmisión de infecciones por vía transfusional. La cocirculación de distintas variantes del HIV-1 en Argentina indica la necesidad de evaluar la sensibilidad de los ensayos serológicos y moleculares disponibles para su detección. En este trabajo se evaluó la sensibilidad del equipo COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), para detectar ARN viral en plasmas de individuos infectados con HIV-1 de Argentina. Los resultados demuestran que esta técnica tiene una alta sensibilidad para detectar ARN de HIV-1 en las condiciones ensayadas: para ensayo de mini-pool (pools ≥ 50 copias de ARN/ml), la sensibilidad fue $\geq 92\%$, y para procedimiento estándar (plasmas ≥ 207 copias de ARN/ml), la sensibilidad fue 100% . Además, la técnica COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), es adecuada para la detección de las variantes de HIV-1 prevalentes.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia:

Correo electrónico: luciapilarg@yahoo.com.ar

KEYWORDS

NAT
HIV-1
COBAS AmpliScreen

Sensitivity of the COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test v1.5 for HIV-1 detection**Abstract**

The introduction of nucleic acid amplification techniques (NAT) in blood banks was intended to reduce the residual risk of transfusion-transmitted infections. Co-circulation of a great diversity of HIV-1 variants in Argentina portrays the need to assess the sensitivity of serological and molecular assays available for their detection. In this study, we evaluated the sensitivity of the COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, version 1.5 (Roche) for the detection of HIV-1 RNA in plasma samples of infected individuals from Argentina. The results of this study reveal that this technique has high sensitivity for the detection of HIV-1 RNA under assay conditions: using mini-pool testing, pools ≥ 50 RNA copies per ml achieved $\geq 92\%$ sensitivity, whereas in the standard procedure, samples ≥ 207 RNA copies/ml achieved 100% sensitivity. Moreover, the COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, version 1.5 (Roche) is suitable for detecting prevailing HIV-1 variants.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Uno de los principales desafíos de la medicina transfusional es evitar la transmisión de enfermedades infecciosas a través de la sangre y sus derivados. En la actualidad, el riesgo de transmisión de infecciones por transfusión es bajo y está asociado principalmente al período de ventana y a la contaminación con patógenos emergentes conocidos y con patógenos todavía no identificados¹.

El tamizaje de marcadores de infección en donantes de sangre tiene especial importancia en Argentina, ya que en la mayoría de los casos son donaciones inducidas por la familia y no donaciones de repetición, altruistas y voluntarias. Debido a las características particulares de la población de donantes, en este país, el riesgo de donación en período de ventana inmunológica es alto⁵.

Las técnicas de NAT (técnica de amplificación de ácidos nucleicos) se incorporaron en los bancos de sangre para reducir al máximo el riesgo residual de transmisión de infecciones por vía transfusional⁷. La realización de NAT en el tamizaje de donantes está dirigida principalmente a la detección del período de viremia en la fase inicial de la infección⁷. La eficacia potencial de este tamizaje depende de la prevalencia de la infección en la población y de la duración del período de ventana inmunológica⁵.

En Argentina se realiza NAT en numerosos bancos de sangre y, si bien hay carencias respecto de leyes nacionales dirigidas a regular su aplicación, no se cuestiona la necesidad de efectuar estas pruebas. Algunas provincias del país cuentan con regulaciones efectivas que establecen la obligatoriedad de las pruebas de NAT a nivel local. En la provincia de Córdoba, según decreto N.° 1047/Resolución N.° 618 (Boletín Oficial 2010), la realización de las pruebas NAT es obligatoria desde 2010 para todos los bancos de sangre, tanto del ámbito público como privado.

La epidemia de sida en América del Sur se debe a múltiples subtipos del grupo M del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), incluidos los subtipos B, F1 y C, además del BF1 y de la forma recombinante BC. La recombinante BF1 representa la forma genética más extendida, después del subtipo B, y alcanza una alta prevalencia (10% -50%) en los países del Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)^{4,15}.

Estudios independientes publicados desde la década de los 90 indican que el patrón molecular del HIV-1 en Argentina sugiere un predominio del subtipo B, la subsiguiente aparición del subtipo F y recombinantes B/F, hasta llegar a una alta prevalencia del subtipo F desde el año 2000. Las formas recombinantes presentan gran diversidad; entre estas, ICRF12-BF es la primera originada en Sudamérica (Argentina y Uruguay)^{2,11}. La circulación conjunta en el país de todas estas variantes del HIV-1 indica la necesidad de evaluar la sensibilidad de los ensayos serológicos y moleculares disponibles para su detección.

Las técnicas comerciales utilizadas en Argentina para el tamizaje de estos virus han sido validadas en otros países utilizando estándares internacionales o muestras que no necesariamente se corresponden con las variantes virales prevalentes en la región. Por este motivo, en este trabajo se evaluó la sensibilidad del equipo COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), para la detección del ARN viral en plasmas infectados con HIV-1 (subtipos B y recombinantes CRF12_BF) de Argentina.

Se estudió un total de 63 muestras de plasma con niveles conocidos de carga viral (concentración de ARN), correspondientes a individuos de Argentina infectados con el virus HIV-1. Estas muestras fueron derivadas al Laboratorio Central de la provincia de Córdoba para el diagnóstico y la evaluación de la infección por HIV-1, acompañadas del consentimiento informado correspondiente.

Para la detección del ARN viral en las muestras se utilizó el *MultiPrep Specimen Processing Procedure* y el *Standard Specimen Processing Procedure*, siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante (Inserto, COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5, Roche).

Las muestras fueron secuenciadas por el kit de genotipificación TRUGENE® HIV-1 y el sistema de secuenciación DNA OpenGene™ de Siemens, y clasificadas como 53 subtipos B y 10 formas recombinantes CRF12_BF utilizando la *HIV Drug Resistance Database*, REGA HIV-1 *Subtyping tool version 2.0* (Stanford University).

Los valores de carga viral de las muestras estudiadas fueron determinados mediante el ensayo VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 (bDNA), Siemens.

El COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, v1.5 (Roche), es un ensayo semiautomático. En el *Standard Specimen Processing Procedure*, el ARN del HIV-1 se aísla directamente a partir del plasma mediante lisis de las partículas virales con el *MultiPrep Lysis Reagent*, seguido de la precipitación del ARN viral con alcohol.

En el *MultiPrep Specimen Processing Procedure*, las partículas virales del HIV-1 se concentran primero a partir de un mililitro de pool de plasmas mediante ultracentrifugación (23 000-24 000 g durante 60 minutos a 2-8 °C). Luego se realiza la lisis de las partículas virales con un agente caotrópico (*MultiPrep Lysis Reagent*) y finalmente la precipitación del ARN con alcohol. La preparación de los pooles de 6 muestras se realizó en forma manual, en condiciones de esterilidad.

Para ambos procedimientos, el ensayo incorpora un control interno para verificar su funcionamiento en cada prueba individual, así como la enzima AmpErase® (uracil-N-glicosilasa) para reducir la posible contaminación por material previamente amplificado (amplicones).

La amplificación mediante RT-PCR del ADN complementario al ARN viral, utilizando *primers* específicos para HIV-1; la hibridación de los productos amplificados con sondas de oligonucleótidos específicas dirigidas hacia el *target*; la detección colorimétrica de los productos amplificados fijados a las sondas y el informe final de los resultados se realiza automáticamente en el analizador COBAS AMPLICOR, sin intervención del usuario (Inserto, COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5, Roche).

De las 63 muestras de plasma, 38 de ellas, con una carga viral entre 1000-100 000 copias de HIV-1/ml, fueron evaluadas por el *MultiPrep Specimen Processing Procedure* (ensayo de mini-pooles). Las muestras fueron secuenciadas y

clasificadas en 32 subtipos B y en 6 formas recombinantes CRF12_BF.

Se realizó una dilución inicial de todas las muestras con cargas virales superiores a 1000 copias/ml a fin de obtener aproximadamente 1000 copias/ml. A partir de esta dilución inicial, se prepararon por triplicado pooles compuestos por 6 muestras (una muestra HIV-1 positiva más 5 muestras de plasma negativas, evaluadas por ensayos serológicos y NAT), con el fin de obtener concentraciones finales en un rango de 50 a 200 copias/ml. Para el armado de cada pool se extrajo el volumen necesario de cada una de las 6 muestras y se obtuvo un volumen final de 1000 µl/pool. La misma muestra de plasma negativo se utilizó como diluyente. Se determinó la carga viral por mililitro de pool para cada dilución (por duplicado).

Complementariamente, 25 muestras de plasma HIV-1 positivas, con cargas virales conocidas, fueron evaluadas con el *Standard Specimen Processing Procedure* (ensayo de muestras individuales). Las muestras fueron secuenciadas y clasificadas en 21 subtipos B y en 4 formas recombinantes CRF12_BF. Se tomaron 200 µl de cada una de estas muestras y se procesaron siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante para el ensayo de muestra individual.

Se estimó la sensibilidad del ensayo de mini-pooles y del ensayo de muestra individual del COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), para cada concentración de ARN (carga viral), determinando el número de pooles positivos o muestras positivas individuales en relación con el número de pruebas realizadas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba exacta de Fisher utilizando el software InfoStat (2008).

Los resultados obtenidos están resumidos en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1 Sensibilidad del ensayo *MultiPrep Specimen Processing Procedure* (ensayo de mini-pooles), (COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5, Roche).

Concentración de ARN de HIV-1 ^a	Número de mini-pooles positivos	Número de mini-pooles testeados	% de positivos (sensibilidad)	Valor p
50 a 60	13	14	92,86	0,989 ^b
61 a 80	10	11	90,91	0,451 ^b
81 a 169	13	13	100,00	
Total	36	38	94,74	

^a Copias de ARN viral por mililitro de pool.

^b El valor p surge de la comparación de la categoría de 81 a 169 copias de HIV-1/ml de pool con las otras categorías.

Tabla 2 Sensibilidad acumulada del ensayo *MultiPrep Specimen Processing Procedure* (ensayo de mini-pooles), (COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5, Roche).

Concentración de ARN de HIV-1 ^a	Número de mini-pooles positivos acumulados	Número de mini-pooles testeados acumulados	% de positivos acumulados (sensibilidad acumulada)	Valor p
50 a 60	13	14	92,86	0,80 ^b
50 a 80	23	25	92,00	0,66 ^b
50 a 169	36	38	94,74	

^a Copias de ARN viral por mililitro de pool.

^b El valor p surge de la comparación de la categoría de 50 a 169 copias de HIV-1/ml de pool con las otras categorías.

Tabla 3 Sensibilidad del ensayo *Standard Specimen Processing Procedure* (ensayo de muestras individuales), (COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5, Roche).

Concentración de ARN de HIV-1 ^a	Número de muestras positivas	Número de muestras testeadas	% de positivos (sensibilidad)	Valor <i>p</i>
70 a 96	3	6	50	0,032 ^b
97 a 206	7	14	50	0,018 ^b
207 a 350	5	5	100	
Total	15	25	60	

^a Copias de ARN viral por mililitro de plasma.

^b El valor *p* surge de la comparación de la categoría de 207 a 350 copias de HIV-1/ml de pool con las otras categorías.

La sensibilidad del ensayo de mini-pooles en función de la concentración de ARN de HIV-1 (carga viral) no varió significativamente en el rango entre 50 a 169 copias de ARN viral por mililitro de pool (tablas 1 y 2). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la sensibilidad para muestras que tienen < 207 copias de ARN de HIV-1 por mililitro de plasma al ser evaluadas por el ensayo de muestras individuales (tabla 3).

Las dos técnicas moleculares validadas actualmente por el organismo de regulación nacional la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para ser utilizadas en el tamizaje de donantes de sangre en Argentina son: PROCLEIX HIV-1/HCV Assay (Novartis Diagnostics) y COBAS AmpliScreen HIV-1 Test, version 1.5; COBAS AmpliScreen HCV, version 2.0, y COBAS AmpliScreen HBV Test (Roche Molecular Systems Inc.) y sus versiones automatizadas PROCLEIX ULTRIO Assay (Novartis Diagnostics) en la plataforma de Tigris y COBAS TaqScreen MPX test (Roche Molecular Systems Inc.) en la plataforma de COBAS s201 (Inserto, Procleix HIV-1/HCV assay, Chiron 2002; Inserto, Procleix Ultrio Assay Gen-Probe, 2004). Mientras que la técnica de Novartis trabaja con muestra individual, la técnica de Roche utiliza mini-pooles.

El número de muestras utilizadas en los ensayos de NAT para mini-pooles puede variar según los requisitos de los bancos de sangre para la sensibilidad de la prueba, así como por los costos en términos económicos, pero en particular está reglamentado por cada país según los ensayos validados para tal fin³. Así, el ensayo AmpliScreen de Roche está validado para ser utilizado en Argentina con mini-pooles constituidos por 6 muestras de plasma.

Numerosos estudios han demostrado que la prueba de mini-pooles se puede incorporar en los programas de detección de donantes de sangre, y que debería ser capaz de detectar las infecciones en el período de ventana de las donaciones de sangre^{10, 13}.

Los resultados del presente estudio muestran que el ensayo COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), ofrece una alta sensibilidad para la detección del ARN del virus HIV-1 en las distintas condiciones ensayadas (mini-pooles y muestra individual). La sensibilidad encontrada en este trabajo, tanto para el ensayo de mini-pooles como para el ensayo de muestra individual, está dentro de los rangos de sensibilidad descritos por el fabricante cuando aquellos fueron validados con estándares internacionales de la OMS (Inserto, COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión

1.5, Roche). Para el ensayo de mini-pooles, la sensibilidad es de 95 % para 50 copias de ARN de HIV-1/ml de pool (78,4 UI/ml), y para el ensayo de muestra individual, la sensibilidad es de 95 % para 207 copias de ARN de HIV-1/ml de plasma (323,4 UI/ml).

Es así que para detectar un donante positivo en un pool de 6 muestras de plasma, el donante debería tener al menos 301,12 copias de ARN de HIV-1/ml de plasma. En el presente estudio obtuvimos para el ensayo de mini-pooles una sensibilidad ≥ 92 % para los pooles con carga viral ≥ 50 copias de ARN de HIV-1/ml de pool (tabla 2), y para el ensayo de muestra individual, una sensibilidad de 100 % para muestras con carga viral ≥ 207 copias de ARN de HIV-1/ml de plasma (tabla 3).

La prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la detección cualitativa del ARN de HIV-1 en plasma COBAS AmpliScreen HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), fue diseñada para el tamizaje de pooles de plasma humano de donantes de sangre que se preparan en función de algoritmos aprobados. La prueba utiliza los mismos *primers* que el ensayo cuantitativo COBAS AMPLICOR MONITOR HIV-1 (Roche). Si bien la técnica incluye el procesamiento manual de las muestras hasta la obtención del extracto de ARN o ADN viral, esta resulta ser muy robusta, tal como fue descrito anteriormente^{9,14}. Se demostró que la técnica tiene también una alta sensibilidad para la detección de genotipos G y B del HIV-1 y para el virus de la hepatitis B (HBV)^{1,12}.

Los estudios que tienen como objetivo determinar la utilidad de las técnicas de tamizaje para detectar cepas de HIV-1 de circulación regional resultan de interés para decidir su utilización en dicha región y es información valiosa para los países o regiones con similares características epidemiológicas. En el presente trabajo se detectaron por la técnica COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5 (Roche), todas las muestras de subtipos B y formas recombinantes CRF12_BF de HIV-1 estudiadas, al ser ensayadas dentro de los límites de sensibilidad de la metodología previamente descritos (Inserto, COBAS AmpliScreen™ HIV-1 Test, versión 1.5, Roche), lo que demuestra que la técnica evaluada es adecuada para el tamizaje molecular en las regiones donde circulan dichas variantes virales. Debido a la gran variabilidad del virus HIV-1, se deberían realizar estudios continuados incluyendo un mayor número de muestras, para corroborar la sensibilidad del ensayo evaluado.

Diversos estudios han descrito la transmisión del HIV-1 después de una transfusión con sangre testeada en mini-

pooles por NAT en la fase de preseroconversión de la infección^{6,10}. Se ha sugerido que el factor de dilución asociado con el tamaño de los mini-pooles (16-24 muestras) está implicado en el fracaso de los ensayos de NAT para la detección de bajos niveles de ARN del HIV-1¹⁰. Además, hay antecedentes de fallas en la detección de donantes en etapas tempranas de infecciones virales utilizando técnicas de NAT que emplean muestras individuales⁸. Es por esto que, independientemente de si los ensayos trabajan con mini-pooles o con muestras individuales, la elección de la técnica de NAT más adecuada para el tamizaje de donantes de sangre debe basarse principalmente en los conceptos de alta sensibilidad y capacidad para detectar las variantes virales prevalentes.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Banco Central de Sangre de Córdoba por facilitar los reactivos e insumos para la realización de este trabajo y al Laboratorio Central, Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba, por facilitar los plasmas infectados con el virus HIV-1 incluidos en este estudio.

Bibliografía

1. Araújo FM, Henriques IS, Monteiro FP, Meireles ER, Cunha-Ribeiro LM. Detection of HIV-1 subtype G using Cobas Ampliscreen test. *J Clin Virol.* 2004;30:205-6.
2. Aulicino P, Holmes EC, Rocco C, Mangano A and Sen L. Extremely rapid spread of human immunodeficiency virus type 1 BF recombinants in Argentina. *J Virol.* 2007;427-9.
3. Bamaga MS, Bokhari FF, Aboud AM, Al-Malki M, Alenzi FQ. Nucleic acid amplification technology screening for hepatitis C virus and human immunodeficiency virus for blood donations. *Saudi Med J.* 2006;27:781-7.
4. Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimarães ML, Lopez-Galindez C, Casado C, Chiparelli H, Rocco C, Mangano A, Sen L, Morgado MG. Phylodynamics of HIV-1 circulating recombinant forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology.* 2010;7:22. [Online] <http://www.retrovirology.com/content/7/1/22>
5. Blejer JL, Carreras Vescio LA, Salamone HJ. Riesgo de transmisión de infecciones por vía transfusional. *Medicina (Buenos Aires).* 2002; 62: 259-78.
6. Delwart EL, Kalmin ND, Jones TS, Ladd DJ, Foley B, Tobler LH, Tsui RC, Busch MP. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation. *Vox Sang.* 2004;86:171-7.
7. Grant PR, Busch MP. Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening. [Review]. *Transfusion Med.* 2002;12: 229-42.
8. Jarvis L, Becker J, Tender A, Cleland A, Queiros L, Aquiar A, Azevedo J, Aprili G, Bressan F, Torres P, Nieto S, Ursitti A, Montoro J, Vila E, Ramada C, Saldanha J. Evaluation of the Roche Cobas s 201 system and CobasTaqScreen multiplex test for blood screening: a European multicenter study. *Transfusion.* 2008;48:1853-61.
9. Koppelman MHGM, Sjerps MC, Reesink HW, Cuypers HTM. 2005. Evaluation of COBAS AmpliPrep nucleic acid extraction in conjunction with COBAS AmpliScreen HBV DNA, HCV RNA and HIV-1 RNA amplification and detection. *Vox Sang.* 2005;89:193-200.
10. Palla P, Vatteroni ML, Vacri L, Maggi F, Baicchi U. HIV-1 NAT mini-pool during the pre-seroconversion window period: detection of a repeat blood donor. *Vox Sang.* 2006;90:59-62.
11. Pando MA, Gómez-Carrillo M, Vignoles M, Rubio AE, dos Ramos Farias MS, Vila M, Rossi D, Ralón G, Marone R, Reynaga E, Sosa J, Torres O, Maestri M, Ávila MM, Salomon H. 2011. Incidence of HIV Type 1 infection, antiretroviral drug resistance, and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina: A Global Fund Project. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27:17-23.
12. Romanò L, Velati C, Baruffi L, Fomiatti L, Colucci G, Zanetti AR, the Italian Group for the Study of Transfusion Transmissible Diseases. Multicenter evaluation of a semiautomated, standardized assay for detection of hepatitis B virus DNA in blood donations. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2991-3.
13. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong M, Caglioti S, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med.* 2004;351:760-8.
14. Yang Y, Lamendola MH, Mendoza M, Xu D, Nguyen M, Yeh S, Wu Y, Ku J, Rosenstraus M, Sun R. Performance characteristics of the COBAS AmpliScreen HIV-1 test, version 1.5, an assay designed for screening plasma mini-pools. *Transfusion.* 2001;41:643-51.
15. Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, Morgenstern B, Bette Korber B, Leitner T. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology.* 2010; 7:25. [Online] <http://www.retrovirology.com/content/7/1/25>