

## **Estado actual** de la evaluación y manejo del paciente HIV positivo con métodos de laboratorio

ARTURO M TERRES SPEZIALE

*Médico Patólogo Clínico Director de CARPERMOR Laboratorio de Referencia Internacional*

### RESUMEN

*A más de una década de la descripción de los retrovirus, del surgimiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, del aislamiento y demostración del papel etiopatogénico de los virus de inmunodeficiencia humana (HIV 1 y 2), se ha desarrollado toda una gama de elementos diagnósticos y terapéuticos, siendo necesario establecer lineamientos para facilitar su comprensión y manejo; en la actualidad el diagnóstico se lleva a cabo con diversos procedimientos inmunológicos, citométricos, virológicos, y más recientemente de biología molecular. En este trabajo se propone una estrategia para el posible abordaje diagnóstico dependiendo de cuatro situaciones clínicas: 1) Individuo con riesgo de infección por HIV, 2) Adulto HIV positivo con o sin manifestaciones de SIDA, 3) Neonato de madre HIV positiva y 4) Paciente bajo tratamiento con drogas antivirales. Hoy día se dispone de esquemas terapéuticos combinados con inhibidores de transcriptasa reversa (ITR) e inhibidores de Proteasa (IP) que han logrado aumentar la supervivencia y mejorar el pronóstico de los pacientes. En este documento se presentan los datos disponibles sobre la confiabilidad y aplicabilidad de las pruebas diagnósticas incluyendo el problema de los costos, el cual sin duda cobra una gran importancia cuando se contempla no sólo desde el punto de vista individual sino que se escala al problema epidemiológico, resultando en todo un reto económico significativo para los países en desarrollo.*

**PALABRAS CLAVE:** HIV, SIDA, biología molecular, inmunoensayos, diagnóstico por laboratorio, tratamiento antiviral, costos de atención médica.

## ABSTRACT

*After more than a decade, since the initial description of Retrovirus, the emergence of AIDS, the isolation and demonstration of the etiopathogenic role of human immunodeficiency virus type 1 and 2; a wide range of diagnostic and therapeutic elements have been described making imperative the need to establish guidelines to understand and facilitate their management. Actually diagnosis is achieved through immunological, cytometric, virological and molecular biology procedures. In this document we intend to present four strategies according to four clinical situations: 1) Individual with risk HIV infection, 2) HIV positive adult with or without AIDS clinical symptoms. 3) HIV positive new-born and 4) Patient under HIV antiviral treatment. Nowadays several therapeutic regimen are available combining Reverse Transcriptase Inhibitors (RTI) with Protease Inhibitors (PI) resulting in a better survival and life quality. Available data are presented according on test's reliability and applicability including costs' problematic which undoubtedly will represent a significative impact not only on an individual basis but on great scale when conceived on the epidemiological scope, which will be more severe most significative on developing countries.*

KEY WORDS: VIH, AIDS, molecular biology, immunoassays, laboratory diagnose, antiviral treatment, cost of medical care.

## Introducción

Los virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (HIV-1 y 2) pertenecen al grupo de los retrovirus descrito por Baltimore y Temin en 1970, cuando demostraron que éstos son capaces de codificar una DNA polimerasa dependiente de RNA (transcriptasa reversa) y de transcribirse a través de un producto intermedio de DNA, dando origen a un fragmento genómico de DNA, el cual se integra ulteriormente en el cromosoma del huésped y se transcribe como un gen celular. Vale la pena destacar que este descubrimiento que mereció el Premio Nobel, contradice el dogma de que la información genética sólo se transmite del DNA al RNA y finalmente a las proteínas. A principios de la década de los ochenta, quedó plenamente establecido que los virus HIV son los causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estos retrovirus pertenecen a la familia lentivirus, de la que filogenéticamente existen nueve subtipos de HIV-1 (ocho en el Grupo M: A-H y uno en el Grupo O) y 2 subtipos de HIV-2 (A y B). Los subtipos A, C y D predominan en África y el subtipo B predomina en Norteamérica y en Europa; HIV-1 es el tipo más común en el mundo occidental, mientras que HIV-2 es

reportado sobre todo en África.

Conforme a datos de la XI Conferencia Internacional de SIDA, celebrada en el mes de julio de 1996 en Vancouver Canadá, en el mundo existen más de 28 millones de portadores de HIV, con aproximadamente cinco millones de casos acumulados de SIDA, de los cuales el 10% son niños. Como consecuencia de que ocurren más de 7,000 nuevas infecciones diariamente y que un promedio de 1,400 niños nacen infectados por día, se calcula que para fin de siglo existirán 40 millones de personas portadoras del virus de un total de 6,000 millones de seres humanos (0.66 %). En México se describió el primer caso en 1983, desde entonces y hasta junio de 1997 el número total de casos acumulados es de 31,000. Los estados de la República que muestran un mayor número de pacientes son por orden de frecuencia, el Distrito Federal, **Estado** de México, Jalisco, Nuevo León y Puebla.

Conforme han ido avanzando la ciencia y la tecnología, diversos procedimientos diagnósticos y terapéuticos han surgido para el manejo de la infección por HIV, del SIDA y de las enfermedades oportunistas que lo acompañan, por lo que se ha hecho necesario establecer lineamientos para facilitar su manejo; en la actualidad ya se dispone de esquemas terapéuticos combinados con inhibidores de transcriptasa reversa (ITR) e inhibidores de proteasa (IP) que han logrado aumentar la supervivencia y mejorar el pronóstico de los pacientes. Adicionalmente se sigue investigando con diversas formas de vacunación sin haber logrado el éxito deseado.

El diagnóstico se lleva a cabo con diversos procedimientos, dentro de los que se incluyen los serológicos, citológicos, cultivos, y más recientemente las pruebas de biología molecular, lo que ha condicionado que en la actualidad se hayan desarrollado diversas estrategias, dependiendo de al menos cuatro diferentes situaciones clínicas:

Caso No. 1. Individuo con riesgo de infección por HIV.

Caso No. 2. Adulto HIV positivo con o sin manifestaciones de SIDA.

Caso No. 3. Neonato de madre HIV positiva.

Caso No. 4. Paciente bajo tratamiento con drogas antivirales.

## **Caso No. 1. Individuo con riesgo de infección por HIV**

- Detección de Anticuerpos HIV-1/2 ELISA.
- Detección de antígeno p24.
- Cultivo viral.
- Detección de HIV por PCR.

Los contactos con un individuo seropositivo a través de relación sexual o por medio de material punzocortante incluyendo agujas hipodérmicas, exposición sanguínea, etc., representan las situaciones más comunes por las que un individuo se expone al riesgo de adquirir la infección por HIV. En esta situación, del 50 al 93% de los casos presentarán un cuadro de «primoinfección» con diversos síntomas gripales, llegando inclusive a manifestaciones neurológicas pasando por un cuadro tipo mononucleosis infecciosa. El cuadro clínico se puede prolongar hasta por más de dos meses, siendo esto un signo de mal pronóstico para desarrollar SIDA. Generalmente esta etapa revierte espontáneamente, quedando clínicamente latente por un período de 1 a más de 10 años, dependiendo de diversos factores dentro de los que se incluye la magnitud de la carga viral basal y la supresión de linfocitos T CD4+.

- Detección de anticuerpos anti HIV (ELISA)

Cuando un individuo sufre una exposición de alto riesgo al HIV, resulta necesario realizar la detección inmediata de anticuerpos contra el virus por el método ELISA, partiendo de una determinación basal, seguida de una serie a las seis semanas, 12 semanas y seis meses. Esta metodología es ampliamente utilizada por los laboratorios clínicos en la actualidad, se trata de una técnica heterogénea que se realiza en múltiples fases, sensible, con la que se pueden cuantificar las concentraciones, tanto de antígenos como de anticuerpos, empleando ya sea antígenos o anticuerpos monoclonales marcados con enzimas en diversos soportes en fase sólida, incluyendo tubos de ensaye, perlas de vidrio, microplacas, etc. siendo entonces una prueba directa o indirecta. La intensidad de la reacción se cuantifica después de adicionar el espécimen y el sustrato, a los complejos antígeno-anticuerpo, ocurriendo un cambio de color directamente proporcional a la concentración de la molécula que se desea cuantificar. La confiabilidad de la detección de anticuerpos tiene una sensibilidad mayor de 99% y una especificidad mayor de 98% cuando se hace con el método ELISA con

controles de calidad adecuados (cuadro I). Hoy día existen metodologías alternativas tales como la hemaglutinación, las cuales resultan prácticas en Bancos de Sangre en situaciones de urgencia, así como en regiones apartadas en las que se carece de metodologías inmunoenzimáticas adecuadas.

**Cuadro I.**

Causas de falsos positivos	Causas de falsos negativos
Enfermedad hematológica maligna	Periodo de ventana previo a seroconversión
Infecciones por virus DNA	Terapia inmunosupresora
Enfermedades autoinmunes	Transfusión sanguínea masr./a
Mieloma múltiple	Neoplasias malignas
Cirrosis biliar primaria	Disfunción de linfocitos B
Hepatitis aicohólica	Trasplante de médula ósea
Vacuna de influenza	Reactivos diseñados para detección de Ag. p24
Vacuna de hepatitis B	Talco de guantes de látex
Inmunidad pasiva transitoria	

Anticuerpos antilinfocitos tipo II	
Trasplante renal	
Insuficiencia renal crónica	
Síndrome de Stevens-Johnson	
VDRL positivo	

La mayoría de los individuos inmunocompetentes infectados se hacen seropositivos antes del 6o mes. Como se mencionó previamente, a las 2-4 semanas de exposición el 50% de los individuos pueden desarrollar un síndrome de mononucleosis infecciosa. Durante este periodo el Ag. p24 es positivo y se hace negativo al aparecer los anticuerpos en la prueba. Aunque las pruebas ELISA son capaces de distinguir los isotipos IgG de los IgM, para fines prácticos, por lo general no se emplea esta capacidad tecnológica en la clínica.

- Ag. p24 HIV (figura 1)

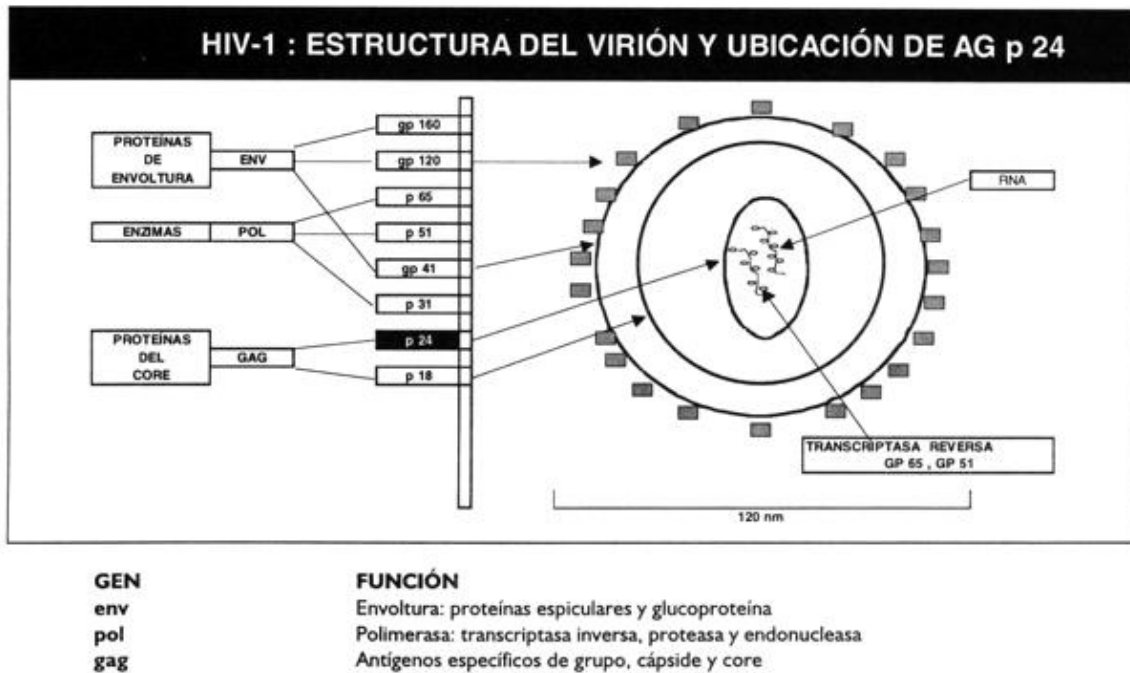


Figura 1. Estructura del virión y ubicación de Ag. p24.

Figura 1. Estructura del virión y ubicación de Ag. p24.

La antigenemia que generalmente refleja la replicación viral también puede ser detectada por medio de un ensayo ELISA, aun antes de la seroconversión que generalmente ocurre entre la semana tres y la 12 postinfección. Recientemente se ha establecido que la detección de p24 también se puede realizar en LCR ya que existen casos con manifestaciones neurológicas en los que se ha demostrado la presencia del HIV en LCR cuando aún es negativo en sangre periférica. El monitoreo de la antigenemia tiene un valor pronóstico. Ag. p24 tiene una especificidad del 99%. La sensibilidad del antígeno varía dependiendo del **estado** clínico; partiendo desde un 4% en asintomáticos, 56% en CRS hasta 76% en SIDA.

En ciertas condiciones la detección del Ag. p24 por el método de ELISA puede ser dudosamente negativa o dar resultados bajos, en estas condiciones es conveniente disociar el antígeno de los complejos inmunes circulantes in vitro con ácido, con lo cual se facilita la detección del antígeno. Si la prueba es positiva conviene confirmar el hallazgo por medio de la prueba de neutralización, en la que se utilizan sueros hiperinmunes capaces de formar complejos en el espécimen, con los que se logra cuando menos una reducción del 50% en la intensidad de la reacción, cuando se compara con la del suero no neutralizado. En función de que esta prueba es capaz de

acortar el periodo de ventana existente entre el momento de la infección y la aparición de anticuerpos HIV demostrables por ELISA, en los Estados Unidos se ha analizado el costo/beneficio de incluir esta prueba en el estudio integral del donador de los Bancos de Sangre, habiéndose llegado a la conclusión de que el costo de este procedimiento no justifica el beneficio.

- Cultivo viral

Aunque esta prueba podría ser considerada como el «estándar de oro» para detectar la infección por HIV, debido a que tiene una confiabilidad de más del 98%, en realidad es un procedimiento poco usado por ser caro, riesgoso (expone al personal del laboratorio a grandes concentraciones del virus), laborioso (requiere de manejo muy especializado) y lento (requiere de varias semanas de incubación). El estudio se puede realizar en 20 mL de sangre total o en plasma obtenido en ACD, CPD o heparina, a partir del cual se obtienen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con un gradiente de Ficoll Hypaque. Este estudio también se puede realizar en LCR, semen y otros tejidos, células o líquidos orgánicos, requiriéndose una muestra de 2 mL mínimo. Las muestras se transportan en un medio RPMI 1640 con glutamina y se envían a temperatura ambiente para iniciar su proceso en el laboratorio antes de 24 horas. Los resultados pueden ser cualitativos o cuantitativos expresándose en pg/mL

- Detección de HIV por PCR

En 1953, un físico inglés y un bioquímico norteamericano, Francis Crick y James Watson respectivamente, reunieron toda la información disponible para elaborar un modelo revolucionario de las moléculas de ácidos nucleicos, modelo que se representó como una doble hélice de bases púricas y pirimídicas enlazadas en cadenas paralelas por medio de azúcares y fosfatos, dando como resultado los ácidos desoxirribonucleicos conocidos como DNA. En 1985, Mullis describió la amplificación in vitro de un fragmento específico o «sonda» de DNA (probes) por medios enzimáticos (DNA-polimerasa), lo cual representa una poderosa herramienta de la tecnología molecular con múltiples aplicaciones en microbiología. La amplificación del DNA permite incrementar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico. Con este método es posible reproducir un billón de copias de una sola molécula de DNA en cuestión de horas. El estudio de las secuencias permite detectar e identificar el agente causal de una enfermedad, establecer su genotipo, su virulencia y la susceptibilidad al tratamiento. En 1989, la revista Science consideró que se trata del descubrimiento más importante de la década, habiendo pronosticado que esta herramienta cambiaría el



curso de la historia de la medicina.

Con la reacción de polimerasa en cadena es posible detectar DNA proviral antes de la seroconversión de los individuos infectados, además de poder demostrar infección en sujetos agammaglobulinémicos. La PCR es capaz de detectar desde una célula infectada por 3,000 leucocitos totales. El plasma debe ser obtenido con ACD o EDTA. Debe ser separado y congelado antes de cuatro horas. La prueba puede ser realizada en suero; sin embargo, pierde sensibilidad analítica por reducción en las cargas virales. El volumen pediátrico mínimo es de 0.5 mL; no obstante, se recomienda un volumen medio de 2 mL de muestra. En el método cuantitativo los valores de referencia son menos de 400 copias/mL; cuando se utiliza el método ultrasensible se pueden cuantificar desde menos de 25 hasta más de un millón de copias/mL. Resultados obtenidos en Specialty Labs, California USA, indican que uno de cada tres pacientes tienen cargas virales de menos de 400 copias por lo que es conveniente solicitar estudios ultrasensibles. Estas pruebas no están recomendadas por la FDA para diagnóstico clínico pues aún se consideran como de investigación, por lo que no se deberán utilizar en forma aislada, debiéndose emplear en conjunto con criterios clínicos y pruebas diagnósticas establecidas.

La carga viral plasmática correlaciona directamente con la progresión y con la sobrevida del paciente en forma inversa. Cargas virales de más de 40,000 copias/mL correlacionan con una rápida progresión y una sobrevida a cinco años de menos del 50%. Cargas virales de menos de 5,000 copias se asocian a baja progresión y sobrevida a cinco años de más del 95%.

## **Caso No. 2. Adulto HIV positivo con o sin manifestaciones de SIDA**

- Detección de anticuerpos HIV-1/2 ELISA
- Confirmación de infección Western Blot
- Citometría de flujo
- Marcadores subrogados: Neopterinina/b2 microglobulina

La situación puede ser desde la de un adulto asintomático que se detecta como

portador de anticuerpos HIV en una prueba de escrutinio hasta el caso del paciente con manifestaciones clínicas de SIDA o del complejo relacionado (CRS), incluyendo pérdida de peso, candidiasis mucofaríngea, infecciones respiratorias y gastrointestinales oportunistas, así como la presencia de neoplasias características dentro de las que destaca el sarcoma de Kaposi.

Los exámenes indispensables para la evaluación son:

1. Biometría hemática completa en la que los datos sugestivos de SIDA son:

- Leucopenia < 4,000 leucocitos/mm<sup>3</sup>
- Linfocitopenia < 1,500 leucocitos/mm<sup>3</sup>
- Trombocitopenia < 150,000 plaquetas/mm<sup>3</sup>

2. Serología basal: VDRL, TORCH y HBsAg

3. Química completa: Glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, índice LDL/HDL, proteínas A/G, calcio, fósforo, bilirrubinas fraccionadas, TGO (ASAT), TGO (ALAT), fosfatasa alcalina, gamma glutamil transpeptidasa, hierro.

4. Examen general de orina

- Detección de anticuerpos anti HIV (ELISA)

Como se mencionó, la seroconversión ocurre generalmente dentro de los primeros seis meses a partir de la infección. En estas condiciones, el diagnóstico se realiza generalmente partiendo de una prueba de detección de anticuerpos, la cual debe ser repetidamente reactiva (dos ocasiones) con una prueba confirmatoria Western Blot positiva. Cuando se sigue este protocolo en una población con prevalencia alta, la especificidad y la sensibilidad son considerablemente confiables (97 a 99% en ambos casos). Sin embargo, en poblaciones de baja frecuencia (< 0.3%) como pueden ser los donadores de sangre, los falsos positivos pueden alcanzar hasta un 90%, motivo por el

que deberán ser empleadas con criterios adecuados.

- Confirmación de infección Western Blot

En 1937, Tiselius y Kabat perfeccionaron la separación de proteínas en un campo eléctrico, logrando así el análisis de la heterogeneidad de las moléculas. De esta técnica han derivado una gran cantidad de metodologías dentro de las que se incluyen las de electroinmunotransferencia, de la que existen tres versiones: Southern Blot (DNA-DNA), Northern Blot (RNA-DNA) y Western-Blot (DNA-anticuerpos) las cuales han sido de gran utilidad en microbiología al conjuntarse a las técnicas de hibridación. Tal técnica consiste fundamentalmente en la detección de un segmento específico de DNA o de RNA empleando una «sonda» complementaria a las bases púricas y pirimídicas marcada con un trazador radiactivo, quemiluminiscente o enzimático.

Western Blot también es conocida como Inmunoblot. Se trata de una técnica desarrollada después de que Edward M. Southern, un biólogo escocés, describió el método que actualmente lleva su nombre (Southern Blot). En la descripción original se desnatura el DNA del espécimen en estudio y se trata con enzimas de restricción hasta obtener fragmentos de DNA de una sola hélice, los cuales se separan posteriormente por medio de la electroforesis. Los fragmentos obtenidos son transferidos (blot) a una membrana de nitrocelulosa conservando siempre su posición electroforética para ser hibridados con bases complementarias de DNA, los cuales son marcados previamente con un trazador radiactivo para, finalmente, ser detectados por autorradiografía. La prueba Western Blot es una modificación de esta prueba, la cual ha sido diseñada para detectar la presencia de anticuerpos contra proteínas separadas electroforéticamente. En el caso de HIV, generalmente se obtienen varias proteínas de acuerdo al esquema de la figura 2.

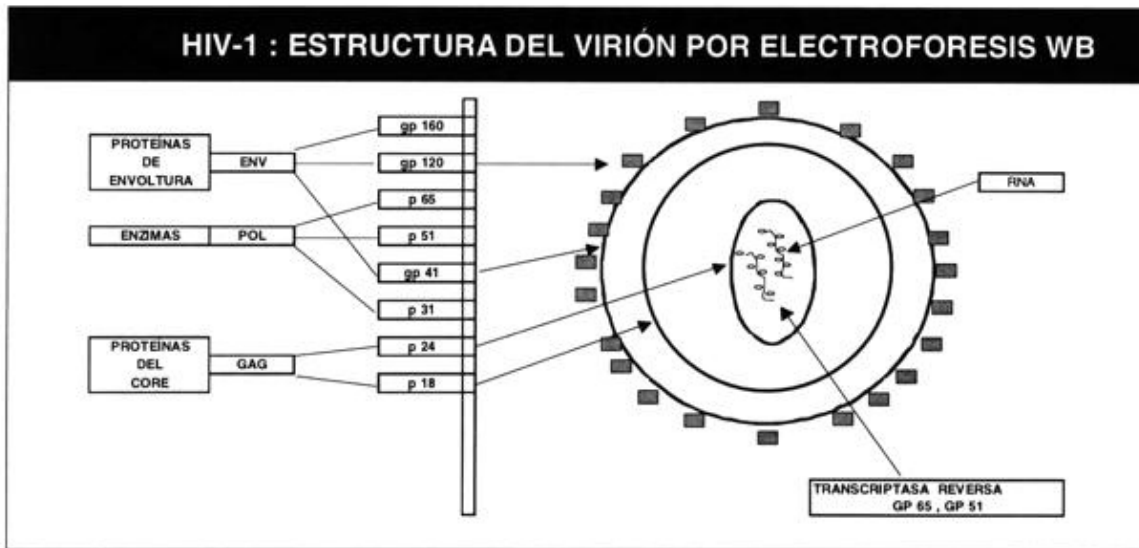


Figura 2. Estructura del virión por electroforesis WB

Figura 2. Estructura del virión por electroforesis WB

Los criterios CDC de Atlanta indican que existe infección cuando hay reactividad a dos de los siguientes: p24, gp 41 o gp 120/160. La falta de reactividad indica por supuesto que la prueba es negativa. Los resultados indeterminados son aquellos que son positivos con ELISA pero en los que el WB no es concluyente. Si el resultado es indeterminado, la prueba se debe repetir a los seis meses. Si la prueba es indeterminada por más de seis meses se debe considerar como negativa. Cuando un individuo, sin factores de riesgo ni sintomatología clínica, es repetidamente reactivo a ELISA e indeterminado con WB por más de seis meses, deberá considerarse como seronegativo para HIV.

Sólo los sueros que sean positivos tanto a ELISA como a WB deben ser considerados como confirmadamente positivos. Se calcula que en poblaciones de riesgo bajo, la probabilidad de obtener un falso positivo empleando ambas pruebas es de menos de 1:100,000; sin embargo, la elevada frecuencia de WB indeterminados puede condicionar que se requieran otras pruebas, dentro de las que destacan:

- Cultivos virales
- Inmunofluorescencia (IFA)
- Radioinmunoprecipitación (RIPA)
- Reacción de polimerasa en cadena (PCR)
- Captura de híbridos por DNA ramificado (B-DNA)

HIV-2 IgG WB: La prevalencia de HIV-2 en los EUA es extremadamente baja, aunque endémica en África occidental, la India y Portugal. Las proteínas características de HIV-2 son gp 120, gp 105, gp 68/58/55, gp 34, gp 31, p 26.

- Citometría de flujo

Se trata de una metodología relativamente reciente, la cual ha resultado sumamente exitosa en la separación, clasificación y cuantificación de células sanguíneas, así como para poner en evidencia a los anticuerpos monoclonales que pueden estarlas afectando. En esta técnica se emplean complejos analizadores computarizados, los cuales cuantifican las células que fluyen en un flujo laminar a través de un haz de láser. Las células son clasificadas inicialmente por su tamaño, siendo marcadas posteriormente con anticuerpos monoclonales marcados con conjugados fluorescentes altamente específicos. El análisis estadístico automatizado de las células así contadas permite conocer los porcentajes relativos y los números absolutos de cada subpoblación de células.

Es ampliamente conocido que el HIV afecta primordialmente a las linfocitos T cooperadores CD4+, de manera que resulta útil su cuantificación total y relativa a los linfocitos totales y los linfocitos T supresores CD8+ (cuadro II).

**Cuadro II.**  
**Impacto de HIV sobre linfocitos T CD4+.**

Linfocitos	SIDA	Control	p
Totales	953 (325)	1833 (475)	< 0.005
B	210 (32)	220 (24)	ns
T	531 (49)	1283 (48)	< 0.005
CD4+	95 ( 6)	641 (7)	< 0.0001
CD8+	258 (11)	256 (5)	ns
NK	127 (6)	192 (4)	< 0.001

*Ariza et al. Revista Médica del IMSS 1987; 25: 1*

En 1997, el Centro de Control de Enfermedades de los EUA (CDC Atlanta USA) revisó y publicó los lineamientos para la cuantificación de linfocitos T CD4+ en personas infectadas con HIV llegando a las siguientes conclusiones:

- Es indispensable estandarizar la toma de muestra, transporte, procesamiento y control de calidad del procedimiento, así como las medidas de seguridad e higiene.
- Sólo se deben considerar como linfocitos T cooperadores a aquéllos que sean simultáneamente CD4+ y CD3+ (representa subpoblación de linfocitos T maduros).
- Del mismo modo, sólo se deben considerar como linfocitos T supresores a aquellos que sean CD3+ y CD8+.
- Los resultados se deben expresar en números absolutos y en porcentajes relativos, además de informar la relación cooperadores/supresores (cuadros III y IV).

**Cuadro III.**  
**Valores de referencia en citometría de flujo\*]**

Leucocitos totales	4,000 - 11,000/mm <sup>3</sup>	100 %
Linfocitos totales	940 -3,281 /mm <sup>3</sup>	21 - 48 %
CD 3y 4 + T cooperadores	457- 1,536/mm <sup>3</sup>	24-56%
CD 3y 8 + T supresores	280 - 1,189/mm <sup>3</sup>	17 - 41 %
Indice CD4+ / CD8+	0.8 - 2.7	

\* Razo D et al. 1995. CARPERMOR. Laboratorio de Referencia Internacional. Rev Mex Pat Clin

**Cuadro IV.**  
**Probabilidad de aparición de SIDA en los próximos 18 meses  
 en presencia de HIV positivo confirmado  
 por ELISA y Western Blot.**

Linfocitos T CD4+ /cu mm	p	Relación CD4+ / CD8+	p
100	58%	0.1	69%
200	33%	0.2	36%
300	16%	0.4	13%
400	8 %	0.6	6%

500	4%	0.8	3%
>650	0%	2.5	0%

Fahey JL. Diagnostic and prognostic factors in AIDS. *The Mount SinaiJ of Med* 1986; 53: 8.

Conforme a los criterios del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta Ga. USA) de 1993, los pacientes con HIV pueden ser clasificados en tres grupos dependiendo de la cifra de CD4 (cuadro V).

<p align="center"><b>Cuadro V.</b></p> <p align="center"><b>Clasificación de los pacientes con HIV</b></p> <p align="center"><b>dependiendo de la cifra de CD4.</b></p>		
Grupo de células T CD4 +	Categoría	Diagnóstico
> 500/mm <sup>3</sup>	1	Depende de clínica
200 - 499 mm <sup>3</sup>	2	Depende de Clínica
< 200/mm <sup>3</sup>	3	SIDA



Es ampliamente conocido que los niveles de CD4+ correlacionan con el grado de inmunodeficiencia en HIV. Con cifras de menos de 500/mm<sup>3</sup> es frecuente que se presente candidiasis del tracto gastrointestinal, con cuentas de menos de 200/mm<sup>3</sup> se presenta neumonía *Pneumocystis carinii* mientras que cuentas de menos de 100/mm<sup>3</sup> correlacionan con infecciones por Citomegalovirus y micobacterias atípicas.

- Marcadores Subrogados: Neopterina/Beta 2 microglobulina

Se consideran como marcadores subrogados a los indicadores indirectos de enfermedad. Los cuales deben llenar los siguientes criterios:

1. Deben ser una sustancia central en la patogénesis o en la sintomatología del padecimiento.
2. Debe correlacionar con la progresión de la enfermedad.
3. Debe proporcionar un valor pronóstico cuando se determine al inicio del problema.
4. Debe ser confiable en términos de precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad.
5. Debe ser aplicable en diagnóstico y en tratamiento.
6. Debe ser accesible, económico y fácil de determinar en el laboratorio.

Neopterina y Beta 2 microglobulina son moléculas producidas por macrófagos y linfocitos T inmunorreactivos. Los niveles altos se observan cuando existe un estímulo antigénico por HIV, otros virus, enfermedades autoinmunes, respuesta inflamatoria y enfermedades neoplásicas, por lo que son altamente inespecíficos (cuadro VI).

<b>Cuadro VI.</b>	
<b>Valores de referencia.</b>	
Neopterin	2.3 - 9.5 nmol/L
Beta 2 microglobulina	0 - 2.5 mg/L

El uso combinado de la citometría de flujo con los marcadores serológicos subrogados ha demostrado ser útil en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de SIDA en los pacientes infectados por HIV (cuadro VII).

**Cuadro VII.**  
**Probabilidad de desarrollar SIDA en tres años.**

CD4+	SIDA p %*	Neopterin	SIDA p %**	n
>400	11	< 12	8	301
		12 - 20	15	205
		>20	22	35
250 - 400	31	< 12	8	57
		12 - 20	30	87
		>20	56	40
<250	73	<20	58	37
		> 20	90	21

\* Probabilidad a 3 años basada en CD4

\*\* Probabilidad a 3 años basada en análisis combinado

El estudio de la Beta 2 microglobulina es una alternativa eficaz, ya que tienen un elevado coeficiente de correlación con la neopterinina. Diversos estudios con Beta 2 microglobulina muestran que niveles por arriba de 3 mg/L predicen el desarrollo de SIDA. En pacientes con sarcoma de Kaposi la respuesta es mejor cuando Beta 2 es de menos de 4.5 mg/L. La terapia antiviral con AZT e inhibidores de proteasas disminuye las cifras de neopterinina y Beta 2 microglobulina y eleva las de los CD4. Los niveles elevados de los marcadores serológicos subrogados también pueden ser indicativos de infecciones oportunistas asociadas (CMV, Pneumo-cistis carinii, micobacterias, etc. )

### **Caso No. 3. Neonato de madre HIV positiva**

- Detección de antígeno p24
- Detección de HIV por PCR

Como se informó en la reunión de Vancouver 1996, se calcula que anualmente nacen 1,400 niños con infección por HIV. La transmisión materno-fetal del virus HIV puede ocurrir en cualquier momento desde la 8a. semana de gestación, hasta inclusive durante el trabajo de parto ocasionando que más del 80% de los productos de madres HIV positivas sean enfermos de SIDA antes de un año de vida. Sin embargo, es posible que los neonatos de madres HIV positivas no estén infectados aun cuando porten anticuerpos maternos anti-HIV demostrables tanto con la prueba ELISA como con el Western Blot. El diagnóstico por lo tanto es difícil, ya que la IgG materna cruza la barrera placentaria y puede persistir hasta por 15 meses. En función de que no existen pruebas IgM específicas para HIV, en la actualidad resulta imperativo demostrar la presencia del virus en el producto, lo cual se puede lograr con metodologías diversas incluyendo pruebas inmunológicas y pruebas de biología molecular.

- Detección de antígeno p24 con anticuerpos monoclonales.

En 1975, Kohler y Milstein describieron una técnica para producir anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas de ratón mantenidos en cultivos celulares. Los hibridomas se obtienen fusionando células de mieloma de ratón con linfocitos B, procedentes del bazo de un ratón inmunizado. Desde su descubrimiento, los anticuerpos monoclonales han sido una herramienta importante en el diagnóstico cuando se acoplan a los inmunoensayos enzimáticos, los cuales ya fueron descritos previamente en este trabajo.

La antigenemia que generalmente refleja la replicación viral puede ser detectada por medio de los inmunoensayos en plasma, suero o líquidos orgánicos. Recientemente se ha establecido que la detección de p24 también se puede realizar en LCR, ya que existen casos con manifestaciones neurológicas en los que se ha demostrado la presencia del HIV en LCR cuando aún es negativo en sangre periférica. El monitoreo de la antigenemia tiene un valor pronóstico, mientras más elevados sean los niveles peor será el pronóstico. Esta prueba habitualmente se hace negativa al aparecer los anticuerpos. La reaparición del antígeno correlaciona con la reactivación de la enfermedad representando un signo de mal pronóstico.

- Detección de HIV por PCR

Como ya se comentó, la reacción de polimerasa en cadena es capaz de detectar DNA proviral antes de la seroconversión de los individuos infectados, además de poder demostrar infección en sujetos agammaglobulinémicos. Del mismo modo es capaz de establecer el diagnóstico diferencial entre infección neonatal y transferencia pasiva transplacentaria de anticuerpos IgG. Con las pruebas cuantitativas (ver más adelante en caso 4) se puede además establecer el pronóstico. Si la carga viral es menor de 80,000 copias/mL durante el primer trimestre de la gestación, la probabilidad de transmisión materno-fetal será de casi un 100%. Si la carga es de menor de 20,000 copias/mL la probabilidad de transmisión será cercana a cero. En el infante sintomático con menos de 15 meses de edad, los cultivos virales y las pruebas de biología molecular son extremadamente útiles para establecer el diagnóstico definitivo. Sin embargo, ninguna de estas pruebas es 100% confiable en productos asintomáticos de menos de dos meses. En los productos de más edad y en los sintomáticos con pérdida de peso, desarrollo inadecuado, candidiasis, diarrea, infecciones bacterianas o enfermedades oportunistas, existen pruebas adicionales que pueden apoyar el diagnóstico incluyendo CD4 bajo para la edad, neutropenia, trombocitopenia, hipergammaglobulinemia.

#### **Caso No. 4. Paciente bajo tratamiento con drogas antivirales**

- Cuantificación de cargas virales
- Cultivos virales con susceptibilidad a antivirales
- Genotipificación por secuencia de aminoácidos
- Evaluación de inmunocompetencia con mitógenos

Dentro del arsenal terapéutico el médico cuenta en la actualidad con diversas drogas, incluyendo los inhibidores de la transcriptasa reversa y los inhibidores de proteasa. Las indicaciones terapéuticas y el monitoreo del tratamiento dependen de diversos criterios, incluyendo la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos y más recientemente la cuantificación de las cargas virales, la cual ha demostrado una mayor correlación con el **estado** clínico del paciente y con el pronóstico.

- Cuantificación de cargas virales

Estas técnicas permiten conocer la cantidad de virus que se encuentran en el plasma de los pacientes infectados con HIV, la cual disminuye de manera significativa cuando se instala el tratamiento antirretroviral efectivo. El número de moléculas de RNA en el plasma proporciona una medición directa de los títulos de viriones presentes. Está bien demostrado que así como el tratamiento reduce la carga viral, la aparición de resistencia correlaciona con su aumento. El análisis cuantitativo del RNA del HIV se puede realizar actualmente con cuatro metodologías, incluyendo por orden alfabético:

- AMPLICOR
- bDNA
- NASBA
- PCR ultrasensible

Además de ser extremadamente útiles en la evaluación de la eficacia de la terapia antiviral estas pruebas son capaces de establecer el pronóstico de la enfermedad. La cifra basal de la carga viral es capaz de predecir la supervivencia del paciente a un lapso de 10 años en individuos con cifras idénticas de CD4+ (70% de supervivencia para cuentas bajas vs 70% de mortalidad para cuentas altas).

En todas estas pruebas es necesario preservar las moléculas de RNA, las cuales son extremadamente lábiles, por lo que la toma de la muestra, las condiciones de transporte, almacenamiento y procesamiento son fundamentales para obtener resultados confiables. El plasma debe ser obtenido con ACD o EDTA. Debe ser separado y congelado antes de 4 horas. La prueba puede ser realizada en suero, sin embargo pierde sensibilidad analítica por reducción en las cargas virales. El volumen pediátrico mínimo es de 0.5 mL; sin embargo, se recomienda un volumen medio de 2 mL de muestra.

- AMPLICOR (ROCHE)

Este método se basa en dos pasos consecutivos, consiste en la aplicación de una transcriptasa reversa para traducir el RNA en DNA y de una reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) que amplifica el DNA. Este método tiene una sensibilidad de 500 copias/mL.

- bDNA (CHIRON)

Branched DNA , o DNA ramificado, es una poderosa herramienta de biología molecular que permite detectar y cuantificar los virus en líquidos orgánicos. Se basa en la hibridación y acoplamiento de sondas moléculares a un amplificador (bDNA). Las sondas se miden por quemiluminiscencia y son representativas de la cantidad de virus circulante. También tiene una sensibilidad de 500 copias/mL.

- NASBA (ORGANON TEKNIKA)

Esta prueba se basa en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, en la que después de utilizar la transcriptasa reversa y la amplificación del DNA mediante un solo proceso enzimático, el DNA resultante transcribe nuevamente mediante otra enzima a RNA, el cual es cuantificado. Tiene una sensibilidad de 400 copias/mL. La versión más reciente de este reactivo recibe el nombre de Nuclisens y tiene una sensibilidad de 80 copias/mL.

- PCR Ultrasensible

Resultados obtenidos en Specialty Labs, California USA, indican que uno de cada tres pacientes tiene cargas virales menores de 400 copias/mL, por lo que es conveniente solicitar estudios ultrasensibles con los que se puede cuantificar desde menos de 25 hasta a más de un millón de copias/mL. Estas pruebas no están recomendadas por la FDA para diagnóstico clínico y se consideran aún como de investigación, por lo que no se deberán utilizar en forma aislada, debiéndose emplear en conjunto con criterios clínicos y pruebas diagnósticas establecidas.

Las pruebas de biología molecular son capaces de detectar los virus en individuos seronegativos, tanto para el antígeno p24 como el anticuerpo HIV. Así mismo son capaces de diferenciar las infecciones HIV-1 de HIV-2. Dentro de las limitaciones se encuentran los falsos positivos que pueden ocurrir sobre todo con PCR, ya que de no emplearse estrictos controles de calidad puede haber contaminación y reacciones cruzadas en el laboratorio.

### **Interpretación de resultados**

La sociedad Internacional de SIDA (IAS) establece las siguientes recomendaciones:

- Si el nivel basal al inicio del tratamiento es de 5,000 a 10,000 copias/mL, dar tratamiento con la meta de reducir a menos de 5,000 copias/mL con pruebas de baja sensibilidad y continuar terapia hasta lograr niveles no detectables con métodos ultrasensibles.

- Frecuencia: Establecer el nivel basal, repetir a los tres meses, continuar cada seis meses si se observa mejoría.

Es conveniente enfatizar que es necesario utilizar siempre la misma metodología para el seguimiento de cada paciente, ya que de otra manera se dificultará la interpretación de los resultados.

- Cultivos virales con susceptibilidad a antivirales

La prueba de susceptibilidad in vitro mide la capacidad de diversos medicamentos (AZT, ddC, ddI) para inhibir la producción del antígeno p24 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) infectadas con HIV, estableciéndose la concentración inhibitoria media (CI50), que es la cantidad de droga necesaria para lograr una reducción del 50 % de los virus presentes en un inóculo estandarizado de virus del propio paciente. Este estudio requiere de una muestra consistente en el sobrenadante de un cultivo celular obtenido de CMSP o del plasma (sin células), enviado a temperatura ambiente, refrigerado o congelado. Como se mencionó previamente, se trata de una prueba confiable con grandes problemas de aplicabilidad (riesgo, tiempo, dificultad técnica y costo).

- Genotipificación de HIV por secuencia de aminoácidos

Los mejores resultados en el tratamiento anti-SIDA disponible son aquellos en los que se combinan varios medicamentos incluyendo un inhibidor de proteasas (IP) con dos inhibidores de transcriptasa reversa (ITR). En los Estados Unidos el costo anual aproximado con tres drogas puede llegar a ser de \$ 24,000.00 dólares. Desafortunadamente el tratamiento no está exento de efectos secundarios y la posibilidad del desarrollo de resistencia, aunque menor que cuando se usa la monoterapia, existe. El costo de un tratamiento potencialmente riesgoso e inefectivo representa una clara justificación para indicar las pruebas de resistencia a los antivirales, las cuales tienen un costo aproximado de \$ 500.00 dólares. La resistencia a los medicamentos se asocia con mutaciones que se presentan en los genes de la región pol (transcriptasa reversa) y de la región pro (proteasa), de tal manera que el



conocimiento de la secuencia de aminoácidos del HIV permite establecer si la resistencia a la reducción de las cargas virales es debida a la presencia de cepas resistentes de HIV, a la utilización de dosis farmacológicas subóptimas, a falta de absorción del medicamento, o a mutaciones mal caracterizadas. La elevación transitoria de las cargas virales puede ser también resultado de infecciones concomitantes tales como herpes simplex, influenza o vacunas. La terapia combinada reduce la probabilidad de desarrollar resistencia, aumentando la eficacia del tratamiento (cuadro VIII).

<b>Cuadro VIII.</b>	
Régimen terapéutico	Mutaciones de resistencia a inhibidores de transcriptasa reversa
ZDV	215 + 41, 67, 70, 219, 210
ddl/ddC	74 + 135, 65, 184
3TC	184
d4T	50 o 75
ZDV + ddl / ddC	62, 75, 77, 116
ZDV + 3TC	184, 210, 215
Régimen terapéutico	Mutaciones de resistencia a inhibidores de proteasas
SAQUINAVIR	48 y 90

RITONAVIR	82 y 84, 46, 71, 90
3 TC	32, 46, 71, 82
d4 T	30 y 46, 71

Aunque la respuesta in vitro tiene una alta correlación in vivo es menester recordar que existen otros factores determinantes del pronóstico del paciente, motivo por el que es necesario considerar la situación clínica integral del enfermo. Dada la eficacia de los nuevos esquemas terapéuticos es frecuente que cerca del 20% de los especímenes tengan cargas virales menores de 3,000 copias/mL, motivo por el cual más del 90% de estos casos no puedan ser sometidos a secuenciación de aminoácidos.

- Evaluación de inmunocompetencia con mitógenos. (cuadro IX)

**Cuadro IX.**  
**Inmunocompetencia celular, respuesta a mitógenos**  
**(sangre total ACD)**

Mitógenos	Valores de referencia
Candida	> 3 0
PPD	> 3.0
Tétanos	> 3.0
PHA	> 70 %
PWM	> 70 %

Con A

> 70 %

*Indice de estimulación (IE): CPM estimulados/CPM sin estímulo. Índice %: Log (IE) paciente/Log (IE) control (100)*

Se trata de un ensayo in vitro capaz de evaluar la inmunidad humoral y celular in vitro en pacientes con inmunodeficiencias, autoinmunidad, enfermedades infecciosas, cáncer y reacciones de hipersensibilidad. Los linfocitos normalmente tienen receptores para diversos mitógenos, incluyendo concanavalina A y la fitohemaglutinina entre otros, que son sustancias capaces de estimular a los linfocitos sin requerir de una exposición previa al antígeno, resultando en una proliferación de linfocitos T y B, habiéndose demostrado que existe una buena correlación entre los niveles de linfocitos T CD4+ y diversos mitógenos en los diferentes estadios de la infección por HIV.

La incorporación de timidina tritiada (3H) es el estándar de oro para medir la respuesta linfocitaria. Sin embargo, existen métodos en los que se utilizan tinciones supravitales. Recientemente ha sido descrito un método en el que la respuesta es evaluada por medio de citometría de flujo.

### **Evaluación de los costos**

El **estado actual** de la evaluación y manejo del paciente con HIV positivo con métodos de laboratorio, representa un reto desde el punto de vista médico, científico y tecnológico que debe ser analizado desde el punto de vista económico, individual y nacional. Para tal fin, proporcionamos datos obtenidos en listas de precios de laboratorios norteamericanos, los cuales aunque potencialmente inexactos dada la variabilidad existente nos permiten realizar un planteamiento suficientemente bueno para nuestros propósitos (cuadro X).

<b>Cuadro X.</b>	
Caso No. 1. Riesgo de infección	Costo aproximado en EUA (USdlls)
Detección de anticuerpo HIV-I /2 ELISA	20.00
Detección de antígeno p24	40.00
Cultivo viral	200.00
Detección de HIV por PCR	140.00
Suma	400.00
Caso No. 2.- HIV positivo	Costo aproximado en EUA (USdlls).
detección de anticuerpos HIV- I / 2 ELISA	20.00
Confirmación de infección Western Blot	30.00
Citometría de flujo	50.00
Neopterinina/ $\beta$ 2 microglobulina	30.00
Suma	130.00
Caso No. 3. Neonato	Costo aproximado en EUA (USdlls)

Detección de antígeno p24	40.00
Detección de HIV por PCR	140.00
Suma	180.00
Caso No. 4. Paciente bajo tratamiento	Costo aproximado en EUA (USdlls)
Cuatificación de cargas virales	200.00
Cultivos virales con susceptibilidad a antivirales	500.00
Genotipificación por secuencia de aminoácidos	400.00
Evaluación de inmunocompetencia	100 00
Suma	1,200.00

### Conclusión

Es claro que en los Estados Unidos el costo anual por paciente bajo tratamiento puede alcanzar los \$ 30,000.00 dólares, incluyendo el manejo con triple esquema, tratamiento sintomático, manejo de infecciones oportunistas y estudios de laboratorio y gabinete. Costos que en la actualidad son parcialmente asumidos por fuentes gubernamentales, seguridad social, compañías de seguros y la propia economía familiar o individual de los pacientes.

Dimensionar esta situación a nuestro medio exige considerar la dependencia tecnológica, los costos de la infraestructura médica y paramédica nacional, el tipo de cambio a pesos mexicanos (más de \$ 10.00 por dólar), la diferencia en los sueldos, salarios y prestaciones, e inclusive la limitación de la disponibilidad de pruebas y tratamientos nos permite estimar una cifra de atención mensual promedio que bien puede oscilar entre \$ 15,000.00 y \$ 25,000.00 dólares la cual, al extrapolarla a datos epidemiológicos resulta francamente preocupante por las implicaciones políticas y económicas, incluyendo la fuga de divisas inherente. Es obvia la urgencia de encontrar una vacuna eficaz, sobre todo para proteger a los países en desarrollo, ya que en éstos —no obstante los avances científicos y tecnológicos alcanzados hasta este momento— difícilmente se podrá atacar el problema con el enfoque diagnóstico y terapéutico aquí presentado.

### **Propuesta**

Es necesario que en México se establezca un esfuerzo conjunto entre el sector público, social y privado, integrando a las instituciones académicas dedicadas a la investigación básica y los laboratorios clínicos de referencia para generar opciones basadas en economías de escala, tendientes a facilitar el acceso de los pacientes a los recursos tecnológicos necesarios y reducir en la medida de lo posible la dependencia tecnológica y la consecuente fuga de divisas.

---

---

### **Bibliografía**

#### **Epidemiología**

1. CONASIDA <http://www.ssa.gob.mx.conasida.index.htm> Status and Trends of the Global HIV/AIDS Pandemic Satellite Symposium of the XI International Conference on AIDS 5-6 July 1996 in Vancouver, Canada.

2. Jackson JB, Kwok SY, Sninsky JJ et al. Human immunodeficiency virus type 1 detected in all seropositive symptomatic and asymptomatic individuals. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 16-9.
3. Roos MTL, Lange JMA, de Goede REY. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 427-32.
4. Lewin SR, Crowe SM. AIDS pathogenesis. *AIDS* 1994; 8: S3-11.
5. Gurtler LG, Zekeng L, Simon F, et al. Reactivity of five anti-HIV-1 subtype O specimens with six different anti-HIV screening and three immunoblots. *J Virol Methods* 1995; 51: 177-84.
6. Centers for Disease Control and Prevention. First 500,000 AIDS cases - United States, 1995. *JAMA* 1995; 274: 1827-8.
7. Imai M, Hayashi T, Kondo M, et al. Differentiation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections from HIV-2-cross-reacting antibody from mixed infections with HIV-1 and HIV-2 by serological absorption test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1727-9.
8. Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, et al. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research and prevention. *JAMA* 1996; 275: 210-6.
9. Dillner L. HIV subtype may explain sexual transmission [News]. *Br Med J* 1996; 312: 530-1.
10. Pantaleo G. Virologic and immunologic events associated with primary HIV infection, pp. 655-7. In: Fauci AS, moderator. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996; 124: 654-63.
11. Mellors J, et al. 3rd National Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Washington, D.C., January, 1996 [News in: *Science* 1996; 271: 755-6].

#### Pruebas de laboratorio

12. Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, et al. The prognostic value of cellular and serological markers in infection with HIV virus type 1. *NEJM* 1990; 322: 166-72.
13. Bylund DJ, Ziegner UHM, Hooper DG. Review of testing for human immunodeficiency virus. *Clin Lab Med* 1992; 12: 305-33.

14. Glassman AB. Human immunodeficiency virus: testing and interpretation. *Infectious Diseases Newsletter* 1992; 11: 41-3.
15. Nuwayhid NF. Laboratory test for detection of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 637-45.
16. Cordes RJ, Ryan ME. Pitfalls in HIV testing. Application and limitations of current tests. *Postgrad Med* 1995; 98: 177-89.
17. Scientific Advisory Committee on Surrogate Markers of HIV. Consensus statement. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10: S114-6.
18. Schellekens PTA, Koot M, Roos MTL, Tersmette M, Miedema F. Immunologic and virologic markers determining progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10: S62-6.
19. Fauci AS. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996; 124: 654-63.

#### Cultivos virales

20. Paul D, Knigge M, Kennedy M, Mack D, Leibowitch J. Detection of HIV-2 Ag in serum and culture by HIV-1 Ag EIA [Abstract]. Fourth International Conference on AIDS. Stockholm, Sweden: 1988.
21. Jackson JB. Human immunodeficiency virus type 1 antigen and culture assays. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 249-53.
22. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-6.

#### Ag p 24

23. Goudsmit J, Lange JMA, Paul DA, Dawson GJ. Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex, and subclinical human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1987; 155: 558-60.



24. Kingsley LA, Rinaldo C, Gupta R, et al. The temporal relationship between HIV p24 antigenemia and HIV seroconversion [Abstract]. Fourth International Conference on AIDS. Stockholm, Sweden: 1988.
25. McHugh TM, Stites DP, Busch MP, et al. Relation of circulating levels of human immunodeficiency virus (HIV) antigen, antibody to p24, and HIV-containing immune complexes in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 1988; 158: 1088-91.
26. Jackson CG, Paul DA, Falk LA, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) antigenemia (p24) in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and the effect of treatment with zidovudine (AZT). *Ann Intern Med* 1988; 108: 175-80.
27. Alter HJ, Epstein JS, Swenson SG, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen in U.S. blood donors - an assessment of the efficacy of testing in donor screening. *N Engl J Med* 1990; 323: 1312-7.
28. Rodriguez-Iglesias MA, Alvarez JR, Vergara A, Garcia-Valdivia MS, Jesus I, Mira J. Improved detection of HIV p24 antigen in serum after acid pretreatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 1: 849-50.
29. Miles SA, Balden E, Magpantay L, et al. Rapid serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. *NEJM* 1993; 328: 297-302.
30. Farley JJ, Bauer G, Johnson JP, Cole GA. Phytohemagglutinin-inducible p24 in peripheral blood mononuclear cells as a predictor of human immunodeficiency virus type 1 vertical transmission and infant clinical status. *Pediatr Inf Dis J* 1994; 13: 1079-82.
31. Duiculescu DC, Geffin RB, Scott GB, Scott WA. Clinical and immunological correlates of immune-complex-dissociated HIV-1 p24 antigen in HIV-1-infected children. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7: 807-15.
32. Singer EJ, Syndulko K, Fahy-Chandon BN, et al. Cerebrospinal fluid p24 antigen levels and intrathecal immunoglobulin G synthesis are associated with cognitive disease severity in HIV-1. *AIDS* 1994; 8: 197-204.
33. Lewis DE, Adu-Oppong A, Hollinger FB, et al. Sensitivity of immune complex-dissociated p24 antigen testing for early detection of human immunodeficiency virus in infants. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 87-90.
34. Bulterys M, Farzadegan H, Chao A, et al. Diagnostic utility of immune-complex-dissociated p24 antigen detection in perinatally acquired HIV-1 infection in Rwanda. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10: 186-91.
35. Morand-Joubert L, Bludau H, Lerable J, Petit JC, Lefrere JJ. Serum anti-p24 antibody concentration has a predictive value on the decrease of CD4 lymphocyte count

higher than acid-dissociated p24 antigen. *J Med Virol* 1995; 47: 87-91.

## ELISA y Western blot

36. Paul DA, Falk LA, Kessler HA, et al. Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status in HIV-infected patients. *J Med Virol* 1987; 22: 357-63.

37. Moss AR, Bacchetti P, Osmond D, et al. Seropositivity for HIV and the development of AIDS or AIDS related condition: three year follow up of the San Francisco General Hospital cohort. *Br Med J* 1988; 296: 745-50.

38. Interpretation and use of Western blot assay for serodiagnosis of HIV type 1 infections. *MMWR* 1989; 38 (No s-7): 1-7.

39. Jackson JB, MacDonald KL, Cadwell J, et al. Absence of HIV infection in blood donors with indeterminate Western blot tests for antibody to HIV-1. *N Engl J Med* 1990; 322: 217-22.

40. Schwander S, Braun RW, Kuhn JE, et al. Prevalence of antibodies to recombinant virion infectivity factor in the sera of prospectively studied patients with HIV-1 infection. *J Med Virol* 1992; 36: 142-6.

41. Celum CL, Coombs RW, Jones M, et al. Risk factors for repeatedly reactive HIV-1 EIA and indeterminate western blots. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1129-37.

42. Asihene PJ, Kline RL, Moss MW, Carella AV, Quinn TC. Evaluation of rapid test for detection of antibody to human immunodeficiency virus type 1 and type 2. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1341-2.

43. Busch MP, Lee LLL, Satten GA, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion* 1995; 35: 91-7.

44. Matter L, Germann D. Detection of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 antibodies by new automated microparticle enzyme immunoassay for HIV types 1 and 2. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2338-41.

45. Jayaraman KS. India refining simple HIV test [News]. *Nature Med* 1995; 1: 984.

46. Imai M, Hayashi T, Kondo M, et al. Differentiation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections from HIV-2-cross-reacting antibody from mixed infections with HIV-1 and HIV-2 by serological absorption test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1727-9.

## Citometría

47. Chaisson RE, Allain J-P, Luther M, Volderding PA. Monocytes in AIDS [Letter]. *N Engl J Med* 1986; 315: 1610-1.
48. Terrés Speziale AM. Utilidad de la cuantificación de linfocitos totales en SIDA. *Rev Mex Pat Clin* 1988; 35: 2.
49. Melmed RN, Taylor JMG, Detels, et al. Serum neopterin changes in HIV infected subjects: indicator of significant pathology, CD4 T cell changes and the development of AIDS. *J Acquir Immune Def Syndrome* 1989; 2: 70-6.
50. Raboud JM, Haley L, Montaner JSG, Murphy C, Januszewska M, Schechter MT. Quantification of the variation due to laboratory and physiologic sources in CD4 lymphocyte counts of clinically stable HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Human Retrovirol* 1995; 10: S67-73.
51. Johnson D, Hirschhorn D, Busch MP, et al. Evaluation of four alternative methodologies for determination of absolute CD4+ lymphocyte counts. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10: 522-30.
52. 1997 Revised Guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with HIV. *MMWR* 1997; 46 (No RR-2): 1-29.

## Transmisión materno-fetal

53. Andiman WA, Silva TJ, Shapiro ED, O'Connor T, Olson B. Predictive value of the human immunodeficiency virus 1 antigen test in children born to infected mothers. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 436-40.
54. Bryant ML, Ratner L. Biology and molecular biology of human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 390-400.
55. Brozar Y, Aubin J-T, Mandelbrot L, et al. Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. *AIDS* 1995; 9: 359-66.

56. Peckham C, Gibb D. Mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus. *NEJM* 1995; 333: 298-302.
57. Fang G, Burger H, Grimson R, et al. Maternal plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level: A determinant and projected threshold for mother-to-child transmission. *PNAS USA* 1995; 92: 12,100-04.
58. Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, et al. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load. *JAMA* 1996; 275: 599-605.
59. Mayaux M-J, Burgard M, Teglas J-P, et al. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. *JAMA* 1996; 275: 606-10.
60. Newell M-L, Dunn D, De Maria A, et al. Detection of virus in vertically exposed HIV-antibody-negative children. *Lancet* 1996; 347: 213-5.
61. DeRossi A, Masiero S, Giaquinto C, et al. Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Invest* 1996; 97: 323-30.
62. Bush CE, Donovan RM, Markowitz N, Baxa D, Kvale P, Saravolatz LD. Gender is not a factor in serum human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in patients with viremia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 970-2.

#### Biología molecular

63. Ou C-Y, Kwok S, Mitchell SW, et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239: 295-7.
64. Bootman JS, Kitchin PA. An international collaborative study to assess a set of reference reagent for HIV-1 PCR. *J Virol Methods* 1992; 37: 23-42.
65. Sevall JS, Prince H, Garratty G, O'Brien WA, Zack JA. Rapid enzymatic analysis for HIV-1 DNA in clinical specimens. *Clin Chem* 1993; 39: 433-9.
66. Bruisten SM, Mientjes GHC, van Delft P, et al. HIV-1 infection detected by polymerase chain reaction frequently precedes antibody seroconversion in drug users. *AIDS* 1994; 8: 1736-7.
67. Loussert-Ajaka I, Simon F, Farfara I, et al. Comparative study of single and nested PCR for the detection of proviral HIV2 DNA. *Res Virol* 1994; 145: 337-42.

68. Gorrino MT, Campelo C, Suarez MD, Santamaria A, Malave C, Cisterna R. Detection of human immunodeficiency virus type 1 by PCR before seroconversion in high-risk individuals who remain seronegative for prolonged periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 271-6.
69. Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, Oakes JW, Saah A, Pomerant RJ. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men. *AIDS* 1994; 8: 1669-74.
70. Fouchier RAM, Brouwer M, Broersen SM, Schuitemaker H. Simple determination of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing V3 genotype by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 906-11.
71. Hsia K, Tsai V, Zvaifler NJ, Spector SA. Low prevalence of HIV-1 proviral DNA in peripheral blood monocytes and dendritic cells from HIV-1-infected individuals. *AIDS* 1995; 9: 398-9.
72. Janssens W, Fransen K, Loussert-Ajaka I, et al. Diagnosis of HIV-1 group O infection by polymerase chain reaction. *Lancet* 1995; 346: 451-2.
73. Kovacs A, Xu J, Rasheed S, et al. Comparison of a rapid nonisotopic polymerase chain reaction assay with four commonly used methods for the early diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in neonates and children. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 948-54.
74. Kappes JC, Saag MS, Shaw GM, et al. Assessment of antiretroviral therapy by plasma viral load testing: standard and ICD HIV-1 p24 antigen and viral RNA (QC-PCR) assays compared. *J Acquir Immune Def Syndr* 1995; 10: 139-49.
75. Zella D, Cavicchini A, Cattaneo E, Cimarelli A, Bertazzoni U. Utilization of a DNA enzyme immunoassay for the detection of proviral DNA of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 1995; 3: 155-64.
76. Sethoe SY, Ling AE, Sng EH, Montiero EH, Chan RKW. PCR as a confirmatory test for human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals with indeterminate Western blot (immunoblot) profiles. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3034-6.
77. Angeles Munoz-Fernandez M, Navarro J, Garcia Montes M, Cosin J, Zabay JM, Fernandez-Cruz E. Quantification of low levels of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in p24 antigen-negative, asymptomatic, HIV-positive patients by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 404-8.

Tratamiento

78. Northfelt DW. Evaluation and treatment of the later manifestations of HIV infection. *Prim Care* 1992; 19: 57-85.
79. Mascola JR, McNeil JG, Burke DS. AIDS vaccines. Are we ready for human efficacy trials? *JAMA* 1994; 272: 488-9.
80. Fauci A. Immunopathogenic mechanisms of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Am J Med* 1995; 99: 59S-60S.
81. Winslow DL, Otto MJ. HIV protease inhibitors. *AIDS* 1995; 9: S183-92.
82. Richman DD. Protease uninhibited. *Nature* 1995; 374: 494.
83. Richman DD. Drug resistance in relation to pathogenesis. *AIDS* 1995; 9: S49-53.
84. Ruffault A, Michelet C, Jacquelinet C, et al. The prognostic value of plasma viremia in HIV-infected patients under AZT: a two-year follow-up study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995; 9: 243-8.
85. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995; 374: 569-71.
86. Roberts NA. Drug-resistance patterns of saquinavir and other HIV proteinase inhibitors. *AIDS* 1995; 9: S27-32.
87. Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996. Recommendations of an international panel. *JAMA* 1996; 276: 146-54.
88. Jacobsen H, Hangii M, Ott M, et al. In vivo resistance to a human immunodeficiency virus type 1 proteinase inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J Infect Dis* 1996; 173: 1379-87.
89. Ponce de León: Tratamiento específico de la infección por HIV. Guía para la atención médica de pacientes con infección por HIV/SIDA en consulta externa y hospitales. CONASIDA 1997.pag 27.

#### Cargas virales

90. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, et al. Determination of plasma viral load in HIV-1

infection by quantitative competitive polymerase chain reaction. *AIDS* 1993; 7: S65-71.

91. D'Aquila RT. HIV-1 chemotherapy and drug resistance. *Clin Diagn Virol* 1995; 3: 299-316.

92. Rinaldo C, Huang X-L, Fan Z, et al. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* 1995; 69: 5838-42.

93. Volberding PA. HIV quantification: clinical applications. *Lancet* 1996; 347: 71-3.

94. Katzenstein TL, Pedersen C, Nielsen C, Lundgren JD, Jakobsen PH, Gerstoft J. Longitudinal serum HIV RNA quantification: correlation to viral phenotype at seroconversion and clinical outcome. *AIDS* 1996; 10: 167-73.

95. Marfaing-Koka A, Aubin J-T, Grangeot-Keros L, et al. In vivo role of IL-6 on the viral load and on immunological abnormalities of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 11: 59-68.

96. David D: Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996: 277, 1124-1125.

97. Saang MS. HIV Viral Load Markers in Clinical Practice. *Nature Medicine* 1996; 2: 625-629.

## Genotipos

98. Rayfield M, De Cock D, Heward W, et al. Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988; 158: 1170-6.

99. Gu Z, Gao Q, Salomon H, Wainberg MA. A novel mutation at codon 50 in the HIV-1 pol gene that encodes resistance to 2', 3'-dideoxy-3'-deoxythymidine (d4T). National Conference on Human Retroviruses and Related Infection (1st), December 12-16, 1993.

100. Frenkel LM, Wagner LE, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S. Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 342-7.

101. Di Stefano M, Sabri F, Leitner T, et al. Reverse transcriptase sequence of paired isolates of cerebrospinal fluid and blood from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 during zidovudine treatment. *J Clin Microbiol* 1995; 33:

352-5.

102. Holodniy M, Mole L, Margolis D, et al. Determination of human immunodeficiency virus RNA in plasma and cellular viral DNA genotypic zidovudine resistance and viral load during zidovudine-didanosine combination therapy. *J Virol* 1995; 69: 3510-6.

103. Kavlick MF, Shirasaka T, Kojima E, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolated from patients receiving (-)-2'-3'-dideoxy-3'-thiacitidine. *Antiviral Res* 1995; 28: 133-46.

104. Merigan TC, Hirsch RL, Fisher AC, Meyerson LA, Glodstein G, Winters MA. The prognostic significance of serum viral load, codon 215 reverse transcriptase mutation and CD4+ T cells on progression of HIV disease in a double-blind study of thymopentin. *AIDS* 1996; 10: 159-65.

#### Infecciones oportunistas

105. Kaplan JE, Masur H, Holmes KK, et al. USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus: An overview. *Clin Infect Dis* 1995; 21: S12-31.

106. Kaplan JE, Masur H, Jaffe HW, Holmes KK. Reducing the impact of opportunistic infections in patients with HIV infection. New guidelines. *JAMA* 1995; 274: 347-8.

#### Vacunas

107. Hanson CV. Measuring vaccine-induced HIV neutralization: report of a workshop. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 645-8.

108. Belshe RB, Graham BS, Keefer MC, et al. Neutralizing antibodies to HIV-1 in seronegative volunteers immunized with recombinant gp120 from the MN strain of HIV-1. *JAMA* 1994; 272: 475-80.

109. Schwartz DH, Mazumdar A, Winston S, Harkonen S. Utility of various commercially available human immunodeficiency virus (HIV) antibody diagnostic kits for use in conjunction with efficacy trials of HIV-1 vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 268-71.



