

R. 15682
0.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

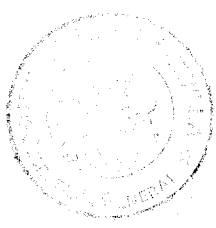
Comité de Publicaciones de la Facultad de Medicina
al nº 214 de la serie 46 del libro
de la biblioteca nº 3001 1989
Sevilla, 1989

El Jefe del Registro de Publicaciones,

Rosa de Joffe

T.D.
5/53

**DETERMINACION SERICA DEL VIH-Ag:
VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ Y
UTILIDAD PRONOSTICA
EN PACIENTES CON INFECCION POR VIH**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Deposito en

el día de mes de año desde el día

de 19

de 19

EL DIRECTOR DE

TESIS DOCTORAL

BASILIO SOTO ESPINOSA DE LOS MONTEROS

SEVILLA, 1989



AVDA. DR. FEDRIANI S/N
SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
—
DIRECCION

RAMON PEREZ CANO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA:

AUTORIZA: a D. Basilio Soto Espinosa de los Monteros, Licenciado
en Medicina y Cirugía, a presentar el trabajo titulado "DETERMINA-
CION SERICA DEL VIH-Ag: VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ Y UTILIDAD
PRONOSTICA EN PACIENTES CON INFECCION POR VIH", para optar al
título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla a veinticinco
de Septiembre de mil novecientos ochenta y nueve.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Departamento de Medicina
DIRECCION
Prof. Dr. R. Pérez Cano

Fdo.: R. Pérez Cano

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA

Consejería de Salud

FERNANDO ANDREU KERN, Profesor Titular del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla y Jefe del Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario - "Virgen del Rocío".

C E R T I F I C A:

Que el trabajo de investigación que lleva - por título: "DETERMINACION SERICA DEL VIH-Ag: VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ Y UTILIDAD - PRONOSTICA EN PACIENTES CON INFECCION POR VIH", efectuado por el Licenciado D. BASILIO SOTO ESPINOSA DE LOS MONTEROS, bajo la Dirección de los Dres.: D. Manuel Leal Noval y D. Eduardo Lissen Otero, reúne las condiciones para ser leída y defendida públicamente como Tesis Doctoral.

Sevilla, 22 de Septiembre, 1989

Fdo.: Prof. F. Andreu Kern



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA

Consejería de Salud

MANUEL LEAL NOVAL, Profesor Asociado del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla, Médico Adjunto del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario "Virgen del Rocío", y EDUARDO LISSEN OTERO, Profesor Asociado del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla y Jefe de Sección del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario "Virgen del Rocío",

C E R T I F I C A N:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: DETERMINACION SERICA DEL VIH-Ag: VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ Y UTILIDAD PRONOSTICA EN PACIENTES CON INFECCION POR VIH", ha sido realizada bajo nuestra Dirección por el Licenciado D. BASILIO SOTO ESPINOSA DE LOS MONTEROS, y que reúne las condiciones para ser leída y defendida públicamente como Tesis Doctoral.

Sevilla, 22 de Septiembre, 1.989

Fdo.:

Dr. E. Lissen Otero

Fdo.: Dr. M. Leal Noval

A G R A D E C I M I E N T O S

A los Dres. Manuel Leal Noval y Eduardo Lissen Otero, grandes maestros y buenos amigos, por la dirección de esta Tesis y sus mejores consejos.

A la Dra. Concepción Rey Romero, por su colaboración importante, seria y desinteresada.

Al Dr. Armando Sánchez Quijano, por su inestimable - ayuda, por su paciencia y su amistad siempre demostrada.

Al resto de mis compañeros de mi Grupo de Trabajo, por el estímulo constante que siempre recibí de ellos.

Al Prof. Dr. D. Fernando Andreu Kern, que siempre estuvo dispuesto a cualquier sugerencia y por la amable acogida que me brindó desde un principio.

A mis padres, por su apoyo incondicional de siempre y sus buenos deseos.

Dedico este Trabajo a Angeles,
mi esposa y a mis dos hijos Ba
silio y Angeles, porque ellos
me hicieron abrigar un mundo -
lleno de ilusiones y esperan-
zas renovadas.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	35
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y METODOS	40
RESULTADOS	60
DISCUSION	73
CONCLUSIONES	85
RESUMEN	86
BIBLIOGRAFIA	95

INTRODUCCION

I. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue descubierto en 1983 (1) tras dos años de una intensa investigación, que se había iniciado desencadenada por las primeras descripciones de unos casos clínicos que, aunados bajo la denominación de Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hacían su aparición en Nueva York en el verano de 1981 (2, 3).

Los primeros aislados virales fueron denominados de forma diferente por los distintos investigadores: "Lymphadenopathy-associated virus" (LAV) o Virus asociado a linfadenopatía (4), "AIDS-associated Retrovirus" (ARV) o Retrovirus asociado al SIDA (5, 6) y "Human T-lymphotropic virus type III" (HTLV-III) o Virus linfotrofo de células T humanas tipo III (7). Para evitar confusiones y habiéndose demostrado que estos aislados constituían variantes de un mismo virus (8), el Comité Internacional para la Taxonomía de los virus propuso la denominación común de Virus de la Inmunodeficiencia Humana o VIH (9), denominación que ha sido aceptada por la Organización Mundial de la Salud.

Tres años mas tarde, en 1986, se aisló un nuevo retrovirus humano implicado como el anterior en la etiología del SIDA y procesos relacionados que fue

denominado VIH-2 (10). Este virus presenta claras diferencias genéticas con el VIH-1, sobre todo en la región que codifica las proteínas de la envoltura viral; además, su potencial patogénico no está tan claramente definido como en el primero. El VIH-2 se concentra fundamentalmente en Africa Occidental, mientras que el VIH-1 se extiende por todo el centro de Africa y otras zonas del mundo entre la que se incluye nuestro propio país, España.

A lo largo de todo este trabajo se hace referencia de manera exclusiva al VIH-1.

I.1. DEFINICION

El VIH pertenece a una familia denominada Retroviridae (subfamilia Lentivirinae) (11-12) y como tal, posee una envoltura de naturaleza glicoproteica y codifica su información genética en forma de ARN de cadena única. Dicha información, para ser operativa, necesita integrarse en el genoma de la célula infectada bajo la forma de ADN de doble cadena y este paso obligado de ARN a ADN, es catalizado por una enzima viral denominada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (13). Dicho "retroceso" en el ciclo genético justifica precisamente la denominación de RETROVIRUS

I.2. ASPECTOS MORFOLOGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

La morfogénesis del VIH ha podido ser observada mediante microscopía electrónica. En líneas generales podemos distinguir en las preparaciones microscópicas, tres estadios morfológicos (13, 14):

1. El brote de partículas, sobresaliendo de la membrana de la célula infectada, a cuya superficie interna se encuentra unida por material compacto la ribonucleoproteína del núcleo viral o core, la cual adquiere aspecto de media luna.

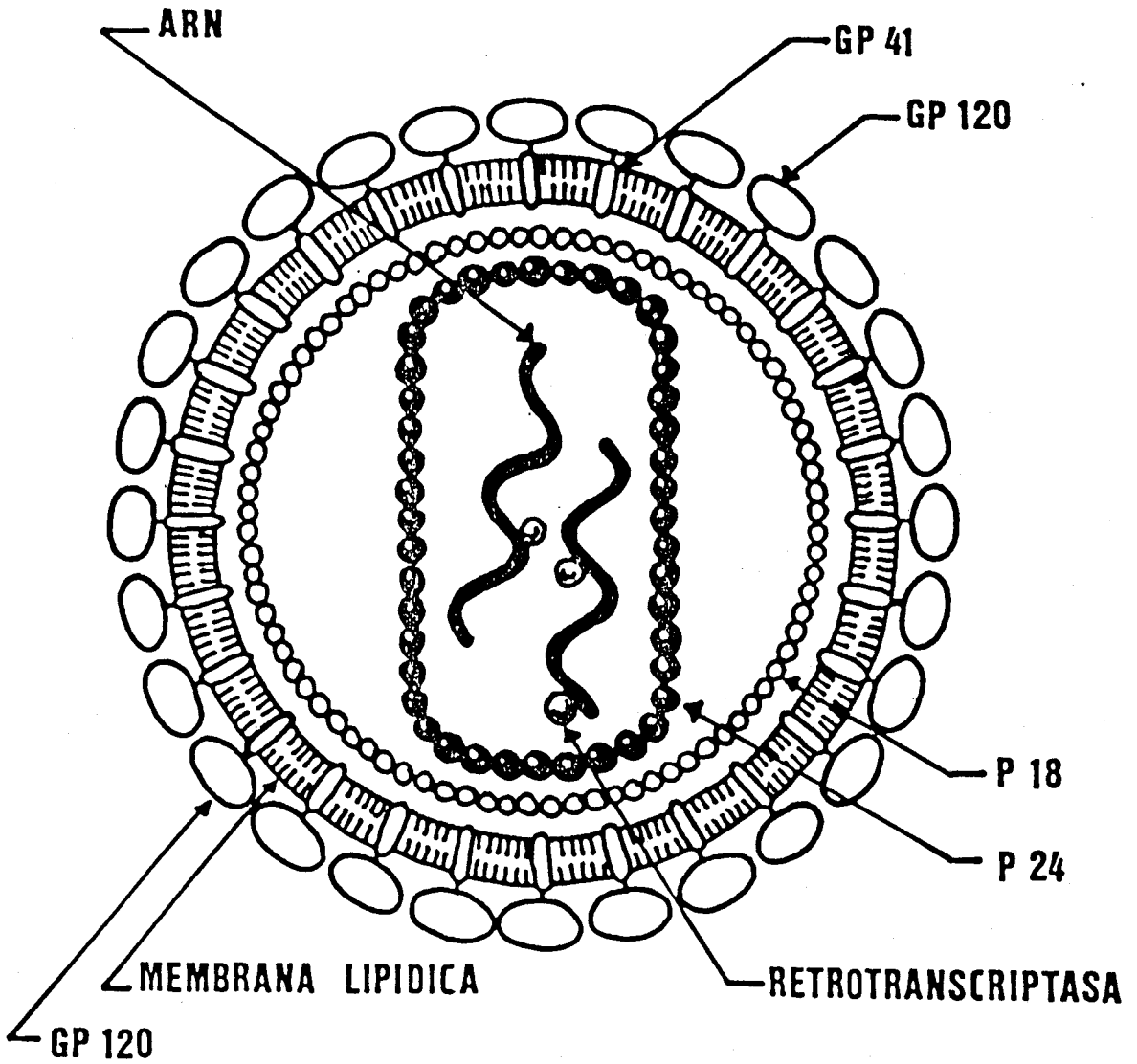
2. El virión inmaduro, partícula libre extracelular, que muestra unas prolongaciones hacia el exterior de su cubierta y un core aun no condensado.

3. El virión maduro, en el que las prolongaciones al exterior parecen más pequeñas que las observadas en el estadio anterior apreciándose, además un pequeño core circular y excéntrico, a veces cilíndrico, y condensado.

El virión del VIH se muestra como una pequeña esfera que mide transversalmente unos 1.000 amgstrongs. Su envoltura externa la constituye una membrana lipídica de doble capa que procede de la membrana externa de la célula infectada y glicoproteínas de codificación viral que poseen 2 componentes, uno con un peso molecular aproximado de 120 kd que sobresale de la membrana y el

segundo, de unos 41 kd, que la atraviesa en todo su grosor denominándose por ello, proteína transmembrana. Bajo este complejo lipoproteico que constituye la envoltura viral, se encuentra la nucleocápside o core del virión formado por proteínas estructurales (fundamentalmente la p24 y la p18), el ARN viral de cadena única y un complejo enzimático formado por la transcriptasa inversa, ribonucleasa, integrasa y otras proteasas (fig.1).

Figura 1
ESTRUCTURA DEL VIH

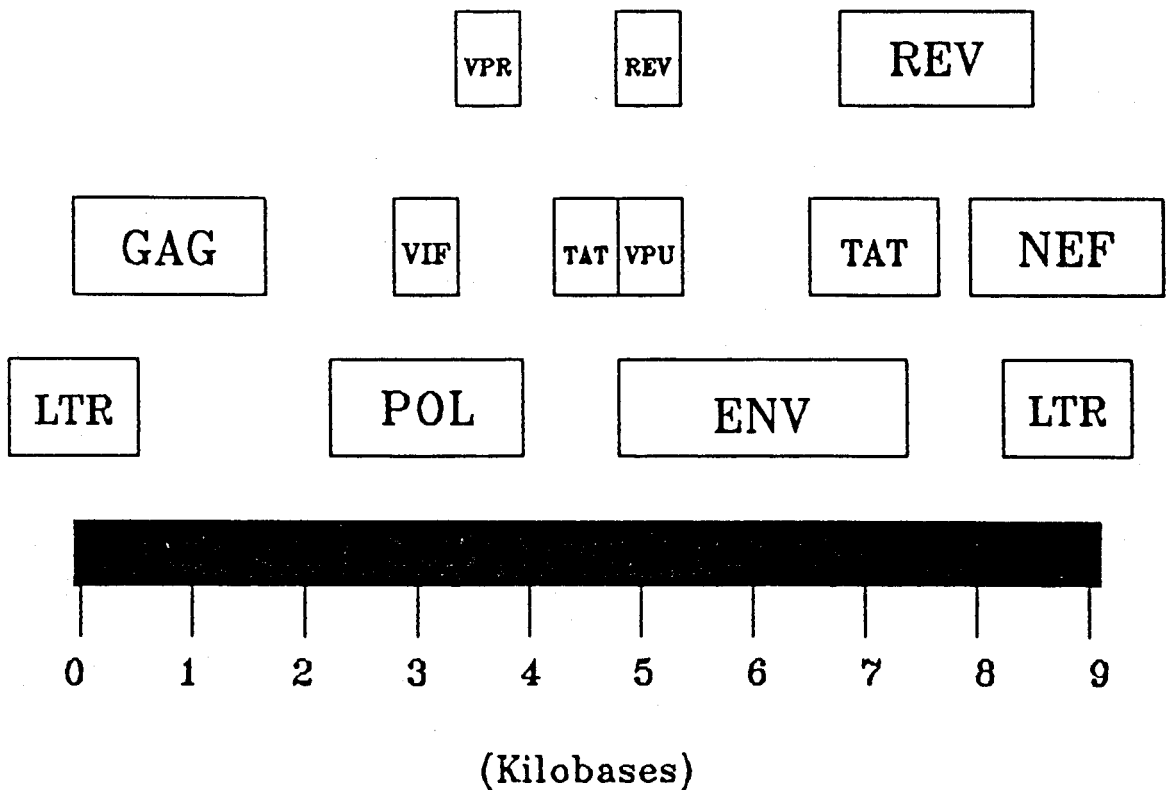


I.3. ESTRUCTURA GENOMICA Y ANTIGENOS DEL VIH

El desarrollo y la aplicación de las técnicas y conocimientos sobre recombinación genética han hecho posible el clonaje molecular de los genes del VIH y, por ende, determinar la organización de su genoma (fig.2), que presenta algunas características dignas de ser mencionadas. En primer lugar, su heterogeneidad (15, 16) que afecta de modo especial a la región ENV; en segundo lugar posee, además de las LTR ("repeticiones terminales largas") y de los genes GAG, POL y ENV comunes a todos los RV, un sistema de regulación genética modulado por varios genes que le otorga una mayor complejidad. Algunos de los productos del genoma viral han sido caracterizados (14), conociéndose de ellos al menos parcialmente, sus propiedades biológicas (Tabla 1). Haciendo un estudio desglosado del sistema genético del VIH, podemos distinguir (Tabla 2):

- 1) LTR. Constituyen secuencias de nucleótidos que flanquean ambos extremos del genoma y dirigen o regulan la expresión de los genes virales (17). En estas LTR se sitúan una secuencia activadora o TAR y una secuencia represora de la transcripción de los genes virales o NER, como posteriormente veremos.

Figura 2
ESTRUCTURA GENETICA DEL VIH



2) Gen GAG. Codifica las proteínas del core viral. El producto inicial es una proteína con peso molecular aproximado de 55 kd (p55), la cual se hiende para dar lugar a tres proteínas que son la p24 o proteína mayor del core, p18 y p15 (18). Estos productos del gen GAG son inmunógenos e inducen en el huésped infectado la producción de anticuerpos que neutralizan la replicación vírica (19)

3) Gen POL. Codifica fundamentalmente la RT, además de una ribonucleasa y una integrasa. Al parecer, los inhibidores de la replicación viral actúan sobre la RT y la proteasa, por lo que probablemente un detallado conocimiento de las actividades enzimáticas codificadas por este gen POL, podría abrir nuevos caminos en lo que respecta al tratamiento del SIDA (20).

4) Gen ENV. Codifica las proteínas de la envoltura viral. El producto inicial es una proteína de 90 kd que posteriormente se glicosila, dando lugar a la glicoproteína gp160 de la que derivan la gp120 y la gp41 (21, 22). Estas proteínas adquieren gran trascendencia por cuanto son las más inmunógenas en individuos infectados, inducen anticuerpos neutralizantes en animales, permiten el acceso del virus a la célula interactuando con el receptor de esta última (23, 24) y contribuyen a la citopatogenicidad viral induciendo transformación sincitial en las células infectadas (25, 26, 27).

5) Región Central. En esta zona del genoma se ubica el sistema de regulación genética viral, constituido por los genes TAT, REV , NEF y VIF, que mantienen un papel esencial en la replicación del virus y que a continuación exponemos:

5.a) El gen TAT codifica una proteína de 14 kd (p14) que estimula la expresión de los genes virales al interactuar con un elemento genético situado en las LTR que se denomina elemento de respuesta a la transactivación o TAR (28, 29). La expresión de este gen es crítica para la replicación viral (30) y junto a los productos codificados por el gen REV que a continuación especificamos, se muestra responsable del complejo ciclo vital del virus (31).

5.b) El gen REV, inicialmente denominado ART, codifica una proteína recientemente identificada de 19 kd (p19) que puede detectarse en el suero de individuos infectados por el VIH.



Tabla 1
PRINCIPALES ANTIGENOS DEL VIH

ANTIGENO	ORIGEN GENOMICO	FUENTE PRINCIPAL
gp160	ENV	Células infectadas
gp120	ENV	Células infectadas
gp41	ENV	Concentrados víricos
p55	GAG	Células infectadas
p24	GAG	Concentrados víricos
p18	GAG	Concentrados víricos

Los ARNm que codifican las proteínas de la nucleocápside y de la envoltura virales poseen una región genética represora CRS y otra antirrepresora denominada CAR que neutraliza la señal inhibidora de la anterior. La proteína codificada por el gen REV actúa sobre la región CAR, permitiendo la síntesis de proteínas al quedar inhibida la señal represora de la región CRS. De otro lado, los ARNm que codifican las proteínas reguladoras TAT, NEF y la propia REV, no poseen secuencia CRS por lo que su síntesis, al contrario de las proteínas de la nucleocápside y de la envoltura (proteínas del virión) no se ve afectada en ausencia de la proteína REV. Es decir, el gen REV a través de la proteína que codifica, se comporta como un regulador selectivo, ya que con su presencia se producen tan sólo proteínas del virión y en su ausencia, por el contrario son las proteínas reguladoras las que de manera exclusiva son sintetizadas. Además, este gen, junto con el anteriormente citado TAT, se muestra absolutamente indispensable para la síntesis de la proteína de la envoltura viral gp120, ya que en estudios realizados con virus manipulados, se demuestra que ésta última no se produce en ausencia de dichos genes (25). Este hecho puede tener notable importancia desde el punto de vista terapéutico, ya que si se consiguiera inhibir de alguna manera la expresión de estos genes reguladores y, por lo tanto, la síntesis de las proteínas de la envoltura,

se anularían los mecanismos patógenos que estas inducen: acceso del VIH a la célula y citopatogenicidad del mismo. Por otro lado y como ya se reseñara anteriormente, este gen también está implicado en la variabilidad del ciclo biológico viral (31).

5.c) El gen NEF cuya denominación anterior fue 3'ORF, es una estructura genética de lectura abierta que codifica una proteína de unos 27 kd (p27) que puede ser caracterizada a partir de células infectadas. A la función activadora del gen TAT y a la regulación selectiva fomentada por el gen REV hay que añadir la regulación negativa que este gen NEF realiza sobre la transcripción de los genes virales.

En las LTR, además de la secuencia activadora TAR, puede localizarse una segunda secuencia de nucleótidos denominada NER, elemento regulador negativo que por sí mismo es capaz de reprimir la transcripción genética del virus. La proteína NEF o p27 actúa, a través de la activación de factores de la propia célula infectada, amplificando el efecto represor de la región NER y determinando quizás por ello la capacidad que tiene el VIH para paralizar su desarrollo y permanecer en fase de latencia.

5.d) El gen VIF, antes denominado SOR (factor de infectividad viral), codifica una proteína de 23 kd (p23) que parece cumplir un papel esencial en la

infectividad del VIH. Esta proteína actúa en la fase en que el VIH libre, mediante la acción de las proteínas de la envoltura se une al receptor CD4 de la célula diana, perfora su membrana e inicia la fusión para posteriormente introducir en ella su material genético. En ausencia de la proteína VIF la transmisión de las partículas virales libres al interior de la célula está dificultada, no siendo así en el caso de transmisión célula-célula.

Este producto genético tiene poder inmunógeno y ha sido detectado en pacientes infectados por el VIH sin mostrar correlación alguna con la situación clínica de estos y, en menor proporción en donantes de sangre no relacionados con esta infección. Se ha sugerido que la baja seropositividad que presentan los pacientes infectados frente a esta proteína pudiera constituir el reflejo de una baja inmunogenicidad o bien, de una infrecuente exposición de dicho antígeno al sistema inmune (32).

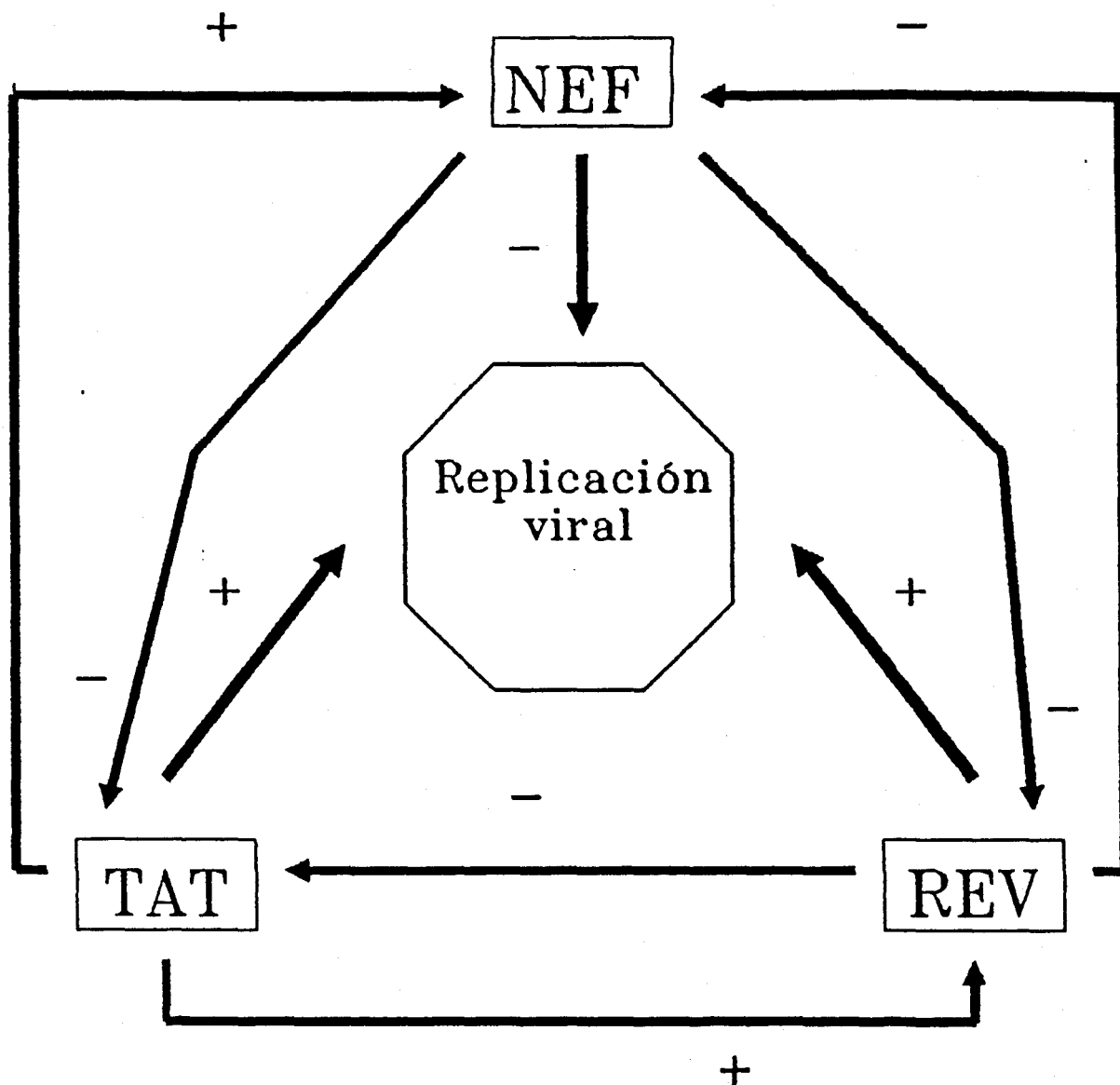
Tabla 2
GENES VIH Y FUNCION BIOLOGICA

GEN	FUNCION BIOLOGICA
GAG	Proteinas nucleocápside
POL	Enzimas
ENV	Proteinas envoltura
TAT	Regulador positivo
REV	Regulador diferencial
VIF	Factor de infectividad
VPR	Desconocida
VPU	Desconocida
NEF	Regulador negativo

Otros genes como VPU y VPR se han identificado aunque la función biológica que pudieran realizar a través de los productos que codifican se desconoce actualmente.

En resumen, el VIH se ha provisto de un sistema de regulación genética que permite, mediante la interacción de los genes que lo componen, un control sobre la propia replicación viral. Este crecimiento controlado le otorga al virus la capacidad de reproducirse durante años, sin eliminar a las células hospedadoras, rasgo este que puede considerarse como de carácter adaptativo. Este sistema de integración genética reguladora, queda reflejado en la figura 3.

Figura 3
REGULACION GENETICA DEL VIH



I.4. CICLO BIOLÓGICO DEL VIH

Como ocurre en cualquier infección vírica, la unión del VIH con la célula huésped constituye el primer paso en su ciclo biológico; dicha unión se produce por la interacción entre la proteína gp120 de la envoltura viral y el receptor de membrana celular CD4 (23,24, 33). La función de esta proteína como receptor viral explica la afinidad que presenta el VIH por ciertas células, de forma particular, el linfocito T4 cooperador/inductor de la respuesta inmune (24), el linfocito de estirpe B, células del sistema mononuclear-fagocítico (34), células endoteliales y células gliales del sistema nervioso entre otras (35-38). Los monocitos resisten relativamente bien los efectos citopáticos del VIH, probablemente debido a que tienen una expresión de receptores CD4 disminuida, pudiendo contribuir con ello a la persistencia del virus en el organismo (39), diseminándolo a otros órganos como pulmón y cerebro (40).

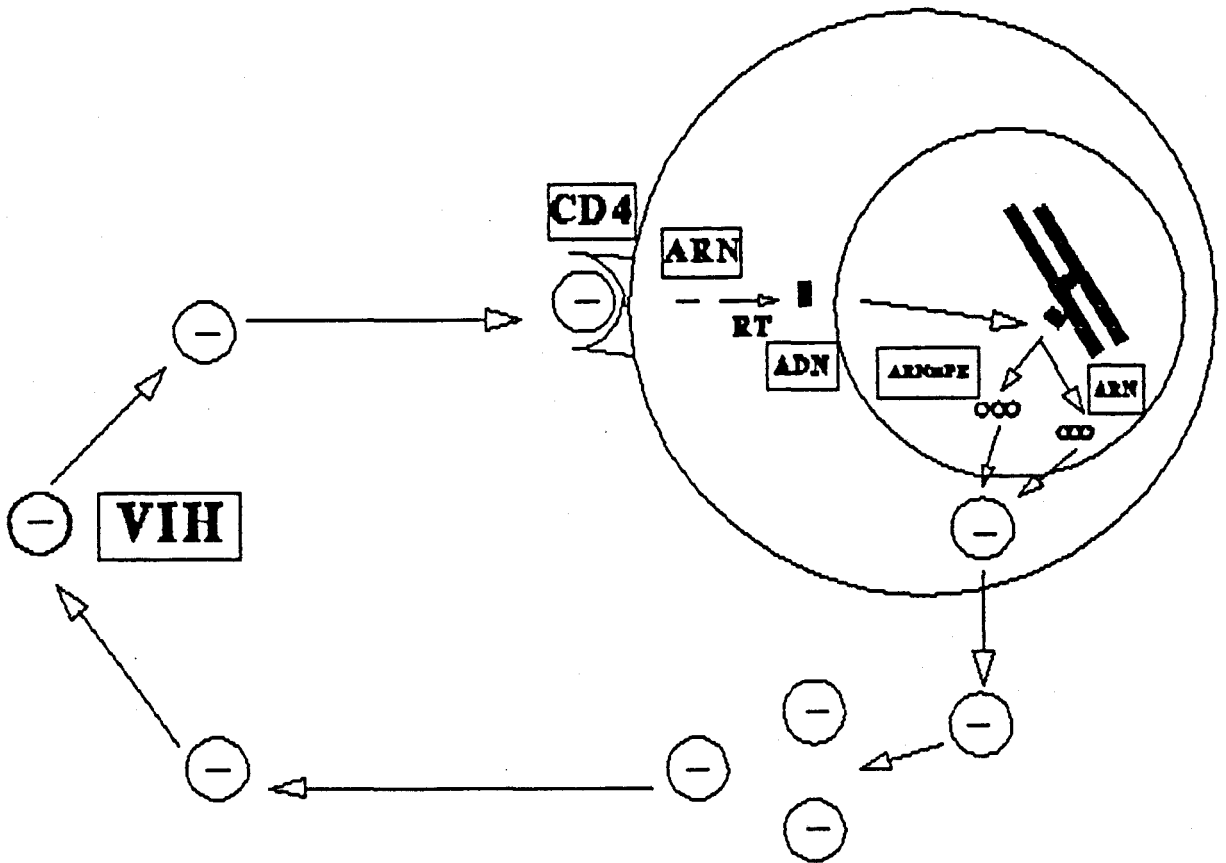
La interacción gp120-receptor CD4, por el cambio conformacional que produce en la proteína de la envoltura viral, pone al descubierto la gp41. Esta glicoproteína se introduce en la membrana celular con la avidez que le confiere su carácter hidrofobo, a modo de perforadora, induciendo la fusión de la envuelta del virus con la membrana plasmática de la célula y asegurando la entrada del material genético del VIH en

esta última. Este posible mecanismo de fusión directa puede explicar asimismo, la formación sincitial que induce el VIH en las células que infecta, fundamentalmente en los cultivos celulares (13, 41).

Una vez que el virión penetra en la célula, la RT que lleva incorporada en el core, transcribe el ARN viral en ADN de doble cadena, el cual puede migrar hacia el núcleo celular integrándose en su genoma en forma de provirus o bien puede permanecer en el citoplasma como forma no integrada (42). El provirus integrado puede quedar en estado quiescente o bien expresarse induciendo la producción de nuevas partículas virales o incluso la formación de sincitios que mueren poco después de aparecer (13). La expresión génica y con ello la replicación viral, parece estar inducida por la activación de la célula huésped y la acción de ciertos genes reguladores fundamentalmente TAT y ART (25, 28, 29, 30). Tras la replicación del VIH, en la fase lítica del ciclo, se produce la muerte de la célula huésped por un efecto citopático directo, y las nuevas partículas virales salen de ella por gemación, dispuestas a infectar nuevas células (Figura 4). Este ciclo biológico es complejo y variable y viene caracterizado por periodos de latencia, que alternan con diferentes grados de actividad replicativa y efecto citopático (43). Ello podría traducirse funcionalmente, por la incapacidad de los linfocitos T4 para reconocer y responder a antígenos solubles (44) y posteriormente,

por una profunda linfopenia, circunstancia esta, observada en los pacientes con SIDA. Aquí radica precisamente la virulencia del VIH, esto es, en la capacidad de devastar un sistema concebido para la defensa del organismo frente a las agresiones externas, como es el sistema inmunológico, incapacitando funcionalmente y aniquilando a la pieza clave en la generación y regulación de la respuesta inmune, que es el linfocito T4. Por otro lado, la complejidad del comportamiento biológico de este virus podría explicar la variabilidad de situaciones clínicas que induce, así como la dinámica de los marcadores serológicos que se expone en el siguiente apartado.

Figura 4
CICLO BIOLÓGICO DEL VIH



RT: Retrotranscriptasa

ARNmPE: ARN para proteínas estructurales

II. EXPRESION SEROLOGICA DE LA INFECCION POR EL VIH

La infección por el VIH genera en el huésped una serie de respuestas, que corren a cargo del sistema inmunitario. Una de estas respuestas es la humoral, por la cual, los antígenos virales inducen la producción de anticuerpos específicos dirigidos contra ellos. La identificación de tales antígenos y anticuerpos, constituyen la base del diagnóstico serológico de la infección por este virus. En líneas generales, las técnicas actualmente disponibles permiten identificar los siguientes "marcadores" serológicos de infección:

1) El antígeno del VIH (VIH-Ag), que parece tratarse de la proteína mayor del core viral p24, se detecta en individuos con anticuerpos frente al VIH con una frecuencia que varía según la situación clínica en que se encuentran. Así, el VIH-Ag se identifica en el 5% y en el 8% de pacientes infectados asintomáticos y con linfadenopatías, respectivamente. Por el contrario, en los pacientes con SIDA, la presencia de este marcador se observa en el 60-75% de los casos (45-48).

2) Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la envoltura viral (Anti-ENV) se detectan prácticamente en el 100% de las personas infectadas con independencia

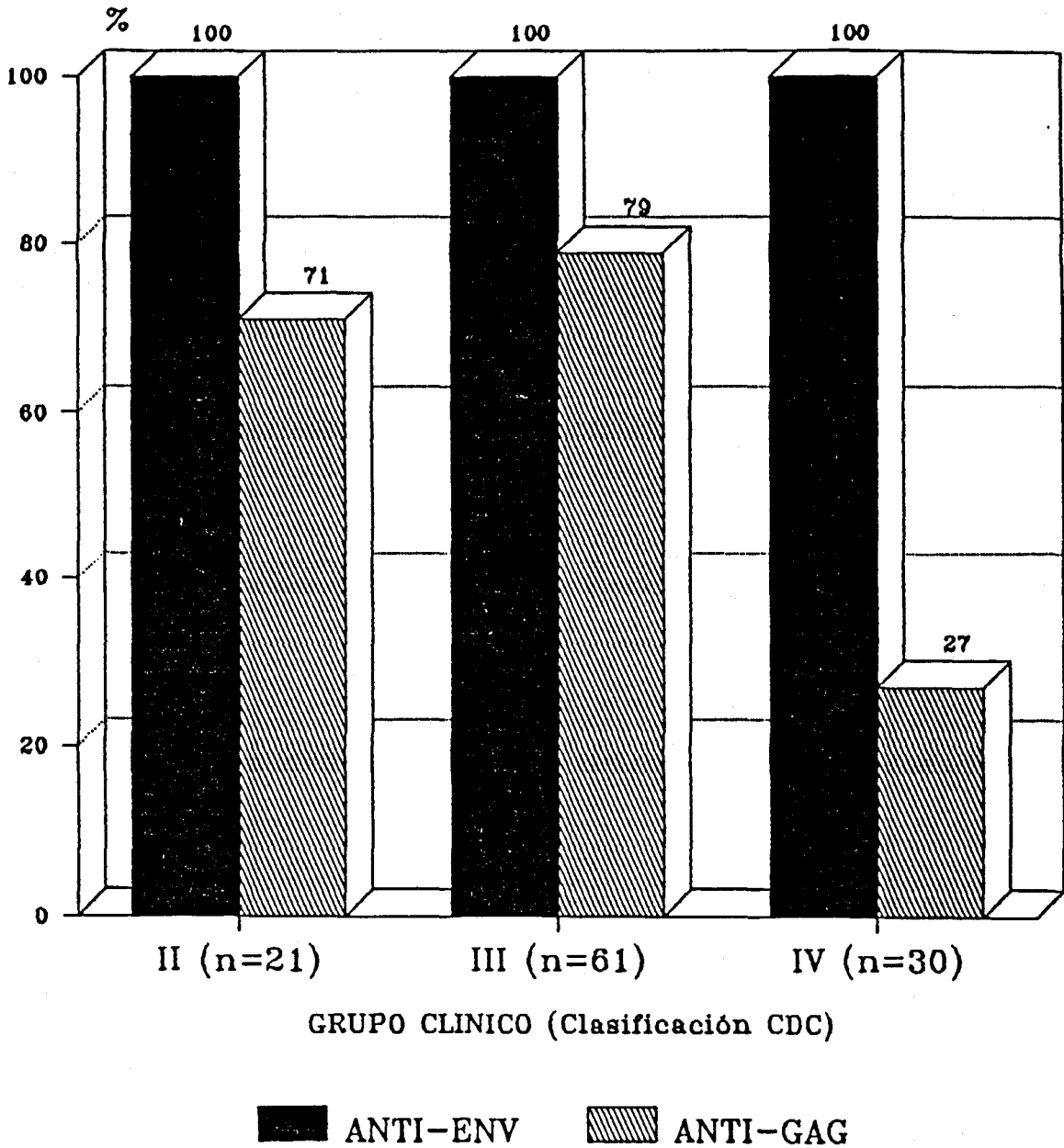
de su situación clínica y de la técnica empleada (49-51).

3) Los anticuerpos dirigidos frente a las proteínas del core viral (Anti-GAG), se detectan con una frecuencia que va disminuyendo a medida que la infección avanza y se deteriora la situación clínica de los pacientes infectados. De esta manera, este marcador puede ser detectado entre el 0% y el 70% de los enfermos que han desarrollado SIDA, dependiendo de la técnica empleada (49-51). El espectro de Anti-VIH en las distintas situaciones clínicas se recoge en figura 5, elaborada a partir de datos propios.

Con respecto a la expresión dinámica de estos marcadores en el largo curso evolutivo de la infección por el VIH, es decir, desde que esta comienza hasta que se llega a la situación de SIDA terminal, poco se conoce con exactitud, aunque a la luz de los conocimientos actuales, dicha dinámica de expresión serológica parece ser como se expone a continuación:

El VIH-Ag puede detectarse como único marcador en la fase precoz de la infección, desde las dos semanas que siguen al inicio de esta, hasta los cinco meses, aunque generalmente desaparece antes, cuando comienzan a aparecer los anticuerpos específicos Anti-GAG. Tras un periodo de meses o años y en una proporción de pacientes aun no determinada, este marcador reaparece,

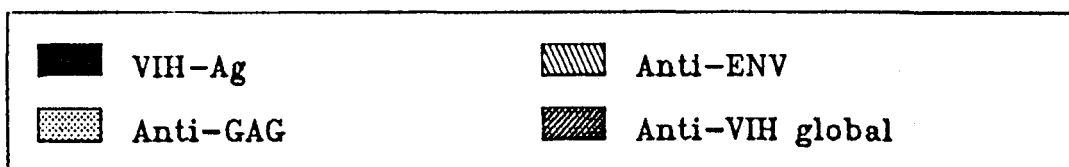
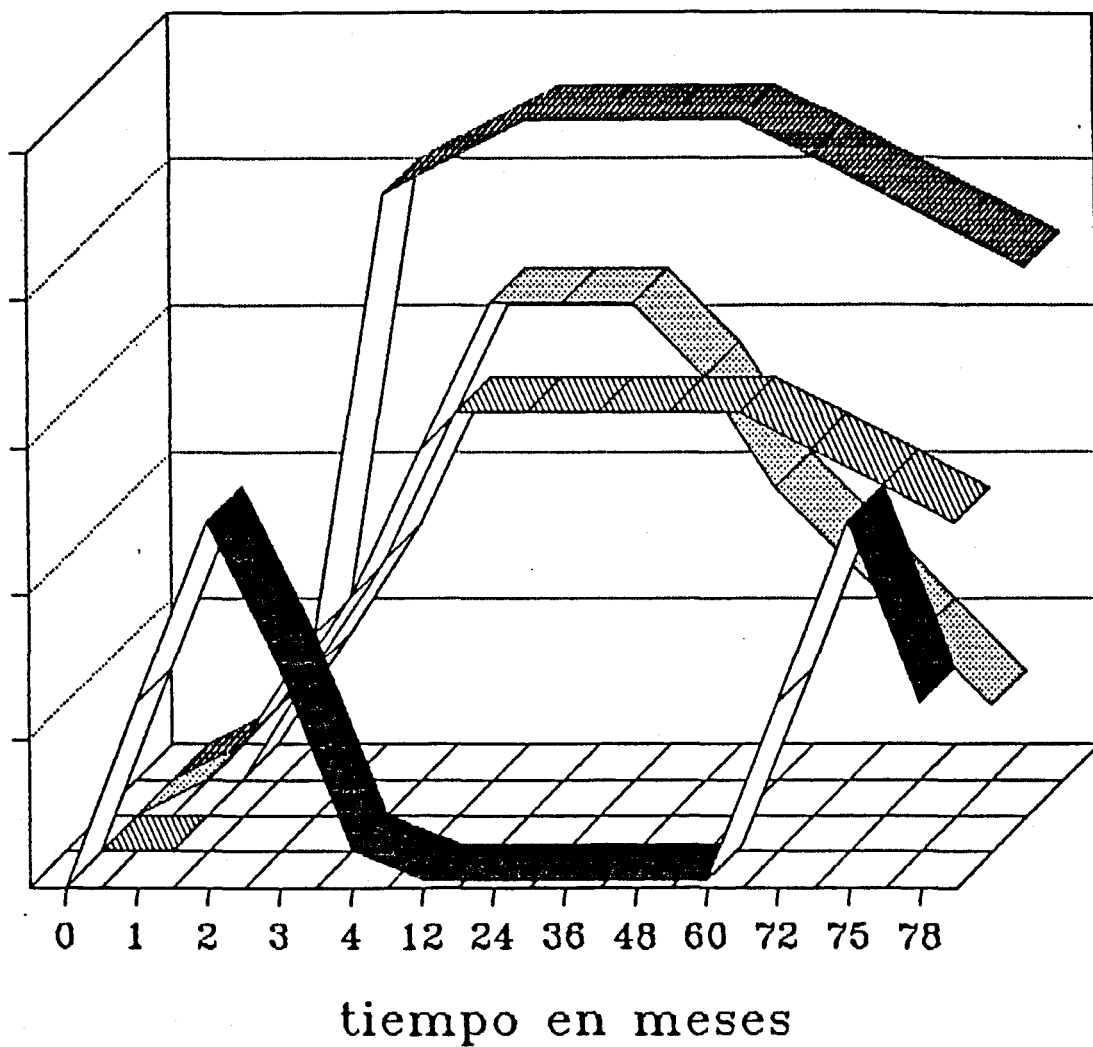
Figura 5
ESPECTRO DE ANTI-VIH
POR SITUACION CLINICA



conllevando este hecho un mal pronóstico. También se ha observado que algunos pacientes con SIDA negativizan el VIH-Ag en las fases terminales de la enfermedad (47).

Los anticuerpos específicos Anti-ENV y Anti-GAG aparecen algo después que el VIH-Ag y en términos generales, son detectados hasta que se establece el SIDA, aunque los Anti-GAG pueden desaparecer antes (45-46). La seroconversión evidenciada por técnicas que detectan anticuerpos globales de la clase IgG se produce más tardíamente, entre las 6 y 8 semanas tras la infección (45-46), manteniéndose la positividad durante toda la evolución de la enfermedad, aunque excepcionalmente puede estar ausente en algunos pacientes con SIDA. Los Anti-VIH globales de la clase IgM pueden ser detectados antes de evidenciarse la seropositividad por técnicas de screening (52). Existe en definitiva, un periodo ventana en los estadios precoces de la infección en el que las técnicas de rutina para detectar anticuerpos anti-VIH resultan negativas. En la figura 6 se recoge la hipotética secuencia de marcadores serológicos de la infección por el VIH.

Figura 6
 MARCADORES VIH
 DINAMICA DE EXPRESION SERICA



III. TECNICAS SEROLOGICAS EN LA INFECCION POR EL VIH

El desarrollo y aplicación de las técnicas serológicas que a continuación detallamos, han ayudado a incrementar los conocimientos relacionados con la biología molecular, epidemiología y dinámica de expresión de los marcadores de la infección por el VIH. Existen dos tipos de técnicas serológicas en el estudio de esta infección, que son: 1) las que detectan VIH-Ag y, 2) las que detectan la presencia de anticuerpos dirigidos contra las proteínas del VIH (Anti-VIH).

1) Determinación de VIH-Ag: Recientemente se ha desarrollado un Enzimoimmunoanálisis comercial (EIA) que detecta VIH-Ag, o lo que parece ser probablemente, la proteína mayor del core viral p24. Es una técnica de fácil realización y posible automatización. La determinación de VIH-Ag puede ser utilizada en la monitorización de la terapia antiviral, ya que parece comportarse como un buen marcador de replicación viral (53) y como indicador pronóstico.

2) Determinación de Anti-VIH: Para determinar Anti-VIH se utilizan dos tipos de pruebas: unas de menor coste, más fácil realización y en general menor sensibilidad y especificidad, que son las denominadas de primera línea o de screening, y otras más sensibles

y específicas aunque más caras y laboriosas que son las llamadas confirmatorias, utilizadas como segundo paso en la determinación de Anti-VIH.

A. Pruebas de primera línea o de screening.

Las dos técnicas utilizadas para este propósito son el EIA, que constituye la prueba de primera línea o de screening en los bancos de sangre, en estudios epidemiológicos y en la evaluación diagnóstica de individuos con presunta infección por el VIH, y el Radioinmunoanálisis (RIA), actualmente no disponible de forma comercial. Ambas técnicas utilizan como fuente de antígenos concentrados virales fraccionados e inactivados, obtenidos de líneas celulares permisivas para el VIH. Dichos antígenos se incuban con el suero problema y los anticuerpos que, de estar presentes, se unan a ellos, se detectarán mediante una Anti-IgG humana marcada con peroxidasa para el EIA o con I-125 para el RIA. Ambas técnicas detectan anticuerpos globales de la clase IgG, poseyendo una sensibilidad y especificidad comparables entre sí (54) que se han estimado cercanas al 100% cuando se toma como referencia una técnica confirmatoria como es el Western-Blot (55, 56) aunque también se ha observado la aparición de reacciones falsas positivas y negativas cuya causa parece estar en relación con el procedimiento de obtención de los antígenos a partir de los cultivos celulares (57). Los falsos positivos pueden estar determinados por contaminación del

antígeno con proteínas celulares, algunas de ellas pertenecientes al sistema HLA, antígenos DR (58, 59) y DQ (59). Las personas que poseen anticuerpos frente a estas proteínas tienen sueros reactivos por EIA. Por otro lado, los falsos negativos se producirían por la pobreza de los concentrados virales en antígenos de la envoltura, por lo que los sueros que sólo contengan anticuerpos frente a estos antígenos, no serán reconocidos como positivos. En enfermedades de naturaleza autoinmune, procesos linfoproliferativos e incluso pacientes talasémicos politransfundidos, también se han comunicado resultados falsos positivos (60, 61). Si a todas estas limitaciones añadimos que el EIA es poco sensible para detectar la infección en estadios tempranos, se entiende la necesidad de disponer de técnicas más precisas para su mejor valoración y para confirmar los resultados positivos, sobre todo en colectivos de baja prevalencia (45, 46, 52, 62). Recientemente ha sido comercializado un EIA que utiliza antígenos del VIH obtenidos por recombinación genética, que en nuestra experiencia mantiene la misma sensibilidad que el EIA convencional, aunque mejorando su especificidad notablemente por lo que pudiera constituir la técnica de elección para el screening del Anti-VIH (63).

B. Pruebas confirmatorias.

Estas pruebas están indicadas en cualquier caso en que un suero, independientemente de la condición de la

persona de la que proceda, sea Anti-VIH positivo mediante técnica de screening. En los individuos adscritos a cualquier grupo de riesgo para la infección que presenten patología atribuible al VIH que resulten seronegativos en el screening, también está indicada la confirmación. Quizás en mujeres seronegativas que han tenido algún factor de riesgo y deseen quedar embarazadas, también esté indicado confirmar. Hay que tener en cuenta que ninguna de estas pruebas puede considerarse óptima, ya que no disponemos de una técnica de referencia ideal con la que compararlas. Las pruebas confirmatorias más utilizadas son las siguientes:

B.1. Western Blot. Los antígenos obtenidos de cultivos celulares infectados con VIH (50) o mediante recombinación genética (64, 65), se separan mediante electroforesis y se transfieren a un papel de nitrocelulosa, que se incuba con el suero problema. La reacción antígeno-anticuerpo se identifica añadiendo una Anti-IgG humana marcada con peroxidasa y revelando posteriormente con un cromógeno. Dicha Anti-IgG también puede marcarse con un isótopo radiactivo, procediéndose al revelado final mediante autorradiografía (50,66,67). De esta forma y a diferencia de las técnicas séricas de primera línea, se puede identificar el espectro de anticuerpos específicos frente a los distintos antígenos virales, con las implicaciones pronósticas y diagnósticas que ello puede conllevar, permitiendo de

esta forma el conocimiento de la situación serológica de cualquier individuo determinado, así como la dinámica de los distintos anticuerpos a lo largo de los estadios evolutivos de la infección por el VIH. La sensibilidad y especificidad del Western-Blot no han sido suficientemente evaluadas ya que la única técnica que podría utilizarse como referencia es el cultivo viral y este adolece de falta de sensibilidad y, aunque muy raramente, puede dar reacciones falsas positivas, especialmente cuando se interpretan como tales los bajos niveles de RT en el sobrenadante (68). Se estima que la sensibilidad de esta técnica es muy alta, aunque no del 100%. De hecho, es positivo en la práctica totalidad de pacientes con SIDA, incluidos aquellos en los que el EIA es negativo (50, 69, 70), así como en personas con infección reciente en los que aún las técnicas de primera línea son negativas (70). No obstante, se han comunicado casos en los que pese a la negatividad del Western-Blot, es posible cultivar el virus o detectar el VIH-Ag (45, 71, 72, 73). Al parecer, la sensibilidad del Western-Blot pudiera depender bastante de la calidad del antígeno y del conjugado empleados; en este sentido, se ha observado que la sensibilidad del método mejora ostensiblemente cuando el conjugado se marca con avidina-biotina en vez de con peroxidasa (74). La posibilidad de reacciones falsamente positivas, especialmente frente a las proteínas del core viral (75, 76, 77), su elevado coste, la necesidad de cierta experiencia para su realización y la ausencia

de criterios uniformes para su interpretación, junto a la cierta subjetividad que esta última encierra, constituyen sus principales inconvenientes.

B.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se han descrito diferentes modalidades de esta técnica como la IFI de membrana (78), la IFI anticomplementaria (79) y la IFI citoplasmática sobre células fijadas (80), siendo esta última la más utilizada. En este caso, son células vivas permisivas e infectadas por el VIH, las que se hacen reaccionar con el suero problema detectándose anticuerpos globales, no específicos, a diferencia de otras pruebas confirmatorias, mediante la adición de una Anti-Ig fluorescente que produce, en el caso de que dicho suero problema contenga anticuerpos Anti-VIH unos patrones citoplasmáticos de fluorescencia que son visualizables con el microscopio de luz ultravioleta. De sensibilidad y especificidad muy altas, puede dar lugar hasta a un 5% de reacciones inespecíficas o, al menos de difícil interpretación, en pacientes con enfermedades de naturaleza autoinmune o con infección aguda por Citomegalovirus (74, 80), que pueden eliminarse casi por completo, si se incluye en la prueba un control de células H9 no infectadas y sólo se valoran como positivos, los patrones de inmunofluorescencia completamente típicos, desechándose los inespecíficos como el homogéneo y el moteado (74, 80). La IFI es de rápida realización pero requiere disponer de células permisivas para el VIH vivas, tanto

infectadas como no infectadas, cuyo manejo precisa experiencia por parte del realizador.

B.3. Radioinmunoprecipitación (RIPA). Altamente sensible y específica para la gp120 y la gp160, aunque tan sólo al alcance de pocos Centros altamente cualificados. En esta técnica se utilizan como antígenos extractos víricos o proteínas virales previamente marcadas con un isótopo radiactivo que se hacen reaccionar con el suero problema. Los inmunocomplejos formados son sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico. Las reacciones frente a las distintas proteínas virales se identifican mediante autorradiografía de las bandas electroforéticas (18, 78, 81).

Por último, existe un método de EIA competitivo que si bien, no está considerado como método de confirmación, en nuestra experiencia mantiene una correlación del 100% con los resultados obtenidos por el western blot (datos no publicados). Esta técnica utiliza esferas recubiertas de antígenos del VIH obtenidos por recombinación genética. Se emplean dos sistemas antigénicos, uno derivado del ADN recombinante ENV que contiene todos los aminoácidos de la gp41 y además, una parte de los de la gp120, y otro derivado del ADN CORE que contiene todos los aminoácidos de la p24 y parte de los de la p18. Dado que tanto la p24 y la p55 como la gp160 y gp41 comparten determinantes

antigénicos (82), la esfera ENV reconocerá AntiVIH-gp160 y AntiVIH-gp41 y la esfera CORE reconocerá tanto AntiVIH-p24 como AntiVIH-p55.



Tabla 3
SEROLOGIA VIH. TECNICAS DIAGNOSTICAS

1) DE DESPISTAJE (SCREENING)

EIA CONVENCIONAL

EIA RECOMBINANTE

RADIOINMUNOANALISIS

2) DE CONFIRMACION

WESTERN BLOT

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

RADIOINMUNOPRECIPITACION

EIA: Enzimoimmunoanálisis

**PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION
DEL ESTUDIO**

Actualmente y a pesar de los notables avances que se han sucedido en el conocimiento de la infección por el VIH, existen muchos aspectos de su naturaleza que permanecen desconocidos o incompletamente evaluados. Observaciones efectuadas en varones homosexuales y receptores de sangre en los que el momento de la exposición pudo determinarse, dan a conocer una "latencia" o intervalo de 6-8 semanas entre infección y aparición de anticuerpos séricos detectables (83). Aun más, en un trabajo muy reciente realizado sobre una cohorte de homosexuales y utilizando técnicas de detección viral sofisticadas y al alcance de muy pocos laboratorios (84), se ha puesto de manifiesto que dicho intervalo podría ser mayor, de años, desde el momento de la infección, En dicha fase de latencia puede estar presente el VIH-Ag como único marcador, antes de la seroconversión (45,46), habiéndose detectado tan precozmente como 2 semanas posteriores a la infección (45). En los pacientes con evidencia clínica de infección aguda por el VIH (grupo I de la clasificación clínica de los C.D.C.) el VIH-Ag puede detectarse (85-87), con posibilidad de constituirse incluso, como el único marcador serológico para el diagnóstico. No obstante, y contrariamente a lo que ocurre con la presencia del Ag-VIH en fases más tardías de la infección, bastante bien conocida, la dinámica de este

marcador en los estadios iniciales de la infección por el VIH sigue siendo objeto de estudio por estar incompletamente evaluada. En esta misma línea y de forma particular, una de las necesidades que más acucian a los Bancos de Sangre es la detección de sangre infectada en ese intervalo que precede a la seroconversión. Para ello, además del aumento de la sensibilidad de las técnicas actuales que detectan Anti-VIH de la clase IgG y de la utilización de técnicas que detecten anticuerpos de la clase IgM en un intento de acortar el periodo ventana o de latencia, se ha propuesto otra opción, disponible actualmente, como es la detección sérica del VIH-Ag (45, 88, 89). En oposición a esto, el valor en el diagnóstico precoz de la infección de este último marcador se ha cuestionado, debido al carácter transitorio que posee su presencia en el suero, durante esa fase inicial; además, hay autores como Lelie, et al (90) que han comunicado que la detección del VIH-Ag de forma aislada, sin Anti-VIH, es rara cuando se utilizan pruebas para anticuerpos de segunda generación, altamente sensibles, lo cual restaría valor al VIH-Ag como marcador diagnóstico en la fase precoz de la infección por el VIH. Es precisamente en estos aspectos polémicos en lo que hace referencia al valor diagnóstico del VIH-Ag en las fases iniciales de la infección, donde queremos incidir con este estudio.

Por otro lado, no se conoce con certeza qué proporción de personas con anticuerpos frente al VIH

terminarán desarrollando SIDA como estadio final de su infección, ni qué marcadores con potencial predictivo debieran ser utilizados para identificar a tales pacientes. En lo que hace referencia a este último punto se han señalado indicadores clínicos (91-94) y biológicos (95-100) que pudieran tener valor predictivo para el desarrollo de SIDA en personas de riesgo. Algunos de estos aparentes indicadores han sido criticados con posterioridad (102, 103). En esta misma línea, se han realizado recientemente estudios que sugieren que el hallazgo persistente del VIH-Ag (81, 104-108) en el suero y/o la ausencia de anticuerpos frente a las proteínas del core del VIH (Anti-p24) (98, 99), pudieran estar asociados a un mal pronóstico. Sin embargo, la tasa de evolución a SIDA en pacientes antígenémicos varía sustancialmente en estos estudios, con tasas que oscilan entre el 0% encontrado por Simmonds et al en un estudio realizado en pacientes hemofílicos (109) y el 50% objetivado por Mayer et al en una cohorte de homosexuales asintomáticos (108).

Con el presente trabajo se pretende evaluar estos aspectos no bien conocidos en relación con la infección por el VIH, es decir, el posible valor que puede tener el VIH-Ag como marcador en el diagnóstico precoz de la infección por el VIH, así como su valor pronóstico en cuanto al desarrollo de SIDA en los pacientes con anticuerpos Anti-VIH positivos. La primera de estas cuestiones se aborda investigando la presencia sérica

del VIH-Ag con anterioridad a la seroconversión franca en un conjunto de individuos donde están representados grupos de alto riesgo. El valor pronóstico del VIH-Ag se evalúa mediante un doble estudio, en el primero de los cuales, de carácter transversal, se establece correlación entre la antigenemia y la situación clínica de individuos infectados por el VIH y en el segundo, longitudinal, se estudia la presencia del VIH-Ag en muestras séricas secuenciadas obtenidas de un grupo de personas con Anti-VIH, correlacionando su evolución clínica con la existencia o no de antigenemia.

OBJETIVOS

1. Establecer el valor que puede tener el VIH-Ag como marcador serológico en el diagnóstico precoz de la infección por el VIH.

2. Establecer el valor que puede tener el VIH-Ag como indicador pronóstico en los pacientes Anti-VIH positivos.

MATERIAL Y METODOS

I. PACIENTES Y METODOS

1. Valor diagnóstico precoz del VIH-Ag

Se incluyeron en este estudio 18 personas adscritas a grupos de riesgo para la infección por el VIH, que seroconvirtieron para Anti-VIH. La selección de estos pacientes se realizó de modo retrospectivo, a través de una revisión llevada a cabo sobre el archivo de la seroteca, correspondiente a los pacientes estudiados en nuestra Unidad desde Enero de 1984, hasta Diciembre de 1988. Para la inclusión de estos pacientes en el estudio, se establecieron dos criterios de selección: 1) evidencia de seroconversión para Anti-VIH, con confirmación serologica mediante tecnica adecuada y, 2) disponer, además de la muestra sérica correspondiente a la seroconversión, de al menos otra muestra de suero obtenida previamente a aquella. El momento de la seroconversión fue definido cuando se obtuvo la primera muestra reactiva para Anti-VIH mediante una técnica de EIA de segunda generación, si se confirmaba dicha positividad por técnica adecuada (Western Blot en este caso) en esa misma muestra, o en la obtenida inmediatamente después.

De estas 18 personas, ocho (44.4%) pertenecían al colectivo de riesgo de los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), cinco (27.8%) eran hemofílicos (HF),

cuatro (22.2%) varones homosexuales (HS) y uno (5.5%) era pareja heterosexual de paciente en riesgo, o compañero sexual (CS). La distribución de estos individuos en sus respectivos grupos de riesgo se recoge en la Tabla 4.

De todos los pacientes incluidos se disponía de muestras séricas secuenciadas obtenidas entre 13 meses y 10 días previos a la seroconversión; dichas muestras se conservaban almacenadas adecuadamente, bajo congelación a -20°C de temperatura. La secuencia de obtención de las muestras y el número de las mismas, resultaron ser bastante irregulares, dado el carácter retrospectivo del estudio. El número total de muestras séricas estudiadas fue de 49.

En todas las muestras disponibles se determinó Anti-VIH mediante un EIA de segunda generación (EIABBOTT HIV1 EIA RECOMBINANTE, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico), y en muchas de ellas (34 de las 49) se determinó también Anti-VIH por un EIA conveccional, de primera generación (ELAVIA 1, Diagnostics Pasteur). Aquellas muestras séricas que resultaron positivas por la técnica de EIA de segunda generación, fueron confirmadas mediante Western Blot, cuyos reactivos fueron suministrados por Laboratorios Pasteur (New LAV-BLOT I, Diagnostics PASTEUR).

El VIH-Ag se investigó también en todas las muestras

séricas mediante un EIA de fase sólida del tipo "sandwich" (ABBOTT HTLV-III ANTIGEN EIA, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico). Las positividades halladas por esta técnica, fueron confirmadas mediante una prueba de neutralización (ABBOTT HTLVIII ANTIGEN NEUTRALIZATION TEST, Laboratorios Abbott, División Diagnóstico)

Tabla 4

DIAGNOSTICO PRECOZ. PACIENTES INCLUIDOS

Grupo de riesgo	n° de casos	(%)
ADVP	8	(44)
HF	5	(28)
HS	4	(22)
CS	1	(6)

N=18

ADVP: Adicto a drogas via parenteral

HF: Hemofílico

HS: Homosexual

CS: Pareja heterosexual



2. Valor pronóstico del VIH-Ag

2.a. Estudio transversal

Se incluyeron en este estudio 167 pacientes Anti-VIH positivos, con confirmación serológica, elegidos sin ningún otro criterio definido, de entre los que se controlaban de forma periódica y ambulatoriamente en nuestra consulta, en el periodo de tiempo comprendido entre Octubre de 1982 y Enero de 1988.

De estos 167 pacientes 113 (67,6%) eran ADVP, 28 (16.7%) HS, 11 (6.6%) HF, siete (4.2%) eran a la vez ADVP y HS (ADVP/HS), cinco (3%) eran CS (cuatro mujeres y un hombre) de pacientes Anti-VIH positivos, uno (0.6%) resultó ser un recién nacido de madre ADVP (RN), uno padecía la enfermedad de von Willebrand (vW) y en un paciente (0.6%) no pudo identificarse el grupo de riesgo a través de la anamnesis, considerándose por ello como de riesgo no conocido (NC). La caracterización de los pacientes incluidos en este estudio en sus correspondientes colectivos de riesgo se recoge en la tabla 5.

Tabla 5
ESTUDIO TRANSVERSAL. PACIENTES INCLUIDOS

Riesgo	n° de casos	(%)
ADVP	113	(67.6)
HS	28	(16.7)
HF	11	(6.6)
ADVP/HS	7	(4.2)
CS	5	(3.0)
RN	1	(0.6)
vW	1	(0.6)
NC	1	(0.6)

N=167

ADVP: Adicto a drogas parenterales

HS: Varón homosexual

HF: Hemofilico

ADVP/HS: Adicto a drogas y homosexual

CS: Compañero heterosexual

RN: Recién nacido de padres en riesgo

vW: Enfermedad de von Willebrand

NC: No conocido

Todos los pacientes fueron sometidos a evaluación clínica mediante modelo de historia clínica convencional y clasificados según aquella, en los grupos clínicos establecidos por los C.D.C. (110). De esta forma los grupos definidos fueron:

GRUPO II: Pacientes con infección por VIH sin síntomas ni signos relacionados con ella, es decir, asintomáticos.

GRUPO III: Pacientes con Linfadenopatía generalizada persistente (LGP), establecida como la existencia de adenopatías palpables de más de un centímetro de diámetro, en dos o más áreas diferentes a la región inguinal, y de más de tres meses de duración (en ausencia de otra enfermedad o infección que las justifique).

GRUPO IV: En este grupo incluimos a aquellos pacientes que presentaron patología diagnóstica de SIDA siguiendo los criterios establecidos y modificados por los CDC(111), del apartado que permite este diagnóstico en los pacientes con evidencia de laboratorio de infección por el VIH.

De todos los pacientes se disponía de al menos una muestra sérica extraída en el momento del diagnóstico o en fecha muy próxima a este. Todas las muestras, hasta el momento del estudio serológico, fueron almacenadas

convenientemente en congelador a -20°C de temperatura.

Todas las muestras fueron analizadas para Anti-VIH mediante un EIA de segunda generación (EIABBOTT HIV1 EIA RECOMBINANTE, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico). Aquellas muestras séricas que resultaron positivas por la técnica anterior, fueron confirmadas mediante un inmunoensayo enzimático competitivo recombinante (ENVACOR HIV1 EIA, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico) y/o inmunoelectrotransferencia, también denominada Western Blot (SORIN/HTLV-III WB, Laboratorios SORIN).

El VIH-Ag fue determinado en todas las muestras disponibles mediante un inmunoensayo enzimático de fase sólida del tipo "sandwich" (ABBOTT HTLV III ANTIGEN EIA, Abbott División Diagnóstico). Las muestras que mostraron positividad para este análisis, fueron confirmadas mediante una prueba de neutralización (ABBOTT HTLVIII ANTIGEN NEUTRALIZATION TEST, Laboratorios Abbott, División Diagnóstico)

2.b. Estudio longitudinal

En este apartado incluimos 37 personas de entre todos los pacientes estudiados por nuestro Grupo entre Enero de 1982 y Enero de 1988 y que cumplieron todas y cada una de las siguientes condiciones:

a) Haber sido evaluadas durante un periodo de seguimiento de 24 meses o más.

b) Disponer de ellas de al menos tres muestras séricas obtenidas a intervalos no menores de ocho meses y conservadas mediante congelación a -20°C .

c) Presencia confirmada de anticuerpos Anti-VIH determinada antes del inicio del seguimiento. La detección de anticuerpos y su posterior confirmación fueron realizadas mediante las técnicas que más adelante se especifican.

d) Todos los pacientes pertenecían al grupo III de la clasificación clínica establecida por los C.D.C. (110).

e) Ningún paciente había seguido tratamiento con inmunomoduladores y/o fármacos antivirales que, como se ha publicado recientemente (112), podrían haber modificado las características del VIH-Ag en suero.

De estas 37 personas seleccionadas 28 (76%) eran HF, cinco (13%) HS y cuatro (11%) eran ADVP. La expresión serológica del VIH-Ag en algunos de estos pacientes ha sido previamente publicada (47). El periodo de seguimiento medio global fue de 38.2 ± 11 meses (rango 24 a 69) siendo similar dicho periodo para los

individuos que desarrollaron SIDA (37.8 ± 18.0 meses; rango 24 a 69) al de los pacientes que evolutivamente no llegaron a presentar dicha enfermedad (38.1 ± 10.2 meses; rango 24 a 60). En el contexto de este estudio el seguimiento se consideró finalizado en el momento en que se hacía el diagnóstico de SIDA.

Dispusimos de un total de 164 muestras séricas con una media de muestras disponibles por persona de 4.4 ± 1.8 (rango 3 a 9). El número de muestras obtenidas de los pacientes que desarrollaron SIDA con un rango de 3 a 6 fue similar al número de las muestras obtenidas de aquellos que no desarrollaron la enfermedad, con un rango de 3 a 9.

Todos los pacientes fueron sometidos a evaluación clínica desde el comienzo del seguimiento y periódicamente hasta la eventual aparición de SIDA, momento en el que dicho seguimiento se consideró finalizado. El diagnóstico de SIDA se realizó siguiendo los criterios establecidos por los C.D.C (111)

La detección de anticuerpos séricos Anti-VIH que se realizó antes de la inclusión de los pacientes en el estudio fue llevada a cabo mediante enzimoimmunoanálisis de fase sólida recombinante, o de segunda generación (EIABBOTT HIV1 EIA RECOMBINANTE, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico). La confirmación de las muestras positivas por la técnica

anterior se realizó mediante Western Blot (SORIN/HTLV-III WB, Laboratorios SORIN). A las 164 muestras séricas totales obtenidas desde el inicio del seguimiento les fueron practicadas las siguientes determinaciones:

.. Determinación de VIH-Ag mediante un EIA tipo sandwich utilizando reactivos suministrados por Laboratorios Abbott (ABBOTT HTLV III ANTIGEN EIA, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico). Las muestras reactivas por este método, se sometieron a confirmación mediante prueba de neutralización (ABBOTT HTLVIII ANTIGEN NEUTRALIZATION TEST, Laboratorios Abbott, División Diagnóstico).

.. Determinación de anticuerpos dirigidos frente a las proteínas de la envoltura del VIH (Anti-ENV) y frente a las proteínas de la nucleocápside viral (Anti-GAG), mediante un EIA competitivo utilizando antígenos proporcionados por el mismo fabricante (ENVACOR HIV 1 EIA, Laboratorios ABBOTT División Diagnóstico). Adicionalmente, 28 muestras fueron analizadas para anticuerpos Anti-VIH mediante Western Blot, cuyo "kit" comercial fue suministrado por laboratorios Sorin (SORIN/HTLV-III WB, Laboratorios SORIN).

II. DESCRIPCION DE LAS TECNICAS DE LABORATORIO

1. Determinación de anticuerpos Anti-VIH.

Los anticuerpos Anti-VIH se analizaron utilizando técnicas de primera línea, EIA en concreto, de primera y/o segunda generación, tal y como se especifica en cada apartado del estudio. Para la confirmación de estas técnicas, se utilizaron dos tipos de métodos distintos, como son el EIA confirmatorio y el Western Blot como ya se indicara en los distintos apartados.

1.a. EIA recombinante o de segunda generacion

Los anticuerpos Anti-VIH se determinaron mediante un enzimoimmunoanálisis de fase sólida (EIABBOTT HIV 1 EIA RECOMBINANTE, ABBOTT División Diagnóstico) que utiliza un sistema de detección en el cual las esferas son recubiertas de antígenos VIH 1 CORE y ENV obtenidos por técnicas de recombinación genética del DNA. Las esferas recubiertas se instalaron en unos pocillos que se ubican en la placa de reacción y en estos se añadieron 10 microlitros de cada muestra problema o muestra de control (2 controles negativos y 3 controles positivos) y posteriormente se distribuyeron 400 microlitros de diluyente de muestras en todos los pocillos. La placa

de reacción se incubó a 40°C durante 30 minutos y pasado este tiempo se aspiró el material y se lavaron las esferas con agua destilada desionizada. Tras el lavado se incubó de nuevo la placa con el conjugado enzimático (anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante o HRPO) aspirándose posteriormente el conjugado no unido y realizando nuevo lavado. A continuación se agregó a las esferas una solución de o-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno (Abbott). La reacción de la solución de sustrato OPD con la HRPO produce un color amarillo-anaranjado cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos Anti-VIH presentes en la muestra. La reacción enzimática se suspendió agregando ácido sulfúrico 1 N, procediéndose a la lectura de los resultados por método fotométrico, utilizando un analizador Quantum, de forma automatizada. Fueron consideradas reactivas, aquellas muestras con valores de absorción iguales o superiores al valor límite de acuerdo con los criterios adoptados por la casa comercial.

1.b. EIA confirmatorio

Los reactivos comerciales utilizados en esta técnica fueron suministrados por Laboratorios Abbott (ENVACOR HIV1 EIA, ABBOTT División Diagnóstico).

.. El ENVACOR HIV1 EIA es un inmunoensayo enzimático que utiliza dos sistemas separados de detección, para evaluar las muestras que han sido encontradas reactivas para los anticuerpos Anti-VIH. En un sistema, cada esfera recubierta de antígeno de la envoltura viral (ENV) obtenido mediante recombinación genética del DNA se incubó a temperatura ambiente en la placa de reacción con 50 microlitros de cada muestra sérica a determinar y de cada muestra control (3 negativos y 2 positivos), 20 microlitros de diluyente de muestras y 200 microlitros del conjugado enzimático Anti-VIH ENV (humano), durante 20 horas. Tras esta incubación se procedió a la aspiración del líquido de cada pocillo de la placa y al lavado de las esferas con agua destilada y posteriormente se añadió 300 microlitros de solución de sustrato de OPD sometiéndose a nueva incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, y añadiendo al cabo de este tiempo 1 ml de ácido sulfúrico 1 N para suspender la reacción.

El procedimiento del ensayo para la placa de reacción CORE se realizó de igual forma que la que se ha descrito para la placa de reacción ENV exceptuando lógicamente, que el conjugado enzimático que se añadió a las muestras fue Anti-VIH CORE (humano). El desarrollo del color se efectuó con el mismo método para ambos sistemas. El proceso de lectura para ambas placas de reacción se realizó con analizador Quantum, cuyo cero se ajusta con un blanco de sustrato,

determinando posteriormente la absorción de los controles y de las muestras. Se consideraron positivas para Anti-VIH ENV aquellas muestras con valores de absorción iguales o inferiores al valor límite. De igual forma aquellas muestras de la placa de reacción CORE cuyos valores de absorción fueron iguales o inferiores al valor límite se consideraron como positivas para los Anti-VIH CORE.

La especificidad de este test se determinó analizando 1468 muestras negativas por el test ABBOTT HTLVIII EIA, de las que 1466 resultaron también negativas por ENVACOR HIV 1 EIA (datos suministrados por el laboratorio).

1.c. Inmunoelectrotransferencia o Western Blot

El Western Blot utiliza antígenos del VIH separados por técnica de electroblotting y transferidos a una tira de nitrocelulosa. Las tiras con las proteínas virales se incubaron con 20 microlitros de cada muestra de pacientes y muestras controles durante 3 horas a 37°C. A continuación se lavaron las tiras con buffer de lavado, añadiendo posteriormente 2 ml de conjugado 1 (anti-IgG humana de cabra conjugada con Biotina) e incubando de nuevo durante 30 minutos a 37°. Tras nuevo lavado se distribuyeron 2 ml de conjugado 2 (Peroxidasa de rábano conjugada con Avidina) en cada tira, que se incubaron durante 30 minutos a 37°C, lavando otra vez como anteriormente y añadiendo 2 ml de cromógeno (4-cloro-1-naftol)/solución de sustrato (peróxido de hidrógeno), y ulterior incubación a 37°C durante 15 minutos. Se lavaron las tiras con agua destilada para suspender la reacción, procediéndose posteriormente a la interpretación de los resultados, comparando la reacción de color de las bandas de las tiras control con las de las tiras de especímenes. Para evaluar los resultados por esta técnica, seguimos los criterios aportados en la última reunión del "Consortium for Retrovirus Serology Standarditation" (113) que en resumen vienen expresados de la siguiente manera: una muestra se consideró positiva cuando presentaba reactividad para banda p24 ó p34 más gp120/160 ó gp41;

se consideró, por el contrario negatividad ante la ausencia de bandas; el resultado se interpretó como indeterminado cuando existía presencia de alguna/s banda/s siempre que su patrón no estuviese incluido en los criterios de positividad.

2. Determinación de VIH-Ag.

El VIH-Ag fue investigado mediante una técnica de EIA de fase sólida y la confirmación de los resultados positivos por esta técnica se realizó aplicando una técnica de neutralización.

2.a. EIA para VIH-Ag

Esta técnica es un inmunoensayo enzimático de fase sólida del tipo "sandwich", cuyos reactivos comerciales fueron suministrados por Laboratorios Abbott (ABBOTT HTLV III ANTIGEN EIA, Abbott División Diagnóstico) y que utiliza esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpo Anti-VIH humano. El procedimiento de ensayo, siguiendo las recomendaciones del laboratorio suministrador de los reactivos se realizó en varias fases (primera, segunda y tercera incubaciones, desarrollo del color y lectura final). En la primera fase se distribuyeron 200 microlitros de cada muestra o controles (3 controles negativos y 2 controles positivos) en el fondo de los pocillos de la placa de reacción, agregando posteriormente a cada uno de estos una esfera con el anticuerpo e incubando a la

temperatura ambiente durante 20 horas; tras la incubación se aspiró el líquido y se lavaron las esferas con agua destilada (volumen total de lavado de 18 ml por esfera). En la segunda fase se distribuyeron 200 microlitros de la solución de anticuerpo Anti-VIH de conejo (concentración mínima: 1 microgramo/ml y conservado en azida sódica al 0.1%) en cada pocillo que contenía una esfera y se incubó a 40°C durante 4 horas, con lavado y secado final como en la fase anterior. En la tercera fase se distribuyeron 200 microlitros de conjugado anti-IgG de conejo (cabra) dentro de cada pocillo, incubando a 40°C durante 2 horas y lavando de igual forma que en las otras fases. El desarrollo del color se realizó transfiriendo las esferas a tubos de ensayos identificados y pipetando en ellos 300 microlitros de solución de sustrato de OPD que se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, agregando finalmente 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo, incluyendo los dos tubos de blanco de sustrato, para suspender la reacción. La absorbancia se determinó a 492 nm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda Quantum. Un resultado fue considerado positivo cuando su densidad óptica se delimitaba por debajo del valor umbral calculado. Dicho valor es la absorbancia de la media de dos controles positivos más la media de dos controles negativos dividida por dos. analizador Quantum y aquellas muestras con valores de absorción iguales o superiores al valor límite se consideraron reactivas para VIH-Ag.

2.b. Prueba de neutralización

El Abbott HTLVIII ANTIGEN NEUTRALIZATION TEST utiliza el principio de la neutralización específica de anticuerpo para indicar la presencia de VIH-Ag en las muestras que resultaron positivas para la determinación de dicho marcador (ABBOTT HTLV III ANTIGEN EIA). El reactivo de neutralización (anticuerpo humano frente al VIH) incubó inicialmente con las muestras y controles (tres negativos y cuatro positivos y de estos últimos, dos para ser neutralizados y los otros dos para no serlo) durante dos horas a temperatura ambiente; posteriormente se añadió a cada pocillo una esfera que contiene Anti-VIH, con incubación a temperatura ambiente durante 20 horas, tras lo cual se procedió a extraer el líquido de los pocillos y a lavar cuidadosamente las esferas con agua destilada (tres lavados con volumen total de lavado de 18 ml). Tras el lavado y secado, se añadió a cada pocillo que contenía una esfera, 200 microlitros de solución de anticuerpos y se procedió a nueva incubación durante 4 horas a 40°C y lavado. En un tercer paso, se añadió a las esferas 200 microlitros de conjugado anti-IgG de conejo incubándose nuevamente a 40°C durante 2 horas con lavado final. Para el desarrollo del color se pipetaron 300 microlitros de sustrato de OPD en dos tubos vacíos (blancos de sustrato) y en cada tubo conteniendo una esfera, con una incubación de 30 minutos a temperatura

ambiente y añadiendo finalmente 1 ml de ácido sulfúrico 1N a cada tubo. La lectura de la placa de reacción se realizó mediante analizador Quantum, ajustando el cero con un blanco de sustrato y determinando posteriormente la absorbancia de controles y muestras estudiadas.

RESULTADOS

1. VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ DEL VIH-Ag

En nueve de los 18 sujetos estudiados se pudo disponer de información clínica obtenida durante el periodo de la seroconversión (Tabla 6). En cinco de ellos (casos nº 1, 3, 4, 7 y 9), la seroconversión se asoció al desarrollo de linfadenopatías generalizadas, que no se acompañaron de ninguna otra sintomatología. En tres individuos (casos nº 2, 6 y 10), la seroconversión estuvo asociada al desarrollo previo (entre dos semanas y un mes) de una enfermedad febril autolimitada, con rash cutáneo en un caso (caso nº 2) y meningitis linfocitaria con diplejía facial en otro (caso nº 6). Estos tres casos cumplieron criterios para ser incluidos en el grupo I de la clasificación clínica de la infección establecida por los C.D.C. (110), y en dos de ellos (casos nº 6 y 10) el VIH-Ag fue positivo con anterioridad a la seroconversión. En el paciente restante (caso nº 8), la seroconversión cursó de forma asintomática.

El VIH-Ag fue detectado en cinco (27.7%) de los 18 pacientes estudiados, en cuatro de ellos (casos nº 6, 8, 15 y 16) como único marcador, y en el restante (caso nº 10) asociado a la positividad de Anti-VIH mediante

EIA de segunda generación (esta misma muestra fue negativa cuando se analizó por EIA de primera generación). En dos de los casos en los que se detectó el VIH-Ag (nº 6 y 10), la determinación de este marcador fue de gran valor diagnóstico para etiquetar etiológicamente el cuadro clínico.

Tabla 6
Diagnóstico precoz. Perfil clínico y serológico

CASO Nº	GRUPO RIESGO	TIEMPO ^a (meses)	Anti-VIH ^b		W-B	VIH-Ag	CLINICA
			1gG	2gG			
1	HS	-13	-	-		-	Aparición de LAG sin síntomas acompañantes
		- 8	-	-		-	
		- 4	-	-		-	
		0	+	+	+	+	
2	HS	-14	-	-		-	Enfermedad febril autolimitada y rash cutáneo
		- 6	-	-		-	
		- 2	-	-		-	
		0	+	+	+	-	
3	HS	-13	-	-		-	Aparición de LAG sin síntomas acompañantes
		- 9	-	-		-	
		- 5	-	-		-	
		0	-	+	+	-	
4	HS	- 6	-	-		-	Aparición de LAG sin síntomas acompañantes
		0	+	+	+	-	
5	CS	- 2	-	-		-	No disponible
		0	+	+	+	-	
6	ADVP	-10 días	-	-		+	Enfermedad febril autolimitada y Meningitis linfocitaria
		0	+	+	+	-	
7	ADVP	-14	-	-		-	Aparición de LAG sin síntomas acompañantes
		- 1	-	-		-	
		0	+	+	+	-	
8	ADVP	-12	-	-		+	Asintomático
		0	+	+	+	-	
9	ADVP	-10	-	-		-	Aparición de LAG sin síntomas acompañantes
		- 6	-	-		-	
		0	+	+	+	-	
10	ADVP	-13	-	-		-	Enfermedad febril autolimitada
		0	-	+	Indeterminado	+	
		+ 5 días	+	+	+	+	
		+11 días	+	+	+	-	

..... / /

Tabla 6
(continuacion)

CASO Nº	GRUPO RIESGO	TIEMPO (meses)	Anti-VIH		W-B	VIH-Ag	CLINICA
			1ªG	2ªG			
11	ADVP	- 2	NR	-	+	-	No disponible
		0	NR	+			
12	ADVP	-25días	NR	-	+	-	No disponible
		0	NR	+			
13	HF	- 6	NR	-	+	-	No disponible
		- 4	NR	-			
		0	NR	+			
14	HF	- 6	NR	-	+	-	No disponible
		0	NR	+			
15	HF	- 6	NR	-	+	-	No disponible
		- 3	NR	-			
		0	NR	+			
16	HF	- 6	-	-	+	-	No disponible
		- 5	NR	-			
		0	+	+			
17	HF	-10	NR	-	+	-	No disponible
		0	+	+			
18	ADVP	- 9	NR	-	+	-	No disponible
		0	+	+			

^a Tiempo en que se obtuvo la muestra con respecto a la seroconversión (0). Mientras no se especifica lo contrario, esta expresado en meses. Los signos +/- indican posterioridad o anterioridad a la seroconversión

^b Determinados por EIA de primera (1ªG) y segunda (2ªG) generación. Los signos +/- indican positividad o negatividad de la prueba

NR: No Realizado

W-B: Western Blot

VIH-Ag: Determinado mediante EIA. Los signos +/- indican positividad/negatividad de la prueba

2. VALOR PRONOSTICO DEL VIH-Ag

2.a. Estudio transversal.

La caracterización epidemiológica por grupos de riesgo en las distintas situaciones clínicas se expresa en la tabla 7. El colectivo de riesgo más numeroso de forma global fue el de los ADVP (67.6%) seguido por el de los HS (16.7%) y el de los HF (6.6%); el grupo de los ADVP/HS constituyó el 4.2%, un 3%, es decir cinco individuos (cuatro mujeres y un hombre), eran CS, uno (0.6%) RN, uno (0,6%) padecía la enfermedad de von Willebrand (vW) y en un individuo (0.6%) perteneciente al grupo clínico II, no fue posible determinar su pertenencia a ningún colectivo considerado como de riesgo para la infección por el VIH (ND).

Los pacientes se distribuyeron en tres poblaciones clínicas y de los 167, 56 (34%) resultaron pertenecer al grupo clínico II, 69 (42%) pertenecían al grupo clínico III y 42 (25%) fueron diagnosticados de SIDA y, como tal, incluidos en el grupo clínico IV. En cuanto a la patología diagnóstica de los pacientes incluidos en este último grupo, hay que resaltar la superior frecuencia de la Esofagitis por *Candida albicans* que supuso el 50% de los casos. La neumonía por *Pneumocystis carinii* constituyó la segunda patología diagnóstica en frecuencia con un 16.7%. El resto queda

detallado en la tabla 8.

De todos estos 167 pacientes, 47 (28%) presentaron antigenemia VIH. La gran mayoría de los individuos antigenémicos pertenecían al grupo IV de la clasificación clínica. La correlación entre antigenemia y situación clínica viene expresada en la figura 7. De los 56 pacientes incluidos en el grupo II, cuatro (7%) fueron VIH-Ag positivos; de los 69 adscritos al grupo III, 14 (20%) presentaron antigenemia, al igual que 29 (69%) pacientes de los 42 diagnosticados de SIDA.



Tabla 7
GRUPO DE RIESGO / SITUACION CLINICA

		Grupo de riesgo (n° de casos)							
		ADVP	HS	HF	ADVP/HS	CS	RN	vW	NC
Situación Clínica	II	51	2	0	1	1	0	0	1
	III	41	18	3	4	2	0	1	0
	IV	21	8	8	2	2	1	0	0
Totales:		113	28	11	7	5	1	1	1

ADVP: Adicto a drogas parenterales

HS: Varón homosexual

HF: Hemofílico

ADVP/HS: Adicto a drogas y homosexual

CS: Compañero heterosexual

RN: Recién nacido de padres en riesgo

vW: Enfermedad de von Willebrand

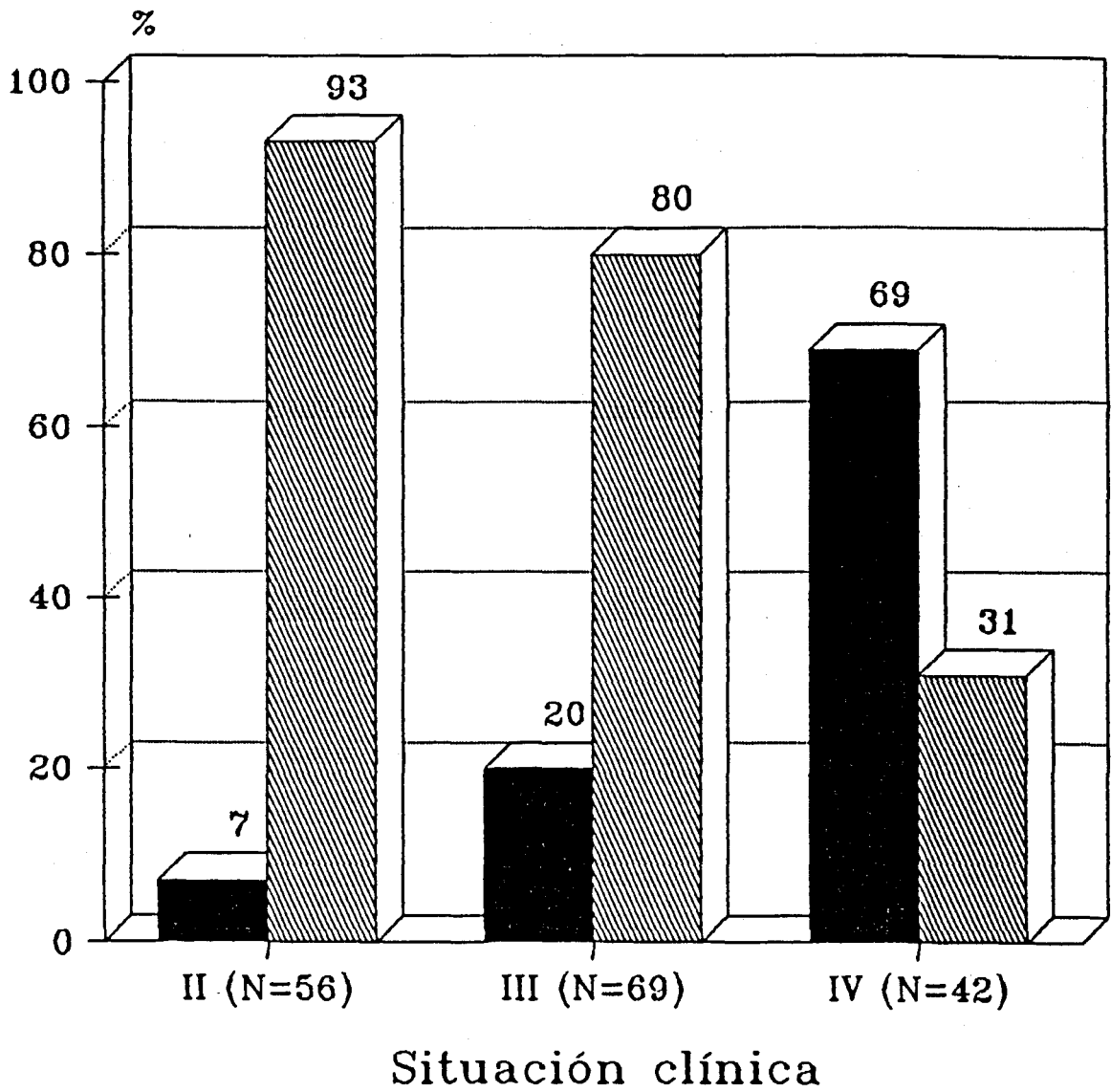
NC: No conocido

Tabla 8
GRUPO IV. PATOLOGIA DIAGNOSTICA

Patologia diagnostica	n° de casos	(%)
ESOFAGITIS CANDIDIASICA (EC)	21	(50)
NEUMONIA POR PNEUMOCISTIS (NP)	7	(16.7)
MENINGITIS CRIPTOCOCOCICA	3	(7.1)
LINFOMA NO HODGKIN	2	(4.8)
SARCOMA DE KAPOSI	2	(4.8)
CRIPТОSPORIDIASIS INTESTINAL	2	(4.8)
TBC DISEMINADA + EC	1	(2.4)
TBC DISEMINADA + NP	1	(2.4)
ENCEFALOPATIA VIH	1	(2.4)
SEPSIS POR SALMONELLA	1	(2.4)
SINDROME CONSUNTIVO	1	(2.4)

N = 42

Figura 7
CORRELACION VIH-Ag
Y SITUACION CLINICA



■ VIH-Ag POSITIVO

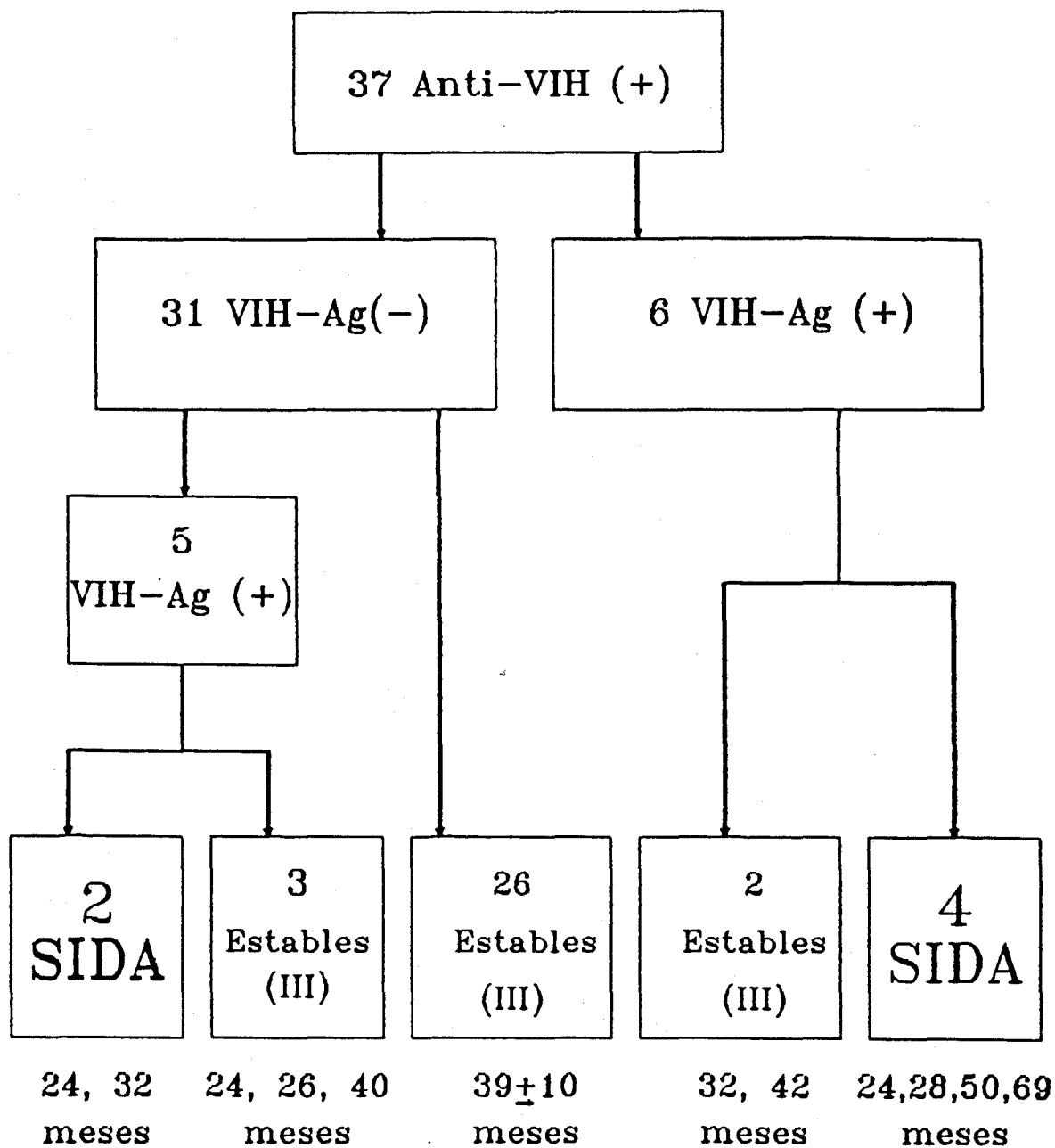
▨ VIH-Ag NEGATIVO

2.b. Estudio longitudinal.

La evolución experimentada por la población incluida en este estudio se expresa en la figura 8. Al comienzo del estudio, seis de los 37 miembros del grupo presentaban antígenemia y cinco de los restantes 31 la desarrollaron entre el tercero y el vigésimo noveno mes del seguimiento. Siete de los 11 pacientes antígenémicos eran HF, dos ADVP y los restantes HS. Seis pacientes antígenémicos (cinco HF y un ADVP) desarrollaron SIDA (grupo IVc de la clasificación CDC) (111).

El intervalo entre la primera evidencia de antígenemia y el diagnóstico de SIDA varió enormemente. Por ejemplo, en el caso nº 3 (tabla 9), el cual había sido previamente seronegativo para este marcador, su detección coincidió con el diagnóstico de SIDA; en el caso nº 6, un individuo que seroconvirtió tres meses después del comienzo del seguimiento, la enfermedad apareció 21 meses más tarde y el caso número 5 era antígenémico al menos cinco años antes del diagnóstico. Ninguno de los otros casos (cinco con antígenemia y 26 que nunca la presentaron) desarrollaron la enfermedad. Todos estos pacientes permanecieron incluidos en el grupo clínico III de la clasificación CDC (110).

Figura 8
VALOR PRONOSTICO. ESTUDIO LONGITUDINAL
Entrada



Fin del estudio

Aunque todas las muestras séricas analizadas contenían Anti-gp41, los anticuerpos Anti-p24 estuvieron ausentes a veces, determinados por EIA, durante la evolución de 12 de los 37 casos (tabla 9). La ausencia de Anti-p24 estuvo normalmente asociada con la presencia de VIH-Ag y viceversa. No obstante, ambos marcadores o coexistieron o estuvieron ausentes en algunas de las muestras de diferentes individuos. En tres de los pacientes que desarrollaron SIDA, los resultados para VIH-Ag y Anti-p24 se mostraron opuestos (casos nº 3, 5 y 6), pero en tres pacientes (casos nº 1, 2 y 4), que habían sido antigenémicos durante muchos meses antes del diagnóstico, los resultados de anti-p24 fluctuaron y en ocasiones, ambos marcadores fueron del mismo signo. Todas las 28 muestras que se analizaron por Western Blot resultaron positivas para Anti-VIH, incluyendo las 20 muestras que fueron no reactivas mediante EIA.

Tabla 9
Estudio longitudinal. Cambios status serológico

CASO Nº	MARCADOR SERICO	STATUS SEROLOGICO						EVOLUCION A SIDA	
		1982	1983	1984	1985	1986	1987		1988
1	VIH-Ag Anti-p24		+++ -+(-)	+	-a -a (+)(-)				SI (1985)
2	VIH-Ag Anti-p24	+ (-)	+ +	+ +	-a (+)	-a (+)	-a (+)		SI (1987)
3	VIH-Ag Anti-p24			- +		- +	+ -		SI (1987)
4	VIH-Ag Anti-p24				+ +	+ -	+++ ---		SI (1987)
5	VIH-Ag Anti-p24	+ -			+ -		+ -		SI (1987)
6	VIH-Ag Anti-p24				- + + -		+ -		SI (1987)
7	VIH-Ag Anti-p24			- +	- - + +	--+ +++	-- ++		NO
8	VIH-Ag Anti-p24			- (-)	- - (-) +	--- (+)(-)(-)	-- -(-)	- (-)	NO
9	VIH-Ag Anti-p24				- (+)		--- (-)-(+)		NO
10	VIH-Ag Anti-p24				- - -(-)	--- (+)+(-)	-- (-) (-)		NO
11	VIH-Ag Anti-p24				- (-)	--- (-)(-)+	+ (-)		NO
12	VIH-Ag Anti-p24			- +	- +	+ - - +	+ -		NO
13	VIH-Ag Anti-p24			+ -	+ (-)	-a (-)			NO
14	VIH-Ag Anti-p24		+ +	+ -	+ -		+ -		NO
15-37 ^b	VIH-Ag Anti-p24		- +	- +	- +	-- ++			NO

+/- indica presencia o ausencia del marcador

() indica muestra analizada por western-blot

^a Todas estas muestras fueron negativas cuando se reanalizaron para VIH-Ag

^b Todos estos casos están agrupadas bajo un perfil sérico que representa la media aproximada del número de muestras séricas y su distribución en el tiempo

DISCUSION

En lo que se refiere al valor diagnóstico de la determinación sérica del VIH-Ag en los estadios precoces de la infección por VIH, antes de la aparición de anticuerpos específicos, nuestros resultados demuestran que dicho marcador puede detectarse de forma aislada, aun utilizando técnicas muy sensibles para Anti-VIH y confirman su valor diagnóstico en la infección sintomática por VIH.

En el apartado que hace referencia al valor pronóstico del VIH-Ag, nuestros resultados demuestran que dicho marcador se comporta como un buen indicador pronóstico, habiéndose encontrado en nuestra serie la tasa más elevada (55%) de evolución a SIDA en pacientes antigenémicos, de las comunicadas en la literatura.

1. VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ DEL VIH-Ag

En este apartado, que hace referencia al valor para el diagnóstico precoz de la infección por el VIH que posee la determinación de VIH-Ag, hay que hacer constar que al menos el 27.7% de los pacientes incluidos en nuestra serie y que seroconvirtieron para Anti-VIH, presentaron antigenemia VIH con anterioridad a la seroconversión. Ello indica que este marcador puede tener valor diagnóstico, cuando aún no han aparecido los anticuerpos detectables por las técnicas

serológicas de screening. Esta afirmación posee un indudable interés, por cuanto incide sobre una de las propuestas estimadas para abordar el problema del "portador oculto" en los Bancos de sangre, como es la determinación sistemática del VIH-Ag (89). En este sentido, la solicitud de autoexclusión al donante voluntario de sangre y la determinación rutinaria de anticuerpos Anti-VIH mediante técnicas serológicas de primera línea, constituyen las medidas que en la actualidad se adoptan con el fin de evitar la transmisión del VIH a partir de donantes infectados. La primera de estas medidas, en la forma en que se desarrolla actualmente en nuestro medio, no carece de limitaciones como ya comunicara el autor de esta tesis en un trabajo previo (114). De igual forma, la eficacia de la determinación sistemática de anticuerpos Anti-VIH, puede estar limitada por la existencia de portadores que en el momento de la donación, carecen de ellos y por lo tanto su detección es infructuosa. En base a la información actualmente disponible, esta situación de "portador oculto" puede ocurrir en dos momentos diferentes de la historia natural de la infección por el VIH: 1) en personas infectadas cuando aún no han desarrollado anticuerpos específicos Anti-VIH y, por lo tanto, se encuentran en el llamado periodo ventana; este periodo incide, generalmente, en los estadios iniciales de la infección, con un intervalo que oscila entre 6 y 8 semanas, como apuntan observaciones efectuadas tanto en individuos expuestos

al VIH en un momento conocido (83), como en el terreno de la experimentación animal (115). De forma adicional, en un estudio muy reciente (84) se ha puesto de manifiesto, mediante biotecnología avanzada, que dicho periodo ventana puede llegar a ser tan largo como tres años, circunstancia esta que imprime aun más gravedad a la problemática que estamos tratando; y 2) en individuos que adquirieron la infección en el pasado, desarrollando anticuerpos Anti-VIH y que por razones no bien conocidas, los pierden convirtiéndose en Anti-VIH negativos, a pesar de seguir siendo portadores del virus y, por lo tanto, potencialmente infectivos (116). Para tratar de soslayar la primera de estas dos situaciones, que ya ha deparado casos de infección vehiculizada por transfusiones (117), se ha propuesto recientemente, como antes indicamos, la determinación sistemática del VIH-Ag (89). En contra de esta propuesta, se ha argumentado que si se utilizara un EIA recombinante, de segunda generación más sensible (118) y específico (63) que el EIA de primera generación habitualmente aplicado en los Bancos de sangre, la determinación del VIH-Ag se tornaría innecesaria, al acortarse el periodo ventana (119). Este argumento se ha visto reforzado por la comunicación de trabajos (120, 121) en los que la determinación simultánea de VIH-Ag y Anti-VIH no identificó mayor número de portadores que la determinación aislada de Anti-VIH. Nuestros resultados se oponen a estas argumentaciones esgrimidas en contra del valor que la determinación del

VIH-Ag puede tener en el diagnóstico precoz de la infección por el VIH, por cuanto demuestran que en los estadios iniciales de dicha infección, el VIH-Ag puede ser detectado como único marcador, aun utilizando técnicas muy sensibles.

Por otro lado, la infección por VIH en sus estadios precoces, suele ser asintomática, aunque a veces puede cursar con una gran riqueza clínica y heterogeneidad, que plantea problemas de diagnóstico diferencial con otros cuadros patológicos que inciden sobre personas en riesgo (mononucleosis infecciosa, secundarismo luético, etc.). En estos casos, la determinación de anticuerpos Anti-VIH carece de valor para el diagnóstico diferencial, a menos que se espere unas semanas, lo que puede conllevar retraso en el diagnóstico y someter al paciente a exploraciones complementarias o tratamientos empíricos innecesarios. En este sentido, como se demuestra en nuestro estudio, la determinación de VIH-Ag puede tener gran valor en el diagnóstico infección sintomática aguda por VIH.

En lo que respecta a la frecuencia (27.7%) con que aparece el VIH-Ag en nuestra serie, durante la fase previa a la seroconversión, es posible que nuestros resultados estén por debajo de las cifras que sería esperable encontrar, dado que la presencia de dicho marcador en estos estadios iniciales puede ser muy transitoria (45, 85) y además nuestro estudio posee el

inconveniente de disponer de muestras séricas obtenidas a intervalos muy irregulares, propiciado por su carácter retrospectivo.

2. VALOR PRONOSTICO DEL VIH-Ag

Cuando correlacionamos la antigenemia con la gravedad clínica de la infección por el VIH, en este caso representada por los distintos grupos clínicos, hallamos que el porcentaje de individuos con VIH-Ag positivo es mayor cuanto más avanzado es el estadio clínico en el que se encuentran. En otros estudios, el VIH-Ag se ha detectado entre el 8% y el 16% de individuos asintomáticos que, como los incluidos en nuestro trabajo, eran portadores de anticuerpos Anti-VIH (46, 48, 122), y entre el 69% y el 75% de los pacientes con SIDA (46, 48, 122). En nuestro estudio la frecuencia con que detectamos antigenemia VIH en los pacientes con SIDA (69%), es similar a la encontrada por estos autores. Podemos deducir, por tanto, que el conjunto de estos trabajos muestran una clara correlación entre la gravedad clínica de la infección por VIH y la frecuencia con la que se detecta el VIH-Ag (46, 48, 122).

La ausencia de VIH-Ag en la mayoría de los pacientes con LGP clínicamente estables (80%), y la observada en los pacientes con SIDA (21%) traducen, sin duda, hechos

biológicos de diferente significación. En estos últimos pacientes, con enfermedad avanzada, una explicación coherente pudiera ser la existencia de un marcado descenso de la replicación vírica a consecuencia del reducido número de linfocitos T4; estas células constituyen el sustrato biológico fundamental para la replicación del VIH. En los pacientes con LGP cabe aventurar dos hipótesis no necesariamente excluyentes: 1) el VIH-Ag se encuentra oculto formando inmunocomplejos con sus anticuerpos específicos, inducidos por él y, por lo tanto, no detectable; 2) el VIH se encuentra en fase de "infección latente", con su genoma integrado en el cromosoma de la célula que parasita, en forma de provirus, sin expresión de sus genes y por ello, sin que se produzca replicación viral activa, o bien en la forma de infección persistente con bajo índice de replicación, en cuyo caso la tasa sérica de VIH-Ag tampoco sería detectable.

Por otro lado, en la población analizada en el estudio longitudinal, hemos observado que más del 50% de las personas en las cuales apareció la antigenemia en algún momento de su evolución, desarrollaron SIDA. Sin embargo, ninguno de los individuos que permanecieron seronegativos para VIH-Ag, desarrollaron la enfermedad. También observamos que cerca de un 16% de los sujetos inicialmente sin VIH-Ag, seroconvirtieron para este marcador a lo largo del seguimiento.

Aunque la asociación directa entre la presencia de VIH-Ag en el suero y la gravedad de la infección viral ha quedado bien establecida, tanto en este trabajo, como por otros autores, tal como se ha comentado en líneas precedentes, aún conocemos poco sobre la dinámica de este marcador, expresada desde el momento de la infección hasta la muerte del paciente con SIDA. Se conoce, sin embargo, que el VIH-Ag puede detectarse en los estadios tempranos de la infección, aunque este marcador desaparece cuando se produce anticuerpos específicos (45, 85, 123). En otro extremo, se ha demostrado recientemente que el suero de algunos pacientes con SIDA se hace negativo para el VIH-Ag; esta desaparición del antígeno en los estadios últimos de la infección se ha considerado como un hecho indicativo de enfermedad progresiva y, por lo tanto, de mal pronóstico (47).

Además del presente trabajo, existen sólo cuatro estudios adicionales de suficiente tamaño (104-107), sobre el comportamiento del VIH-Ag antes del desarrollo del SIDA. Todos estos trabajos apuntan que los pacientes que seroconvierten para VIH-Ag, así como todos aquellos con antigenemia desde el comienzo del seguimiento, corren un muy alto riesgo de desarrollar SIDA. Sin embargo, en un estudio reciente realizado sobre un pequeño grupo de pacientes hemofílicos, Simmonds et al. (109) no encuentran relación alguna

entre la presencia de VIH-Ag en el suero y el desarrollo de SIDA. Se ha estimado que la tasa de seroconversión para VIH-Ag en individuos con anticuerpos Anti-VIH, puede ser tan alta como de un 20% al cabo de los dos años (106). Este porcentaje es muy similar al que obtenemos en nuestro estudio, de un 16%. El periodo de tiempo que transcurre entre la seroconversión para Anti-VIH y la aparición de antigenemia puede variar enormemente y los intervalos que se han comunicado van desde los cuatro hasta los 26 meses (105-106).

Los cinco individuos en los que apareció la antigenemia VIH durante nuestro estudio, la desarrollaron entre los meses tercero y vigesimonoveno del seguimiento. Sin embargo, no hemos podido averiguar con exactitud el momento de la seroconversión en estos casos. Nuestros resultados, al igual que los comunicados por otros autores derivan del estudio de pequeñas series, seguidas por periodos limitados de tiempo, de tal manera, que si los periodos de seguimiento en estos pacientes hubieran sido prolongados, la tasa de seroconversión hubiera alcanzado, probablemente, valores superiores al 20%.

Las tasas de evolución a SIDA en los pacientes antigenémicos que han sido comunicadas oscilan desde un 0% como se perfila en el estudio de Simmonds et al (109), hasta un 50% objetivado en el trabajo que

realizaron Mayer et al (108). Esto pone de manifiesto que la tasa de desarrollo de SIDA en estos pacientes antígenémicos encontrada por nosotros, de un 55%, es la más alta de las comunicadas hasta la fecha. Por supuesto, estas discrepancias pueden, al menos, ser parcialmente explicadas por algunos hechos como son la desigualdad en los periodos de tiempo empleados en el seguimiento de los pacientes, las diferencias en los criterios de selección de casos y por último, las diferencias en los momentos evolutivos desde la adquisición de la infección. En el presente estudio, hemos demostrado que el intervalo desde la primera evidencia de antigenemia VIH hasta el diagnóstico de SIDA puede variar enormemente, como también han comunicado otros autores (104-106), aunque la razón para esta variabilidad permanece desconocida.

Por otro lado, 26 de nuestros casos estudiados fueron persistentemente negativos para VIH-Ag y ninguno de ellos desarrolló SIDA durante un periodo medio de seguimiento que fue superior a 39 meses. Sin embargo, esto no significa que los pacientes sin antigenemia VIH detectable estén exentos de desarrollar SIDA o incluso que necesariamente tenga que pasar por un estado de antigenemia previo al desarrollo de la enfermedad. De hecho, es bien conocida la situación de personas con viremia VIH demostrada, en las cuales no ha sido posible detectar el VIH-Ag (124). En cualquier caso, el riesgo de desarrollar SIDA podría ser tan alto como 20

veces mayor en los individuos antígenémicos, como han señalado De Wolf et al (105).

En todas las muestras séricas analizadas hemos observado que la presencia de VIH-Ag estuvo de forma habitual, asociada a una ausencia de Anti-p24 y viceversa. Sin embargo, la ausencia de Anti-p24 no constituyó un hallazgo constante en estos casos y en ciertas ocasiones, su presencia coexistió incluso con la presencia de VIH-Ag. Esta observación podría poner de manifiesto que la detección de VIH-Ag tiene un mayor valor pronóstico que la ausencia de Anti-p24, como ha sido sugerido recientemente por Moss et al (105). Hemos encontrado, además, varias muestras reactivas para Anti-p24 mediante WB, pero no reactivas para este mismo marcador cuando dichas muestras eran analizadas mediante EIA. De cualquier forma, esto no constituye un hallazgo sorprendente, ya que como Lelie et al demuestran en un trabajo recientemente publicado (118), el WB es una técnica serológica más sensible para detectar Anti-p24 que el EIA. Además, la ausencia de reactividad para Anti-p24 mediante EIA pero no por WB, probablemente ponga de manifiesto la existencia de unos niveles bajos de anticuerpos (108).

El hecho de que el VIH-Ag se comporte como un indicador pronóstico, tal como se demuestra en este trabajo, tiene una enorme trascendencia. Recientemente Fischl et al (125) han demostrado que la Zidovudina

(AZT), un fármaco que inhibe la retrotranscripción del VIH (126, 127), puede mejorar las expectativas de vida media, así como la calidad de ésta, en los pacientes con SIDA o con Complejo relacionado con el SIDA. A pesar de esto, existen varias razones por las que el tratamiento con AZT no se ha hecho extensivo a todos los individuos Anti-VIH positivos, de forma indiscriminada: 1) escasa disponibilidad y elevado coste del medicamento; 2) los importantes y frecuentes efectos indeseables que induce este fármaco (128) y 3) el relativo desconocimiento de la historia natural de estas personas con anticuerpos Anti-VIH, que ha impedido delimitar dentro de ellas, una subpoblación de más alto riesgo para desarrollar la enfermedad fatal. En lo que hace referencia a este último punto, se han señalado indicadores clínicos y biológicos con posible valor predictivo de evolución a SIDA. Entre los indicadores clínicos se han considerado la aparición de herpes zoster (91), linfadenopatías (92), candidiasis oral (93) y leucoplaquia peluda (94); entre los biológicos se han referido como tales indicadores la escasa respuesta proliferativa frente a determinados antígenos (95), la trombopenia y/o descenso significativo de linfocitos T4 (96, 97), la pérdida del Anti-VIH-GAG (98, 99), la determinación de interferón gamma sérico (100) y el incremento de la beta-2 microglobulina en suero (107). Algunos de estos aparentes indicadores evolutivos han sido criticados con posterioridad y así, por ejemplo, se ha cuestionado

que los pacientes con linfadenopatías evolucionen más a SIDA que los Anti-VIH positivos asintomáticos (101); la candidiasis oral es una entidad que se encuadra en el diagnóstico presuntivo de esofagitis candidiásica, por lo que obviamente no debe ser considerada como un indicador pronóstico de estadios precoces de la infección. Otros marcadores o bien señalan ya un estado avanzado de depresión inmune, o su complejidad técnica y escasa disponibilidad hacen que no sean de aplicación rutinaria en la mayoría de los hospitales.

En nuestro estudio, el hecho de que más del 50% de los pacientes VIH-Ag positivos que hemos evaluado durante un periodo de seguimiento de tres años hayan desarrollado SIDA al contrario de los que no presentaban antigenemia, demuestra el verdadero valor pronóstico que posee este marcador. En este sentido, y en caso de que la terapia antiviral fuese iniciada en pacientes Anti-VIH positivos, los candidatos debieran ser elegidos del grupo de pacientes con antigenemia VIH. El tratamiento antiviral debiera ser instaurado lo más precozmente posible, en los estadios iniciales de la infección, cuando el sistema inmune está aún poco comprometido. Los resultados preliminares de un estudio en el que se somete a tratamiento con AZT a individuos asintomáticos con antigenemia VIH, proporcionan un horizonte pleno de nuevas esperanzas para estos pacientes (129).

CONCLUSIONES

1) El VIH-Ag puede detectarse como marcador aislado en los estadios iniciales de la infección por VIH, aun cuando se utilizan técnicas muy sensibles de detección de anticuerpos Anti-VIH.

2) Existe una clara correlación entre la gravedad clínica de la infección por VIH en sus estadios evolutivos, y la frecuencia con que es detectado el VIH-Ag.

3) Los pacientes con antigenemia persistente o aparición de VIH-Ag durante la evolución de su infección, corren un muy alto riesgo de desarrollar SIDA, en contraste con aquellos que no presentan dicho marcador.

4) De estas dos conclusiones precedentes, podemos establecer que el VIH-Ag posee indudable valor como indicador pronóstico.

RESUMEN

En relación con la infección por VIH, existen algunos aspectos incompletamente conocidos o evaluados. Uno de ellos, hace referencia al valor diagnóstico de la determinación del VIH-Ag en los estadios precoces de la infección, cuando aún no se han producido anticuerpos específicos; si bien este marcador puede detectarse de forma aislada durante las fases iniciales de la infección, su utilidad diagnóstica real se ha cuestionado en base a lo efímero de su presencia en el suero, habiéndose incluso afirmado, que su detección aislada, sin Anti-VIH, es excepcional cuando se utilizan técnicas serológicas para anticuerpos, de segunda generación, más sensibles.

Por otro lado, el relativo desconocimiento de la historia natural de la infección por VIH, hace muy difícil, si no imposible, establecer qué porcentaje de personas portadoras de anticuerpos Anti-VIH, desarrollarán SIDA y en este sentido, el VIH-Ag se ha considerado, entre otros, como un buen indicador pronóstico, y como tal, capaz de delimitar una subpoblación de mayor riesgo para el desarrollo de la enfermedad mortal. No obstante, también existen discrepancias en la literatura acerca del valor que

como indicador pronóstico posee el VIH-Ag.

En base a estas premisas, emprendimos nuestro trabajo con un doble objetivo:

1) Establecer el valor de la determinación de VIH-Ag en el diagnóstico precoz de la infección por VIH.

2) Establecer el valor del VIH-Ag como indicador pronóstico en la infección por VIH.

Abordamos estos objetivos mediante un doble estudio, el primero de los cuales, de carácter retrospectivo, estuvo dirigido a la valoración del VIH-Ag en el diagnóstico precoz de la infección por VIH; el segundo bloque, dirigido a la evaluación del VIH-Ag como indicador pronóstico se constituyó a partir de un primer estudio transversal y otro longitudinal, de seguimiento.

1. VALOR DIAGNOSTICO PRECOZ

Se incluyeron 18 personas en riesgo, y la selección se realizó de modo retrospectivo, revisando el archivo de nuestra seroteca correspondiente a los pacientes estudiados entre Enero de 1984 y Diciembre de 1988. Se

establecieron dos criterios de inclusión: 1) evidencia de seroconversión para Anti-VIH, confirmada adecuadamente y 2) disponer de al menos otra muestra sérica distinta a la correspondiente a la seroconversión, obtenida previamente. El momento de la seroconversión se definió cuando se obtuvo la primera muestra reactiva para Anti-VIH analizada por EIA de segunda generación (Lab. Abbott), si dicha positividad era confirmada mediante Western Blot (Lab. Pasteur) en esa misma muestra o en la obtenida inmediatamente después.

De todos los pacientes se dispuso de muestras de suero secuenciadas (un total de 49), obtenidas entre 13 meses y 10 días previos a la seroconversión. La secuencia de obtención de muestras y el número de ellas, resultaron ser muy irregulares. En todas las muestras se investigó Anti-VIH mediante un EIA de segunda generación (Lab. Abbott) y en mucha de ellas (34 de las 49 totales), también se había aplicado un EIA de primera generación (Lab. Pasteur); la confirmación de las positivities se realizó con Western Blot (Lab. Pasteur). El VIH-Ag se determinó en todas las muestras mediante un EIA (Lab. Abbott) y la confirmación se realizó mediante técnica de neutralización (Lab. Abbott).

En nueve individuos se dispuso de información clínica correspondiente al periodo de la seroconversión

(cinco con linfadenopatías generalizadas, tres con infección aguda por VIH y uno asintomático).

En cinco de los 18 pacientes, se detectó VIH-Ag, en cuatro de ellos como marcador aislado y en uno asociado a positividad para Anti-VIH por EIA recombinante, aunque negativo por EIA convencional. En dos de los casos en que se detectó VIH-Ag, su determinación fue de gran valor diagnóstico para etiquetar etiológicamente el cuadro clínico.

2. VALOR PRONOSTICO

2.a. Estudio transversal

En este apartado se incluyeron 167 pacientes con positividad para Anti-VIH confirmada, elegidos sin ningún otro criterio definido de entre los que se controlaban periódicamente en nuestra consulta, desde Octubre de 1982 hasta Enero de 1988.

Todos estos pacientes fueron sometidos a evaluación clínica y clasificados, según esta, en los estadios clínicos de la infección por VIH establecidos por los C.D.C.. De cada uno de estos individuos se disponía de al menos una muestra sérica, extraída en el momento del diagnóstico o en fecha muy próxima a este, y todas ellas fueron analizadas para Anti-VIH mediante un EIA de segunda generación (Lab. Abbott) y confirmadas por EIA confirmatorio (Lab. Abbott) y/o Western Blot (Lab. Sorin). Asimismo, se investigó VIH-Ag en todas las muestras, mediante un EIA (Lab. Abbott), con confirmación por técnica de neutralización (Lab. Abbott).

De los 167 pacientes incluidos, 56 resultaron pertenecer al estadio clínico II y de ellos, el 7% presentó VIH-Ag, 69 pertenecía al estadio III presentando un 20% de ellos antigenemia; finalmente, 42 individuos estaban adscritos al estadio IV de la infección, siendo VIH-Ag positivo en el 69% de estos.

2.b. Estudio longitudinal

Se incluyeron 37 pacientes de entre todos los estudiados por nuestro Grupo desde Enero de 1982 y Enero de 1988, que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- a) Tiempo de seguimiento de al menos 24 meses.
- b) Disponer de al menos tres muestras séricas obtenidas a intervalos no menores de ocho meses y conservadas mediante congelación a -20°C .
- c) Positividad confirmada para Anti-VIH, antes del inicio del seguimiento, mediante técnicas adecuadas.
- d) Pertenencia al estadio clínico III de la infección por VIH.
- e) No haber seguido tratamiento con inmunomoduladores y/o fármacos antivirales.

El periodo de seguimiento global fue de 38.2 ± 11 meses (rango 24 a 69), siendo similar dicho periodo para los individuos que desarrollaron SIDA de 37.8 ± 18 meses (rango 24 a 69), al de los pacientes que evolutivamente no llegaron a presentar dicha enfermedad de 38.1 ± 10.2 meses (rango 24 a 60). Todos los pacientes fueron sometidos a evaluación clínica con revisiones periódicas.

Se dispuso de un total de 167 muestras séricas con

una media de muestras por paciente de 4.4 ± 1.8 (rango 3 a 9). La detección de Anti-VIH antes de la inclusión en el estudio se realizó por EIA de segunda generación (Lab. Abbott) y las muestras positivas se confirmaron mediante Western Blot (Lab. Sorin). A partir del inicio del seguimiento, las muestras fueron analizadas para VIH-Ag mediante EIA (Lab Abbott) y técnica de neutralización (Lab. Abbott) para confirmación de las positividadades. Los anticuerpos Anti-gp41 (Anti-ENV) y Anti-p24 (Anti-GAG) se determinaron mediante un EIA competitivo (Lab. Abbott). Adicionalmente, 28 muestras se analizaron por Western Blot (Lab. Sorin).

Al comienzo del estudio seis pacientes presentaron VIH-Ag detectable y de ellos, cuatro (67%) evolucionaron a SIDA en distintos periodos de tiempo (24, 28, 50 y 69 meses). De los 31 pacientes que inicialmente fueron VIH-Ag negativos, cinco desarrollaron antigenemia a lo largo del seguimiento, evolucionando a SIDA dos (40%) a los 24 y 32 meses respectivamente; los 26 pacientes restantes permanecieron VIH-Ag negativos y ninguno (0%) desarrolló SIDA, permaneciendo estables clínicamente en estadio III de la infección. En resumen, seis de los 11 pacientes (55%) que en algún momento de su evolución presentaron antigenemia, desarrollaron SIDA; en todos los casos de SIDA (100%), el VIH-Ag fue positivo antes del establecimiento del diagnóstico. Esto contrasta con lo observado en los pacientes persistentemente

negativos para el VIH-Ag, donde el diagnóstico de SIDA constituyó el 0% a todo lo largo del seguimiento.

Las muestras que se analizaron por EIA competitivo, presentaron Anti-gp41 en todos los casos, mientras que los anticuerpos Anti-p24 estuvieron ausentes, a veces, durante la evolución de 12 de los 37 probandos. La ausencia de anti-p24 estuvo normalmente asociada con la presencia de VIH-Ag y viceversa. No obstante, ambos marcadores o coexistieron, o estuvieron ausentes en algunas de las muestras de diferentes individuos.

Todos estos resultados demuestran que el VIH-Ag tiene utilidad en el diagnóstico precoz de la infección por VIH así como el indudable valor pronóstico que posee dicho marcador serológico.

La utilidad práctica que se desprende de estas conclusiones es obvia. Por un lado, la primera de ellas puede constituir un argumento a favor, aunque no suficiente, para la determinación sistemática de VIH-Ag en los Bancos de sangre, como ya han propuesto algunos autores, o al menos, punto de partida para la realización de estudios prospectivos amplios que ayuden a clarificar esta problemática que acontece en relación con el tema del portador "oculto". En segundo lugar, la determinación de VIH-Ag en la práctica clínica debiera estimarse, al menos, en aquellos pacientes adscritos a colectivos de riesgo con datos clínicos de sospecha de

infección aguda por VIH, en los que dicho marcador puede clarificar el diagnóstico etiológico, aún cuando no se haya producido todavía, la seroconversión para anticuerpos Anti-VIH. Por otro lado, la demostración del valor pronóstico del VIH-Ag, o lo que es lo mismo, de su capacidad para delimitar subpoblaciones de alto riesgo dentro del colectivo de personas Anti-VIH positivas, puede constituir la base para la adopción de este marcador como criterio de selección de candidatos para el tratamiento antiviral.

BIBLIOGRAFIA

1. BARRE-SINOUSSE F, CHERMANN JC, REY F, et al. Isolation of T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220: 868-70.

2. GOTTLIEB MS, SCHROFF R, SCHANKER HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981; 305: 1425-31.

3. FRIEDMAN-KIEN AE, LAUBENTEIN LJ, RUENSTEIN P, et al. Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. Ann Intern Med 1982; 96: 693-700.

4. KLATZMAN D, BARRE-SINOUSSE F, NUGEYRE MT, et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper inducer T lymphocytes. Science 1984; 225: 59-63.

5. LEVY JA, HOFFMAN AD, KRAMER SM, et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. Science 1984; 225: 840-842.

6. LEVY JA, SHIMABUKURO JM. Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. J Infect Dis 1985; 152: 734-738.

7. GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984; 224: 500-3.

8. RATNER L, GALLO RC, WONG-STAAAL F. HTLV-III, LAV, ARV, are variants of the same AIDS virus. Nature 1985; 313: 636-637.

9. CASE K. Nomenclature: human immunodeficiency virus. Ann Intern Med 1986; 105: 133.

10. CLAVEL F, GUETARD D, BRUN-VEZINET F, et al. Isolation of a new human retrovirus for West African patients with AIDS. Science 1986; 233: 343-6.

11. GONDA MA, BRAUN MJ, CLEMENTS JE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4007-4011.

12. HIRSCH V, RIEDEL N, MULLINS JI. The genome organization of STLV-III is similar to that of the AIDS virus except for a truncated transmembrane protein. Cell 1987; 49: 307-319.

13. GALLO RC, WONG-STAAAL F. A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985; 103: 679-689.

14. MONTAGNIER L. Lymphadenopathy-associated virus: From molecular biology to pathogenicity. Ann Intern Med 1985; 103: 689-93.

15. STAAL FW, GALLO RC. Human T-lymphotropic retroviruses. Nature 1985; 317: 395-403

16. HANH BH, GONDA MA, SHAW GM, et al. Genomic diversity of the acquired immunodeficiency virus HTLV-III: Different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. Proc Natl Acad Sci 1985; 82: 4813-4817.

17. RATNER L, HASELTINE W, PATARCA R, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature 1985; 313:277-284.

18. ROBEY WG, SAFAI B, OROSLAN S, et al. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. Science 1985; 228: 593-5.



19. SARIN PS, SUN DK, THORNTON AH, NAYLOR PH, GOLDSTEIN AL . Neutralization of HTLV-III/LAV replication by antyserum to tymosin alfa-1. Science 1986; 232: 1135-7.

20. FARMERIE WG, LOEB DD, CASAVANT NC, et al. Expression and processing of the AIDS virus reverse transcriptase in Escherichia coli. Science 1987; 236: 305-8

21. LASKY LA, GROOPMAN JE, FENNIE CW. Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. Science 1986; 233: 209-12.

22. ALLAN JS, COLIGAN JE, BARIN F, et al. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. Science 1985; 228: 1092-4.

23. DALGLEISH AG, REVERLY PCL, CLAPHAM PR, CRAWFORD DH, GREAVES MF, WEIS RA. The CD4 (T4) antigen is a essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 1984; 312: 763-7.

24. KLATZMANN D, CHAMPAGNE E, CHAMARET S, et al. T-lymphocyte T4 molecula behaves as the receptor for human retrovirus LAV. Nature 1984; 312 767-8.

25. KNIGHT DM, FLOMMERFELT RA, GHAYEB J. Expression of the ART/TRS protein of HIV and study of the role in viral envelope synthesis. *Science* 1987; 236: 837-40.

26. LIFSON J, FEINBERG MB, REYES GR, et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 1986; 323: 725-8.

27. FISHER AG, RATNER L, MITSUYA M, et al. Infection mutants of HTLV-III with changes in 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science* 1986; 233: 655-9

28. PETERLIN BM, LUCIW PA, BARR PJ, WALKER ME. Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 86: 9734-8.

29. SODROSKY J, PATARCA R, ROSEN C, WONG-STAAAL F, HASELTINE W. Location of the Trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 1985; 229: 74-77.

30. FISHER AG, FEINBERG MB, JOSEPHS SF, et al. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 1986; 320: 367-70.

31. BURNY A. More and better trans-activation. Nature 1986; 312: 378.
32. KAN NC, FRANCHINI G, WONG-STAAAL F, et al. Identification of HTLV-III/LAV sor gene product and detection of antibodies in human sera. Science 1986; 231: 1553-5.
33. MCDUGAL JS, KENNEDY MS, SLIGH JM, CORT SP, MWLW A, NICHOLSON JKA. Binding of HTLV III/LAV to T4 cell by a complex of the 110 viral protein and t4 molecula. Science 1986; 231: 382-5.
34. TALLE MA, RAO PE, WESTBERG E, et al. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. Cell Immunol 1983; 78: 83-95.
35. WILEY CA, SCHRIER RD, NELSON JA, et al. Cellullar localization fo human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immunodeficiency syndrome patients. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 7089-7093.
36. GABUZDA DH, HO DD, DE LA MONTE SM, et al. Immunohistochemical identification of HTLV-III in brains of patients with AIDS. Ann Neurol 1986; 20: 289-295.

37. MADDON PJ, DALGLEISH AG, McDOUGAL JS, CLAPHAM PR, WEISS RA, AXEL R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain.

38. PERT CB, HILL JM, RUFF MR, et al. Octapeptides deduced from the neuropeptide receptor-like pattern of antigen T4 in brain potently inhibit human immunodeficiency virus receptor binding and T-cell infectivity. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 9254-9258

39. HO DD, ROTA TR, HIRSCH MS. Infection of monocyte/macrophages by human T-lymphotropic virus type III. J Clin Invest 1986; 77: 1712-1715.

40. GARTNER S, MARKOVITZ P, MARKOVITZ DM, KAPLAN MH, GALLO RC, POPOVIC M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. Science 1986; 233: 215-219.

41. RESNICK L, NOVATT G. Human T-cell lymphotropic viruses: syncytia formations. JAMA 1986; 255: 3421.

42. SHAW GM, HANH BH, ARYA SK, GROOPMAN JE, GALLO RC, WONG-STAAAL F. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immunodeficiency syndrome. Science 1984; 226: 1165-1171.

43. HOXIE JA, HAGGARTY BS, RACKOWSKI JL, PILLSBURY N, LEVY JA. Persistent non-cytopathic infection of normal human T lymphocytes with AIDS-associated retrovirus. Science 1985; 229: 1400-2.

44. LANE CH, DEPPER JM, GREENE WC, et al. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for selective defect in soluble antigen recognition. N Engl J Med 1985; 313: 79-84.

45. ALLAIN JP, LAURIAN Y, PAUL DA, SENN D. Serological markers in early stages of human immunodeficiency infection in hemophiliacs. Lancet 1986; 2: 1233-6.

46. GOUSMIT J, DE WOLF F, PAUL DA, et al. Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. Lancet 1986; 2: 178-80.

47. LEAL M, REY C, PINEDA JA, et al. Expresión sérica del (de los) antígeno(s) del virus de la inmunodeficiencia humana (Ag-VIH) en personas de riesgo. Evidencia de desaparición del Ag-VIH en el curso evolutivo de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Med Clin (Barc) 1987; 89: 634-7.

48. CHASE R, KESSLER H, PAUL D, et al. Serum HTLV-III/LAV antigen and antibody detection: Correlation with clinical status. International Conference on AIDS. Paris 1986.

49. BARIN F, McLANE MF, ALLAN JS, LEE TH. Virus envelope proteins of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. Science 1985; 228: 1094-6.

50. SCHUPBACH J, HALLER O, VOGT M, et al. Antibodies to HTLV-III in swiss patients with AIDS and pre-AIDS and in group at risk for AIDS. N Engl J Med 1985; 312: 265-70.

51. KITCHEN L, MALONE G, ORGAD S, et al. Virus envelope protein is the major target antigen for antibodies in hemophiliacs patients. J Infec Dis 1986; 153. 788-90.

52. BEDARIDA G, CAMBIE G, D'AGOSTINO F, et al. HIV IgM antibodies in risk groups who are seronegative on ELISA testing. Lancet 1986; 2: 570-1.

53. CHAISSON RE, ALLAIN JP, LETTHER M, et al. Significant changes in HIV antigen levels in the serum of patients treated with azidothymidine. N Engl J Med 1986; 315: 1610-12.

54. ABAD MA, LEAL M, PINEDA JA, et al. Comparación del radioinmunoanálisis frente a enzimoimmunoanálisis en la detección de anticuerpos séricos contra el virus del SIDA. Med Clin (Barc) 1987; 89: 144-6.

55. REESINK HW, LESLIE PN, HUISMAN JC, et al. Evaluation of six enzyme immunoassay for antibody against human immunodeficiency virus. Lancet 1986; 2: 483-6.

56. WARD JW, GRINDON AJ, FEORINO PD, SCHABLE C, PARVIN M, ALLEN JR. Laboratory and epidemiologic evaluation of an enzyme immunoassay for antibodies to HTLV-III. JAMA 1986; 256: 357-61.

57. ESSEX M, ALLAN J, KANKI P, et al. Antigens of human lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy associated virus. Ann Intern Med 1985; 103: 700-3.50.

58. KUHNLE P, SEIDL S, HOLZBERGER G. HLA-DR4 antibodies cause positive HTLV-III antibody ELISA results. Lancet 1985; 2: 1222-3.

59. WEISS SH, MANN DL, MURRAY C, POPOVIC M. HLA-DR antibodies and HTLV-III antibody ELISA testing. Lancet 1985; 2: 157.

60. PRENTICE RL, COLLINS RJ, WILSON RJ. Evaluating HTLV-III antibody test. Lancet 1985; 2: 274-5.

61. MICHAÏL-MERIANOU V, TZIVARAS A, PIPERI-LOWES L, KATTAMIS C, LADIS V, PAPADAKOU-LAGOGIANNI R. False positive HTLV-III antibody test in multitransfused patients with thalassaemic. Lancet 1986; 1: 678.

62. BEDARIDA G, CAMBIEL G, D'AGOSTINO F. Anti IgM screening for HIV. Lancet 1986; 2: 1456.

63. NAVARRO MD, PINEDA JA, VELARDO MA, et al. Recombinant EIA for testing is more specific than conventional EIA. Vox sanguinis 1988; 54: 62-63.

64. SCHULTZ TF, ASCHAUER JM, HENGSTER P, et al. Envelope gene-derived recombinant peptide in the serodiagnosis of human immunodeficiency virus infection. Lancet 1986; 2: 111-2.

65. CABRADILLA CD, GROOPMAN JE, LANIGAN J, RAUZ M, LASKI LA, CAPOU DJ. Serodiagnosis of antibodies to the human AIDS retrovirus with a bacterially synthesized env polypeptide. Biotechnology 1986; 4: 128.33.

66. FISCHINGER PJ, BOLOGNESI C. Perspectivas de las pruebas diagnósticas, la intervención y el desarrollo de la vacuna contra el SIDA. En: De Vita NT, Hellman S, Rosenberg SA eds. SIDA. Etiología, diagnóstico tratamiento y prevención. Salvat. Barcelona 1986; 53-87.

67. VERONESSE FDM, SARNGADHARAN MG, RHAMAN R, et al. Monoclonal antibodies specific for p24, the major core protein of human T-cell leukemia virus type III. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 5199-5202

68. GOEDERT JJ. Testing for human immunodeficiency virus. Ann Inter Med 1986; 105: 609-10.

69. SAJAI B, GROOPMAN JE, POPOVIC M, et al. Seroepidemiological studies of human T lymphotropic retrovirus type III. Lancet 1984; 1: 1438.

70. ULSTRUP JC, SKAUG K, FIGENSCHAU KJ, ORSTAVI DI, BRUUN JN, PETERSEN G. Sensitivity of Western Blotting (compared with ELISA and immunofluorescence) during seroconversion after HTLV-III infection. Lancet 1986; 1: 1151-2.

71. GROOPMAN JE, HARTZBAND PI, SHULMANN L, et al. Antibody seronegative human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) infected patients with acquired immunodeficiency syndrome or related disorders. Blood 1985; 66: 742-44.

72. MAYER KH, STODDARD AM, McCUSKER J, AYOTTE D, FERRIANI R, GROOPMAN JE. Human lymphotropic virus type III in high-risk, antibody negative homosexual men. Ann Inter Med 1986; 104: 194-96.

73. SALAHUDDIN SZ, GROOPMAN JE, MARKHAM PD, et al. HTLV-III in symptom-free seronegative persons. Lancet 1984; 2: 1418-20.

74. GALLO RC, DIGGS JL, SHELL GR. Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence and Western Blot methods. J Clin Microbiol 1986; 23: 1049-51.

75. COROUCE AM, MULLER JY, RICHARD D. False positive Western-Blot reactions to human immunodeficiency virus in blood donors. Lancet 1986; 2: 921-2.

76. BURKE DS, REDFIELD RR. False positive Western Blot test for antibodies to HTLV-III. JAMA 1986; 256:347.

77. BIBERFIELD G, RADEN WB, BOTTIGER B. Blood donor sera with false-positive western-blot reactions to human immunodeficiency virus. Lancet 1986; 2: 289-90.

78. ESSEX M, McLANE MF, LEE TH, et al. Antibodies to human T-cell leukemia virus membrane antigen (HTLV-MA) in hemophiliacs. Science 1983; 221: 1061-4.

79. BLUMBERG RS, SAUDSTROM EG, PARADIS TJ, et al. Detection of human T-cell lymphotropic virus type III-related antigens and anti-human by anticomplementary immunofluorescence. J Clin Microbiol 1986; 23: 1072-7.

80. SAUDSTROM EG, SCHOOLEY RT, HO DD, et al. Detection of human anti-HTLV-III antibodies by indirect immunofluorescence using fixed cells. Transfusion 1985; 25: 308-12.

81. LANGE JMA, PAUL DA, HUISMAN HG, et al. Persistent HIV antigenemia and decline of HIV core antibodies associated with transition of AIDS. Br Med J 1986; 293: 1459-62.

82. VERONESSE FD, DE VICO AL, COPELAND TD, OROSLAN S, GALLO RC, SARNGADHARAN MG. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gen. Science 1985; 229: 1402-4.

83. ESTEBAN JI, SHIH JWK, TAI CC, et al. Importance of western blot analysis in predicting infectivity of anti-HTLV III/LAV positive blood. Lancet 1985; 2: 1083-6

84. IMAGAWA DT, LEE MH, WOLINSKY SM, et al. Human immunodeficiency virus type I in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. N Engl J Med 1989; 320: 1458-1462.

85. KESSLER HA, BLAAUW B, SPEAR J et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. JAMA 1987; 258: 1196-1199.

86. GAINES H, ALBERT J, von SIDOW M, et al. HIV antigenaemia and virus isolation from plasma during primary HIV infection. Lancet 1987; 1: 1317-8.

87. WALL RA, DENNING DW, AMOS A. HIV antigenaemia in acute VIH infection. Lancet 1987; 1: 566.

88. von SYDOW M, GAINES H, SÖNNERBORG A, et al. Antigen detection in primary HIV infection. Br Med J 1987; 296: 238-240.

89. STRAMER SL, HELLER JS, COOMBS RW, HO DD, ALLAIN JP. Transmission of HIV by blood transfusion. N Engl J Med 1988; 319: 513-514.

90. LELIE PN, van der POEL CL, REESINK HW, HUISMAN HG, BOUCHER CAB, GOUDSMIT J. Efficacy of the latest generation of antibody assays for (early) detection of HIV 1 and HIV 2 infection. Vox Sanguinis 1989; 56: 59-61.

91. MELBYE M, GROSSMAN RJ, GOEDERT JJ, EYSTER ME, BIGGAR RJ. Risk of AIDS after herpes zoster. Lancet 1987; 1: 728-731.

92. KAPLAN JE, SPIRA TJ, FISHBEIN DB, PINSKY PF, SCHONBERGER LB. Lymphadenopathy syndrome in homosexual men. Evidence for continuing risk of developing the acquired immunodeficiency syndrome. JAMA 1987; 257: 335-337.

93. KLEIN RS, HARRIS CA, SMILL CB, et al. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1984; 311: 354-358.

94. GREENSPAN D, GREENSPAN JS, HEARST NG, et al. Relation of oral leukoplakia to infection with the human immunodeficiency virus and the risk of developing AIDS. J Infec Dis 1987; 155: 475-481.

95. HOFFMAN B, LINDHART BO, GERSTOFT J, et al. Lymphocyte transformation response to pokeweed mitogen as a predictive markers for development of AIDS and AIDS related symptoms in homosexual men with HIV antibodies. Br Med J 1987; 295: 293-6.

96. POLK BF, FOX R, BROOKMEYER R, et al. Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. N Engl J Med 1987; 316: 61-66.

97. EYSTER ME, GAIL MH, BALLARD JO, AL-MONDHIRY H, GOEDERT JJ. Natural history of human immunodeficiency virus infection in hemophiliacs: effects of T-cell subset, platelet counts, and age. Ann Intern Med 1987; 107: 1-6.

98. FRÖSNER GG, ERFLE V, MELLER W, HELHMANN R. Diagnostic significance of quantitative determination of HIV antibody specific for envelope and core proteins. Lancet 1987; 1: 159-160.

99. WEBER JN, CLAPHAM PR, WEISS RA, et al. Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralising sera and associated of anti-GAG antibody with prognosis. Lancet 1987; 1: 119-122.

100. EYSTER ME, GOEDERT JJ, POOM MC, PREBLE OT. Acid-labile alpha interferon: a possible preclinical marker for the acquired immunodeficiency in hemophilic. N Engl J Med 1983; 309: 583-586.

101. OSMOND D, CHAISSON R, MOSS A, BACHETTI P, KRAMPF W. Lymphadenopathy in asymptomatic patients seropositive for HIV. N Engl J Med 1987; 317: 246.

102. NAVARRO MD, LEAL M, PINEDA JA, et al. Infecciones oportunistas y Sarcoma de Kaposi en hemofílicos. Análisis de una serie de pacientes controlados en un Hospital y valoración de la conducta médica. Rev Clin Esp 1987; 180: 188-193.

103. TAVITIAN A, RAUFMAN J-P, POSENTHAL LE, et al. Oral candidiasis as a marker for esophageal candidiasis in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Inter Med 1986; 104: 54-55.

104. PEDERSEN C, NIELSEN CM, VESTERGAARD BF, KROGSGAARD K, NIELSEN JO. Temporal relation fo antigenaemia and loss of antibodies to core antigens to development of clinical disease in HIV infection. Br Med J 1987; 295: 567-9.

105. De WOLF F, GOUDSMIT J, PAUL D, et al. Risk of AIDS-related complex and AIDS in homosexual men persistent HIV antigenemia. Br Med J 1987; 295: 569-572.

106. ALLAIN JP, LAURIAN YL, PAUL D, et al. Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. N Engl J Med 1987; 317: 1114-1121.

107. 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: 745-750.

108. MAYER KH, FALK LA, PAUL DA, et al. Correlation of enzyme-linked immunosorbent assays for serum human immunodeficiency virus antigen and antibodies to recombinant viral proteins with subsequent clinical outcomes in a cohort of asymptomatic homosexual men. Am J Med 1987; 83: 208-212.

109. SIMMONDS P, LAINSON FAL, CUTHBERT R, et al. HIV antigen and antibody detection: variable responses to infection in the Edinburg haemophiliac cohort. Br Med J 1988; 296: 593-8.

110. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Classification system for human T-Lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus infections. MMWR 1986; 35: 334-339.

111. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Revision of the CDC surveillance case definition of acquired immunodeficiency syndrome. MMWR 1987; 36: 3-15.

112. JACKSON GG, PAUL D, FALK LA, et al. Human immunodeficiency virus antigenaemia (p24) in the acquired immunodeficiency syndrome and the effect of treatment with zidovudine. Ann Intern Med 1988; 108: 175-180.

113. CONSORTIUM FOR RETROVIRUS SEROLOGY STANDARDIZATION. Serological diagnosis of human immunodeficiency virus infection by western blot testing. JAMA 1988; 260: 674-9.

114. SOTO B, SANCHEZ-QUIJANO A, CASTRO R, LEAL M. La autoexclusión del donante en relación con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana: una problemática aún no resuelta. Med Clin (Barc) 1987; 89: 526.

115. ALTER HJ, EICHBERG JW, MASUR H, et al. Transmission of HTLV III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. Science 1984; 226: 549-552.

116. FARZADEGAN M, POLIS MA, WOLINSKY SM, et al. Loss of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies with evidence of viral infection in asymptomatic homosexual men. *Ann Inter Med* 1988; 108: 785-790.

117. WARD JW, HOLMBERG SD, ALLEN JR, et al. Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusion screening as negative for HIV antibody. *N Engl J Med* 1988; 319: 473-478.

118. LELIE PN, REESINK HW, HUISMAN H. Evaluation of three second generation and three confirmatory assays for antibodies to human immunodeficiency virus. *Vox Sang* 1988; 54: 84-91.

119. LELIE PN, REESINK HW, HUISMAN H. Earlier detection of HIV and second-generation antibody assays. *Lancet* 1987; 2: 343.

120. PEITREQUIN R, GRAF I, LANTIN JP, FREI FC. Routine test for HIV antigen. *Lancet* 1987; 2: 916-917.

121. BACKER U, WEINAVER F, GATHOF G, EBERLE J. HIV antigen screening in blood donors. *Lancet* 1987; 2: 1213-4.

122. PAUL D, FALK L, KNIGGE M, et al. Potencial use of serum assay for HTLV-III Ag and Ab in following disease progression in Ab+ inividuals. International Conference on AIDS. Paris 1986.

123. CALABRESE LH, PROFFITT MR, LEVIN KH, et al. Acute infection with the human immunodeviciency virus associated with acute brachial neuritis and exanthema rash. Ann Intern Med 1987; 107: 849-851.

124. FALK LA, PAUL D, LANDAY A, et al. HIVisolation plasma of HIV-infected persons. N Engl J Med 1987; 316: 1547-8.

125. FISCHL MA, RICHMAN DD, GRIECO MH, et al. The efficacy of azidothimidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A doubled-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med 1987; 317: 185-191.

126. MITSUYA H, WEINHOLD KJ, FURMAN PA, et al. 3'azido-3'-deoxythimidine (BMA509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effects of human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy asso ciated virus in vitro. Proc Nat Acad Sci USA 1985; 82: 7096-7100.

127. ANONYMOUS: Zydovudine. Lancet 1987; 1: 957-8.

128. RICHMANN DD, FISCHL MA, GRIECO MH, et al. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. N Engl J Med 1987; 317: 192-7.

129. DE WOLF F, LANGE JMA, GOUDSMIT J, et al. Effect of zidovudine on serum human immunodeficiency virus antigen levels in symptom-free subjects. Lancet 1988; 1: 373-6.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Escuela de Enología

Reunido el Tribunal Integrado por los señores miembros en el día de la fecha, para emitir el Veredicto de

Banco Joto Espinola de los Montes

Determinación única del vino de Valor Diferencial por su fuerza y aptitud benéfica en vinos con influencia por vino.

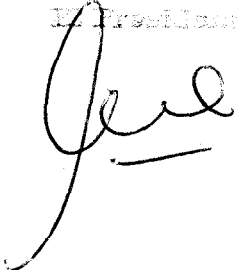
APTO "CUM LAUDE"

POR UNANIMIDAD

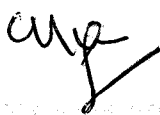
El Vocal,



El Presidente



El Vocal,



El Vocal



El Vocal,

Ramón Luis Álvarez

El Decano

