

75
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"INCIDENCIA DE PORTADORES DEL VIH-I EN
PACIENTES ONCOLOGICOS POLITRANSFUNDIDOS
DEL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

ROSA ELIA LOPEZ ARECHIGA



MEXICO, D. F.

AGOSTO DE 1993

**LIBROS CON
FALLA DE C...**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	3
GENERALIDADES.....	3
EPIDEMIOLOGIA.....	6
SITUACION MUNDIAL.....	6
SITUACION EN MEXICO.....	7
CARACTERISTICAS DEL AGENTE CAUSAL.....	9
TAXONOMIA.....	9
INFORMACION GENETICA.....	10
CICLO VIRAL.....	13
GENES Y SU FUNCION.....	15
PATOGENESIS.....	16
FORMAS DE CONTAGIO DEL VIH.....	18
MANIFESTACIONES CLINICAS.....	20
SISTEMA WALTER REED.....	21
SISTEMA DE CLASIFICACION DE WALTER REED.....	22
CLASIFICACION DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE LA INFECCION DEL VIH SEGUN LA CDC.....	23
DIAGNOSTICO DEL PADECIMIENTO.....	24
PRUEBA INESPECIFICAS (PERFIL INMUNOHEMATOLOGICO).....	24
PRUEBAS ESPECIFICAS (DETECCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS CONTRA EL VIH).....	25
PRUEBA DE ESCRUTINIO.....	26
ANALISIS INMUNOENZIMATICO ELISA.....	26
FUNDAMENTO.....	26
DESARROLLO DE LA TECNICA.....	27
METODOS CONFIRMATORIOS.....	27
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).....	27
FUNDAMENTO.....	28
DESARROLLO DE LA TECNICA.....	28
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.....	29
TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	29
FUNDAMENTO.....	30
INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.....	30
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	31
TECNICA DE ELISA DIRECTA PARA LA DETECCION DE ANTIGENOS P25.....	31
FUNDAMENTO.....	32
TECNICA DE ELISA INDIRECTA ANTI-P 25.....	32
FUNDAMENTO.....	33
REACCION EN CADENA CON POLIMERASA (PCR).....	33
FUNDAMENTO.....	33
OBJETIVOS.....	35
PARTE EXPERIMENTAL.....	36
MATERIAL Y METODO.....	36

EQUIPO	36
GENELAVIA MIXT (tercera generación)	36
INSTRUMENTACION.....	36
MATERIAL BIOLOGICO	37
MEDIDAS PRECAUTORIAS.....	38
DESARROLLO DE LA TECNICA	38
GENELAVIA MIXT ELISA INDIRECTA	38
PROCEDIMIENTO	38
INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	39
CALCULOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	40
PRUEBA CONFIRMATORIA.....	41
DESARROLLO DE LA TECNICA.....	41
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	42
RESULTADOS	44
ENFERMEDADES ONCOLOGICAS.....	44
TRANSFUSIONES.....	47
TECNICAS EFECTUADAS	47
DISCUSION	50
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA.....	55

INTRODUCCION

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fué descrito como una nueva entidad clínica en 1981 [1]. Este Síndrome se había observado a raíz de un agrupamiento inusual de enfermedades, tales como el Sarcoma de Kaposi y la neumonía por Pneumocystis carinii, ésta última es una complicación frecuente de casos de inmunodeficiencia celular, en tanto que el Sarcoma de Kaposi, que clásicamente ocurre en sujetos de origen mediterráneo y de más de 60 años de edad, ahora se presentaba en individuos jóvenes de cualquier grupo étnico y en pacientes cancerosos gravemente enfermos [2]. En la década de 1980 hubo un aumento notable en el número de casos anuales notificados al Centro de Control de Enfermedades (CDC por su nombre en inglés) en la ciudad de Atlanta, Georgia [2]. El sorprendente paralelismo en el aumento de la frecuencia de estas dos enfermedades, condujo a la realización de encuestas epidemiológicas que pronto demostraron que detrás de ambas entidades existía un cuadro de inmunodeficiencia severa y adquirida, que deterioraba en forma inexorable el sistema inmunológico de los individuos afectados. A partir de 1983 aparecieron los primeros reportes señalando al virus linfotrópico de las células T humanas, (HTLV III), como el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [3]. Este retrovirus, denominado Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), fué descubierto en 1983 en el Instituto Pasteur de Francia, por el Dr. Luc Montagnier y sus colaboradores [4]. Posteriormente en 1984, Roberto C. Gallo y su grupo de colaboradores del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, confirmaron la presencia del VIH.

La existencia de SIDA asociado a transfusiones sanguíneas se sospechó debido a que algunos individuos con la enfermedad no mostraban ninguna de las características de los grupos de riesgo anteriormente definidos, es decir homosexuales, hemofílicos o drogadictos por vía intravenosa, pero si tenían antecedentes de transfusiones sanguíneas entre los tres y cinco años anteriores a la detección del SIDA [5]. Fué en noviem-

bre de 1982 cuando se tuvo el primer reporte de la adquisición del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) por transfusiones sanguíneas [6]. Conforme a lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial se tienen registrados entre diez y doce millones de personas infectadas por el virus, de las cuales alrededor de medio millón ya presentan SIDA; sin embargo el comité de expertos del programa mundial de SIDA de la OMS, estima que el número real es de dos millones y medio [7]. En México los casos registrados de SIDA alcanzan la cifra de doce mil novecientos hasta el 28 de febrero de 1993, según el boletín mensual del Consejo Nacional para la prevención del SIDA (CONASIDA) [8], pero se estima que el número real de casos de SIDA que han ocurrido en México es de diecinueve mil seiscientos al corregir la subnotificación y el retraso en la notificación.

Existe una gran preocupación a nivel mundial por tratar de detener la diseminación del VIH, ya que se ha tenido un aumento considerable en los últimos años en los casos registrados; situación que resulta alarmante si se considera que los casos no reportados probablemente sean un número mayor de aquellos de los que se tiene conocimiento. Los esfuerzos se han concentrado en la promoción de campañas tendientes a mejorar la educación sexual de la población en general, a combatir el uso de drogas de cualquier especie, especialmente las que se usan por vía intravenosa, así como un adecuado control de los donadores de sangre. En lo que se refiere a las transfusiones sanguíneas, en México se dictaron normas legales específicas para impedir el comercio con la sangre [9], [10], las cuales fueron publicadas en mayo de 1986 y 16 de diciembre de 1992 en el Diario Oficial.

Para la población pediátrica (grupo de edad comprendida entre 0 a 14 años), sobre la cual se ha trabajado en esta investigación, el Comité Epidemiológico del CONASIDA señaló la distribución porcentual de los casos pediátricos con SIDA detectados hasta el 28 de febrero de 1993 por su origen [8] en los siguientes porcentajes:

- 51.7% Perinatal
- 28.1% Transfusión
- 18.3% Hemofílicos
- 1.9% Por abuso sexual

Considerando que era importante determinar el grado de incidencia que tenía el contagio del VIH por transfusiones entre la población infantil atendida en nuestros hospitales, con el fin de estar en posibilidad de tomar las medidas preventivas correspondientes en el caso de que éste resultara muy alto, se determinó realizar una investigación entre 149 pacientes oncológicos del Hospital Infantil de México. Se seleccionó esta población tomando en consideración que, por la índole de sus padecimientos, se trata de pacientes inmunodeprimidos y sujetos a constantes transfusiones sanguíneas.

VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

GENERALIDADES.

La hipótesis más apoyada hasta la fecha es aquella que sostiene que el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) tiene como inmediato antecesor a un retrovirus presente en monos africanos desde hace miles, o tal vez millones de años, particularmente en el mono verde africano (*Ercopithecus Aethiopus*), que actúa como portador asintomático de un virus muy similar al VIH y que se conoce actualmente como Virus de la Inmunodeficiencia en Simios (VIS) [11].

En el África Ecuatorial, posiblemente através de una mordedura, el VIS pasó al ser humano. El CDC reportó dos casos de transmisión del VIS al humano [12], relacio-

nados con la exposición de macacos en el laboratorio, quienes por algún tiempo mantuvieron un estado de portadores asintomáticos. La mutación constante del VIS, dió lugar eventualmente a una forma patógena para el ser humano, el VIH.

La diseminación de la infección en la población humana del Africa Ecuatorial se efectua através de contacto sexual, intercambio de fluidos corporales y perinatalmente; se considera que de ahí se extendió a otras regiones del Africa. La infección se propagó a Europa y América mediante la migración humana, particularmente a Haití; de ahí paso a los Estados Unidos de Norteamérica através de los inmigrantes y también por contagio de varones homosexuales que visitaban la isla. La diseminación fué mayor en las ciudades de los Estados Unidos que presentaban una congregación de elevado número de varones homosexuales (Nueva York, San Francisco, Los Angeles). De los Estados Unidos, la infección se propagó al resto de América.

Actualmente, la diseminación del VIH y los casos de SIDA son de cobertura mundial, pudiendo hablarse claramente de una pandemia desde hace varios años.

Los mecanismos primarios de transmisión del VIH aceptados por la comunidad científica son: a) por contacto sexual con una persona infectada; b) parenteral; exposición a sangre contaminada; y c) perinatal. En sentido estricto cualquier persona puede infectarse con el VIH si se expone a sangre o a productos hematológicos infectados.

El Dr. Montagnier y colaboradores del Instituto Pasteur de París identificaron en 1986 un nuevo retrovirus de Inmunodeficiencia Humana al que denominaron VIH-2 [13]. Este fué observado en pacientes con SIDA que no estaban infectados por el VIH-1. Al parecer, este virus resulta menos citotóxico para los linfocitos T cooperadores [14], [15].

El VIH-1 predomina en Africa central y el VIH-2 en la parte occidental; tanto el primero como el segundo se han encontrado en infantes y niños, lo que sugiere a la vía perinatal como fuente de infección, salvo que en el caso del VIH-2, se piensa que el periodo de incubación es mayor que el del VIH-1 [85].

Las encuestas de seroprevalencia indican que el VIH-2 es relativamente frecuente sobre todo entre prostitutas de algunos países del Africa Occidental. El primer reporte registrado de VIH-2 en los Estados Unidos de Norteamérica, apareció en 1989 [17]. En México sólo se ha registrado un reporte de la presencia de VIH-2 publicado por CONASIDA en su boletín mensual en 1992 [18].

EPIDEMIOLOGIA

SITUACION MUNDIAL

De conformidad con los datos publicados por la OMS en Julio de 1992 se reportan los siguientes datos con SIDA por continente (Gráfica #1):

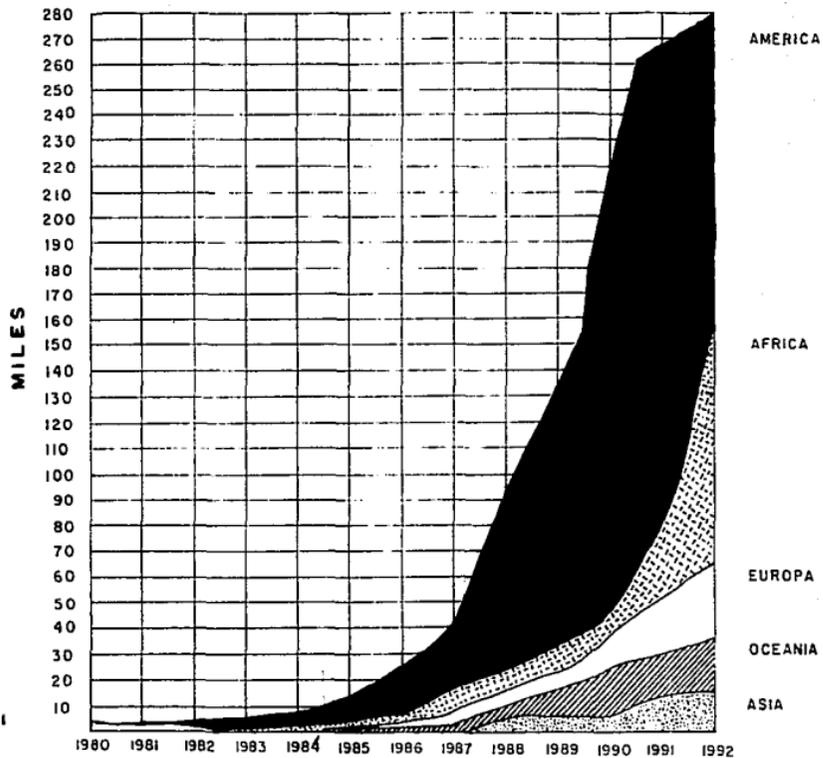
- América 277,042
- Africa 152,463
- Europa 66,545
- Oceanía 3,370
- Asia 1,552

y ya para Febrero de 1993 la población mundial infectada por el VIH fluctúa entre 13 millones de personas. De éstos, 611,589 presentan SIDA [8].

- América 313,097
- Africa 211,046
- Europa 80,824
- Oceanía 4,096
- Asia 2,596

Estas cifras se han obtenido de lo reportado por 194 países a la OMS.

CASOS DE SIDA REPORTADOS POR LA OMS



GRAFICA 1

SITUACION EN MEXICO

A nivel mundial, México ocupa el décimo primer lugar entre los países con mayor número de casos de SIDA reportados [8], [9], [19], y el tercero dentro del continente Americano, sólo precedido por Brasil y Estados Unidos. Como es del conocimiento público, el VIH se ha importado a México a través de la enorme frontera que compartimos con los Estados Unidos.

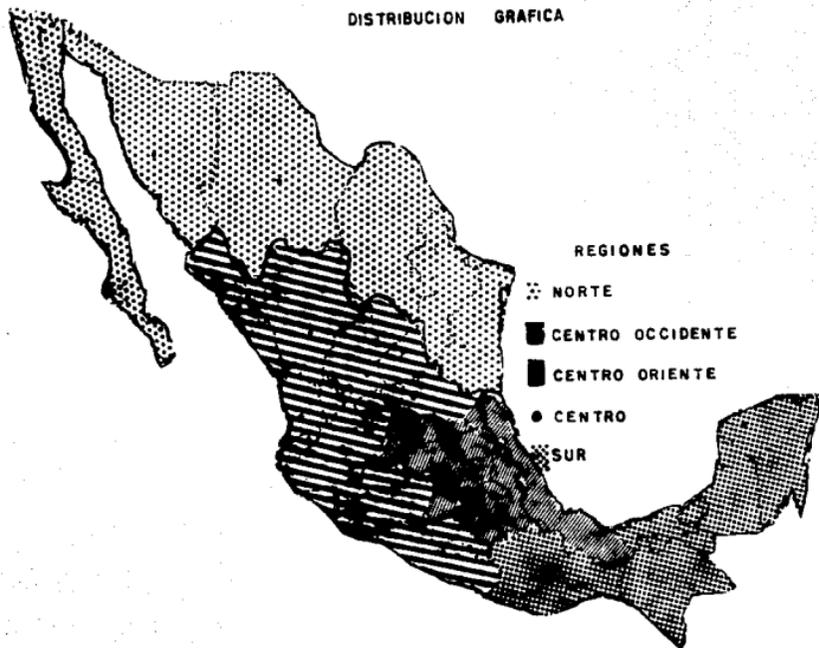
En México se reportaron dos primeros casos de SIDA en 1981 y ya para 1982 se habían acumulado 13. Estos casos ocurrieron en hombres homosexuales y bisexuales de nivel socioeconómico alto y se trataba de nacionales y extranjeros, la mayor parte residentes del Distrito Federal, que adquirieron la infección del VIH fuera del país.

El crecimiento de los casos en nuestro país continúa siendo en forma exponencial, de modo que hasta el 28 de febrero de 1993 CONASIDA tiene registrados doce mil novecientos casos de SIDA [9]. Es lógico suponer que existan más casos sin descubrir o que no hayan sido notificados, existiendo la posibilidad de un impacto epidémico importante en nuestra población. Desde hace poco más de dos años se consideró pertinente establecer medidas adecuadas para su prevención y control, similares a las sugeridas por la OMS. En 1986, Ruiz Argüelles y colaboradores [20] confirmaron el diagnóstico de SIDA a dos pacientes mexicanos que habían recibido varias transfusiones sanguíneas en hospitales norteamericanos, con lo cual quedaba demostrado otra vía de entrada del VIH a nuestro país.

En cuanto a la distribución de los casos de SIDA notificados en los diferentes estados de la República Mexicana, tomando en cuenta el boletín mensual del CONASIDA hasta marzo de 1993, ésta se divide en cinco regiones: Centro, Centro Oriente, Centro Occidente, Norte y Sur, (Fig. #2).

- **Región Centro** contiene únicamente al Distrito Federal, en donde se encuentra el mayor número de casos registrados hasta el 28 de febrero de 1993, 4,161 casos, que representan el 32.3% de los registrados en el país y una tasa de 471 casos por millón de habitantes.
- **Región Centro Oriente** está compuesta por los Estados de México, Puebla, Veracruz, Morelos, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y Tlaxcala. Los casos registrados en esta región ascienden a 3,309 y representan el 25.7% y una tasa de 106 casos por millón de habitantes.
- **Región Centro Occidente** está conformada por los Estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Sinaloa, San Luis Potosí, Nayarit, Durango, Aguascalientes, Zacatecas y Colima. Esta región tiene 3,054 casos registrados que representan el 23.7% y una tasa de 140 casos por millón de habitantes
- **Región Norte** integrada por los estados de Nuevo León, Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Tamaulipas, Chihuahua, y Sonora. Esta región registra 1,547 casos, que representan el 12% y una tasa de 106 casos por cada millón de habitantes.
- **Región Sur** constituida por los estados de Yucatán, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Quintana Roo y Campeche, es la que menos número de casos registra, sólo 715 que representa el 5.5% y una tasa de 66 casos por cada millón de habitantes.

DISTRIBUCION GRAFICA



CARACTERISTICAS DEL AGENTE CAUSAL

TAXONOMIA

De acuerdo con lo señalado por los doctores Luc Montagnier y colaboradores del Instituto Pasteur de París, por Gallo y colaboradores del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos y por H. Gerderblom y colaboradores del Instituto Robert Koch de Berlín, las principales características del VIH son [21]:

- Está relacionado con los lentivirus.
- Pertenecen a la familia retroviridae.
- Genoma: Acido Ribonucleico (ARN).
- Simetría de la cápside: helicoidal.
- Sitio armado de las cápsides: citoplasma.
- Virión envuelto.
- Diámetro del virión: de 90 a 120 nanómetros.

Gracias a los trabajos de diversos investigadores, ahora se conoce que la partícula viral del VIH está constituida de la siguiente manera [22], [23]:

- **Envoltura.** Constituye la capa proteica externa del virus en la que se encuentran las glicoproteínas Gp 120 y Gp 41 [24]. La primera tiene carácter fuertemente hidrofílico y se localiza en la parte exterior de la membrana viral que recubre el virión. En cambio la Gp 41 se encuentra incrustada en la membrana viral.

En la capa externa de la envoltura se encuentra la glicoproteína Gp 120 en el VIH-1, y en el VIH-2 la Gp 140. Estas son las responsables de que se lleve a

cabo el tropismo de los virus hacia las células que presentan el receptor CD4. Se encuentran principalmente en la superficies de las células inmunocompetentes, incluyendo macrófagos, monocitos, y linfocitos T cooperadores [22], [24].

Las proteínas transmembranales de la envoltura del virus contiene las glicoproteínas Gp 41 en el VIH-1 y Gp 36 en el VIH-2 [27]. Se ha sugerido que también participa en el proceso de reconocimiento y adhesión a las células que el virus va a atacar.

- **Cápside.** Estructura protéica interna que encierra el material genético. En el interior de esta estructura se encuentran dos cadenas de ARN y varias unidades de las enzimas siguientes: ADN polimerasa, ribonucleasa, integrasa, proteasa y transcriptasa reversa.

INFORMACION GENETICA

Ambos VIH's (1 y 2) poseen nueve genes, tres de ellos con función estructural y seis con función reguladora, limitados ambos por una secuencia genética de Repeticiones Terminales Largas (LTR) localizadas en los extremos del genoma vírico, como se ilustra en la tabla número 1 [21], [22], [23]. Los genes estructurales son: Gag, Pol y Env, los cuales poseen la información para la síntesis de los diversos componentes del virus [4]; estos genes son comunes en todos los retrovirus [31], [32]. Los genes reguladores son: Tat, Rev, Vif, Nef, Upr, Upu, y Upx [30]. Algunos de estos sólo han sido encontrados en los VIH's y virus relacionados, los cuales tienen por función controlar la actividad de los genes estructurales, induciéndoles el momento de iniciar o de suspender su mecanismo de acción; así como la velocidad y la cantidad de componentes virales que se requieren fabricar, entre otros.

Los LTR del provirus presentan determinada secuencia que le permiten regular la transcripción y la integración al cromosoma celular. Estos LTR son reconocidos dentro de la célula por transcriptasa reversa, y se lleva a cabo la transcripción del provirus. Esto sucede al activarse el provirus por algún factor estimulante. El mensaje genético del provirus es transcrito a moléculas de ARN y se sintetiza ARNm viral, el cual es traducido para la síntesis de proteínas virales.

La función que lleva a cabo la ARN-pol-ADN dirigido participa en la transcripción del ADN formando ARN complementario a partir del ADN proviral duplex: reconociendo los puntos de iniciación específicos en los cromosomas de la célula huésped [22].

- **Gag.** Se encarga de sintetizar las proteínas del core o centro del VIH, que revisitan al material genético (ARN) junto al cual existen varias copias de transcriptasa reversa.
- **Pol.** Codifica la producción de la enzima retrotranscriptasa responsable de la multiplicación del virus. [52], [53].
- **Env.** Está formada por moléculas tanto de origen viral como de la membrana de la célula. En esta se encuentran las glicoproteínas Gp 120 y Gp 41, la primera en la parte externa de la membrana viral, y la segunda incrustada en la membrana interna. Estas dos glicoproteínas son necesarias para que se lleve a cabo el reconocimiento celular y en consecuencia la infección a la célula huésped.

- **Tat.** Gen regulador positivo que actúa como estímulo para la generación de moléculas grandes de ARNm, así como activador de la transcripción para la síntesis de proteínas virales.
- **Rev.** Regulador diferencial que reprime a los genes estructurales y a **Tat** para que no se lleve a cabo la síntesis proteica viral; y por tal motivo el provirus integrado en el cromosoma de la célula puede permanecer en estado de latencia hasta que un factor estimulante lo active. En el momento en que esto sucede, este gen actúa como transportador de moléculas grandes de ARNm del núcleo celular al citoplasma, para posteriormente llevar a cabo la síntesis de las diferentes proteínas virales [22].
- **Vif.** Regulador negativo considerado como factor de infectividad viral.
- **Nef.** Factor activador negativo que delimita la replicación y expresión viral. Puede actuar como un activador o represor de la síntesis proteica. Participa de manera muy importante en el estado de latencia del provirus, reprimiendo la síntesis proteica viral.

Al activarse este gen aumenta la capacidad de expresión del provirus, y se estimula a los genes estructurales **Gag**, **Pol**, y **Env** para la síntesis viral. Al activarse los genes reguladores disminuye el estado de latencia, se presenta una seroconversión aumentando la reproducción viral hasta provocar la enfermedad conocida como SIDA [21], [22], [23].

- **UpU.** Especifico para VIH-1. Participa en la infección de las células.
- **UpX.** Especifico para VIH-2. Participa en la especificidad celular del virus.

CICLO VIRAL

Es de gran utilidad conocer los mecanismos por los cuales se vale el virus para dañar a su célula huésped. Estos mecanismos se enuncian a continuación.

- **ADHESION.** En ésta se lleva a cabo el reconocimiento celular ya que los linfocitos T cooperadores presentan en la superficie membranal los receptores CD4, hacia los cuales los virus VIH-1/2, tienen gran afinidad debido a que estos presentan las glicoproteínas transmembranales GP 120 y GP 140 respectivamente [50].
- **ENTRADA.** En ésta se lleva a cabo el proceso conocido como endocitosis mediada por receptores los cuales facilitan la entrada a la célula blanco. Se ha observado que ocurre una fusión entre la membrana viral y la de la célula huésped, penetrando de esta forma la nucleocápside al citoplasma.
- **ACTIVACION DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA.** Una vez que la nucleocápside penetra en el citoplasma se activa la transcriptasa reversa y transcribe una cadena de ARN en una de ADN; posteriormente una enzima emparentada con la ribonucleasa destruye al ARN original y la polimerasa sintetiza una segunda cadena de ADN usando como molde la primera [29], [52].
- **INTEGRACION DEL PROVIRUS.** A estas dos cadenas de ADN se le denomina provirus, el cual se desplaza al interior del núcleo celular en donde puede permanecer en forma libre o integrarse a los cromosomas de la célula, interviniendo una enzima vírica (integrasa) que es la que realiza la inserción. Se piensa que el ADN adquiere la forma circular para poder ser integrado a la célula [29], [52], [53]. Cuando esto ocurre puede que permanezca como provirus

por mucho tiempo en fase de latencia, en la cual el ciclo se detiene; ésta es la razón que hace al provirus parte permanente de la persona infectada sin mostrar signos de su presencia mientras no se activen sus genes [29], [52].

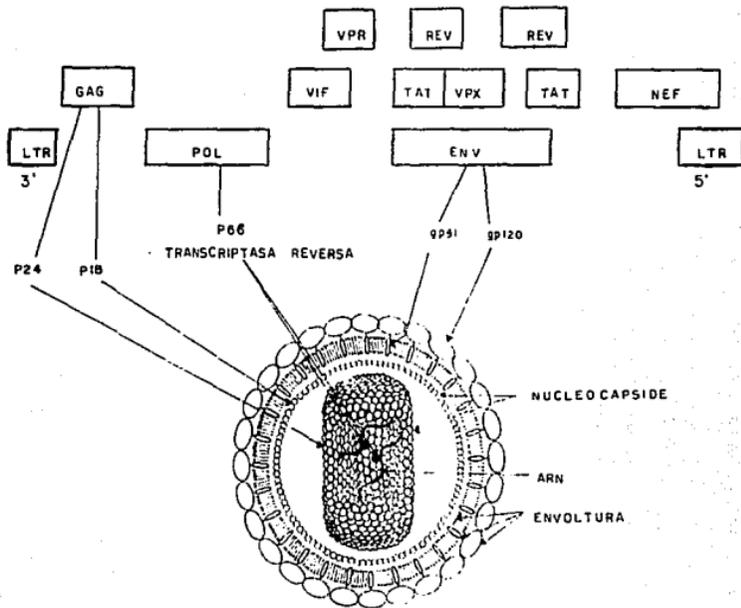
- **TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DEL ADN VIRAL.** Cuando el metabolismo de la célula es "activado" por la presencia de un factor estimulante ya sea por una molécula extraña o por un virus, el mensaje genético del provirus es transcrito en moléculas de ARN haciendo uso de toda la maquinaria celular para su multiplicación. En esta etapa se sintetizan moléculas de ARNm viral que es traducido para la síntesis de proteínas virales [29], [52].
- **ENSAMBLAJE.** Ya sintetizadas las proteínas y partículas vírales, así como el ARN, se ensamblan utilizando la superficie interna de la membrana celular de la célula [51], [52].
- **LISIS CELULAR.** Estas proteínas víricas, asociadas a moléculas de ARN viral, tienden a ser envueltas por la membrana celular, misma que ha acumulado glicoproteínas virales. Este conjunto da la formación de nuevas partículas virales que geman hacia el exterior de la célula, adquiriendo de esta forma su envoltura [51], [53].

GENES Y SU FUNCION

Gene Nombre Propio	Nuevo Nombre	Proteinas		Función
Genes Estructurales		VIH-1	VIH-2	
Gag	Gag	p55 p40 p24/25 p18	p56 p28 p16	Síntesis de la capsida
Pol	Pol	p68,64 p51 p32	p68 p53 p34	Síntesis de la transcriptasa reversa (responsable de la multiplicación del virus)
Env	Env	Gp160 Gp120 Gp41	Gp140 Gp80 Gp36/41	Síntesis de la glicoproteínas de la envoltura del virus en ella se lleva a cabo el tropismo del virus entre la célula blanco.
Genes Reguladores				
tat	tat	p14	p11	Regulador positivo que inicia la síntesis de las proteínas del virus.
art/vra	rev	p18-20	P14	Actúa como regulador dife- rencial. Regula la síntesis de las proteínas de virus.
Spr	Vif	P23	p25	Regulador negativo de la infectividad del virus.
son muy variables 3'Or	nef	p25-27	p28	Regulador negativo. Delimita la reproducción y expresión del virus.
R	Upr	p12-13	p12	Poco conocido.
UpU	UpU	Upu		Estimula la producción de anticuerpos en los pacientes y pueden ser usados para distinguir entre la infección por VIH-1 y VIH-2.
UpX	UpX		UpX p16	Participación en la infección de las células. Participa en la especificidad celular del virus.

Tabla 1

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL VIH Y DE SU ESTRUCTURA GENETICA



EN LA PARTE SUPERIOR SE ENCUENTRA EL GENOMA VIRAL CON SUS DIVERSOS GENES ESTRUCTURALES (GAG, POL Y ENV) Y REGULADORES (LTR, VIF, tat, upu, rev, upr, nef).

PATOGENESIS

En vista de que los virus poseen un sólo tipo de ácido nucléico y carecen de la información genética, enzimas y estructuras para producir energía y fabricar sus propios componentes, únicamente pueden vivir y multiplicarse en el interior de las células huésped.

Después de que una persona es infectada por el VIH, sus principales células blanco son los linfocitos T cooperadores y las células del sistema fagocítico mononuclear del sistema inmunológico, ya que presentan en la superficie de la membrana el determinante antigénico CD4, moléculas que ambos virus reconocen y a la cual se unen en forma específica a través de la glicoproteína Gp120 en el VIH-1 y en el VIH-2 por la Gp140. Se han formulado varias hipótesis para tratar de explicar tal suceso, como la que formula Haseltine y del Instituto de Cáncer Dana Farber de los Estados Unidos, la cual sugieren que "la velocidad de muerte celular es proporcional a la concentración de los receptores CD4 presentes sobre la superficie de la membrana de la célula blanco". Basándose en los trabajos de Wong-Staal, de Risher, de Montagnier y de Gallo se formulan las siguientes hipótesis [31], [32], [41].

- La muerte celular depende de una interacción entre la cubierta viral (por medio de las glicoproteínas de la envoltura) y la membrana de la célula huésped.
- Para la entrada del virus a la célula es suficiente un nivel bajo del receptor CD4, pero se requiere un nivel mayor para causar efecto citopático. Sin embargo el efecto principal de la infección por VIH es la destrucción de los linfocitos T cooperadores en los que se multiplica el virus. Para tratar de explicar el mecanismo de daño celular Scott propone que el virus, al empezar a gemar hacia afuera, hace agujeros en la membrana celular, y debido a que la cantidad de virus que gema es muy grande las células no pueden reparar los orificios tan

rápido como son hechos [35]; de este modo los componentes vitales de la célula escapan a través de la membrana, por lo que la célula no puede sobrevivir mucho tiempo.

En resumen la pérdida de linfocitos T cooperadores dañan selectivamente al sistema inmune, lo que deja al organismo muy vulnerable a infecciones.

Los monocitos y macrófagos participan en forma muy importante en los mecanismos de la diseminación del VIH ya que un subgrupo tanto de monocitos como de macrófagos tienen en su membrana los receptores CD4, lo que les condiciona poderse infectar con VIH, preservando efecto citopático.

Se ha observado la presencia de la glicoproteína Gp 41 en el cerebro tanto de niños como de adultos que presentaron SIDA [34]. A partir de 1984, investigadores como Show, Hann, Wong-Staal, entre otros, señalaron la presencia por primera vez del VIH en tejidos cerebrales y de médula ósea [33], ya que los monocitos y macrófagos son capaces de atravesar la barrera sanguínea cerebral. Es posible que al ser infectados en la sangre transporten el virus al cerebro. En el cerebro y médula espinal, al parecer, el virus tiene un efecto patogénico directo que no depende de la inmunodeficiencia.

Las principales patologías observadas en el cerebro son una proliferación anormal de las células gliales que rodean a las neuronas, y las lesiones resultantes son la pérdida de la materia blanca.

FORMAS DE CONTAGIO DEL VIH

El conocer las características del virus nos permitirá conocer los mecanismos que propician su transmisión. Estos mecanismos son similares para las dos variedades del VIH que se conocen. Se sabe que la transmisión se efectúa por las siguientes vías

- Contacto sexual cuando existe intercambio de líquidos corporales tales como sangre, semen, y secreciones vaginales [36] entre una persona infectada a otra sana. Esta es la forma más frecuente de contagio en todo el mundo y la más difícil de prevenir.
- Compartir agujas o jeringas contaminadas por VIH [37].
- Transfusiones de un donador infectado por el VIH a un individuo sano [38].
- Transplantes o injertos de órganos o tejidos infectados [36], [39], [40], [41].
- Transmisión perinatal: En 1983 aparecieron los primeros casos reportados [42]. La transmisión del VIH de una madre a su producto puede ocurrir por tres mecanismos distintos: a) Durante el embarazo por vía transplacentaria: esta vía de transmisión se sospechó desde que se empezaron a reportar los primeros casos de SIDA en lactantes [43]. b) Durante el parto: al existir contacto de la sangre materna con la del niño, pudiendo de esta forma ocurrir la transmisión del VIH [44], [45]. c) A través de la leche materna, ya que existen además informes de casos en los cuales fué posible aislar el virus en la leche materna, quedando como un mecanismo de contagio al recién nacido [46].

En las lágrimas, la orina y la saliva se ha encontrado también la presencia del VIH, pero en pequeña proporción [47]. No existe la evidencia que implique a los insectos como transmisores o vectores del VIH, exceptuando a las chinches [48]; no existe tampoco evidencia de transmisión por vía aérea, ni através del contacto social casual no sexual entre las personas [49].

MANIFESTACIONES CLINICAS

Después de que el individuo se ha infectado con el VIH, este virus infecta a los linfocitos T cooperadores, se multiplica dentro de ellos y los destruye por lo que estos se encuentran en baja concentración; sin embargo el número de las células supresoras permanece casi constante o ligeramente aumentado, lo que provoca una disminución en la relación células Cooperadoras/Supresoras y por consiguiente provoca la enfermedad conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [52].

La inmunodeficiencia generada por el virus eleva la vulnerabilidad del individuo para contraer infecciones que en una persona sin dicho síndrome pudieran pasar inadvertidas, pero en los pacientes con esta enfermedad son muy evidentes y van quedando fuera de control. El cuadro básico de tipo inmunológico entre los pacientes con SIDA se caracteriza por [55], [56].

- Disminución de la relación linfocitos T Cooperadores/Supresores.
- Niveles elevados de gamaglobulinas, específicamente las clases G, A y M.
- Disminución de la respuesta inmune contra antígenos, mitógenos y aloantígenos.
- Ausencia de hipersensibilidad de tipo retardado a las pruebas de sensibilidad cutánea (PPD, candidina, histoplasmina, entre otras).
- Adenopatía generalizada con hiperplasia folicular.
- La concentración de la β_2 microglobulina es mayor a 5 mg/ml.

SISTEMA WALTER REED

El Centro Médico Walter Reed agrupa a los pacientes de acuerdo a la etapa de la infección en la que se encuentran, en función de algunos indicadores del grado de deterioro inmunológico que presenten. El sistema de clasificación Walter Reed se basa en el recuento y la medición del estado funcional de los linfocitos T cooperadores, como indicadores del estadio de la enfermedad. Entre otros indicadores se incluyen el inicio de la linfadenopatía crónica acompañada de los siguientes parámetros [52], [60]: a) Linfadenopatías crónicas; b) Pruebas cutáneas anormales de inmunidad celular; y c) Presencia de infecciones. Conforme el padecimiento progresa, el paciente pasa a través de 6 etapas, la última de las cuales es el SIDA. Las etapas o estadios del Sistema Walter Reed (WR) se esquematizan en la tabla siguiente:

CLASIFICACION DE WALTER REED

Estado	Duración de acuerdo a la etapa de la Infección	Pbas. que evidencian la Infección	Indicadores de los estados de la enfermedad	Célm ³	Hipersensibilidad retardada	Muguet
WR0 Exposición al virus		no hay presencia de Ac's	no hay presencia de síntomas	800	-	-
WR1 Detección de la presencia del virus	6 a 8 semanas	presencia de Ac's	desordenes del S.N.C. fatiga aumento leve del tamaño de los ganglios linfáticos	800	-	-
WR2	3 a 4 años	presencia de Ac's	aumento persistente de los ganglios linfáticos. Presencia de hiperactividad de las células B y disminución del número de células	400	-	-
WR3	14 a 20 meses	pruebas que directamente muestren la incapacidad de la inmunidad celular	disminución inmunológica subclínica	<400	-	-
WR4		*presencia de Ac's *cultivo de virus *búsqueda de proteínas o de ácidos nucleicos virales	disminución inmunológica subclínica con alergia cutánea falla de 3 a 4 pruebas cutáneas para la determinación de hipersensibilidad retardada	<400	regular	-
WR5	de uno a dos años	*presencia de Ac's *cultivo de virus *búsqueda de proteínas o ácidos nucleicos virales	anergia (ausencia total de hipersensibilidad) se inicia la aparición de infecciones fúngicas	<200	+	+
WR6	2 años	*presencia de Ac's *cultivo de virus *búsqueda de proteínas o ácidos nucleicos virales	disminución de las funciones inmunológicas extremadamente grave y aparece una gran variedad de infecciones oportunistas, y en consecuencia el SIDA	<100	+	+

CLASIFICACION DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE LA INFECCION DEL VIH SEGUN LA C.D.C.

- **Grupo I:** Primer contacto con el VIH.
- **Grupo II:** Infección asintomática del VIH. Sin anormalidades.
- **Grupo III:** Linfadenopatía generalizada crónica.
- **Grupo IV:**

A: Signos funcionales, incluyendo pérdida de peso >10%, sudoraciones, fiebre, diarrea >1 mes.

B: Signos neurológicos, incluyendo neuropatías y mielopatías.

C1: Presencia con un mínimo de alguna de las infecciones oportunistas de las cuales se caracteriza el SIDA.

a) Pneumonía por *P. carinii*.

b) Criptosporiosis.

c) Toxoplasmosis cerebral.

d) Candidiasis bronquial o pulmonar, criptococosis, histoplasmosis diseminada, infecciones por bacterias atípicas, infecciones diseminadas crónicas mucocutáneas, leucoencefalopatías, progresiones multifocales.

C2: Con un mínimo del seguimiento de 6 infecciones, con leucoplasias en la cavidad oral, bacteremia causada por salmonela, nocardiasis, tuberculosis, y candidiasis oral.

D: **cánceres secundarios**

a) Sarcoma de Kaposi.

b) Linfomas de Hodgking.

c) Linfomas progresivos cerebrales.

E: **otras condiciones**

a) Neumonía crónica.

- b) Trombocitopatías.
- c) Otras manifestaciones que no pudieran ser clasificadas en los grupos anteriores.

DIAGNOSTICO DEL PADECIMIENTO

El diagnóstico del SIDA es en gran medida clínico, basado en la historia médica, estilo de vida sexual, así como en los exámenes realizados en el laboratorio. La historia médica es de gran ayuda para la identificación de grupos de alto riesgo a la enfermedad.

Existen varias técnicas inmunológicas utilizadas para demostrar las evidencias de anticuerpos contra el VIH en el material biológico de las personas sospechosas de padecer esta enfermedad. Es necesario efectuar pruebas complementarias más exhaustivas para poder llegar a un diagnóstico definitivo. A continuación se mencionan las pruebas de laboratorio más frecuentemente utilizadas para apoyar un diagnóstico de la infección por este virus [52], [58], [59], [61].

PRUEBA INESPECIFICAS (PERFIL INMUNOHEMATOLOGICO)

- Cuenta de células blancas totales.
- Cuenta diferencial
- Determinación de linfocitos T y B en sangre periférica (linfocitos formadores de rosetas E y rosetas EAC)
- Determinación de la funcionalidad de los linfocitos T y B através de la estimulación con mitógenos, midiendo su capacidad para sintetizar ADN.

- Evaluación de la relación CD4/CD8 mediante la utilización de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de las células T.
- Evaluación de la hipersensibilidad de tipo retardado mediante la utilización de pruebas cutáneas con antígenos como candidina, toxoide tetánico y estreptocinasa.

PRUEBAS ESPECIFICAS (DETECCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS CONTRA EL VIH)

- Análisis inmunoenzimático ELISA.
- *Inmunolectrotransferencia Western Blot.
- *Inmunofluorescencia (directa o indirecta).
- Método de ELISA (detección de Ag).
- Método de ELISA (detección de anti P 25).
- *Reacción en cadena con polimerasa (PCR).

*son considerados como métodos confirmativos.

Desde que el VIH es señalado como el agente causal del SIDA, los investigadores se han valido de diversas técnicas inmunológicas para la búsqueda de este virus y de los anticuerpos en el material biológico (suero, plasma y tejidos) de los pacientes que se sospecha que padecen la enfermedad. A continuación se mencionan las pruebas de escrutinio y las confirmatorias.

PRUEBA DE ESCRUTINIO

ANALISIS INMUNOENZIMATICO

Este método se emplea para cuantificar Ac's o Ag's presentes en las muestras biológicas [62], [63], [64], [65].

FUNDAMENTO

Se basa en la determinación de Ac's presentes en la muestra biológica, por lo que el antígeno conocido es inmovilizado en la fase sólida. Después de que se lleva a cabo la reacción Ag-Ac, se elimina el exceso de Ac's por medio de lavados, y la presencia de Ac unido se demuestra mediante una anti-inmunoglobulina marcada con la enzima; se elimina lo no reaccionante por medio de lavados. La actividad enzimática se mide al agregar el sustrato de la enzima más cromógeno. El desarrollo de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra.

El antígeno generalmente utilizado en esta prueba se obtiene aislando el VIH y propagándolo en la línea celular TH9 HTL VIII B de linfocitos T cooperadores; en éstos el virus se reproduce, se fracciona, y se inactiva con detergentes antes del recubrimiento de la fase sólida. Esto constituye las técnicas de Primera Generación. Recientemente se han desarrollado nuevas alternativas, utilizando antígenos de VIH obtenidos por síntesis de péptidos *in vitro* o bien a través de Ingeniería Genética constituyendo técnicas de Tercera Generación.

DESARROLLO DE LA TECNICA

Una vez unido el Ag en la fase sólida se pone en contacto con el material biológico problema, así como sus respectivos controles. Después de que se lleva a cabo la reacción Ag-Ac, se elimina por medio de lavados el exceso de Ac's; posteriormente la presencia de Ac's unidos se demuestra por medio de una anti-inmunoglobulina marcada con la enzima. El conjugado no unido se elimina por medio de lavados y a continuación se agrega una solución de sustrato de la enzima mas cromógeno, y se incuba. La presencia de color nos indica que hay anticuerpos anti-VIH en la muestra analizada. La intensidad de color medido espectrofotométricamente es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. En términos generales, a este método se le atribuyen las siguientes ventajas y desventajas:

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">*Sensibilidad elevada (nanogramos/militros)*Especificidad satisfactoria*Estabilidad de reactivos*Potencial para su automatización	<ul style="list-style-type: none">*Se requiere de mucho lavados

A las pruebas que fueron positivas por ELISA se les realizarán pruebas confirmatorias como: Western Blot, Inmunofluorescencia y PCR (reacción en cadena con polimerasa).

MÉTODOS CONFIRMATORIOS

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Es una técnica utilizada para la búsqueda de la reactividad de los anticuerpos del paciente en contra de las proteínas virales individuales [66], [67], [68].

FUNDAMENTO

Se basa en llevar a cabo una separación de una mezcla de proteínas virales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa en la cual se fijan. La presencia de Ac's en el suero o plasma del paciente frente a las proteínas propias del virus se pone de manifiesto mediante la adición de un conjugado específico anti-inmunoglobulina marcada con la enzima, y finalmente se agrega el sustrato de la enzima más cromógeno. Como resultado se observan bandas de color en las zonas donde se llevo a cabo la reacción Ag-Ac, lo cual indica la presencia de Ac's frente a cada una de las proteínas propias del virus.

DESARROLLO DE LA TECNICA

- Las proteínas del virus se distribuyen según su peso molecular, expresado en kilodaltons, al ser aplicado un campo eléctrico en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- Las proteínas (P) y glicoproteínas (Gp) del VIH separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, las cuales actúan como antígenos específicos.
- Las tiras (proteínas virales transferidas a nitrocelulosa) se incuban con el material biológico problema. Los anticuerpos, si es que existen, se unen a las proteínas virales individuales correspondientes formandose el complejo Ag-Ac; posteriormente lo no reaccionante se elimina mediante lavados, y se le incorpora una anti-inmunoglobulina humana conjugada con una enzima. Se elimina lo no reaccionante por medio de lavados y se agrega el sustrato de la enzima

mas el cromógeno, y en caso de existir anticuerpos se observan bandas teñidas en las zonas en las que se llevo a cabo la reacción Ag-Ac.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a la casa comercial antes mencionada, nuestra interpretación de resultados se realiza de la manera siguiente:

POSITIVO	2 Env 2 Env ± Gag ± Pol Gag ± Pol Gag	Es importante usar:
INDETERMINADO	1 Env ± Gag ± Pol Gag ± Pol Pol Gag	Control Positivo Control Indeterminado Control negativo
NEGATIVO	*no presenta ninguna banda *banda no específicas	

A continuación se mencionan las ventajas y desventajas del Western-Blot.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
* Sensibilidad elevada * Especificidad elevada	* Tecnología laboriosa * Requiere el uso de varios controles para la correcta interpretación de los resultados.

TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica, histoquímica o citoquímica, se aplica ampliamente para la búsqueda del virus en la superficie y dentro de las células, así como de sus anticuerpos en líquidos biológicos o en biopsias de los tejidos del paciente sospechoso de estar infectado.

FUNDAMENTO

Se fundamenta en la conjugación de antígenos o anticuerpos específicos con compuestos fluorescentes (fluorocromos); el conjugado resultante brilla al ser excitado por radiación de longitud de onda apropiada [69], [70], [71].

Los compuestos fluorescentes comunmente utilizados son: el isotiocianato de fluoresceína y el isotiocianato de tetrametilrodamina, los cuales tienen espectros característicos de absorción y emisión. Estos presentan una absorción máxima en longitudes de onda entre 490-492 nm. A continuación se mencionan, en términos generales las ventajas y desventajas de este método.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">• Sensibilidad elevada• Especificidad satisfactoria• Ausencia de riesgo a la radiación	<ul style="list-style-type: none">• Reactivos con corto tiempo de vida media• Equipo costoso especializado.• Experiencia para la interpretación de la prueba

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

También se conoce como inmunofluorescencia de un sólo paso, y se utiliza para la identificación del VIH en biopsias de tejidos de los pacientes sospechosos de estar infectados.

El anticuerpo marcado con el fluorocromo reacciona directamente con el antígeno investigado, ya sea por medio de cortes de tejidos o suspensiones de células viables, formandose la reacción Ag-Ac. Las proteínas que no reaccionaron se eliminan por medio de lavados y la preparación resultante se observa en el microscopio de fluorescencia; las zonas fluorescentes indican la presencia de antígenos en la muestra analizada.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Esta técnica permite la identificación de anticuerpos en el material biológico del paciente sospechoso de estar infectado por VIH.

Se basa en agregar un primer anticuerpo no conjugado, presente en el suero o plasma del paciente, al material biológico conocido (Ag), formándose la reacción Ag-Ac. Lo no reaccionante se elimina por medio de lavados. En una segunda etapa, se hace reaccionar una anti-inmunoglobulina conjugada con un fluorocromo. Por último se observa con el microscopio de fluorescencia. Las zonas luminosas indican la presencia de anticuerpos anti-VIH en el material biológico en estudio. En esta metodología, el uso del segundo anticuerpo genera una mayor sensibilidad.

TECNICA DE ELISA DIRECTA PARA LA DETECCION DE ANTIGENOS P25

Esta técnica permite la detección de antígenos asociados al VIH-1 en el material biológico utilizando el método de amplificación de avidina-biotina [73].

Indicaciones clínicas

Se utiliza en los pacientes asintomáticos. El desarrollo de antigenemia indica un mal pronóstico precedido por una disminución de los linfocitos T cooperadores ($200-500$ $CD4^+$ células/ mm^3). Este parámetro puede ayudar a introducir tratamientos anti-retrovirales.

En pacientes con SIDA, se utiliza para el monitoreo de la respuesta a tratamientos retrovirales y para el monitoreo de antigenemia; así como para una valoración inmune.

En transmisión perinatal se utiliza para un diagnóstico temprano, ya que los anticuerpos maternos indican la presencia del VIH durante los primeros meses de vida detectando si el bebé es asintomático o presenta seroconversión; así también para predecir el riesgo de transmisión perinatal, el cual aumenta cuando la antigenemia en la madre es positiva.

FUNDAMENTO

Se basa en la determinación de antígeno (P25) en la muestra por analizar, y consiste en cubrir la fase sólida con un anticuerpo (anti-P25) no marcado, el cual se unirá al antígeno en el período de incubación. Se realizan lavados para eliminar lo no reaccionante, adicionándose un segundo anticuerpo marcado con biotina que reconoce un epítopo diferente del antígeno. Posteriormente, se incorpora una anti-inmunoglobulina con avidina marcada con una enzima dirigida al anticuerpo biotinizado; mediante lavados se elimina lo no reaccionante. Por último se adiciona el sustrato de la enzima más cromógeno y se cuantifica el desarrollo de color, el cual es directamente proporcional a la concentración del antígeno presente en la muestra.

TECNICA DE ELISA INDIRECTA ANTI-P 25

Detecta anticuerpos contra la proteína P25 del virus VIH-1 en el material biológico [74].

Indicaciones Clínicas

En pacientes asintomáticos, la disminución del nivel de Ac's anti-P25 nos indica que avanzan las manifestaciones clínicas de la infección, las cuales se presentan más temprano que la reaparición de la antigenemia. Cuando la concentración de CD4 está

entre 200-500 células/mm³, el estudio del nivel de anticuerpos anti-P25 debe de realizarse dos veces por año.

FUNDAMENTO

Se basa en la determinación de anticuerpos presentes en la muestra biológica, por lo que el antígeno conocido (P25) es inmovilizado en la fase sólida. Al llevarse a cabo la reacción Ag-Ac, se separa el exceso de anticuerpos por medio de lavados, y la presencia de anticuerpo unido se demuestra mediante una anti-inmunoglobulina marcada con la enzima. Posteriormente, se elimina lo no reaccionante por medio de lavados y se mide la actividad enzimática adicionando el sustrato de la enzima mas cromógeno; el desarrollo de color es directamente proporcional a la concentración de anti-P25 encontrada en la muestra.

REACCION EN CADENA CON POLIMERASA (PCR)

FUNDAMENTO

Se basa en llevar a cabo la amplificación de un fragmento del ARN o ADN de la célula de interés por medio de sondas iniciadoras (**primer**) una en cada extremo del fragmento. Estas sondas sirven para iniciar la polimerización del ADN por medio de una enzima termoestable, llevándose a cabo ciclos repetidos de desnaturalización del ADN → hibridación de las sondas → síntesis enzimática [75], [76], [77].

En términos generales, la desnaturalización se lleva a cabo entre 94-98 °C y la síntesis entre 70-75 °C. La temperatura clave es la de hibridación, ya que si se usan temperaturas muy bajas las sondas iniciadoras se hibridarán indiscriminadamente, y si se usa una temperatura muy alta no habrá una hibridación adecuada. Cada ciclo

generalmente se lleva a cabo en 3 o 5 minutos; para completar 30 ciclos se requiere de 2 a 4 horas.

La PCR permite detectar al ADN de hasta una sola célula aislada. Esta técnica promete ser de gran utilidad tanto en el estudio de la patogénesis de la infección por VIH, como para su diagnóstico en la investigación clínica dando una respuesta rápida, sobre todo en la etapa llamada asintomática, detectándose material genético viral en células infectadas en forma latente o en baja concentración. Este estudio demuestra una sensibilidad comparable al del cultivo viral y superior al del ensayo por antígeno P25.

La PCR también está siendo aplicada para estudiar el efecto que tiene la carga viral sobre el cuadro clínico del paciente, sería de utilidad para estudiar la eficacia de los tratamientos antivirales al permitir cuantificar la carga viral del paciente y durante el curso del tratamiento.

A continuación se mencionan las ventajas y desventajas de esta técnica:

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">* Se utiliza en el diagnóstico temprano del VIH* Es una técnica muy sensible.	<ul style="list-style-type: none">* Debido a la alta sensibilidad de la técnica, las impurezas más insignificantes pueden resultar en un alto número de falsos positivos.

OBJETIVOS

- Conocer la incidencia de portadores del VIH-1 en la población pediátrica del Departamento de Oncología del Hospital Infantil de México.
- Determinar el número de casos de VIH-1 y su relación con la sangre empleada en la transfusión.
- Determinar si existe en esta población condicionamiento a la adquisición del VIH-1 por su estado inmunológico de inmunodeprimido por el cáncer, el tratamiento que reciben y las transfusiones.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODO

EQUIPO

Para llevar a cabo la determinación de anticuerpos contra el VIH, en las muestras de suero de los niños incluidos en la presente investigación se emplearon pruebas de tamizaje como los métodos inmunoenzimáticos, en este caso se realizó la técnica de ELISA, tercera generación (Genelavia Mixt) de los laboratorios Diagnóstico's Pasteur en París y distribuida por Diagnóstico's Pasteur de México. Para la prueba confirmatoria, se empleo un equipo de Western-Blot (New Lav Blot) perteneciente al mismo laboratorio.

GENELAVIA MIXT (tercera generación)

Esta técnica utiliza en la fase sólida proteínas sintéticas recombinantes glicosiladas (Gp 160, y Gp 41 para el VIH-1; Gp 36 para el VIH-2) y no glicosiladas, lo cual hace que la técnica sea más sensible, ya que emplea en su fase sólida las proteínas virales mas antigénicas, así como un conjugado que posee anticuerpos contra IgG e IgM.

INSTRUMENTACION

Para la realización de la prueba ELISA (Ensayo Inmunoenzimático) en la determinación de anticuerpos contra el VIH se requiere de un sistema que permita el lavado correcto de la placa de muestras después de la adición de cada reactivo y de los periodos de incubación requeridos para que sea adecuado y no conduzca a resultados falsos. Por tal motivo se empleó el equipo automatizado de los laboratorios Diagnóstico's Pasteur empleando un sistema de lavado de microplaca del modelo LP-35 y un lector de micro-

placa modelo LP-400. Las técnicas fuerón realizadas en el laboratorio de Oncología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, durante 1992.

MATERIAL BIOLÓGICO

Los niños incluidos en la presente investigación, con edades entre 2 y 15 años, pertenecen a la consulta externa del departamento de Oncología. Esta investigación se llevó durante 1992 através de las siguientes etapas en orden cronológico:

- **Recolección de muestras de sangre de los niños en estudio (200), pero la cantidad de muestras seleccionadas en este estudio fué de 149 debido a problemas técnicos.**

- **Procesamiento técnico de las muestras de la siguiente manera:**
 - a) **Centrifugar la sangre.**
 - b) **Separar el suero del paquete globular.**
 - c) **Fraccionar las muestras en alícuotas, para posteriormente congelarlas a menos 70 °C hasta llevar a cabo el procedimiento técnico.**

- **Revisión de expedientes clínicos de los niños en estudio, de los cuales se obtuvieron los siguientes datos: número de registro, nombre, edad, sexo, diagnóstico, tipo de tratamiento (quimioterapia o radioterapia), condición actual, antecedentes de transfusiones.**

- **Análisis de resultados.**

- **Elaboración del manuscrito.**

MEDIDAS PRECAUTORIAS

Los reactivos utilizados se manejaron como si fueran capaces de transmitir una infección. Por tal motivo el equipo utilizado durante el ensayo se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 2%. En la manipulación de los reactivos y de las muestras se aplicaron las buenas prácticas del laboratorio durante todo el desarrollo de las técnicas.

DESARROLLO DE LA TECNICA

GANELAVIA MIXT ELISA INDIRECTA

En todos los casos se llevó a cabo el análisis de los sueros pertenecientes a los niños incluidos en este estudio. Se seleccionó el número de tiras necesarias (Sistema Micro ELISA) de trabajo, de acuerdo al número de muestras para procesar sumando los controles que son: control normal, control positivo, control positivo alto de corte, y controles positivos y negativos de muestras. La placa consta de 96 pozos.

PROCEDIMIENTO

Se distribuyeron 80 microlitros de solución diluyente de la muestra a cada pozo. Las muestras se colocaron en el siguiente orden:

- 20 μ l de suero control negativo en el pozo A1.
- 20 μ l de control positivo de corte a los pozos B1, C1, D1.
- 20 μ l de control positivo alto de corte en el pozo E1.

- 20 μ l de las muestras por analizar a partir de F1. En el pozo número 94 se adicionaron 20 μ l de control negativo de muestra, en el 95 se colocó el control indeterminado, en el 96 se adicionó el control positivo del VIH.
- Se cubrió la microplaca con tira adhesiva.
- Se incubó durante 30 minutos a 40 °C.
- A continuación se lavó la placa con solución diluyente de muestra tres veces.
- Se adicionaron 100 μ l de conjugado a cada uno de los pozos cubriéndose la placa.
- Se incubó durante 30 minutos a 40 °C.
- La placa se lavó cuatro veces y se secó como en el procedimiento anterior.
- Se preparó la solución de sustrato, justamente antes de usarse, distribuyéndose 100 μ l a cada pozo.
- Se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se colocaron 50 μ l de solución de paro y se leyó la placa a 492 nm/620 nm de referencia.

El tiempo requerido para llevar a cabo la técnica fue de una hora y 30 minutos.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los criterios seguidos en la presente investigación fueron los establecidos por el proveedor y se mencionan a continuación: a) Muestras con absorbancia menores al valor de corte son consideradas como **negativas**. b) Los resultados obtenidos cercanos al valor de corte deben ser interpretados con cautela; se sugiere un **segundo corrimiento** el cual debe realizarse por duplicado de la muestra por analizar. c) Las muestras con valores de absorbancia iguales o mayores al valor de corte son inicialmente consideradas como **positivas**. d) Se recomienda realizar las muestras por duplicado antes de la interpretación final. Si en éstas resultarán menores las absorbancias

al valor de corte, la muestra se considera como **negativa**. e) Resultados negativos indican que la muestra examinada no contiene anticuerpos VIH. f) Las muestras inicialmente reactivas que resulten negativas después de la repetición del análisis se deben volver a analizar utilizando una nueva muestra de suero del paciente.

CALCULOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

A continuación se menciona la forma de realizar los cálculos que deben hacerse para dar los resultados del ensayo, según la casa fabricante. La presencia o ausencia de anticuerpos para VIH-1 y/o VIH-2 se determina por la comparación de la absorbancia de cada una de las muestras con los valores de corte calculados.

- Cálculo del valor medio de la absorbancia de corte del suero control.

$$D.OR4 = \frac{D.O(B1) + D.O(D1)}{3}$$

R4 Control positivo de corte.

D.O Densidad óptica.

B1,C1,D1 Sueros control de corte.

- Calcular el valor de corte, éste valor está dado por el cociente:

$$\frac{D.OR4}{10}$$

- Ensayos válidos.

El suero del control negativo debe ser menor al 70% del valor de corte obtenido. Un resultado positivo indica que la muestra contiene anticuerpos para VIH-1 y/o VIH-2. La naturaleza exacta de estos anticuerpos pueden ser confirmados por medio de los KIT ELAVIA AC Ab-AK-1 (para VIH-1) y ELAVIA AC Ab-AKII (para VIH-2), por ejemplo. Para discriminar el tipo de VIH que presun-

tivamente causa la seroconversión. Para confirmar la positividad es necesario que la muestra se sometida a la técnica de Western-Blot.

PRUEBA CONFIRMATORIA

La prueba confirmatoria desarrollada en este trabajo fué la de Western-Blot, o también llamada método de *Electroinmunotransferencia*.

DESARROLLO DE LA TECNICA.

El reactivo empleado en el desarrollo de la técnica fué New Lab Blot 1, el equipo utilizado pertenece al distribuidor anteriormente mencionado.

- Se seleccionó el número de tiras de trabajo de acuerdo al número de muestras y controles utilizados, colocándose dentro de su correspondiente canal.
- Posteriormente se realizó una dilución 1:5 de la solución diluyente de la muestra con agua destilada para hidratar las tiras por 5 minutos con agitación constante.
- A continuación se colocaron 20 μ l de muestra (suero o plasma) y controles según corresponden.
- Se incubaron las tiras dos horas a temperatura ambiente con agitación constante.
- Las tiras se lavaron con 2 ml de solución diluyente 1:5 y se removió en seguida, realizándose tres lavados de las tiras con intervalos de incubación de 5 minutos cada una.
- Se adicionaron 2 ml de conjugado a cada uno de los canales.

- Se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente durante una hora con agitación constante.
- Al finalizarse la incubación se procedió a realizar nuevamente el lavado de las tiras como en el sexto punto.
- Se colocaron 2 ml de sustrato + cromógeno por medio del cual se observa la presencia de bandas de precipitación, llevándose a cabo una incubación de 5 minutos con agitación constante. La reacción se detuvo al adicionarle agua destilada tres veces a cada uno de los canales.
- Finalmente se secaron las tiras.

El tiempo requerido en la realización de esta técnica fué de cuatro horas.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

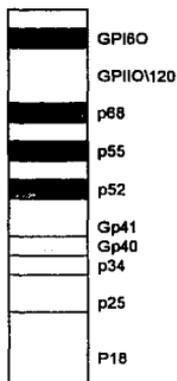
La presencia de anticuerpos contra las proteínas constitutivas del VIH-1 en la muestra queda demostrada mediante la aparición de bandas coloridas (azul-violeta). La posición corresponde a los pesos moleculares de las proteínas virales que se enlistan en la siguiente tabla

NOMBRE	GÉNOMA	NATURALEZA	ASPECTO EN WESTERN-BLOT
Gp160	Env	Glicoproteína precursora de Gp120 y Gp41	bandas claras
Gp 110/120	Env	Glicoproteína de envoltura	bandas con bordes difusos
p68	Pol	Transcriptasa reversa	bandas claras
p55	Gag	precursor de las proteínas del core	bandas claras
p52	Pol	Proteasa	bandas claras
Gp41	Env	Glicoproteína de transmembrana	bandas difusas
p40	Gag	Precursor de las proteínas del core	banda clara
p34	Pol	Endonucleasa	bandas claras
p24/25	Gag	Proteína del core	bandas claras
p18	Gag	Proteína del core	bandas claras

Criterio de interpretación de resultados de Western-Blot de acuerdo a la O.M.S. y a la casa comercial.

INTERPRETACION	BANDAS
Positivo	2 Env 2 Env ± Gag±Pol Gag±Pol Gag
Indeterminado	1 Env ± Gag± Pol Gag± Pol Gag Pol
Negativo	- no hay presencia de bandas - bandas no específicas

Resultados indeterminados nos pueden indicar las siguientes alternativas: a) Se trata de un VIH-2; y b) Se presenta una reacción cruzada con otros retrovirus. La representación de la distribución de las proteínas en la tira se esquematiza en la siguiente figura.



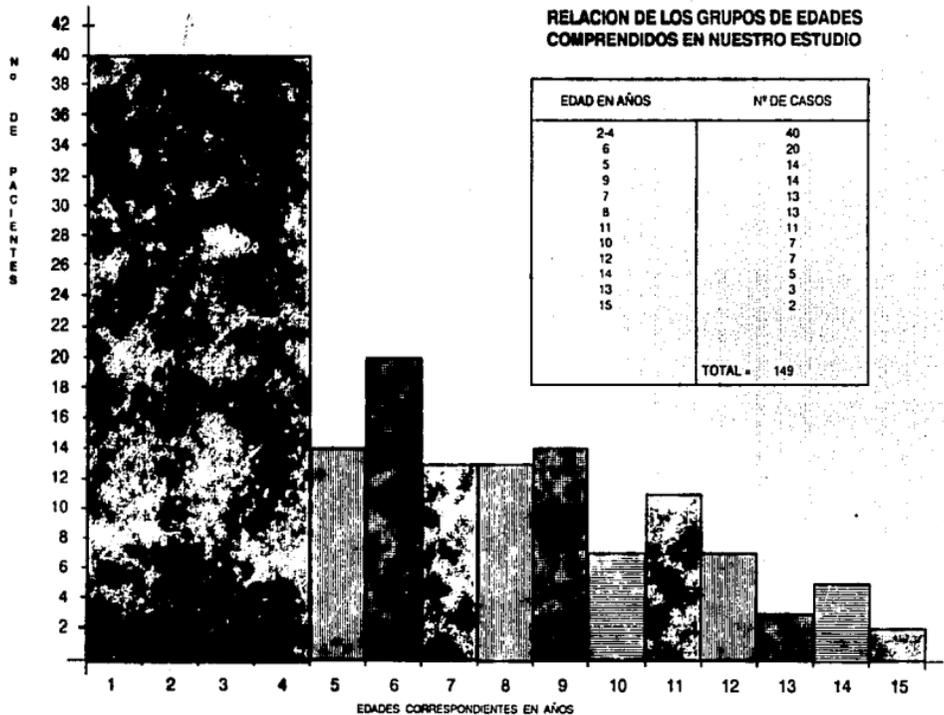
Es importante usar tanto el control positivo como el negativo para identificar las proteínas referidas en la figura anterior.

RESULTADOS

A continuación mencionaremos los resultados obtenidos, los cuales están comprendidos en 149 muestras analizadas; observándose que 87 correspondieron al sexo masculino y 62 al femenino. La edad comprendida en este estudio fué de 2 a 15 años, como se esquematiza en la siguiente gráfica.

ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS

El 75.1% (113 muestras) del total correspondieron a malignidades Hematológicas, como se muestra en la siguiente tabla:



CASOS HEMATOLOGICOS

Padecimientos	No. de casos	%del total de casos
Leucemia aguda linfoblastica	60	40.25
Leucemia aguda no linfoblástica	20	13.42
Enfermedad de Hodgkin	18	18.08
Linfoma no Hodgkin	15	10.07

% del total de casos= 75.1

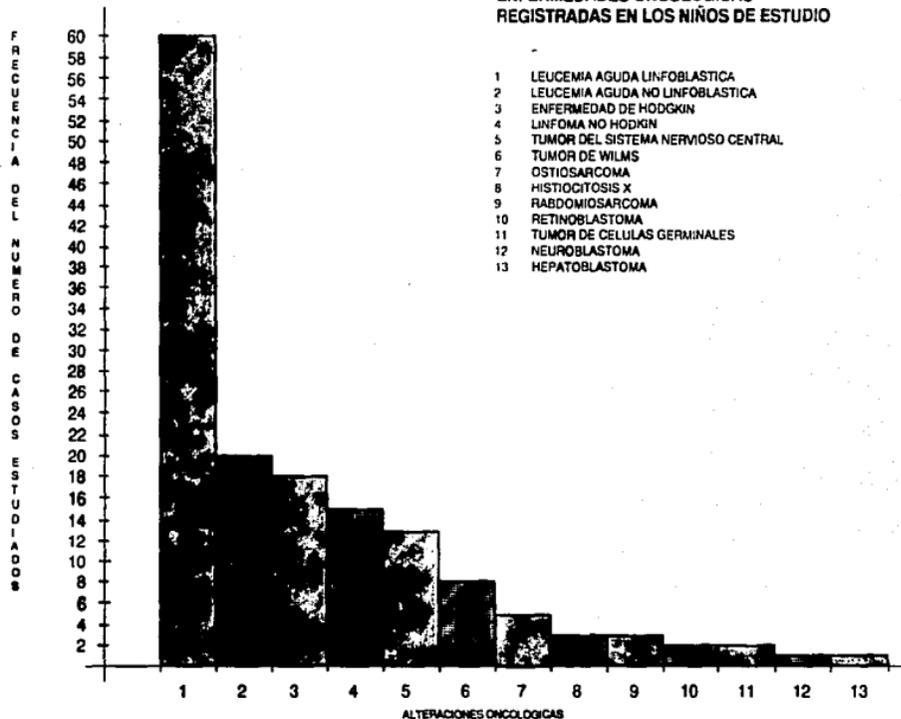
El 24.9% de los casos (36 pacientes) correspondieron a tumores sólidos, como se muestra en la siguiente tabla.

TUMORES		SOLIDOS
Padecimientos	No. de casos	%del total de casos
Tumor del sistema nervioso central (Astrocitoma)	11	7.4
Tumor de Wilms Nefroblastoma	8	5.4
Ostiosarcoma (Sarcoma óseo)	5	3.35
Histiocitosis X	3	2.02
Rabdomiosarcoma (sarcoma de partes blandas)	3	2.02
Retinoblastoma (tumor maligno en retina)	2	1.34
Tumor de células germinales (ovario)	2	1.34
Neuroblastoma (tumor del sistema nervioso periférico)	1	0.67
Hepatoblastoma (tumor maligno del hígado)	1	0.67

Total=24.9%

Todos los pacientes se encuentran en seguimiento por tratamiento de quimioterapia. Los casos se encuentran tabulados en la siguiente gráfica.

ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS REGISTRADAS EN LOS NIÑOS DE ESTUDIO



TRANSFUSIONES

En cuanto a la administración de transfusiones éstas se realizaron en 146 pacientes enlistados a continuación.

Transfusiones	Tipo de transfusión	% de transfundidos
146		97.9
53	tres unidades de paquete globular	35.6
93	politransfundidos con: derivados sanguíneos, plasma, conc. plaquetario y paquete globular.	62.3

En tres de los casos analizados no se registró transfusión alguna. Estas unidades de derivados sanguíneos correspondieron a donadores que se examinaron por la prueba de ELISA Behring Enzignost HIV-1 micro, durante 1990-1991, en la cual se reportaron resultados negativos de las unidades a ser transfundidas.

TECNICAS EFECTUADAS

A las muestras estudiadas se les realizó la prueba de ELISA tercera generación, en un corrimiento simultáneo con un control positivo y negativo externo, adicionales a los que indican los controles de ensayo. Se realizó un primer ensayo de ELISA, en el cual se observaron cuatro muestras positivas y dos consideradas como dudosas debido a que estas últimas se encontraban cercanas al valor de corte. Posteriormente se efectuó un segundo corrimiento con la técnica empleada a los seis casos antes mencionados, se observaron cuatro muestras positivas y dos negativas, por lo que se descartaron las consideradas como dudosa. Los resultados se esquematizaron en el siguiente cuadro.

RESULTADO DE LAS PRUEBAS REALIZADAS			
ELISA			
No. de pacientes	1er. ensayo	2do. ensayo	Western-Blot
1	dudosa	negativo	
2	dudoso	negativo	
3	positivo	positivo	positivo bandas Gp120, Gp41, p24, p18
4	positivo	positivo	indeterminado Gp41, p18
5	positivo	positivo	indeterminado P68
6	positivo	positivo	indeterminado p68

A las cuatro muestras positivas por método de ELISA se decidió efectuarles la prueba confirmatoria *Inmunoelectrotransferencia* (Western-Blot), obteniéndose los resultados siguientes:

No. del paciente	Bandas	Genoma	Resultado	EdadSexo	Diagnostico	Condición actual
3	Gp120 p41 p25 p18	Env+ Gag+ Gag	positivo	8M	Hepato blastoma	Fallece Nov.92 por infec- ciones oportu- nistas
4	Gp41 p18	Env+ Gag	Indetermi- nado	9M	Tumor de células germinales	Fallece en feb.93 sin quimio- terapia
5	p68	Pol	Indetermi- nado	9M	Astrocitoma	Con qui- mioter- apia
6	p68	Pol	Indetermi- nado	4M	Tumor de Wilms	Con qui- mioter- apia

Tanto en el caso considerado como positivo, como en los tres casos de indeterminados, el antecedente de transfusión fué de politransfundidos durante el año de 1991 descartándose otras causas de contagio del VIH-1 (drogadicción por vía intravenosa, hemofílicos, por abuso sexual) exceptuando transfusiones y vía perinatal.

Se realizó investigación retrospectiva en banco de sangre del Hospital Infantil de México, encontrándose que las unidades de sangre transfundidas a estos pacientes durante el año de 1991 fueron reportadas como negativas a la presencia de anticuerpos anti VIH.

DISCUSION

Al realizar este trabajo nos enfocamos en la transmisión de VIH a través de los productos transfundidos a pacientes inmunocomprometidos con cáncer. Por los artículos referidos sabemos que al realizarle transfusiones con sangre contaminada por VIH a este tipo de población, este virus afecta al organismo inmunodeprimido mutando rápidamente, en particular el gen de la envoltura, provocando que se potencie la virulencia. Por tal motivo, se cree que se presenta una seroconversión temprana después de la transfusión recibida [78], [79]. Las manifestaciones clínicas de la infección con VIH en esta población ocurren aproximadamente de 1 a 2 años después de recibir los productos contaminados, potenciado por el tratamiento que reciben estos pacientes ya que por lo general se les administra quimioterapia o radioterapia.

En el estudio realizado se observaron cuatro muestras consideradas como positivas por el método de ELISA de tercera generación. Se les efectuó la prueba confirmatoria Western-Blot en la cual se observó una muestra con patrón positivo y tres con patrón considerado como indeterminado. En la muestra positiva, el niño se encontraba bajo esquema de quimioterapia con enfermedad primaria de un hepatoblastoma, en el cual no se presentó actividad tumoral, pero sí pancitopenia e infecciones oportunistas; esto transcurrió aproximadamente en el lapso de seis meses. El espacio comprendido entre la primera transfusión recibida fué de un año cuatro meses, y fallece seis meses después de recibir la última transfusión. Lo anterior nos hace pensar que la seroconversión que se presentó fué temprana y potenciada por el tratamiento.

El paciente con enfermedad primaria de tumor de células germinales, cuya muestra fué considerada como indeterminada con las bandas Gp 41 y P18, recibió quimioterapia. En este niño se empezó a observar que presentaba infecciones por Candida en la

zona esofágica; posteriormente se decidió suspenderle el tratamiento de quimioterapia, no obstante continuaron apareciendo infecciones oportunistas. Lo anterior se empezó a manifestar en un promedio de un año y seis meses, mientras que el lapso transcurrido entre la primera transfusión recibida fué de dos años y tres meses, y la última fué de ocho meses. La muestra analizada fué tomada siete meses antes de morir el niño. Se piensa que tal vez pudo presentar una seroconversión, pero no se comprobó debido a que no fué posible la obtención de una segunda muestra de sangre, ya que se les dió aviso a los padres del niño para que se presentarían en el departamento de Oncología; aproximadamente un mes después, el padre notificó que el niño había fallecido en el mes de febrero de 1993.

En los otros dos casos considerados como indeterminados, estos pacientes se encuentran bajo esquemas de quimioterapia. El tiempo transcurrido desde su primer transfusión recibida fué de dos años; hasta la fecha no se ha observado actividad tumoral ni tampoco infecciones por oportunistas. Estos pacientes se encuentran bajo seguimiento para detectar el momento en el que se presente una seroconversión.

Los cuatro casos anteriores fueron considerados como politransfundidos, se descartaron todas las fuentes de infección (drogadicción por vía intravenosa, abuso sexual, hemofílicos), excepto las transfusiones y vía perinatal, debido a que no fué posible obtener muestras sanguíneas de los padres; sin embargo, el intervalo entre las infecciones y la aparición de los síntomas del SIDA declarado es más corto en los niños que en los adultos, y menor en los infectados por vía perinatal. Por esta vía es más corto que el intervalo promedio (siete años) en los niños estudiados. Por tal motivo, es difícil pensar como fuente de infección la vía perinatal [84]. En algunos niños transfundidos, la aparición del SIDA se ha retrasado sustancialmente (siete años y medio) [86].

Nuestros resultados hacen notar que en los pacientes con una enfermedad neoplásica y politransfundidos existe una mayor probabilidad de que el virus se manifieste más rápido que lo usual.

Las múltiples transfusiones favorecen la infección por VIH, presentándose infecciones por oportunistas que se observan frecuentemente en los pacientes con cáncer y en pacientes portadores del VIH. Esto puede prestarse a confusión con la enfermedad primaria (cáncer), sin sospecharse de la presencia del VIH.

La frecuencia de infecciones por VIH a través de múltiples transfusiones realizadas en nuestra población de estudio fue de 0.67% en el patrón positivo, y de 2.02% en el indeterminado. Este mismo estudio se realizó también en la Central Regional de Servicio de Sangre de la Cruz Roja Estadounidense en Ohio [78], obteniéndose resultados similares a los nuestros.

Es importante mencionar que a los donadores de sangre se les efectuó la prueba de escrutinio (ELISA), obteniéndose resultados negativos. Aunque es posible que de haber sido donadores que se encontraran en fase asintomática, no pudieran ser detectados por la técnica empleada, presentándose falsos negativos. Aún no se cuenta con técnicas de escrutinio específicas para detectar la etapa asintomática. La técnica empleada en este estudio es capaz de detectar a portadores del VIH en las primeras fases de la etapa de seroconversión, pero no en la asintomática. Esta técnica debe de ser reforzada con pruebas confirmatorias como Western-Blot, y de inmunofluorescencia.

Debido a la gran problemática que continúa presentandose en cuanto al contagio del VIH por transfusiones, se sugiere el empleo de técnicas con una alta sensibilidad y

especificidad que sea capaz de detectar a portadores del VIH en fase asintomática, las cuales sean usadas en pruebas de escrutinio [73], [74].

Una de las técnicas que ha presentado buenos resultados para la detección en fase asintomática del VIH, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [76], la cual sería de gran ayuda para abatir esta fuente de transmisión; sin embargo en la actualidad se encuentra en fase de desarrollo.

Toda prueba que se lleve a cabo debe ser potenciada con la buena realización de las técnicas, para ésto es muy importante el adiestramiento adecuado del personal que participa en la realización de las mismas.

CONCLUSIONES

En el estudio realizado, llegamos a las siguientes conclusiones:

- Efectivamente los productos sanguíneos continúan siendo una de las fuentes de infección del VIH. Esto se favorece en los pacientes con padecimientos oncológicos o por el tratamiento recibido.
- Probablemente, por el estado inmunológico de la población estudiada la etapa asintomática es más corta, y como consecuencia la seroconversión se presenta más rápido, esto puede correlacionarse en lo observado, particularmente en uno de los casos analizados.
- La frecuencia de infección por VIH a través de transfusiones en la población de estudio fue baja, tanto en patrón considerado como positivo como en los indeterminados. Los casos considerados pudieran tener una relación con los productos sanguíneos transfundidos.
- Para tener un mejor control de esta vía de transmisión se requiere del implemento de técnicas de escrutinio que muestren mayor sensibilidad y especificidad en donadores de riesgo, y que sean eficientes para detectar la etapa asintomática.
- Es necesario que se sometan los productos sanguíneos a técnicas de inactivación de virus para disminuir esta vía de transmisión.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Gottlieb, M. S. and Schanker, H.: *Pneumocystis carinii, Pneumonia and Mucosal candidiasis in Previously*. N. Eng. J. Med. **305**:1420-1428 (1981).
- [2] Vita, V. T., Helman, S., and Rosenberg, A.: *Origen del SIDA y de los retrovirus humanos*. En: AIDS Etiology, Diagnosis, treatment, and Prevention. Lipnicott company, 1988, pp 3-4.
- [3] Gallo, R. C. and Sarin, P. S.: *Isolation of Human T-cell leukemia virus in acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)*. Science **220**:855-859, (1983).
- [4] Montagnier, L.: *The Human Immune Deficiency Viruses in 1989*. AIDS Diagnostics Pasteur Paris, pp 10-16, (1989).
- [5] Raymond, C. A.: *First Needle-Exchange Program Approved; Other Cities Await Results*. Med. News & Persp. **259**:1289-1290, (1989).
- [6] Peterman, T.A.; Jaffe, H.W.; Feorino, P.M.; Getchell, J.P.; Warfield, D.T.; Haverkos, H.W.: *Transfusion Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome in the United States*. JAMA **254**:2913-2913, (1985)
- [7] World Health Organization Geneva: Weekly Epidemiological Record. 15 January: 10-16, (1993).
- [8] Boletín mensual: SIDA/ETS, CONASIDA, año 7, Número 3, pp 2376-2393, marzo de 1993.
- [9] S.S.A.: *Normas y Técnicas para disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos*. Diario Oficial, artículo 15 pp 5-7, 22 de mayo de 1986.
- [10] S.S.A.: *Norma Oficial Mexicana de emergencia para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos*. Diario Oficial, pp 4-12, 16 de diciembre de 1992.

- [11] Burg, A.: *SIDA punto de interrogación ; Entrevista con Luc Montagnier. ICYT Información Científica y Tecnológica*. **132**:9-5-11, (1987).
- [12] Boyles, S.: *Informative Briefs from World Wide Sources. AIDS Weekly, News Report* October 26 (1992).
- [13] Clavel, F. Guetard, D. Vezinet, B.F.: *Isolation of a New human retrovirus from West Africa patients with AIDS. Science* **233**:243-250, (1986).
- [14] Clavel, F. Monshok, A. Chamaret, S.: *Human Immuno Deficiency virus type 2 Infection associated with AIDS in West Africa. N. Engl J. Med.* **316**:1780, (1987).
- [15] Hillins, H. A. Hayes, R., and Alonso, P.: *Risk factors for VIH-2 infection in the Gambia. AIDS* **5**:1127-1132, (1991).
- [16] Piot, P., Laga, M., Ryder, R., Perriens, J., Temmemam, M., Heyward, W., and Curran, J. W.: *The Global Epidemiology of VIH Infection: Continuity, Heterogeneity, and Change. J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**:403-412, (1990).
- [17] Fitzgerald-Bocarsly, P., Feldman, M., Howell, D., Kloser, P.: *Deficient Interferon α Production but Normal Natural Killer Cell Activity in AIDS Patient with HIV-2 Infection. J. Infec. Dis.* **160**-6:1084-1085, (1989).
- [18] Vázquez-Valls, E., Lequin, R. M., Campos-López, P., Calkhoven, P. G.: *Coinfección por VIH-1, VIH-2 en México. SIDA/ETS CONASIDA P.A.* **2073**:2250, (1992).
- [19] Situación del SIDA en México. Contexto Internacional datos actualizados hasta la semana 41. pp 2276, (1992).
- [20] Ruiz-Argüelles, G. J., Madrid, M. R.: *Importación no sexual de SIDA en México, un peligro del malinchismo. Rev. Invest. Clin. (Mex)* **38**:113, (1986).
- [21] Caputo, A., Sodroski, G. J., and Haseltine, W. A.: *Constitutive Expression of VIH-1 tat Protein in Human Jurkat T Cells Using a BK Virus Vector. J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**:372-379, (1990).

- [22] Paule-Kieny, M.: *Structure and Regulation of the Human AIDS virus*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **3**:395-402, (1990).
- [23] Goff, S. P.: *Retroviral reverse transcriptase: Synthesis, structure, and function*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **3**:817-831, (1990).
- [24] Predraza-Martins, L., Chencinen, N., Asjo, B., Meyerhans, A., and Wain-Hobson, S.: *Independent fluctation of Human Immunodeficiency virus type 1 rev and gp41 quasy species in vivo*. J. Virol. **65**-8:4502-4507, (1991).
- [25] Knight, S. C., Macatania, S. E.: *Effect of HIV on Antigen presentation by Dendritic Cells and Macrophages*. Res. Virol. **142**-(2,3):123-128, (1991).
- [26] Braathen, L. R., Ramirez, B., Kunze, R., and Gelderblom, H.: *Células de Langerhans como principales células Diana en la infección por VIH*. The Lancet **2**:1-99, (1991).
- [27] Looney, J. D., Hayashi, S., Niklas, M. Redfield, R. R., Broder, S. Wong-Staal, F., and Mitsuya, H.: *Differences in the Interaction of HIV-1 and HIV-2 with CD4*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **3**:649-657, (1990).
- [28] Goudsmit, J., Meloen, R., Brasseur, R. and Barin, F.: *Human B-cell Epitopes of HIV-2 Transmembrane Protein Are Similarly Spaced as in HIV-1*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **2**:297-302, (1989).
- [29] Martha Elena.: *Esqueleto y entrañas de un nuevo virus*. ICYT Información Científica y Tecnológica **9**-132:19-21, (1987).
- [30] Cohen, E.A. Terwilliger, E.F. Jalinoos, Y. Proulx, J. Sodrosski, J.G., and Halseltine: *Product and Function of HIV-1 Upr Product and Function*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **3**:11-18,(1990).
- [31] Gallo, R.C.: *The AIDS Virus 2*. Scientific American **257**-5:39, (1988).
- [32] Montagnier, L.: *AIDS and its related viruses*. Virology-HIV. Sanofi Diagnostics Pasteur pp. 4-6, (1992).

- [33] Baum, R.M.: *Making roads in understanding a complex virus.* AIDS Res. C & EN 12:7, (1986).
- [34] Kure, K. Ilena, J.K. Lyman, W. D. Soeiro, R. Weidenheim, K.M. Hirano, A., and Dickson, D.W.: *Human Immunodeficiency virus-1 Infection of the Nervous System.* Human Pathology 22-7:700-709, (1991).
- [35] Scott, A.: *Science of AIDS the virus behind.* New Scientific 1553:38, (1987).
- [36] Leads from the MMWR, Centers for Disease Control.: *Semen Banking, Organ and Tissue Transplantation, and HIV antibody testing.* JAMA 259-9:1301, (1988).
- [37] Raymon, C.A. Medical News Perspectives.: *First Needle-Exchange Program approved; other cities await Result.* JAMA 259(9): 1289-1290, (1988).
- [38] Kamihira, S., Nakasima, S. Oyakawa, Y. Moriuti, Y. Ichimaru, M. Okuda, H. Kanamura, M. and Oata Takiko.: *Transmission of Human T cell Lymphotropic virus type 1 by blood transfusion before and Mass Screening of sera from Sero positive Donors.* Vox Sang 52:43-44, (1987).
- [39] Aridjis-Perea, P.: *¿Cómo se contagia el virus del SIDA?* Gaceta CONASIDA, año 1 No. 1, junio (1988).
- [40] *Evolución de la Infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana Transmisión del VIH.* Boletín mensual de CONASIDA, AÑO 1, No 2 pg. 37 abril 1987.
- [41] Gallo, C. R. Montagnier, L.: *AIDS in 1988.* Scientific American 259-4:148-152, (1988).
- [42] Uribe, P.: *¿Cómo se transmite el virus del SIDA de madre a hijo?* Gaceta CONASIDA, año 1, No. 3, pp 3-4, septiembre-octubre (1988).
- [43] Aridjis-Perea, P.: *¿Cómo se contagia el virus del SIDA?* Gaceta Informativa CONASIDA número especial, enero de 1990.
- [44] Pinsker-Shor, V., Arredondo, J. L.: *El ABC SIDA perinatal.* Gaceta CONASIDA año 3, No. 4 pp 3-5, (1990).

- [45] *Mecanismo de transmisión perinatal de VIH*. Boletín mensual de CONASIDA año 1, No. 8, pp 151-153, octubre de 1987.
- [46] Arrantía-Gradin, R. D.: *Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y sus riesgos perinatales*. Infectología, año 7, No. 5, mayo de 1987.
- [47] Barriga, G. Castillo, P., Seymor, E., and Stramer, S. L.: *Saliva Diagnostics Systems*. P. B. 3602 *Eventos sobre SIDA*. Boletín mensual SIDA/ETS, 6-8:2259, (1992).
- [48] Lifson, A. R.: *Do alternate modes for transmission of Human Immunodeficiency Virus exist?* JAMA 259-9:1353-1361, (1988).
- [49] Daniel, G. Victor.: *SIDA*. El manual moderno, pp 325-327 (1988).
- [50] Plata, F., Wain-Hobson, S.: *SIDA Inmunidad y vacunas*. Mundo Científico 8-76, enero de 1988.
- [51] Solar, C. C.: *Biología de los virus de la Inmunodeficiencia Humana*. Laborat acta 1-1, (1989).
- [52] Redfield, R. R., Burke, D. S.: *Infección por VIH: Cuadro Clínico*. Investigación y Ciencia 147:82-91, (1988).
- [53] García, H. F.: *Síndrome de la soledad*. ICYT Información Científica y Tecnológica 11 (148): 26-29, (1989).
- [54] Offestandt, G. Pinta, P.: *Multiple opportunistic infection due to AIDS in a previously healthy black woman from zaire*. Correspondence 308-(13):775 (1983).
- [55] Díez-Martínez, C.: *Manifestaciones Clínicas*. ICYT Información Científica y Tecnológica 11-(148): 31-35, (1989).
- [56] Pialoux, G.: *Natural history and biological markers of VIH infection*. Virology-HIV Instituto Pasteur Hospital de Paris. Sanofi Diagnostic's Pasteur pg 7-9, (1992).
- [57] Sansonetti: *Clinical Spectrum of VIH Infection*. Instituto Pasteur, Diagnostic's Pasteur pg 13-16, (1989).

- [58] Daniel P. Stites, John D. Stobo, J. Vivian Wells. *Metodos Clínicos de laboratorio para detectar la función Inmunitaria celular*. Inmunología básica y clínica. 281-296. Ed: El manual moderno, sexta edición (1988).
- [59] *Características de la infección virus huesped*. Boletín mensual de CONASIDA, número 7 septiembre (1987).
- [60] Mosqueira-Osuna, C.: *Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida*. Laborat acta 1-(4): 30-38, (1989).
- [61] Schwartz, J. S. Dans, P. E. Kinosian, B. P.: *Human Immunodeficiency virus test evaluation performance and use: proposals to make good test better*. JAMA 259:2574-2579, (1988).
- [62] Nusbacher, J. Naiman, R.: *Longitudinal Follow-up of blood donors found to be reactive for antibody to human Immunodeficiency virus (anti-HIV) by enzyme-linked Immunoassay (EIA*) but negative by Western-Blot (W-B)*. Transfusion 29 (4): 365-367, (1989).
- [63] Healy, D. S. Howard, T. S. Colin, S. and Gust, D. I.: *An evaluation of competitive and second generation Elise Screening test for antibody to HIV*. J. Virol. Methods 22: 61-73, (1988).
- [64] Iglesias, L. S. Torres, S. A. Lara-Eleazar, P. Isabasi, A. y Acosta, G. A.: *Análisis Inmunoenzimático*. Rev. Mx. Patol. Clin. 32(2): 53-59, (1985).
- [65] Johnson, J. E.: *Empleo de un reactivo de ELISA para el diagnóstico de infección por virus del SIDA*. Infectología año 8, número 1, pg. 41-43 enero de 1988.
- [66] *Interpretation and use of the western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections* Center for Disease Control 38(7): 1-4, (1989).
- [67] Samgadharan, M. G. Popovic, M. Bruch, L.: *Antibodies reactive with Human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS*. Science 224:506, (1984).

- [68] Chiodo, F. Ricchie, E. Costigliola, P. Michelacci, L. Bovicelli, L.: *Vertical Transmission of HTLV-III. Lancet* **213**:739, (1986).
- [69] Secretaría de Salud.: *Laboratorios de detección de anticuerpos anti-VIH. Boletín mensual de CONASIDA* año 1, número 2, diciembre, (1987).
- [70] *Recomendaciones para la detección de anti-VIH. Boletín mensual de CONASIDA* año 1, número 7, septiembre (1987).
- [71] Saint-J, M. and Chamaret, S.: *In vitro Diagnosis of VIH Infections (1-anti-VIH serology). AIDS Diagnostic's Pasteur* pg 17-19, (1988).
- [72] Amman, J. A. Schiffman, G.: *B-Cell Immunodeficiency in Acquired Immuno-deficiency Syndrome. JAMA* **251**(11):1447, (1984).
- [73] *Técnica de ELISA método del Sandwich para la detección de Ag del VIH, ELAVIA AG1, Instituto Pasteur de Paris, julio de (1992).*
- [74] *Técnica de ELISA método del Sandwich para la detección de Ac's, anti-P25. ELAVIA anti-P25, Instituto Pasteur Paris, julio de (1992).*
- [75] Sweet-Cordero, A. Santos-Preciados J.I.: *Utilidad de la Reacción en Cadena con Polimerasa (PCR) en la investigación y el diagnóstico clínico en pediatría. Bol Med. Hosp. Infant. Méx.* **50**(2):73-135, (1993).
- [76] Gerald, Schochetman, Chin-Yin, Ou, and Wanda-Jones,K.: *Polymerase Chain Reaction. J. Infect. Dis.* **158**(6):1154-1157, (1988).
- [77] Ayehunie, S. Sonnerborg, A. Johansson, B. Fehniger, T. E. work-zewdie, D. Yeamene Berhan, T. Petros, B. Abens, J. Britton, S. and Strannegard, O.: *Differences in PCR Reactivity Between HIV Proviruses from Individuals in Ethiopia and Swedan. J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**:975-980, (1990).
- [78] Brady, M. T. and Cuartas, J. F.: *HIV Infection of Multiply-Transfused Pediatric Oncology Patients in a Low-Prevalence Area. Am. J. Pediat. Hematol. Oncol.* **14**(3):233-235, (1992).

- [79] Anderson, K. C. Gorgone, B. C. Marlink, R. G. Ferriani, R. Esseck, M. E. Benz, P. M. and Groopman, J. E.: *Transfusion-Acquired Human Immunodeficiency Virus Infection Among Immuno compromised Persons.* Ann. Intern. Med. **105**:519-527, (1986).
- [80] Vemura, Y. Uriyu, K. Hirao, y. Takechi, K. Ishikawa, H. Nakajima, T. Kagitani, Y. Yokoyama, K.: *Inactivation and Elimination of viruses during the fractionation of and Intravenous Immunoglobulin Preparation: Liquid Heat Treatment and, Polyethylene Glycol Fractionation.* Vox Sang **56**: 156-161, (1989).
- [81] Kitchen, A. D. Mann, G. F. Harrison, J. J. Zucherman, A. J.: *Effect of Gamma Irradiation on the Human Immunodeficiency Virus and Human Coagulation Protein.* Vox Sang **56**:223-229, (1989).
- [82] Lin, L. Wiesehahn, G. P. Morel, P. A. and Corach-L.: *Use of 8-Methoxy psoralen and long-wavelength ultraviolet radiation for decontamination of platelet concentrates.* Blood **74**(1):517-525, (1989).
- [83] Prodouze, N. and Fratantoni, J. C.: *Inactivation of virus in blood products.* Transfusion **28**(1): 2-3, (1988).
- [84] Hassig, S. E. Kinkela, N. Nsa, W. Kamenga, M. Ndilu, M. Francis, H. and Ryder, W. R.: *Prevention of Perinatal HIV Transmission: Are There Alternatives to Pre-pregnancy Serological Screening in Kinshasa, Zaire?* AIDS **4** (9):913-916, 1990.
- [85] Morgan, G. Wilkins, A. Pepin, J. Jobe, O. Brewster, D. and Whittle, H.: *AIDS Following Mother-to-child Transmission of HIV-2.* AIDS **4** (9):879-882, 1990.
- [86] Miotti, P. Dallabetta, G. Ndbui, E. Liomba, G. Saah, J. A. and Chipangwi, J.: *HIV-1 and Pregnant Women: associated factors, prevalence, estimate of incidence and role in fetal wastage in Central Africa.* AIDS **4** (8):733-736, 1990.