UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

CATEDRA DE BIOQUIMICA

SIDA: ESTUDIO INMUNOLOGICO EN COLECTIVOS DE RIESGO DE LA PROVINCIA DE GRANADA

ARMANDO F. REYES BERTOS

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA

PROF. G. PIEDROLA
PROF.ª M. C. MAROTO

AVENIDA DE MADRID, 9
TFNO. 958 / 28 01 44
18012-GRANADA

LA PROFESORA DRA. Mª CARMEN MAROTO VELA, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de medicina de la universidad de Granada D. ARMANDO FRANCISCO REYES BERTOS, sobre el tema **SIDA: Estudio inmunológico en colectivos de riesgo de la provincia de Granada,** ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas, que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada a 30 de Enero de 1.987.

Fdo. Mª Carmen Maroto Vela

D. EMILIO DOBLARE CASTELLANO, DOCTOR EN MEDICINA POR LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CORDOBA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada D. ARMANDO FRANCISCO REYES BERTOS, sobre el tema **SIDA: Estudio inmunológico en colectivos de riesgo de la provincia de Granada**, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas, que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada a 30 de Enero de 1.987.

Fdo. Emilio Doblaré Castellano

A Mª Carmen

AGRADECIMIENTOS

A la Profª. Maroto Vela, por la extraordinaria paciencia demostrada en la dirección y corrección de este trabajo.

Al Dr. D. Emilio Doblaré, que me proporcionó los conocimientos básicos para la realización de las técnicas inmunológicas.

Al Prof. Piédrola Angulo, Director del Departamento donde tan satisfactoriamente cursé mi residencia.

A la Profª. Bernal Zamora. Dra. Leyva y Dra. Galán, por saber orientarme en las dudas que me han surgido.

A los integrantes de la sección de Inmunología y en especial al Prof. Gutiérrez Gea y al Dr. Carlos Muñoz, por el apoyo prestado.

A todos los miembros del Departamento de Microbiología: Dres. Peco, Liébana, Pérez-López, Román, Escobar y Marín y a todas las enfermeras, secretarias y auxiliares, por la comprensión demostrada.

Al personal sanitario de la Prisión Provincial de Granada: Dr. Treceño, Luis, Simeón y Rosa, por su afán de colaboración.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION	1
I.El agente etiológico del SIDA	4
II.Epidemiología del SIDA	23
1.Definiciones importantes	23
2.Grupos de riesgo de SIDA	32
3.Historia natural de la infección por el HTLV III	48
4.El SIDA en España	54
III.Clínica del SIDA	60
1.Acción directa del virus	60
2.Infecciones en el SIDA	61
3.Sarcoma de Kaposi	71
4.Otras neoplasias malignas	75
IV.Alteraciones inmunológicas en el SIDA ..	77
1.Linfopenia	78
2.Alteraciones funcionales de los linfocitos T	81
3.Alteraciones funcionales de los monocitos	84
4.Alteraciones funcionales de los linfocitos B	85
5.Alteraciones serológicas	85
6.Alteraciones inmunológicas en homosexuales asintomáticos	86

Pag.

7. Alteraciones inmunológicas en hemofílicos asintomáticos 87

8. Alteraciones inmunológicas en drogadictos intravenosos 87

9. Alteraciones inmunológicas en el Complejo Relacionado con el SIDA 89

10. Inmunopatogénesis 90

V. Subpoblaciones linfocitarias y anticuerpos monoclonales 94

VI. Métodos de detección de anticuerpos anti-HTLV III 102

VII. Seroprevalencia del HTLV III 112

VIII. Instituciones Penitenciarias 120

OBJETIVOS 128

MATERIAL Y METODOS 131

RESULTADOS 273

DISCUSION 360

CONCLUSIONES 416

BIBLIOGRAFIA 420

INTRODUCCION

El denominado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) tiene una corta e intensa historia que se inicia en el estado norteamericano de California en 1.981, cuando un grupo de médicos constatan la aparición, de forma inusual, de casos de neumonía por Pneumocystis carinii, microorganismo oportunista, en cinco jóvenes homosexuales previamente sanos. (GOTTLIEB, M.S. y cols; 1.981).

Fueron estos autores los primeros que hablaron de la evidencia de un nuevo síndrome de inmunodeficiencia adquirida de tipo celular, aunque ya desde 1.979 se sabía de la existencia, primero en Nueva York y luego en Los Angeles, de jóvenes adultos que, sin ningún historial clínico significativo y ningún antecedente que pudiera explicarlo, presentaban serias infecciones producidas por microorganismos oportunistas y/o una forma muy virulenta de sarcoma de Kaposi (FRIEDMAN-KIEN, A.E. y cols., 1.982).

El aumento de casos fue vertiginoso, convirtiéndose en una auténtica epidemia y con el agravante de que la mayoría de los pacientes fallecía en el curso de pocos meses.

Fue entonces cuando se tomó conciencia de la aparición de una nueva enfermedad y la totalidad de la comunidad científica internacional se lanzó a la

búsqueda del origen y etiología del nuevo síndrome.

Estudios inmunitarios revelaron que estos enfermos padecían trastornos de las poblaciones de linfocitos T que se traducían en un importante déficit de la inmunidad celular.

Dicho trastorno consistía en una importante disminución de la población de linfocitos T helper/ inductores (MASUR, H. y cols., 1.981; GLUCKMAN, J.C. y cols., 1.985).

Se dedujo que la enfermedad era primariamente debida a un agente inmunotóxico que podía actuar asociado a una sobrecarga antigénica, ya que en la mayoría de los pacientes se descubrió con gran frecuencia infecciones de tipo vírico, dando lugar a la posterior manifestación de los diversos cuadros clínicos característicos del SIDA derivados del estado de deficiencia inmunitaria celular.

En la investigación de la epidemiología del SIDA se comenzó por la identificación de los casos clínicos mediante una rígida definición del concepto de la nueva enfermedad. Tras el estudio de numerosos casos se llegó a la identificación del virus linfotrópico humano tipo III (HTLV III) como agente etiológico del síndrome (POPOVIC, M. y cols., 1.984; GALLO, R.C. y cols., 1.984; SCHUPBACH, J. y cols.,

1.984; SARNGADHARAN, M.G. y cols., 1.984).

Previamente, investigadores del Instituto Pasteur de París habían sugerido que el agente etiológico del SIDA era el virus asociado a la linfadenopatía (LAV) de la familia de los retrovirus humanos (BARRE-SINOUSSI, F. y cols., 1.983; BRUN-VEZINET, F. y cols. 1.984).

Parece ser que ambos virus son idénticos, al igual que el virus aislado por el grupo de Levy en San Francisco y denominado por ellos como virus relacionado con el SIDA (ARV). En todo caso las diferencias serían mínimas siendo virus íntimamente relacionados (LEVY, J.A. y cols., 1.984).

Recientemente se ha aceptado el nombre de virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)para el agente causal del SIDA, y con esta denominación aparece en las publicaciones de la OMS (Boletín Epidemiológico Semanal, Nº 1.732 del 20-8-1.986).

I. EL AGENTE ETIOLOGICO DEL SIDA:

Numerosos agentes han sido estudiados como posibles causantes del SIDA: el nitrito de amilo o afrodisíacos en homosexuales, algunos hongos, el virus de Epstein-Barr o el citomegalovirus. Sin embargo, la especificidad de la afectación de una determinada subpoblación de linfocitos T, hacía suponer que sólo un retrovirus (virus oncógeno de RNA) podía poseer esta especificidad y ser responsable del SIDA.

El descubrimiento de los primeros retrovirus humanos representa el fruto de una contínua investigación que comenzó hace más de 50 años (GROSS, L. 1.983).

Los retrovirus son muy conocidos en animales por ser la causa de enfermedades de tejidos linfoides (leucemias o linfosarcomas) e incluso de enfermedades letales como el Visna o la anemia infecciosa equina. En los gatos el virus de la leucemia felina (FELV) ocasiona inmunodepresión e incrementa la susceptibilidad a numerosas infecciones oportunistas que resultan letales (ESSEX, M. 1.975). Los gatos infectados, natural y experimentalmente, con el virus de la leucemia felina mostraron evidencia directa de afectación inmunológica asi como atrofia tímica, retraso

en el rechazo de injertos y respuesta humoral defectuosa (TRAININ, Z. y cols., 1.983).

A partir de estas observaciones se han identificado los retrovirus humanos denominados virus HTLV (virus linfotrópico humano de células T).

El HTLVIha sido reconocido como agente causante de linfomas cutáneos como la enfermedad de Sézary o de una leucemia presente sobre todo en Japón, Africa y Caribe llamada leucemia de células T del adulto (POIESZ, B.J. y cols., 1.980).

El HTLV II se aisló de una leucemia de células peludas o tricoleucemia (KALYANARAMAN, V.S. y cols., 1.982).

Estas y otras observaciones acerca de la biología del SIDA y de las características de los HTLV I y II llevaron a considerar la posibilidad de que un retrovirus relacionado, aunque diferente de los anteriores, fuera el causante del SIDA. El hecho que los HTLV presentan únicamente tropismo por las células T helper, que el SIDA sea claramente una enfermedad de esta población celular (SELIGMAN, M. y cols., 1.984) y que el HTLV-I se transmita a través de estrecho contacto físico (sobre todo contactos sexuales entre hombres) y por transfusión sanguínea, merecían una con-

CUADRO 1

PROPIEDADES COMPARATIVAS DE LOS RETROVIRUS HTLV-I,II y III.

PROPIEDADES	HTLV-I	HTLV-II	HTLV-III
1.Infectividad general	Linfo.	Linfo.	Linfo.
2.Trofismo particular	T4	T4	T4
3.Tamaño transcriptasa de reversión(RT)	~100 K	~100 K	~100 K
4.Catión divalente de la RT	Mg++	Mg++	Mg++
5.Proteína central más importante	p 24	p 24	p 24
6.No fosfoproteína cerca del terminal aminoácido de la proteína gag	+	+	+
7.Epítope común de la cubierta	+	+	+
8.Polimorfismo de la cubierta	−	−	+
9.Epítope común de la p 24	+	+	+
10.Activación transcripcional de transacción (TAT)	+	+	+
11.Genes extra codificando la función Tat	+	+	+
12.Mecanismo de partición doble que origina un 3' mRNA de unos 2 Kb	+	+	+
13.Produce células gigantes multinucleadas	+	+	+
14.Altera la función de la célula T	+	+	+
15.Efecto citopático sobre células T4	−	−	+
16.Origen africano	Probable	?	Probable

(Tomada de ROBERT-GUROFF, M. 1986)

siderable atención.

Aunque la secuencia primaria de nucleótidos ha mostrado solamente pequeñas diferencias de homología entre el HTLV-III/LAV y el HTLV I o el HTLV-II (RATNER, L. y cols., 1.985), éstas y otras características revelan similitudes biológicamente remarcables entre los tipos de HTLV. Otras semejanzas incluyen el pequaño tamaño de la proteína del core (p 24/25), la propensión de la transcriptasa inversa por el ión Mg++ y la presencia de un gen viral que regula la transcripción (SHAW, G.M. y cols., 1.984).

El descubrimiento de factores de crecimiento, como el TCGF (factor de crecimiento de células T) o IL-2 (interleukina 2) permitió el cultivo "in vitro" de los linfocitos y la expresión de retrovirus detectados por su transcriptasa inversa en el desarrollo del cultivo. Ello hizo posible el aislamiento de un tercer retrovirus denominado LAV por los franceses y HTLV III por el grupo norteamericano del profesor Gallo (GALLO, R.C. y cols., 1.984).

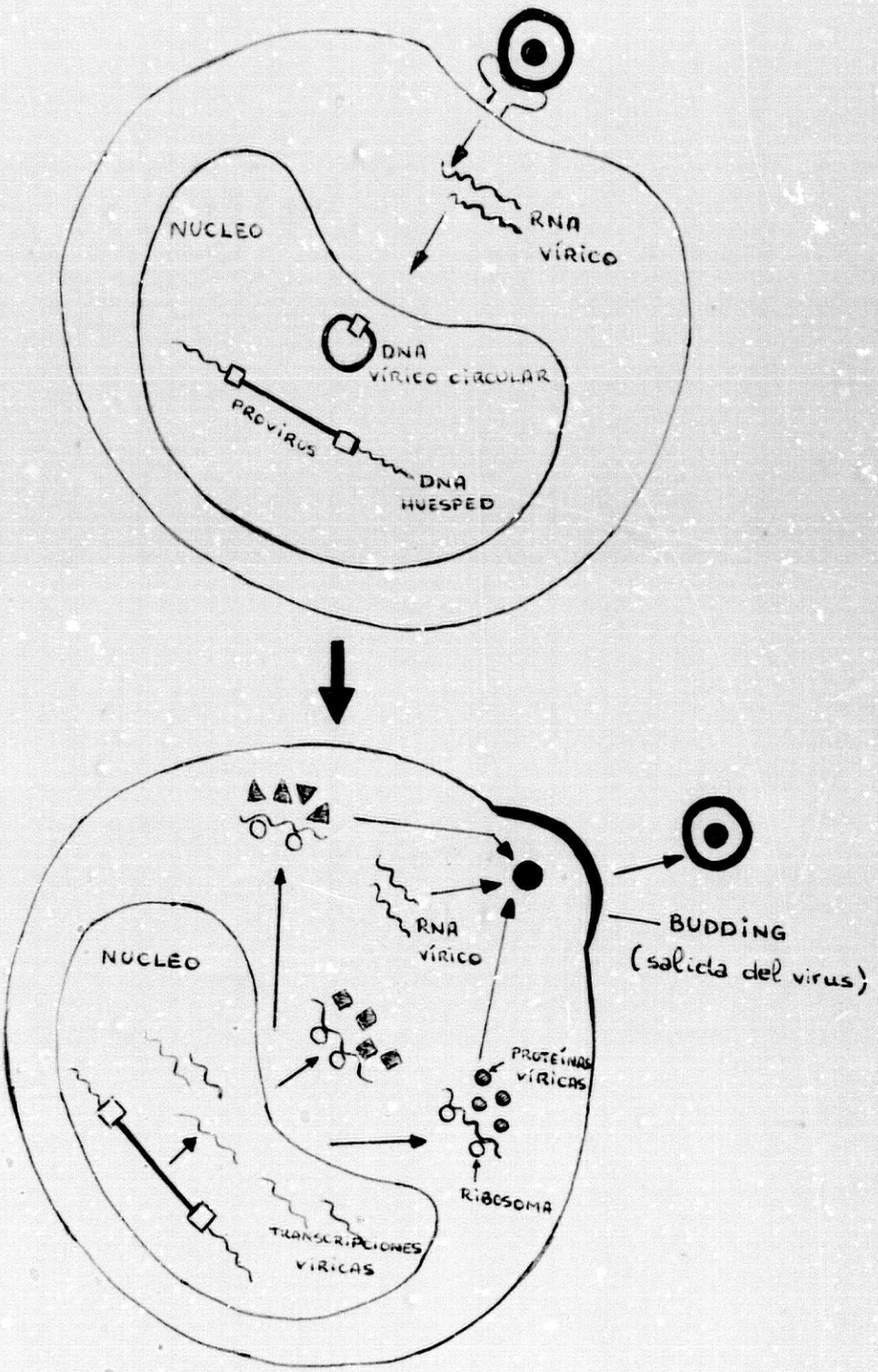
Los retrovirus son una familia de virus con cubierta (envelop) portadores de una única hélice de RNA como fuente de las informaciones de codificación necesarias para su supervivencia. Su replicación depende del uso de la maquinaria celular y de la integración de su forma intermedia de hélice doble de

DNA (un provirus) en el DNA de la célula huésped. Una de sus características es que estos retrovirus portan en el virión una enzima codificada por su genoma, la transcriptasa de reversión o transcriptasa inversa, que les permite convertir su RNA de hélice única en DNA (SODROSKI, J. y cols., 1.985).

Un retrovirus capaz de replicar contiene por lo menos tres genes (gag, pol y env) dispuestos en dirección 5'-3' de transcripción del genoma vírico. El gen gag codifica las proteínas del núcleo vírico (core) que están localizadas en la parte central del virión y asociadas con el RNA genómico; el gen pol codifica la transcriptasa de reversión (una DNA-polimerasa RNA dependiente que transfiere la información genética del RNA al DNA) y el gen env codifica las proteínas de la cubierta que median la unión del virus con la célula diana. Los tres genes retrovíricos están incluídos en la estructura genética típica de los retrovirus denominada "repetición terminal larga" (LTR) que contiene la información necesaria para la regulación de la transcripción vírica. Las LTR son por consiguiente elementos cruciales en la modulación de la expresión vírica.

El ciclo reproductivo de un retrovirus se representa en la figura 1. El virión se une al receptor de la membrana celular de las células diana con la cubierta y el RNA vírico penetra en la célula. El

FIGURA 1

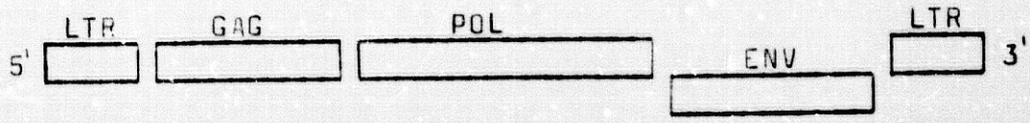


CICLO VITAL DE UN RETROVIRUS.
(Tomada de FRANCHINI, G. 1986)

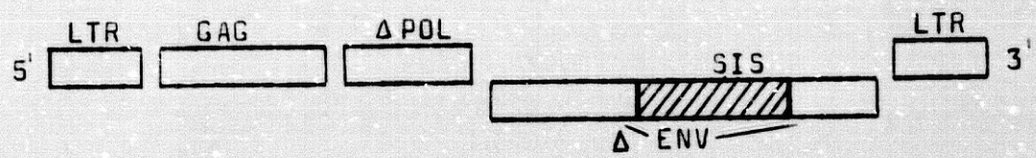
RNA vírico se convierte en una hélice única de DNA de extensión completa mediante la transcriptasa de reversión que queda envuelta en el virión, y en DNA de doble hélice por la polimerasa celular. Una vez formado, el DNA de doble hélice adopta forma circular y se integra en el DNA genómico de la célula diana o huésped (provirus). El provirus se transcribe en RNA por la maquinaria de transcripción celular, las transcripciones víricas se procesan apropiadamente y los RNA víricos específicos para los genes gag, pol y env se traducen en los ribosomas celulares. La generación de partículas víricas ocurre a nivel de la membrana celular. Las proteínas víricas se unen entre ellas e incorporan una transcripción de RNA vírico de longitud completa que se convertirá en el genoma de la futura generación de virus. Las partículas víricas son liberadas entonces a través de un proceso denominado "budding" que afecta a la membrana celular. Los viriones maduros están ahora listos para infectar a otras células (FRANCHINI,G. 1.986).

Los retrovirus HTLV-I y HTLV-II transforman las células T humanas, comportándose como un virus transformante agudo (POPOVIC,M. y cols., 1.984). Se cree que inducen la leucemia en adultos después de un largo período de latencia después de la infección, al igual que el virus de la leucemia crónica. Los retrovirus HTLV-I y HTLV-II poseen además de los genes gag, pol y env, los genes tat I y tat II (regulador trans-

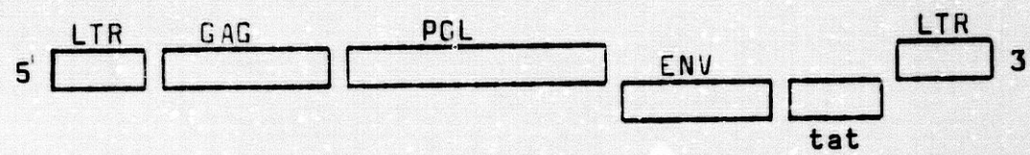
FIGURA 2



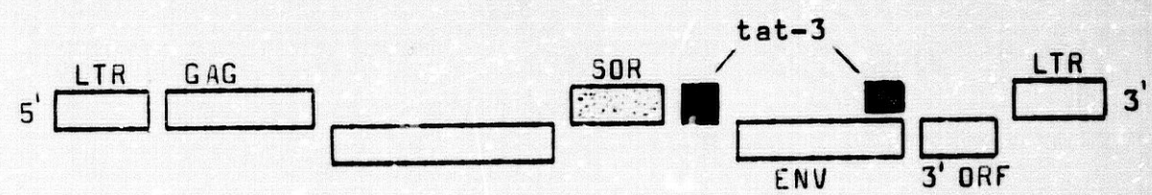
Mo Mu LV*



SSV **



HTLV-I/HTLV-II



HTLV-III

Representación esquemática del genoma de un retrovirus.
*Virus de Moloney de la leucemia del ratón (Mo Mu LV).
**Virus del sarcoma de los simios (SSV).
(Tomada de FRANCHINI,G. 1986).

cripcional y transoperativo) que son necesarios para la función replicativa vírica y posiblemente representen un papel principal en la transformación de las células T. La leucemia inducida por el retrovirus HTLV-I se origina por la proliferación de una única célula(clona) tal como se deduce por la detección de una copia única de provirus integrado monoclonal en las células leucémicas lo que representa el estado final de transformación por HTLV-I.

La infección por HTLV-III se correlaciona con una disminución de las células T-OKT4+ (helper/inductoras) tanto in vitro como in vivo (FISHER,A.G. y cols., 1.985). Mientras que la inmunodepresión observada en enfermos con SIDA pudiera ser una consecuencia directa del efecto citopático del virus ejercido en las células T, todavía no está claro el papel representado por el retrovirus HTLV-III en la patogénesis de varias de las manifestaciones clínicas del síndrome. La clonación molecular y la secuencia de nucleótidos del HTLV-III (HANH,B.H. y cols., 1.984 ; RATNER, l. y cols., 1.985) permitió la identificación de los genes de la cubierta, de la polimerasa y de la proteína central, así como la de 3 fragmentos de secuencias (open reading frames) 3' orf, sor y tat-III que codifican las proteínas de 27,23 y 14 kd respectivamente. La proteina tat-III parece aumentar la expresión del virus en las células infectadas (ARYA, S.K. y cols., 1.985) y puede que represente un importante papel en

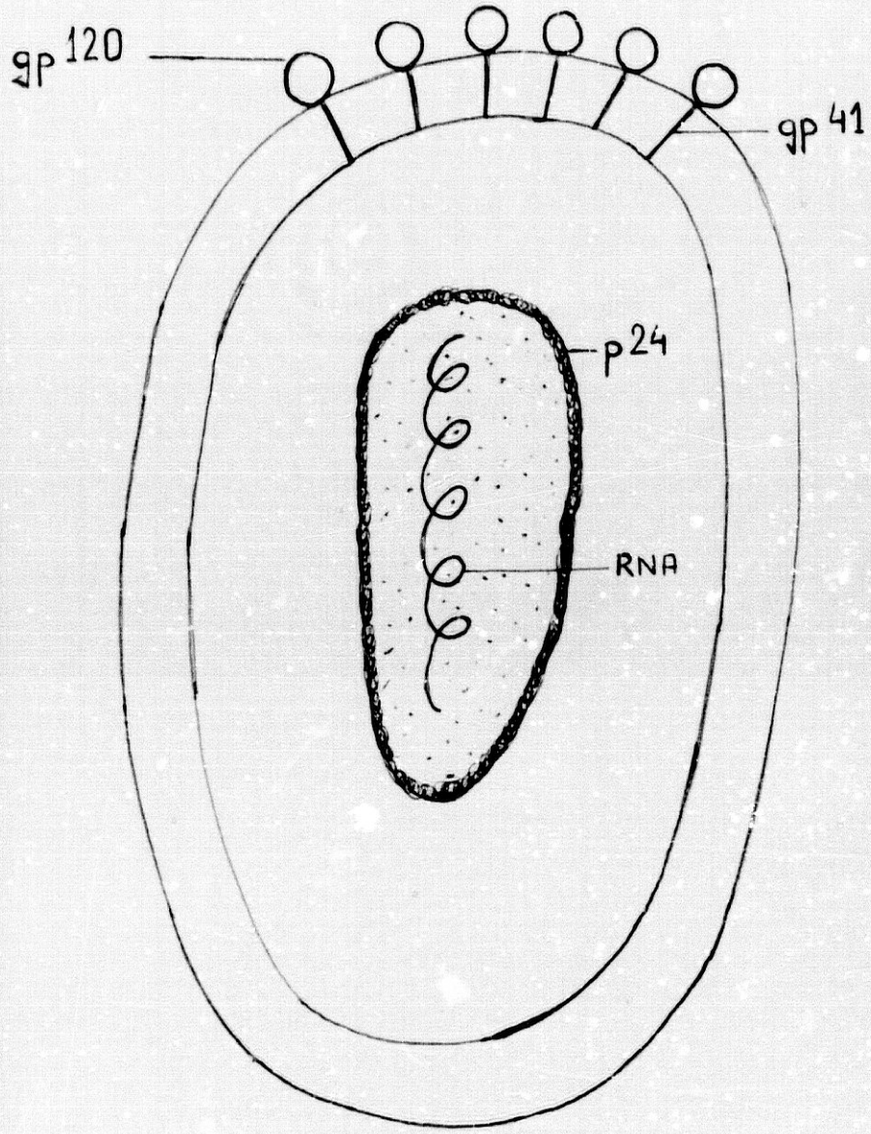


FIGURA 3

Representación esquemática del virus HTLV-III.
(Tomada de ESSEX,M. y cols.,1985)

el mecanismo de replicación vírica, y quizás en el efecto citopático del HTLV-III en las células T. Las funciones de las proteínas 3' orf y sor relativas al ciclo de la vida del virus o del metabolismo celular de las células infectadas está por descubrir; en el sujeto infectado por el HTLV-III se hallan anticuerpos frente a estos productos.

La estructura genómica, la morfología y las características biológicas revelan una homología del HTLV-III con los retrovirus animales de la subfamilia lentiviridae (virus de la anemia infecciosa equina, virus visna). Una característica de estos virus es que son capaces de sufrir un proceso de cambio genético que afecta al gen de cubierta del virus, característica que hace que escapen a la respuesta inmune del sujeto a través de un cambio en la antigenicidad de la proteína de cubierta.

Varios de los retrovirus HTLV-III muestran una diversidad genómica que es más pronunciada en el gen de la cubierta. Sin embargo no hay evidencia definitiva que sugiera que las diferencias genéticas observadas conduzcan a cambios en las proteínas de la cubierta de estos aislados del virus HTLV-III. Incluso se ha demostrado que alguna región del gen de la cubierta está bien conservada en los distintos aislados del virus lo cual da una relativa esperanza para la consecución de una vacuna eficaz.

ANTIGENOS DEL HTLV-III:

El virus HTLV-III parece poseer 6 genes que pueden codificar proteínas o poli proteínas (MUESING, M.A. y cols., 1.985):

El gen gag codifica una proteína de 55 kd que es procesada ulteriormente para dar origen a 3 proteínas, de aproximadamente 24 kd, 17 kd, y 15 kd, respectivamente.

El gen pol codifica la transcriptasa de reversión.

El gen sor (short open reading frame) codifica una proteína de 23 kd.

El gen tat, un fragmento de secuencia de unos 250 nucleótidos, codifica una proteína de 14 kd.

El gen env codifica una glicoproteína precursora de 160 kd que es procesada para producir dos glicoproteinas de 120 kd y 41 kd.

Por último, el gen 3' orf codifica una proteína de 27 kd. (Ver tabla 1).

Recientemente, el Comité Ejecutivo de Taxonomía de virus, ha considerado que en adelante la denominación

para el retrovirus responsable del Sindrome de Inmunodeficiencia Adquirida será: VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV), sustituyendo las anteriores denominaciones LAV y HTLV-III (Boletin Epidemiológico Semanal Nº1.732 del 20-VIII-1.986).

TABLA 1

ANTIGENOS MAYORES DEL HTLV-III QUE INDUCEN ANTICUERPOS.

Antígeno	Origen genómico	Inmunogenicidad	Procedimiento óptimo de detección de anticuerpos
p 55	gag	moderada	WBIC, IPIC, CIF.
p 24	gag	moderada	ELISA, WBCV, WBIC, ICV, IPIC, CIF.
pp 17	gag	débil	ELISA, WBCV, ICV.
gp 160	env	alta	IPIC, MIF.
gp 120	env	alta	IPIC, MIC.
gp 41	env	moderada/alta	ELISA, WBCV, CIF.
p 27	3'orf	baja	IPIC.

*WBIC: Western blot con homogeneizado de células infectadas. IPIC:inmunoprecipitación con homogeneizado de células infectadas. CIF: inmunofluorescencia citoplásmica. WBCV: Western blot con concentrado viral. ICV: inmunoprecipitación con concentrado viral. MIF: inmunofluorescencia de membrana.

(Tomada de ESSEX, M. y cols., 1985)

PROPIEDADES BIOLOGICAS DEL HTLV-III

Los linfocitos de pacientes afectos de SIDA, Complejo Relacionado con el SIDA (CRS) y de sujetos pertenecientes a algún grupo de riesgo para el síndrome suelen liberar el virus a las 2-3 semanas de introducirlo en el medio de cultivo. Durante éste tiempo se produce una evidente disminución de células viables, especialmente OKT4+ (helper/inductoras). Así también, cuando se infectan las células mononucleadas de sujetos normales sanos con HTLV-III, el virus sale de las células gigantes hacia los 7-14 días después de la infección, formándose células gigantes mononucleadas y perdiéndose las células viables. Este efecto citopático es más rapido y destructor sobre las células OKT4+ : las células infectadas liberan pronto el virus y mueren en pocos días.

In vivo, el virus sólo se recupera de linfocitos OKT4+ de pacientes infectados. In vitro, las únicas células que se pueden infectar son los OKT4+ y no los OKT8+ . Sin embargo se ha visto que el virus puede estar en otras células como son linfocitos B, monocitos, células microgliales del cerebro y células dendrítico-foliculares de los ganglios linfáticos (KLATZMANN,D. y cols., 1.986). Se piensa que éstas poblaciones celulares pueden ejercer una función de reservorio del virus en el organismo. Por otro lado,

TABLA 2

ESPECIFICIDAD DEL TROPISMO CELULAR DEL HTLV-III.

Tipos celulares	Presencia de antígeno o de partículas virales	Replicación viral en células normales	Células transformadas
Linfocitos T:			
-T helper/inductores.....	+	+	+
-T supresores/citotóxicos..	—	—	—
Linfocitos B:.....	+	—	+
Células dendrítico-foliculares(ganglios linfáticos)..	+	—	?
Células microgliales cerebrales	+	+	?
Monocitos/macrófagos	+	+	+

(Tomada de KLATZMANN, D. y cols., 1986)

cada tropismo da lugar a los signos de la infección:

-OKT4 + : inmunodeficiencia.
-células microgliales: lesiones cerebrales.
-linfocitos B : linfoma de células B.
-células dendrítico-foliculares del retículo linfonodular (ganglios linfáticos) : linfodenopatías.

Se desconocen los mecanismos responsables del efecto citopático del HTLV-III sobre las células infectadas, especialmente las OKT4 + . Se ha sugerido que las células infectadas por HTLV-III son capaces de liberar sustancias inmunoreguladoras que suprimen la función de las células T y de otras del sistema inmune (LAURENCE, J. y cols., 1.984). Los experimentos demuestran que los sobrenadantes de cultivos humanos infectados con HTLV-III contienen sustancias capaces de suprimir la activación y maduración de las células T y B, aunque se ignora la significación de estas observaciones (GALLO, R.C. y cols., 1.984).

Se ha visto que la molécula T4 es un receptor específico para el HTLV-III lo que se demostró porque los anticuerpos monoclonales frente a los diferentes epítopes de la molécula T4 previenen la infección de los linfocitos T helper/inductores por el HTLV-III.

También se ha observado una estrecha relación entre la glicoproteína de cubierta del virus y la mo-

lécula reconocida por el anticuerpo monoclonal OKT4. Los pasos en la infección por el HTLV-III son la adsorción y luego la penetración. La activación de los linfocitos infectados es necesaria para la replicación viral, de lo que resulta que los estímulos antigénicos dan lugar a la replicación del virus.

La fusión de las células infectadas, con la producción de células gigantes multinucleadas, se debe a la interacción entre proteínas virales, expresadas en la membrana de las células productoras de virus.

La molécula T4 es enmascarada por proteínas solubles virales libres producidas en grandes cantidades después de la lisis celular. Estas proteínas solubles son responsables de la disminución de la capacidad de proliferación de los linfocitos, secreción policlonal de inmunoglobulinas por los linfocitos B y disminución de la respuesta a los activadores policlonales de las células B como PWM y virus de Epstein-Barr. El último resultado de la replicación viral es la producción de numerosas partículas virales viables que infectan otras células. El rápido aumento de los linfocitos T supresores citotóxicos es sugestivo de una respuesta específica proliferativa frente a las células infectadas por el virus (KLATZMANN, D. y cols., 1.986).

En la actualidad se sabe que el virus es sensible a la mayoría de los germicidas químicos que se usan en los hospitales y se ha visto que el HTLV III muere a concentraciones más bajas que las que usan en la práctica diaria.

Los procesos que se usan para la producción de la vacuna de la hepatitis B a partir del plasma humano han demostrado que inactivan el HTLV-III.

El virus se inactiva mediante etanol al 20%, hipoclorito sódico al 0,2%, glutaldehído al 1%, éter, y otros agentes. El virus es sensible al calor, mediante la exposición a 56ºC durante 30 minutos se reduce la infectividad por lo menos dos logaritmos, pero es relativamente sensible a las radiaciones ionizantes y a los rayos ultravioletas (Bol. epidem. semanal. nº. 1.726).

II. EPIDEMIOLOGIA DEL SIDA

1. DEFINICIONES IMPORTANTES:

-SIDA:

Infección grave por microorganismos oportunistas o sarcoma de Kaposi en sujetos que no presentan causa conocida de inmunodeficiencia ni están sometidos a tratamiento inmunosupresor (C.D.C, 1.982). Se excluye el sarcoma de Kaposi que aparece en personas mayores de 60 años y por el contrario también puede incluirse en la definición el linfoma primario del sistema nervioso central y, en ciertas circunstancias, el linfoma de Burkitt (Tabla 3).

-SIDA PEDIATRICO:

La definición de SIDA es aplicada a los niños menores de 13 años excluyendo las infecciones congénitas y los estados de inmunodeficiencia congénitos (Tabla 4).

-COMPLEJO RELACIONADO CON EL SIDA (CRS):

Incluye una serie de alteraciones que suelen estar presentes en sujetos con linfodenopatía generalizada persistente, los cuales constituyen un gru-

po con una probabilidad más acentuada de desarrollar SIDA en el futuro (Tabla 5).

-ANOMALIAS INMUNOLOGICAS SUBCLINICAS:

Designa una serie de anomalías que se manifiestan con cierta frecuencia en sujetos asintomáticos pertenecientes a grupos de alto riesgo y que se han empleado como marcadores alternativos de SIDA en numerosos estudios epidemiológicos (BIGGAR, R.J. y cols., 1.984; KORNFELD, H. y cols; 1.982).

El marcador inmunológico que parece ser más sensible y específico para HTLV-III es la presencia de una cifra baja de linfocitos T helper/inductores, considerándose claramente bajas las cifras inferiores a 400 células/mm^3 (FAHEY, J.L. y cols., 1.983). Como consecuencia de ello, la relación de linfocitos T helper o inductores a supresores o citotóxicos es por lo general inferior a 1.

Otras dos anomalias inmunológicas adicionales que no se emplean como marcadores epidemiológicos pero que pueden ser útiles para definir la historia natural de la infección por el HTLV-III son la presencia de interferón alfa-ácido-lábil circulante y la elevación de la cifra de Beta-2-microglobulina sérica (ZOLLA-PAZNER, S. y cols., 1.984).

SIDA

Definición de los Centers for Disease Control (1982).

Aparición de una enfermedad que traduce un defecto de la inmunidad celular en una persona en la que no existe causa conocida que justifique dicha inmunodeficiencia. Entre las enfermedades se incluyen:

- -Sarcoma de Kaposi (en menores de 60 años).
- -Linfoma primario del sistema nervioso central.
- -Neumonía por Pnumocystis carinii.
- -Enterocolitis por Cryptosporidium, de más de 4 semanas de duración.
- -Esofagitis por Candida albicans, citomegalovirus, o virus del Herpes simple.
- -Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
- -Herpes simple mucocutáneo muy extendido, de más de 5 semanas de duración.
- -Neumonía, meningitis o encefalitis por uno o más de los siguientes agentes:

  Aspergillus, C. albicans, Cryptococcus neoformans, citomegalovirus, Nocardia, Strongyloides, Toxoplasma gondii, Zygomycosis o micobacterias atípicas (excluyendo la tuberculosis y la lepra).

TABLA 3

CRITERIOS DIAGNOSTICOS REVISADOS

(C.D.C. Atlanta, 1.985).

Además de los indicados en 1.982:

A) En ausencia de infecciones oportunistas requeridas previamente:

Todos los pacientes HTLV III/LAV seropositivos con:

1. Histoplasmosis diseminada (no limitada a ganglios y pulmón) diagnosticada por cultivo, serología o detección de antígeno.

2. Isosporiasis con diarrea crónica diagnosticada por histología o cultivo de heces.

3. Candidiasis pulmonar o bronquial diagnosticada por histología o características placas blanquecinas bronquiales (no sólo por cultivo).

4. Linfoma de Hodgkin de alto grado (difuso, indiferenciado) y de células B o de fenotipo inmunológico desconocido diagnosticado por biopsia.

B) Neumonitis intersticial linfoide en niños menores de 13 años diagnosticada histológicamente, con HTLV III/LAV positivo.

C) Neoplasia linforreticular maligna diagnosticada 3 meses después de infección oportunista exigida como marcador.

D) Serán excluidos los casos con:

-HTLV III/LAV seronegativo.
-Ausencia de descenso de linfocitos T helper/inductores.
-Ausencia de inversión del cociente T4/T8.

*Si no se han podido realizar estas pruebas, los pacientes que cumplen los otros criterios serán incluidos.

TABLA 4

SIDA PEDIATRICO

Definición provisional de los Centers for Disease Control (1982)

Idéntica que la del SIDA en adultos con las siguientes modificaciones:

-Se deben excluir las siguientes infecciones congénitas:

1. Toxoplasma gondii en pacientes de menos de un mes de edad.

2. Virus del Herpes simple en pacientes de menos de un mes de edad.

3. Citomegalovirus en pacientes de menos de 6 meses de edad.

-Se deben excluir los siguientes trastornos específicos de los niños:

1. Enfermedades de inmunodeficiencia primaria: inmunodeficiencia grave combinada, síndrome de Di George, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia-telangiectasia, enfermedad injerto contra huésped, anomalías de la función de los neutrófilos, neutropenia, agammaglo-

bulinemia con aumento de IgM.

2. Inmunodeficiencia secundaria asociada con tratamiento inmunosupresor, enfermedad maligna linforreticular o ayuno.

TABLA 5

COMPLEJO RELACIONADO CON EL SIDA

Definición de los Centers For Disease Control (1.982).

A. Cualquiera de los datos clínicos siguientes (mínimo: dos) que deben estar presentes desde hace tres meses o más:

-Linfadenopatía: ganglios de más de 1 cm. de diámetro en dos o más localizaciones extrainguinales.

-Pérdida de peso mayor del 10% del peso corporal o mayor de 7-8 Kg.

-Fiebre superior a 38ºC contínua o intermitente.

-Diarrea.

-Fatiga.

-Sudores nocturnos.

B. Cualquiera de los datos de laboratorio siguientes (mínimo: dos):

-Células T helper menor de $400/mm^3$.

-Cociente T4/T8 menor de 1.

-Leucopenia (menos de 4.800/mm^3.

-Trombopenia (menos de 150.000/mm^3).

-Anemia (hematocrito 31-39%).

-Anergia en pruebas cutáneas.

-Depresión de la blastogénesis (fitohemaglutinina).

2. GRUPOS DE RIESGO DE SIDA:

2.1.-Varones homosexuales activos:

Hasta ahora constituyen el grupo de riesgo más numeroso, por lo menos en Estados Unidos.

2.2.-Drogadictos por vía parenteral:

El número de casos de SIDA en este grupo de riesgo ha aumentado con gran rapidez por lo que se estima que la incidencia del sindrome en drogadictos es probablemente tan elevada como en los homosexuales activos.

2.3.-Haitianos.

2.4.-Hemofílicos.

2.5.-Receptores de transfusiones sanguíneas.

2.6.-Contactos heterosexuales de personas con SIDA o con riesgo de éste.

2.7.-Hijos de padres con SIDA o con riesgo de él.

Factores de riesgo del SIDA (Tabla 6):

2.1. Varones homosexuales:

De los 5 primeros casos de neumonía por

P. carinii en jóvenes homosexuales de Los Angeles, 2 de ellos mantenían relaciones promíscuas y todos ellos habían empleado drogas estimulantes inhaladas (GOTTLIEB, M.S. y cols., 1.981). En los estudios realizados en varones homosexuales de Los Angeles, San Francisco y Nueva York se comprobó que el factor de riesgo más importante para el SIDA era el número de parejas homosexuales (DARROW, W.W. y cols., 1.983).

También se comprobó que las alteraciones en las células T guardaban relación con el número de parejas homosexuales (KORNFELD, H. y cols., 1.982).

Los estudios de seropositividad para HTLV III también demuestran que ésta se asocia estrechamente con el número de parejas homosexuales (GOEDERT, J.J. y cols., 1.984).

Actualmente no se cree que el consumo de drogas inhaladas, como los nitritos de amilo y butilo, aumenten el riesgo de SIDA, sino que constituyen un indicador de una frecuente realización del coito anal, práctica que se relaciona claramente con el sarcoma de Kaposi y con la seropositividad para el HTLV-III (MELBYE, M. y cols., 1.984).

En resumen, puede afirmarse que los dos factores de riesgo más importantes para la infección por HTLV III en varones homosexuales son el coito anal pasivo y las numerosas parejas homosexuales.

2.2. Drogadictos por vía parenteral:

En Nueva York el SIDA apareció en los drogadictos parenterales casi simultáneamente con los varones homosexuales. Un elevado porcentaje de pacientes con SIDA son homosexuales que también son drogadictos por vía parenteral.

El factor de riesgo principal en éste grupo es la transmisión del HTLV-III por el uso repetido o común de agujas contaminadas de sangre (ROBERTSON, J.R., y cols., DES JARLAIS, D.C. y cols., 1.985).

El segundo grupo de riesgo para el SIDA, en número de casos, es el de los drogadictos intravenosos. De los 9.500 casos de SIDA registrados en los CDC hacia Abril de 1.985, 1.573 (16%) tenían el uso de drogas intravenosas como factor de riesgo primario. En 850 casos (9%) coexistían la homosexualidad y la drogadicción parenteral como factores de riesgo. Estos porcentajes se han mantenido relativamente estables a lo largo de la epidemia (SELIK, R.M. y cols., 1.984). Los casos de SIDA en drogadictos intravenosos han estado concentrados en el área metropolitana de Nueva York. De los casos en los que el uso de drogas es el factor de riesgo primario, 1.268 (81%) se localizan en 3 estados; Nueva York, Nueva Jersey y Connecticut. Sin embargo, en ciudades como San Francisco

o chicago, con un gran número de drogadictos, la seropositividad para el HTLV-III/LAV sólo aparece en un 10% de estos sujetos.

La transmisión del SIDA dentro de este grupo parece ocurrir a través de la transferencia de pequeñas cantidades de sangre durante el intercambio de agujas.

Por otra parte los drogadictos aparecen como un puente hacia otros grupos de riesgo para desarrollar SIDA: hijos de padres o madres drogadictos, que se infectan en el útero materno (THOMAS, P.A. y cols., 1.985) y parejas heterosexuales, grupo compuesto por personas cuyo único factor de riesgo conocido para el SIDA es la actividad heterosexual con miembros de un grupo de riesgo identificado previamente.

Por lo tanto, el control de la epidemia de SIDA debe incluir el control dentro del grupo de drogadictos intravenosos, tanto por su gran número como por ser una vía de contagio para los no drogadictos.

2.3. Haitianos:

No existen pruebas de que los sujetos originarios de Haití posean un mayor riesgo de SIDA ni de que el SIDA se originara en Haití o de que los turistas homosexuales norteamericanos importaran el HTLV-III de este país. Sin embargo es cierto que la incidencia de SIDA en los Haitianos que emigraron a Estados Unidos después de 1.978 es muy superior a la que se encuentra entre los que emigraron con anterioridad a esta fecha (HARDY, A.M., y cols., 1.985).

En Haití el SIDA es una enfermedad nueva que apareció al comienzo de nuestra década y que se concentra en las principales ciudades de la isla: Puerto Principe y Carrefour (PAPE, J. y cols., 1.983; MALEBRANCHE, R. y cols., 1.983).

Los estudios realizados sugieren que la transmisión se produce por contacto sexual, tanto de tipo homo como heterosexual (una cuarta parte de los pacientes con SIDA son mujeres) y por vía parenteral, aunque en un escaso porcentaje se debe al consumo de drogas (gran pobreza del país) y entonces se explica por el uso de agujas contaminadas que hacen los curanderos para inyectar diversos fármacos y sustancias desconocidas (PAPE, J. y cols., 1.985).

2.4. Hemofílicos:

La aparición de SIDA en hemofílicos que no presentaban ningún otro factor de riesgo dió consistencia a la hipótesis que propugnaba que el agente del SIDA era similar en su transmisión al virus de la hepatitis B (VHB).

El tratamiento básico de la hemofilia grave consiste en concentrados de factores de la coagulación derivados del plasma, que se consiguen con plasmas reunidos de miles de donantes. A pesar de los controles, estos concentrados tienen niveles bajos de VHB por lo que casi todos los receptores tienen seropositividad para la hepatitis B.

Es obvio pensar, pues, que los concentrados de factores de coagulación son un vector de transmisión del virus del SIDA (GOEDERT, J.J. y cols., 1.985; MELBYE, M., 1.984).

La incidencia del SIDA es mucho mayor en los pacientes con hemofilia A que la registrada en enfermos con hemofilia B. Ello es debido a que la hemofilia A es más grave y requiere un tratamiento mucho más intenso con factor VIII, que además parece tener mayor capacidad de transmisión para el HTLV III que el factor IX utilizado en el tratamiento de la he-

mofilia B (OLLERO, M. y cols., 1.985).

La evidencia de que es el factor VIII (sus concentrados) el vector del HTLV III se tuvo cuando se comprobó la ausencia de anticuerpos anti HTLV III en hemofílicos tratados con concentrados de factor VIII previamente calentados (ROUZIOUX, C y cols., 1.985).

2.5. Receptores de transfusiones y otros productos sanguíneos:

Los primeros casos de SIDA en receptores de sangre sin otro factor de riesgo fueron estudiados detenidamente (CURRAN, W.J. y cols., 1.984) y se comprobó que los donantes correspondientes eran seropositivos para el HTLV-III (JAFFE, H.W., y cols., 1.984).

La incidencia de SIDA guarda relación con el número de transfusiones recibidas (HARDY, A.M. y cols., 1.985).

Hacia 1.983 se recomendó que todas las personas que pertenecieran a algún grupo de riesgo se abstuvieran de donar sangre y a partir de 1.985 en la mayoría de los bancos de sangre se analizan los anticuerpos antí HTLV III de los donantes para excluir las unidades que son seropositivas según la prueba de ELISA anti HTLV III (WEISS, S.H. y cols., 1.985).

Con ello se logrará reducir la incidencia de SIDA asociado a transfusiones aunque cabe recordar que se ha aislado el virus de sujetos seronegativos (GROOPMAN, J.E. y cols., 1.984).

2.6. Contactos heterosexuales de personas con SIDA o con riesgo de él.

Se ha observado SIDA en las parejas heterosexuales femeninas de varones bisexuales, drogadictos parenterales y hemofílicos (HARRIS, C. y cols., 1.983; KREISS, J.K. y cols., L.985).

Ello parece indicar que el HTLV III se transmite también por vía vaginal, pasando tanto de varón a hembra como viceversa; en este sentido, un estudio del Dr. Redfield, del Centro Médico Militar Walter Reed, demuestra que 15 de 41 sujetos con HTLV-III adquirieron dicha infección de parejas del sexo opuesto. De los 15 pacientes que contrajeron el HTLV-III el 33% (5) eran mujeres y el 66% (10) eran hombres (REDFIELD, R.R. y cols., 1.985).

Otros estudios demuestran la transmisión heterosexual en mujeres que fueron inseminadas artificialmente con semen de portadores asintomáticos del HTLV III (STEWART, G.J. y cols., 1.985).

También se ha encontrado HTLV III en secreciones cervicales (WOFSY, C. y cols., 1.986; VOGT, M.W. y cols., 1.986).

Estos y otros hallazgos indican claramente la viabilidad de este modo de transmisión por lo que

las personas sexualmente activas deberán tomar precauciones acerca de los riesgos potenciales que representan los contactos heterosexuales con otras personas que no sean la pareja habitual.

2.7. Hijos con padres con SIDA o con riesgo de él:

El denominado SIDA pediátrico comienza a manifestarse entre los 6 y 20 meses de edad en la descendencia de padres con alto riesgo del síndrome (THOMAS, P.A. y cols., 1.984; OLESKE, J., 1.986). El momento de la infección aún no está claramente determinado.

MEDIOS DE PROPAGACION:

Se ha aislado el HTLV III en sangre, semen, saliva (CURRAN, J.W. y cols., 1.985), lágrimas (FUJIKAWA, L.S. y cols., 1.985), leche de mujer (THIRY, L. y cols., 1.985) y secreciones vaginales y cervicales. La transmisión de la infección sólo ha podido relacionarse de modo definitivo con el semen, la sangre y los productos hematológicos, aunque también hay clara evidencia de transmisión a varones de mujeres infectadas.

En la saliva el virus se encuentra de forma excepcional y a títulos bajos lo que explica la ausencia de transmisión por esta vía (SAVITEER, S.M. y cols., 1.985).

Hay pruebas significativas de que la infección

por HTLV III no se propaga a través de los contactos domésticos no sexuales de los pacientes con SIDA (FRIEDLAND, G.H. y cols., 1.986)ni por contactos sociales circunstanciales, lo cual se demuestra en que las pruebas del anticuerpo HTLV III han sido siempre negativas en los contactos familiares habituales que comparten el baño y la cocina con personas de alto riesgo, personal de hospital que cuida de los pacientes con SIDA y personal de laboratorio que maneja muestras biológicas de alto riesgo.

Grupos y factores de riesgo	Dirección de la asociación con la seropositividad HTLV III
Varones homosexuales:	
- Número de parejas	↑
- Coito anal pasivo	↑
- Coito anal activo	↓
- Contacto homosexual en zona de alto riesgo	↑
Drogadictos parenterales:	
- Proximidad a región endémica	↑
- Inyecciones frecuentes	↑
Hemofílicos:	
- Dosis de factor concentrado	↑
- Productos plasmáticos no comerciales	↓
Receptores de sangre:	
- Número de transfusiones	↑
- Donante de grupo de riesgo	↑

Otros grupos:

- Contacto heterosexual con miembro de grupo de riesgo ↑
- Número de contactos heterosexuales ↑
- Frecuente contacto con prostitutas ↑
- Transfusiones de sangre ↑
- Exposición a pinchazos con agujas usadas ↑
- Padres de grupos de alto riesgo ↑

Haitianos, Africanos, sujetos heterosexuales y miembros de familia.

TABLA 6

Factores de riesgo para la seropositividad al HTLV-III.
En: De vita, V.T. y cols. Salvat. 1.986.

Grupo	Casos.84	Casos.85	% Incremento
Homosexuales drogadictos i.v.	418	599	43,3
Homosexuales.	2.939	5.669	92,9
Drogadictos i.v.	785	1.429	82,0
Hemofílicos.	38	69	81,6
Contactos hetero-sexuales.	53	100	88,7
Receptores de Transfusiones.	56	171	205,4
Riesgo no identifi-cado.	131	348	165,6
Nacidos fuera de U.S.A.	114	144	26,3
Total	4.534	8.529	88,1

TABLA 7

Casos de SIDA reportados por grupos de riesgo y porcentaje de incremento anual en U.S.A. MMWR, Jan 17, 1.986. vol. 35/ No. 2, pg. 19.

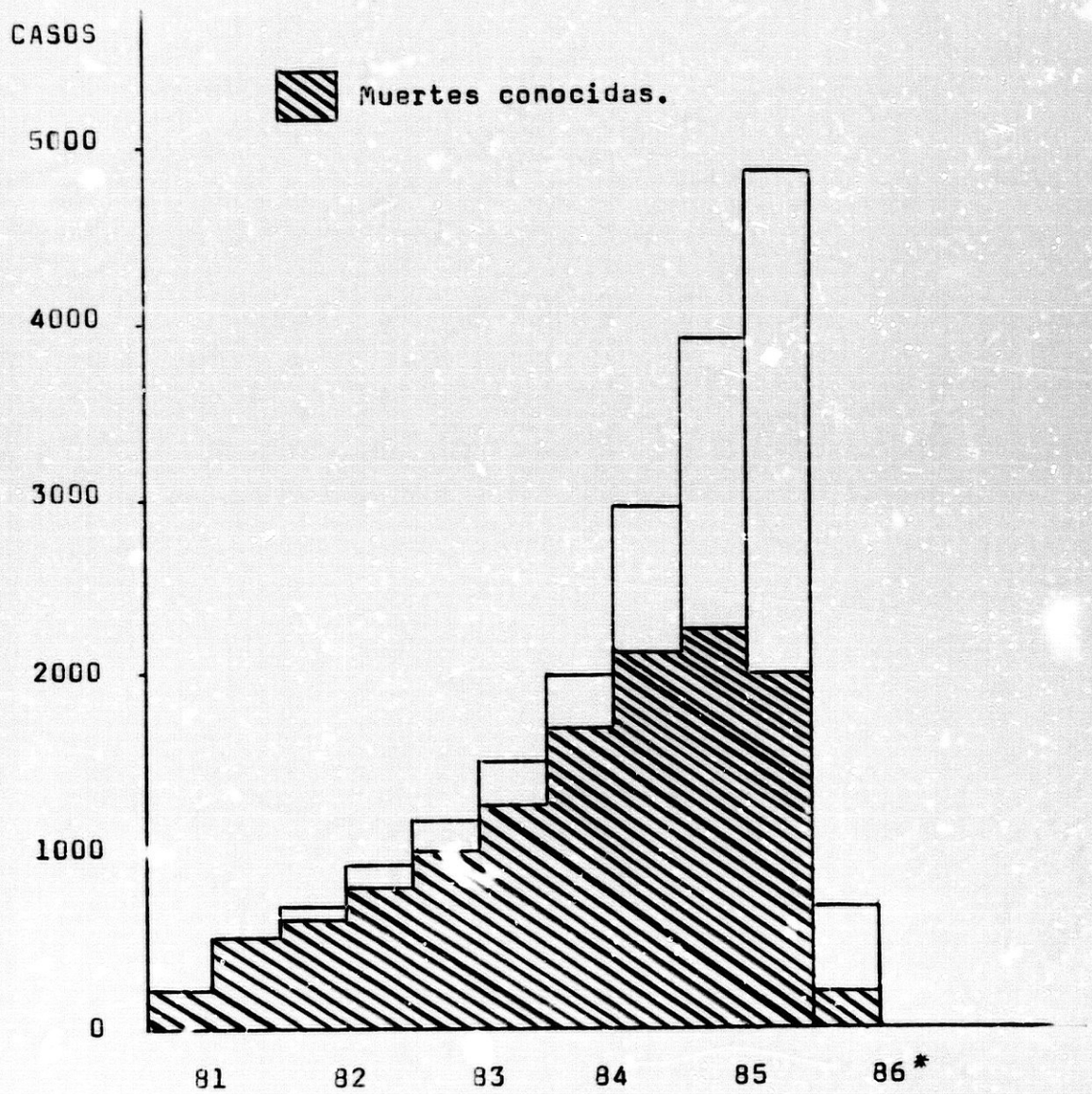


TABLA 8

Casos de SIDA y muertes conocidas en USA según los Centers for Disease Control.January 13, 1986.

3. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR HTLV-III.

Una vez que el HTLV-III se introduce en una persona susceptible, ésta se convierte en un portador sano, como sugieren los estudios de cultivos virales en miembros de grupos de riesgo donde ha sido reportado el aislamiento de virus en ausencia de anticuerpos (SALAHUDDIN, S.Z. y cols., 1.984). En estos sujetos, unos pocos linfocitos T helper/inductores son infectados (en éste sentido se piensa que la infección del virus ocurre más eficientemente cuando se transmiten linfocitos infectados, cada uno de ellos capaz de liberar miles de partículas virales). La replicación viral ocurre sólo después de su activación, un evento improbable de suceder hasta que los T-linfocitos necesiten ser específicamente estimulados por su receptor antigénico.

Se piensa que éste estado de portador sano tiene una duración prolongada (FRANCIS, D.P. y cols., 1.985). Durante este período el virus se va replicando en sucesivas estimulaciones antigénicas de células infectadas, aumentando el número de células infectadas y la probabilidad de que otras células además de los linfocitos T helper/inductores puedan ser infectadas.

La producción de anticuerpos, como respuesta

del huésped a la infección, se ha estudiado en chimpancés. A las 4-5 semanas de la inoculación, todos los animales producen anticuerpos tipo IgG específicos contra el virus y en la mitad de los animales la respuesta de IgG va precedida por una respuesta de IgM. En humanos, estudios recientes indican que el período de incubación entre la infección y la seroconversión (el período de tiempo al final del cual un paciente produce anticuerpos frente al virus) puede ser tan corto como 4 semanas y tan largo como 47 días después de la exposición al HTLV-III. En las exposiciones parenterales parece que el intervalo más probable para el desarrollo de anticuerpos oscila entre 4-7 semanas. En el caso de la transmisión sexual, el período de latencia no se conoce mejor (MELBYE, M. 1.986).

Los síntomas asociados a la infección pueden aparecer tras un corto período de tiempo tras la infección o mucho más tarde (incluso años).

Así, puede producirse, a veces, coincidiendo con la seroconversión, una enfermedad transitoria de tipo gripal o similar a una mononucleosis infecciosa (COOPER, D.A. y cols., 1.985). Esta enfermedad puede manifestarse por fiebre, sudoración, mialgias, malestar general, molestias de garganta, cefalea, artralgias, náuseas y exantema.

No todos los portadores sanos con anticuerpos positivos, por razones todavía no determinadas, desarrollan manifestaciones subclínicas y clínicas de inmunodeficiencia. Algunos de los sujetos que son seropositivos durante largo tiempo pueden mostrar características clínicas y constitucionales tales comolinfadenopatía persistente, diarrea, sudoración nocturna, úlceras bucales y herpes zóster (GOEDERT, J.J. y cols., 1.984).

En un porcentaje de estos sujetos, las infecciones múltiples o aloestimulaciones aumentarán finalmente la replicación viral. Cuando los macrófagos están involucrados, la replicación viral probablemente se incrementa porque estas células son más a menudo estimuladas (no específicamente) que los linfocitos. El progresivo aumento de la replicación viral incrementará el deterioro del sistema inmune. Los linfocitos B serán afectados a través de su regulación por los linfocitos T helper/inductores pero también por el efecto de las proteínas virales solubles. Se establece un equilibrio, con el virus replicándose y atacando nuevas células, por un lado, una reacción inmunitaria en otro e inmunodeficiencia en progreso. Este frágil status quo puede subsistir hasta que la replicación aumenta rápidamente, como sucede por ejemplo cuando células transformadas por el virus de Epstein-Barr comienzan a infectarse, constituyendo un

un reservorio para la permanente y activa replicación, que contribuirá a la activa destrucción final del sistema inmune y a la contínua diseminación del virus a otros órganos. Las infecciones oportunistas y los tumores pueden entonces desarrollarse estableciéndose el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida con todos sus atributos (KLATZ-MANN, D. y cols., 1.986).

El porcentaje de sujetos seropositivos que desarrollan SIDA es desconocido, aunque hay algunos datos:

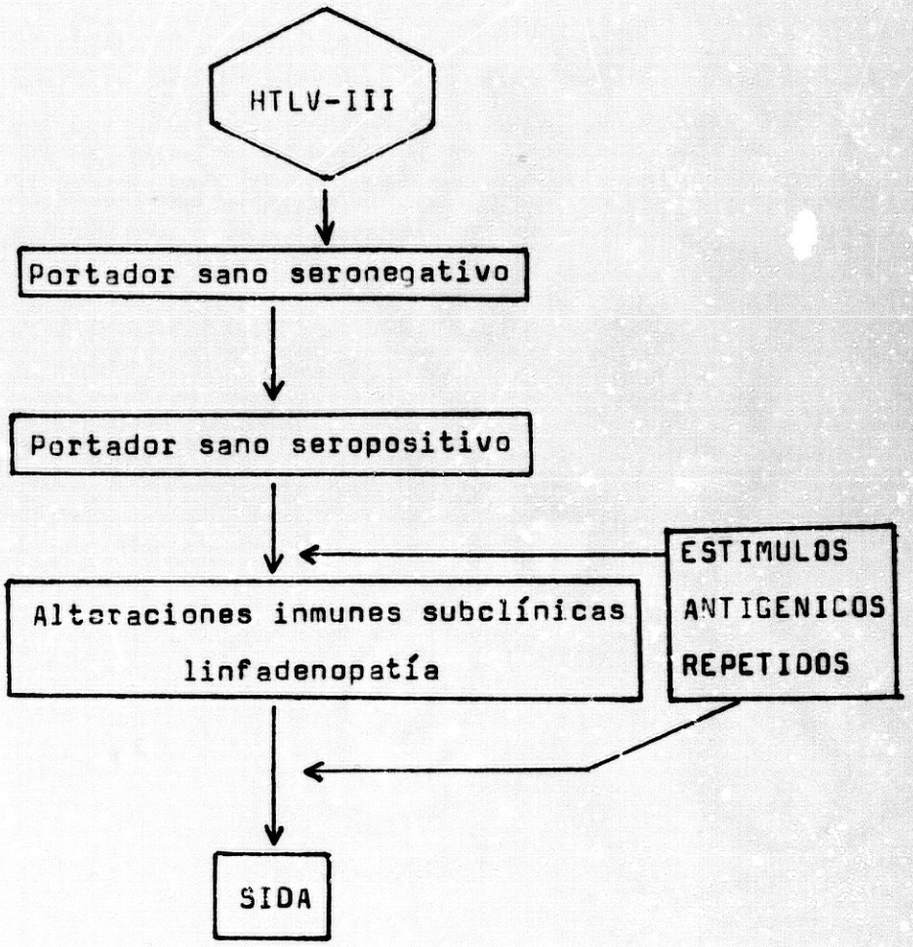
- Las comunicaciones iniciales sobre varones homosexuales en Dinamarca y Nueva York indicaron que de un 9 a un 14% de ellos habían desarrollado SIDA en un período de 2 años de seguimiento (MELBYE, M. y cols., GOEDERT, J.J. y cols., 1.984).

- En otro grupo de varones homosexuales de San Francisco, el 6,4% de individuos seropositivos durante más de 5 años desarrollaron SIDA, y otro 25,8% desarrollaron linfadenopatía. (JAFFE, H.W. y cols., 1.984).

- De 281 individuos seropositivos la incidencia de SIDA a los 3 años era de 34% entre los homosexuales y del 15% en un grupo de hemofílicos y drogadictos parenterales (GOEDERT, J.J. y cols., pendiente de publicación).

La estimación del intervalo transcurrido entre la exposición al virus y el desarrollo de la enfermedad indica que el período de incubación es largo. En 18 pacientes con SIDA que habían sido probablemente expuestos a partir de una transfusión de sangre, la media del tiempo transcurrido entre ésta y el diagnóstico fue de 28 meses (CURRAN, J.M. y cols., 1.984). En 24 homosexuales de San Francisco fue de 43 meses (JAFFE, H.W. y cols., 1.985). En la primera infancia el SIDA parece tener un período de incubación mucho menor (VILMER, E. y cols., 1.984).

FIGURA 5



Historia natural de la infección por HTLV-III (Modificado de Blattner W.A. y cols., 1.985).

4. EL SIDA EN ESPAÑA:

En 1.983 el Ministerio de Sanidad y Consumo creó la Comisión Nacional de Trabajo sobre el SIDA, una de cuyas funciones era unificar criterios para diagnosticar los posibles casos del síndrome. Se adoptó la definición de los Centers For Disease Control y se elaboró un cuestionario con datos clínicos, analíticos y epidemiológicos. La comisión examina los protocolos que recibe y sigue los casos diagnosticados definitivamente como SIDA.

El primer caso de SIDA detectado en España fue el de un varón homosexual en Barcelona (VILASECA, J. y cols., 1.982). A partir de 1.983 el número de casos se ha ido casi duplicando hasta llegar a los 83 casos diagnosticados hasta Diciembre de 1.985. De ellos un 60% fueron diagnosticados en ese año. La tasa total es de 4,6 casos por millón de habitantes, que coloca a España en una posición intermedia en cuanto al número total de casos en relación a los demás países europeos (10 por millón en Bélgica a 0,9 por millón en Italia y Grecia) y equiparable a la situación de Alemania (4,6 por millón).

De los 83 enfermos, 78 son varones (94%) y 5 son mujeres (6%). La mayoria tienen entre 20 y 40 años. Todos los enfermos, salvo uno, de edades en-

tre 1 y 18 años son hemofílicos. Hay 2 enfermos menores de 1 año que son hijos de madres que consumían drogas por vía intravenosa.

Por grupos de riesgo los homosexuales son 25 (30%), teniendo en cuenta que 3 de ellos son también drogadictos intravenosos; 36 drogadictos intravenosos (43,4%), 17 son hemofílicos (20,5%), 2 hijos de madres drogadictas (2,24%) y sin factor de riesgo conocido, 3 (3,6%).

Llama la atención que el grupo de riesgo mayoritario sea el de drogadictos intravenosos, cuando en los Estados Unidos es el de varones homosexuales y la elevada proporción que representan los hemofílicos entre los casos de SIDA detectados.

Por provincias las que cuentan con más casos son Madrid (25) y Barcelona (20). Les siguen Guipúzcoa, Sevilla y Valencia con 5 casos y con uno se encuentran Cádiz, Cantabria, Córdoba, Huelva, La Coruña, Málaga, Mallorca, Murcia, Navarra, Pontevedra, Toledo, Valladolid y Vizcaya.

De los 83 enfermos han fallecido 60 (letalidad del 72,3%). La mortalidad aumenta con los años de evolución siendo del 100% para los diagnosticados en 1.981 y 1.982, 87,5% en 1.983, 80% en 1.984 y 66% en 1.985.

En cuanto a la patología presentada las infecciones oportunistas son la forma más frecuente (78,3%), sobre todo la neumonía por Pueumocystis carinii. El Sarcoma de Kaposi se presenta en el 21,8% de los casos, sobre todo en homosexuales, no habiéndose encontrado en ningún hemofílico.

Podemos afirmar que el número de casos de SIDA en España es reducido si lo comparamos con Estados Unidos: el SIDA ha llegado a España con algunos años de retraso y su expansión es más lenta.

En España el grupo de riesgo más importante es el de los drogadictos intravenosos (43,4%), mucho más elevado que en Estados Unidos (17%) y que en Europa (3,9%). El grupo homosexual en España sólo representa un 30,1% de los casos en contraste con Estados Unidos (78%) y Europa (73,5%). El grupo de hemofílicos (20,5%) es más numeroso que el descrito tanto en Estados Unidos (1%) como en Europa (3,2%).

En los pacientes españoles hay una mayor proporción de infecciones oportunistas y menor de Sarcoma de Kaposi, lo cual se puede explicar por la menor proporción de homosexuales entre los casos de SIDA en nuestro país.

Por otra parte, la letalidad del SIDA en España es de un 72,3%, mayor que la registrada en Estados

Unidos (47%) o Europa (49%), lo cual puede deberse al retraso en la detección de casos y en la inclusión para su estudio epidemiológico.

Hemos visto, pues, que el SIDA en España tiene unas características diferenciales con otros países y su explicación puede ser la siguiente: los primeros casos de SIDA en España, tal como ocurrió en otros países europeos, aparecieron en homosexuales. Al detectarse estos primeros casos años más tarde que en otros países, este grupo social estaba ya sensibilizado ante el problema y puso en marcha medidas preventivas, lo cual explica la expansión menor del SIDA en los homosexuales españoles.

Posteriormente el virus fue transmitido a los drogadictos, que debido a sus características sociales no adoptaron las medidas preventivas necesarias y la infección se extendió con rapidez dando lugar a una rápida elevación de las tasas de prevalencia de anticuerpos anti HTLV-III en los drogadictos españoles (RODRIGO, J.M. y cols., 1.985; ZULAICA, D., y cols., 1.985).

El que la proporción de hemofílicos sea tan elevada puede explicarse porque la mayor parte de los productos plasmáticos consumidos en España son de origen norteamericano (OLLE GOIG, J.E., 1.986).

En Marzo de 1.986, la situación del SIDA en España era la siguiente (Boletin Epidemiológico Semanal. Nº 1.724 de 30-V-1.986):

La Comisión Nacional de Trabajo sobre el SIDA ha confirmado 145 casos según la definición de los C.D.C. 131 son varones y 14 mujeres.

Se ha comunicado el fallecimiento de 93 de los casos, lo que supone una letalidad del 64%. La probabilidad de sobrevivir tras el diagnóstico de SIDA es del 57% a los 3 meses, del 34% al año y del 8% a los 3 años.

Las infecciones oportunistas constituyen la patología más frecuente asociada al SIDA, apareciendo en 116 de los casos (80%). Ver tabla 9.

SIDA EN ESPAÑA
(18-III-86)

I. DISTRIBUCION POR FECHA DE DIAGNOSTICO.

Año	Casos	Defunciones
81	1	1
82	2	2
83	10	9
84	24	22
85	93	52
86 *	15	7

* Datos incompletos (hasta el 18-III-86).

II. DISTRIBUCION POR GRUPOS DE RIESGO Y DIAGNOSTICO PRINCIPAL.

Grupos de riesgo	SK	SK-IO	IO	OTROS TUMORES	CASOS	DEFUNCIONES
Homosexuales	10	9	11	-	30	19
Homosexuales+DIV	-	2	6	-	8	5
Drogadictos IV	3	2	66	1	72	42
Hemofílicos	-	-	25	2	27	22
Hijos de padres en riesgo	-	-	2	-	2	1
Transfusiones	-	-	3	-	3	3
Otros/desconocido	-	-	5	-	5	1
TOTAL	13	13	116	3	145	93

III. DISTRIBUCION POR EDAD.

Edad	Casos	Defunciones
1-9	6	4
10-19	11	8
20-29	76	45
30-39	38	23
40-49	9	9
50-59	4	3
>59	1	1

TABLA 9
(Tomada del Boletín Epidemiológico Semanal nº1724)

III. CLINICA DEL SIDA

Las manifestaciones clínicas del SIDA pueden clasificarse en 4 categorías:

1. Las que se deben a la acción directa del HTLV III.
2. Las originadas por las infecciones oportunistas que acontecen debido a la inmunosupresión provocada por el virus.
3. Las debidas al sarcoma de Kaposi.
4. Las causadas por las neoplasias malignas que parecen ser originadas por una sumación del efecto inmunosupresor del virus y de los efectos cancerígenos de otros virus.

1. ACCION DIRECTA DEL VIRUS.

Produce, en el ataque agudo, una clínica similar a la mononucleosis infecciosa con fiebre, sudores, dolor de garganta, linfadenopatía generalizada, dolores musculares y articulares, un eritema macular en el tronco y trombocitopenia. Muchos de los sujetos estudiados presentaban una inversión del cociente T4/T8 inmediatamente después del síndrome febril y mostraban seroconversión a las 3-8 semanas de éste (COOPER, D.A. y cols., 1.985; VALLE, S.L. y cols., 1.985). Esta

presentación clínica es considerada prodrómica para el SIDA y se incluye en la definición del Complejo Asociado al SIDA.

A finales de 1.985 se describían alteraciones neurológicas en pacientes con SIDA, que se manifestaban como demencia o encefalopatía (SHAW, G.M. y cols., 1.985), lo cual sugiere una acción directa del virus sobre el tejido cerebral.

Otras acciones directas del virus son:

- alteraciones de la función inmune con alteraciones del sistema hematológico.
- hipercalcemia e insuficiencia suprarrenal.
- reacciones alérgicas a trimetropim-sulfametoxazole.
- malabsorción.
- alteraciones de la función renal con gran incidencia de proteinuria.

2. INFECCIONES EN EL SIDA:

La mayoría de los pacientes afectos de SIDA acaban presentando múltiples infecciones de carácter oportunista que son las que en definitiva ocasionan la muerte del sujeto, bien porque no exista un trata-

miento eficaz o porque deje de responder a los antimicrobianos convencionales.

Aunque el sujeto padezca un sarcoma de Kaposi o un linfoma cerebral, lo más común no es que fallezca por esta causa sino que en la mayoría de los casos la muerte se debe a infecciones oportunistas, que constituyen las manifestaciones clínicas más frecuentes del SIDA (MASUR, H. y cols., 1.985).

En todo caso, el proceso infeccioso manifestado por el paciente refleja predominantemente la alteración inmunológica subyacente, por lo que el espectro de infecciones es semejante a los sujetos con defectos graves de inmunidad celular aunque con notables diferencias (VER TABLA 10) entre las que destacan la gran frecuencia de infecciones por Pneumocystis carinii (35-70% de casos de SIDA), Mycobacterium avium-intracellulare o Cryptosporidium; infecciones que eran escasísimas antes de la descripción del síndrome.

2.1. Pneumocystis carinii:

Produce una neumonía que puede presentarse acompañada de otra infección oportunista, presentándose aproximadamente en el 50-60% de los sujetos afectos de SIDA, por lo que se considera la infección oportunista más frecuente en estos pacientes (GOTTLIEB, M.S.

INFECCIONES EN PACIENTES CON SIDA

MICROORGANISMO	MANIFESTACIONES CLINICAS
Protozoos:	
Pneumocystis carinii	Neumonía
Toxoplasma gondii	Encefalitis, infección diseminada
Cryptosporidium	Enterocolitis
Virus:	
Citomegalovirus	Neumonía, infección diseminada coriorretinitis, encefalitis
Herpes simplex	Lesiones mucocutáneas recurrentes severas
Herpes zoster	Lesiones cutáneas localizadas
Epstein-Barr	Implicado en enfermedades linfoproliferativas de células B y en el linfoma de Burkitt
Papovirus	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
Hongos:	
Candida albicans	Estomatitis, esofagitis, infección diseminada
Cryptococcus neoformans	Meningitis, infección diseminad
Histoplasma capsulatum	Infección diseminada
Aspergillus	Infección pulmonar invasiva con posibilidad de diseminación
Bacterias:	
M. avium-intracellulare	Diseminación
M. tuberculosis	Diseminación
Nocardia	Diseminación
Legionella	Neumonía

TABLA 10

(En DE VITA, V. y cols. 1986)

y cols., 1.981; FAUCI, A.S. y cols. 1.985).

Se manifiesta por una tos no productiva y disnea que dura días o semanas. La radiografía de tórax muestra una neumonitis intersticial mínima o un infiltrado evidente bilateral. Se acompaña de fiebre y escalofríos. En otros casos el sujeto presenta inicialmente un cuadro de insuficiencia respiratoria progresando a ARDS (adult respiratory distress syndrome). La gasometría arterial no suele estar alterada.

El diagnóstico se lleva a cabo demostrando la existencia del microorganismo en una tinción de tejido o secreciones pulmonares, no disponiéndose por ahora de pruebas serológicas para la detección de antígenos o de anticuerpos y tampoco se ha logrado cultivar. La técnica más eficaz para demostrar P. carinii es el lavado broncoalveolar de los bronquios subsegmentarios (OGNIBENE, F.P y cols., 1.984).

También es eficaz para el diagnóstico de P. carinii la biopsia transbronquial. En ambos casos pueden utilizarse diversos métodos de tinción para poner de manifiesto los quistes de éste protozoo.

2.2. Candida:

Las infecciones por Candida siguen en frecuencia a las producidas por P. carinii siendo un hecho fre-

cuente la candidiasis mucosa en pacientes con SIDA. Se manifiestan generalmente como esofagitis o estomatitis (GOTTLIEB, M.S. y cols., 1.981).

Algunos autores han considerado la caudidiasis oral como heraldo del SIDA, ya que es un proceso muy infrecuente, salvo en sujetos inmunodeprimidos o en tratamiento antibiótico (KLEIN, R.S., y cols., 1.984).

La esofagitis por Candida es frecuente en los pacientes con SIDA y presenta un cerácter invasivo. La proctitis por Candida es ocasional, dando lugar a dolor rectal y prurito. La enfermedad invasiva resulta relativamente rara, salvo como complicación del cateterismo intravenoso o como complicación terminal en pacientes caquécticos.

2.3. Herpes simplex:

Origina extensas úlceras mucocutáneas en zonas orales y perirrectales (SIEGAL, F.P. y cols., 1.983).

La manifestación más frecuente son las ulceraciones perirrectales que ocasionan dolor rectal y sangrado. También pueden presentar herpe genital y úlceras bucales.

El diagnóstico se hace cultivando el virus a partir de las lesiones activas, viendo los cuerpos

de inclusión herpéticos o la presencia de células gigantes multinucleadas.

2.4. Citomegalovirus:

Los pacientes con SIDA son casi universalmente seropositivos para Citomegalovirus y con gran frecuencia los excretan a través de la orina o la garganta (DREW, W.L. y cols., 1.981).

Numerosos pacientes presentan viremia citomegalovírica persistente. En la mayoría de los casos los sujetos presentan fiebre, pérdida de peso y malestar general, pero estos síntomas pueden ser también debidos a otras infecciones intercurrentes o al propio agente productor del SIDA. Dado que la infección por citomegalovirus no puede ser tratada de manera eficaz en la mayoría de los casos, el papel de este virus no puede determinarse con una reevaluación del paciente tras la eliminación de este virus.

El Citomegalovirus puede causar importantes lesiones en los pacientes de SIDA que se demuestran por la presencia de los típicos cuerpos de inclusión en diversos tejidos. Así puede causar neumonía, ulceraciones intestinales con posible perforación, coriorretinitis (más frecuente que la debida a toxoplasma) que puede ocasionar ceguera, encefalitis, esofagitis,

hepatitis, etc. En la autopsia se han encontrado cuerpos de inclusión citomegalovíricos en la mayoría de los órganos, siendo la diseminación de citomegalovirus una causa importante de muerte, sobre todo cuando hay una extensa afectación pulmonar (MACHER, A.M y cols., 1.983).

2.5. Virus de Epstein-Barr:

Todos los pacientes muestran evidencia serológica de infección por este virus (ROGERS, M.F. y cols., 1.983).

Su papel en el SIDA no está claro.

2.6. Herpes zoster:

Sólo aparece en un reducido número de pacientes jóvenes de SIDA en los que puede aparecer afectando a un solo dermatomo o de forma diseminada. El diagnóstico clínico es suficiente en estos casos.

En los casos de diseminación aparecen vesículas cutáneas, sobre todo en manos y pies.

2.7. Cryptococcus neoformans:

Su presentación más frecuente es la producción de meningitis, dando lugar a la aparición de febrí-

cula y cefalea que se continúa con vómitos y síndrome meníngeo. El líquido cefalorraquídeo puede presentar aumento de células y proteinas con glucosa baja, aunque puede ser completamente normal.

Como diagnóstico puede utilizarse la tinción con tinta china y el cultivo del líquido cefalorraquídeo. La prueba del antígeno criptocócico en sangre o en suero suele ser positiva (GODMAN, J.O., 1.971).

También puede ocasionar una infección diseminada: neumonía, linfadenopatía, peritonitis, retinitis, etc (KOVACS, J.A. y cols., 1.985).

2.8. Toxoplasma gondii:

Produce fundamentalmente encefalitis (WONG, G. y cols., 1.984) que se manifiesta por defectos neurológicos focales detectados en la exploración neurológica.

El diagnóstico se hace demostrando taquizoitos de Toxoplasma en los tejidos obtenidos por biopsia cerebral. El L.C.R. presenta ligera pleocitosis, aumento de proteínas y glucosa normal o un poco baja.

La serología no ha resultado muy útil en los pacientes afectos de SIDA; todos son seropositivos

para IgG aunque sólo un 20% presentan títulos elevados, superiores a 1:1024. El enzimoanálisis para IgM tampoco es útil. El diagnóstico específico descansa, por tanto, en la evidencia histológica de infección por Toxoplasma.

2.9. Cryptosporidium:

Causa diarrea persistente y debilitante en sujetos con SIDA, aunque no todas las diarreas acuosas que se presentan en los pacientes con este síndrome son debidas al protozoo. Estos microorganismos residen en el intestino delgado produciendo dolores cólicos y abundante emisión de heces líquidas, también puede aparecer fiebre y vómitos. La intensidad de las diarreas es muy variable aunque puede llegar a ser grave.

El protozoo puede detectarse mediante frotis en fresco teñido con yodo o en extensiones de heces teñidas con colorantes acidorresistentes. Se concentra mediante flotación con sacarosa y puede ser también detectado en la biopsia de mucosa gastrointestinal (MA, P. y cols., 1.983).

2.10. Mycobacterium avium-intracellulare:

Es frecuente que cause infección diseminada en los pacientes con SIDA (hasta en un 20% de los casos),

provocando fiebre, pérdida de peso y debilidad (ZAKOWSKI, P. y cols., 1.982; GREENE, J.B. y cols., 1.982) aunque resulta difícil saber la participación verdadera del microorganismo en estos síntomas debido a la presencia simultánea de otras infecciones. Puede ser cultivado y demostrar su presencia en sangre, hígado, pulmón, médula ósea y ganglios linfáticos de un elevado porcentaje de pacientes con SIDA.

El cultivo a partir de esputo no permite el diagnóstico definitivo ya que puede ser saprófito en el árbol bronquial. Los bacilos son acidorresistentes, más grandes y gruesos que M. tuberculosis, creciendo rápidamente (2-3 semanas). Los hemocultivos pueden positivizarse en 5-10 días demostrando la persistencia de la micobacteria.

2.11. Mycobacterium tuberculosis:

Se ha detectado sobre todo en los pacientes con SIDA de origen haitiano, en los que es muy frecuente que la tuberculosis diseminada sea una manifestación precoz del sindrome. En España la infección diseminada por M. tuberculosis, en pacientes afectos del sindrome, es mucho más frecuente que la producida por M. avium-intracellulare (AGUADO, J.M. y CASTRILLO, J.M., 1.986).

2.12. Otras infecciones:

Se han encontrado casos de salmonelosis (diarrea y bacteriemia), histoplasmosis, coccidiodomicosis, nocardiosis, etc.

3. SARCOMA DE KAPOSI:

El sarcoma de kaposi era hasta hace muy poco una enfermedad rara que se veía en ancianos de origen mediterráneo o judío. Recientemente se ha asociado con individuos inmunosuprimidos y en jóvenes homosexuales que lo presentan con mucha mayor frecuencia que los drogadictos parenterales en el SIDA (SCHWARTZ, R.A., 1.986).

Precisamente, los primeros casos de SIDA se dieron en jóvenes homosexuales que presentaban neumonía por Pneumocystis carinii y sarcoma de kaposi (GOTTLIEB, M.S. y cols., 1.981).

La deficiencia inmunológica que acontece en los pacientes con SIDA y que afecta a la inmunidad celular es la que predispone al paciente a la aparición de esta neoplasia, anteriormente de escasa incidencia.

El sarcoma de kaposi (SK) o sarcoma hemorrágico múltiple fue descrito por primera vez por el dermatólogo húngaro Moritz Kaposi que lo describió como

nódulos de color rojo marronáceo a azulado con tamaño de un guisante a una avellana, las lesiones sobresalen de la piel y son blandas y suaves al tacto teniendo una distribución distal en brazos y piernas, aunque también aparecían en tronco y cara. Estas lesiones también aparecían en mucosa de laringe, tráquea, estómago, entestinos o hígado.

Típicamente, el sarcoma de kaposi sólo se encontraba en ancianos de origen mediterráneo o judío. Posteriormente también se halló en jóvenes y niños africanos de raza negra y en sujetos sometidos a tratamiento inmunosupresor. La epidemia de sarcoma de kaposi observada entre jóvenes homosexuales norteamericanos se denominó sarcoma epidémico de kaposi por la necesidad de diferenciarlo con las formas anteriormente descritas (FRIEDMAN-KIEN, A.E. y cols., 1.982).

Se desconoce la etiología del sarcoma de kaposi. Curiosamente es muy poco frecuente entre los drogadictos parenterales aunque lo sea entre los homosexuales, y se encuentra asociación con el citomegalovirus, de forma que la prevalencia de anticuerpos frente a este virus es muy elevada en homosexuales (DREW, W.L. y cols., 1981).

Recientes observaciones sugieren que este tumor no es una neoplasia metastatizante, sino un tumor multicéntrico originado en una hiperplasia localizada

en una célula de origen endotelial, es por ello que algunos autores lo han definido como una "neoplasia oportunista".

El sarcoma de kaposi suele aparecer como manchas, nódulos o placas vasculares múltiples, normalmente en las extremidades inferiores, aunque puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo, inclusive en la conjuntiva o en la cavidad oral.

En el caso del sarcoma de kaposi epidémico aparecen de forma repentina y a menudo difuse lesiones que afectan la piel, mucosa bucal, ganglios linfáticos y vísceras (intestinos, pulmón, higado, bazo), por lo que el espectro de las manifestaciones clínicas y la morfología de las lesiones son mucho más variados que los observados en la forma clásica. Como signos sistémicos pueden aparecer fiebre, pérdida de peso, diarrea y fatiga, también es frecuente la asociación con infecciones oportunistas. La evolución de la enfermedad suele producirse partiendo de algunas lesiones mucocutáneas localizadas o diseminadas que se van generalizando, extendiéndose a los ganglios linfáticos y conducto gastrointestinal. La afectación pleuropulmonar suele presentarse en fase terminal, en los pacientes que mueren de sarcoma de kaposi,(SAFAI, B. y cols., 1.985). De todas formas la mortalidad entre los pacientes de SIDA con sarcoma de kaposi es notablemente inferior a la de los que presentan infecciones oportu-

nistas asociadas o no a la neoplasia.

Para facilitar el estudio de los modos de aparición y progresión de la enfermedad se ha propuesto una clasificación en estadíos (KRIGEL, R.L. y cols., 1.986):

Estadio	Descripción
I.	Cutáneo, localmente insidioso (clásico).
II.	Cutáneo, localmente agresivo con adenopatías regionales o sin ellas (africano localmente agresivo).
III.	Cutáneo generalizado o con afectación de ganglios linfáticos (linfadenopático africano y epidémico).
IV.	Visceral (epidémico).

Subtipos:

A. Sin signos ni síntomas sistémicos.

B. Signos sistémicos pérdida de peso del 10% o fiebre mayor de 37,5ºC en boca, no relacionada con causas de infección y mantenida durante más de 2 semanas.

El sarcoma observado en los pacientes de SIDA se corresponde con los estadíos III y IV.

Existen 3 factores pronósticos en el sarcoma de kaposi epidémico:

1) La extensión de la enfermedad.

2) La presencia o ausencia de sintomas sistémicos.

3) La asociación con una infección oportunista.

Evidentemente la supervivencia será menor cuanto más extenso sea el sarcoma, se manifiesten síntomas sistémicos y concurran infecciones oportunistas.

En cuanto a la incidencia, es predominante en varones homosexuales o bisexuales (72% de los casos), siguiendo a mucha distancia los drogadictos parenterales (17%), haitianos (4%) y hemofílicos (1%). También en mujeres que han mantenido relaciones sexuales con varones aquejados del SIDA (1%), receptores de transfusiones (1%) y otros sin factor de riesgo conocido (C.D.C. 1.984).

Se ha sugerido que la promiscuidad sexual y las prácticas que implican contacto con materias fecales aumentan el riesgo de padecer SIDA y sarcoma de kaposi epidémico (MARMOR, M. y cols., 1.984), también se relaciona el nitrito de amilo con el desarrollo de este sarcoma.

4. OTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS EN EL SIDA:

Carcinomas oral y anorrectal:

La incidencia de carcinoma epidermoide de lengua y de carcinoma de ano y recto está aumen-

tando en pacientes de SIDA, aunque estas neoplasias no eran raras entre homosexuales en los que el carcinoma de ano y recto se adquiere probablemente por vía venérea, estando asociado al virus del herpes simplex tipo II y al virus del papiloma humano.

Linfomas malignos:

Los pacientes de SIDA tienen una incidencia aumentada de linfomas no Hodgkin. Entre las localizaciones, la más frecuente es el sistema nervioso central, siguiendo la médula ósea y el intestino. Se trata de linfomas de células B extraganglionares. Existen pruebas serológicas que sugieren que el virus de Epstein-Barr interviene en la patogenia del linfoma de Burkitt así como en la del linfoma de células gigantes del cerebro.

La expresión de estas neoplasias depende probablemente de la activación de diferentes vías oncogénicas con diferentes períodos de incubación, o bien de la combinación particular de virus oncogénicos, gérmenes patógenos y estimulación heterogénica que compone el medio individual del enfermo (SAFAI, B. y cols., 1.986., STUTMAN, O., 1.986).

IV. ALTERACIONES INMUNOLOGICAS EN EL SIDA

Cuando comenzaron a detectarse en Estados Unidos los primeros casos de una nueva y extraña enfermedad, que luego seria conocida como SIDA, dos hechos llamaron poderosamente la atención de los Centers For Disease Control: el grado elevado de mortalidad entre los sujetos que padecían la enfermedad y que los fallecimientos eran debidos a infecciones oportunistas, así como al poco fracuente sarcoma de kaposi. Existía una semajanza en esta patología con la que presentan los enfermos cuyo sistema inmune está debilitado yatrogénicamente (quimioterapia en sujetos con cáncer o inmunosupresores en transplantados). De ahí que pronto se llegara a la conclusión de que los enfermos de SIDA fallecían como consecuencia de una afección que alteraba su sistema inmune (MASUR, H. y cols., 1.981; SIEGAL, F.P. y cols., 1.981); por ello se adoptó el nombre de sindrome de inmunodeficiencia adquirida para denominar la nueva enfermedad.

En los últimos años se ha producido un espectacular avance en el conocimiento del SIDA, en especial con el aislamiento de su agente oroductor, el HTLV-III/LAV, llamado ahora HIV. Gracias al aislamiento y cultivo del virus se ha comprobado cómo éste tiene un marcado tropismo por los linfocitos T helper/inductores

o T4 (KLATZMAN, D. y cols., 1.984), la infección de estos linfocitos por el HTLV III conlleva su ulterior destrucción y con ella la desaparición de un elemento coordinador imprescindible en la respuesta inmune del ser humano por lo que se produce el colapso de las funciones inmunológicas en los enfermos de SIDA.

Las alteraciones inmunológicas son variadas y afectan tanto a la inmunidad celular como a la humoral (QUINNAN, G.V. y cols., 1.985). Se han descrito las siguientes (VER TABLA 11) :

1. Linfopenia:

Fue una de las primeras anomalías descritas en los pacientes de SIDA. Puede llegar a ser muy severa (menos de 500 linfocitos/mm3)en el síndrome ya establecido. Se debe a una notable disminución de los linfocitos T helper/inductores (GOTTLIEB, M.S. y cols., 1.981; FRIEDMAN-KIEN, A.E. y cols., 1.981). La disminución de los linfocitos T identificados por el anticuerpo monoclonal OKT4 da lugar a una inversión en el cociente T4/T8 que en individuos normales es de alrededor de 2/1. En la mayoría de las enfermedades víricas se produce una inversión del cociente T4/T8, pero en este caso es debido a un aumento de los linfocitos citotóxicos/supresores (FAHEY, J.L. y cols., 1.983).

Otro dato de interés es que en los pacientes de

TABLA 11

ANORMALIDADES INMUNOLOGICAS DESCRITAS EN EL SIDA

Alteraciones cuantitativas de los linfocitos T:

-Disminución de los linfocitos helper/inductores(T4, Leu 3a).
-Alteración variable del nº de linfocitos citotóxicos/supresores(T8, Leu 2a).

Alteraciones funcionales de los linfocitos T:

-Susceptibilidad del huésped a las infecciones oportunistas.
-Susceptibilidad del huésped a cánceres poco comunes.
-Disminución a la respuesta de hipersensibilidad tardía.
-Pobre respuesta proliferativa a mitógenos y antígenos en preparados de células mononucleares in vitro.
-Respuesta proliferativa normal a mitógenos en subpoblaciones purificadas de linfocitos T4 y T8 con respuesta anormal a mitógenos específicos.
-Proliferación espontánea aumentada.
-Disminución de la función de los linfocitos citotóxicos frente a citomegalovirus.
-Disminución de la función de producción de linfokinas, en especial en respuesta a la estimulación con antígenos específicos.
-Expansión clonal deprimida de los linfocitos T4 y T8.
-Disminución de la función facilitadora a los linfocitos B para la producción de inmunoglobulinas.

Alteraciones funcionales de las células Natural Killer(NK):

-Disminución de la actividad citotóxica espontánea.
-Recuperación de la actividad citotóxica natural tras la incubación con interleukina-2.

Alteraciones funcionales de los linfocitos B:

-Niveles elevados de inmunoglobulinas séricas.

-Presencia de inmunocomplejos circulantes.

-Incapacidad de originar una respuesta inmune frente a una inmunización o infección nueva.

-Proliferación espontánea elevada.

-Dismunición de la respuesta de los linfocitos B frente a los mitógenos tanto en activación o proliferación como en diferenciación.

Alteraciones funcionales de los monocitos/macrófagos:

-Disminución de la quimiotaxis.

-Disminución in vitro de la actividad citotóxica frente a Giarda lamblia y a Toxoplasma gondii, mejorada in vitro mediante la adición al cultivo de gamma-interferón.

-Ausencia de respuesta a los inductores comunes de la producción de interleukina-1.

-Secreción espontánea de interleukina-1 incrementada.

-Producción espontánea de prostaglandina E2 aumentada.

Alteraciones serológicas:

-Factores supresores presentes en el suero.

-Sustancias supresoras derivadas de los linfocitos T.

-Anticuerpos antilinfocito.

-Acido-lábil alfa interferón.

-Elevación de la Beta-2-microglobulina.

-Elevación de la Alfa-1-timosina.

-Disminución de los niveles de timulina en suero.

(Tomada de BOWEN, D.L. 1986)

SIDA cuya primera manifestación es el sarcoma de kaposi tienen un número más elevado de linfocitos T4 que aquellos que presentan una infección oportunista. Por otro lado la esperanza de vida es mayor en los sujetos con SIDA que sólo presentan sarcoma de kaposi; se ha sugerido que estos sujetos tienen su función inmune más preservada que los que sufren infecciones oportunistas por lo que el pronóstico se relaciona positivamente con el número de linfocitos T4 periféricos del paciente.

También conviene reseñar que el número de linfocitos supresores/citotóxicos suele estar aumentado en homosexuales sanos y que estos sujetos suelen tener un número de linfocitos T4 casi normal o un poco descendido (KORNFELD, H. y cols., 1.982).

2. Alteraciones funcionales de los linfocitos T:

Las alteraciones funcionales de las células T se manifiestan clínicamente por la aparición de infecciones oportunistas y de neoplasias malignas poco comunes. También dan lugar a la presentación de anergia en las pruebas cutáneas estándard realizadas con un panel de antígenos, aunque la hipersensibilidad de tipo tardío puede conservarse en las fases primarias de la enfermedad (SIEGAL, F.P., 1.982).

Los linfocitos T, in vitro, presentan una disminución de la respuesta proliferativa a la estimulación con mitógenos y con antígenos específicos.

La incapacidad de la población de células T4 para organizar una respuesta proliferativa frente a antígenos solubles parece ser uno de los más tempranos defectos cualitativos en el sitema inmune de los pacientes con SIDA.

Sin embargo, cuando se separan las células T4 y T8, la respuesta a los mitógenos está intacta en las dos subpoblaciones. Lo que está claro es que la subpoblación de células T que se encarga de la respuesta proliferativa a la estimulación con antígenos está disminuída. A este respecto se ha comprobado que los individuos afectos del síndrome de linfadenopatía tienen una deplección selectiva de una fracción de las células T4 que viene definida por el anticuerpo monoclonal TQ1 y que fenotípicamente corresponde a linfocitos inductores (NICHOLSON, J.K y cols., 1.984).

En estudios realizados con células T4 y T8 de sujetos con SIDA se comprobó que la función supresora de los linfocitos T8 era normal (disminuían la producción de IgG por linfocitos B inducida por antígenos), mientras que la función cooperadora de las células T4 era muy deficiente (no conseguían aumentar la producción de IgG por los linfocitos B).

Se ha comprobado que la expresión de los receptores de la interlenkina-2 se halla disminuída mientras que su producción es normal en cultivos estimulados con mitógeno de células T en pacientes con SIDA. Al separar las células T4 y T8 la expresión de los receptores de la interlenkina-2 y la producción de ésta son normales al estimularlas con mitógeno.

También se ha observado una disminución en la producción de linfokinas por los linfocitos T.

Igualmente se ha descrito una deficiente actividad de las células NK y de la citotoxicidad especifica frente a virus mediada por células T. La disminución de la función de las células citotóxicas no es debida a una disminución en el número de células citotóxicas circulantes, sin embargo es probable que la función de las células T4 inductoras sea deficiente, resultando en los defectos citotóxicos observados, ya que las células citotóxicas requieren una señal inductora de las células T4 para realizar su función de forma óptima. La adición de interlenkina-2 en los cultivos mejora la capacidad citotóxica de estas células (ROOK, R.H. y cols., 1.983).

La lisis espontánea de las células tumorales por las Natural Killer también está disminuída.

3. Alteraciones funcionales de los monocitos:

Se ha encontrado que los monocitos de los enfermos con SIDA presentan defectos en la función quimiotáctica (SMITH, P. y cols., 1.984) y son incapaces de destruir a los parásitos como Giarda lamblia y Toxoplasma gondii.

Los monocitos parecen estar en un estado de preactivación ya que de forma espontánea producen interleukina 1 y prostaglandina E2, mientras que cuando se les estimula con un inductor común de interleukina 1 la producción de ésta se encuentra muy disminuída. Tales observaciones pueden explicar la disminución de la respuesta a los parásitos y a ciertas micobacterias en los pacientes con SIDA.

La función de los monocitos in vitro puede mejorar añadiendo interferón gamma al cultivo, por lo que se piensa que la función defectuosa del monocito puede deberse a la disminución de elaboración de linfokinas por parte de las células T.

Por otra parte, el estado de preactivación en que se hallan los monocitos impide que éstos puedan responder de forma adecuada cuando se presenta un antígeno nuevo.

4. Alteraciones funcionales de los linfocitos B:

En los sujetos afectos de SIDA se detecta una notable activación policlonal de las células B (LANE, H.C. y cols., 1.985) que se manifiesta por el hallazgo en suero de niveles elevados de inmunoglobulinas, especialmente de Tipo IgG e IgA, y por la presencia de inmunocomplejos circulantes además de la frecuente presentación de fenómenos autoinmunes.

A pesar de esta secreción espontánea y elevada de inmunoglobulinas, los pacientes de SIDA presentan una disminución en la respuesta a mitógenos estimulantes de la diferenciación de las células B. Estos hechos indican una alteración de los linfocitos B independiente de la afectación de los linfocitos T4. Los linfocitos B están en un estado permanente de activación, proliferación y secreción de inmunoglobulinas, pero no responden a las señales fisiológicas normales por lo que no pueden ejercer una respuesta humoral correcta ante la entrada de un antígeno nuevo. Es por ello que la confirmación de una infección por un agente, que normalmente se manifiesta por un aumento en los títulos de anticuerpos serológicos específicos resulta poco fidedigna.

5. Alteraciones serológicas:

Se han observado incrementos de la beta-2-microglobulina y de alfa-1-Timosina. En el suero de

los pacientes también se ha identificado una forma ácido-lábil de interferón alfa.

También se han hallado factores supresores en el suero, factores que ejercen efectos supresores selectivos sobre la población de linfocitos T (LAURENCE, J. y cols., 1.984) bloqueando la función receptora, la secreción o la síntesis de linfokinas. Se han detectado también anticuerpos antilinfocíticos y una disminución de los niveles de timulina en suero.

6. Alteraciones inmunológicas en homosexuales asintomáticos:

Es frecuente que presenten una notable disminución del cociente T4/T8 debido principalmente a una elevación de la población de linfocitos T citotóxicos (KORNFELD, H. y cols., 1.982; PINCHING, A.J. y cols., 1983). También es relativamente frecuente que presenten anergia en las pruebas cutáneas, así como linfopenia. Sin embargo es escaso el número de homosexuales asintomáticos que muestran una disminución de los T4 circulantes y son precisamente los sujetos de este grupo de riesgo que presentan unas alteraciones inmunológicas más acusadas, los que tienen más probabilidad de desarrollar SIDA clínico (MATHUR-WAGH,U. y cols., 1.984).

7. Alteraciones inmunológicas en hemofílicos asintomáticos:

Se han observado signos de activación de las células B policlonales que se manifiesta por niveles séricos elevados de IgG y de IgA. El cociente T4/T8 se haya disminuído en la mitad de los casos lo que frecuentemente se debe a un aumento de los linfocitos T8, aunque también se ha descrito disminución de los linfocitos T4 en algunos casos (GOLDSMITH, J.C. y cols., 1.983).

8. Alteraciones inmunológicas en drogadictos intravenosos:

Con anterioridad a la aparición del SIDA se hicieron varios estudios que habían mostrado alteraciones inmunitarias en drogadictos (ORTONA, L. y cols., 1.979): aumento de IgM, inmunocomplejos circulantes y reducción intensa en la capacidad de los linfocitos para responder a la estimulación de mitógenos del tipo de la Fitohema-glutinina, Pokeweed y concavalina A. Se comprobó que los defectos en la función de los linfocitos T revierten incubando in vitro las células de los pacientes con naloxona, un antagonista de los opiáceos, lo que sugiere un efecto directo de éstos. Por otra parte la respuesta blastogénica a la fitohemaglutinina y los niveles de las inmunoglobulinas retornan a la normalidad tras 1-3 meses de interrupción de la drogadicción. Los defectos de la inmunidad humoral y celular se atribuyen a las repetidas

inyecciones de virus, bacterias y sustancias adulterantes, a hepatopatías asociadas (vírica, alcohólica) y al efecto directo de la droga.

En recientes estudios se comprobó que más de la mitad de los drogadictos asintomáticos tenía el índice T4/T8 disminuido por descenso de las células T4 y aumento de las T8. Layon estudió un grupo de drogadictos hospitalizados, la mayoría por complicaciones infecciosas de su adicción y encontraron un descenso del cociente T4/T8 en el 75% de los casos. El 50% tenía un aumento de linfocitos T8 y sólo el 38% presentaba una disminución de los linfocitos T4 (LAYON, J. y cols., 1.984). Recientemente, en un estudio realizado en Barcelona se afirmaba que el 60% de los drogadictos estudiados tenían un índice T4/T8 disminuído en la mayoría de los casos por el aumento de linfocitos T8 (GALLART, T. y cols., 1.984). No hay que olvidar que los drogadictos parenterales padecen con frecuencia infecciones de todo tipo, entre ellas las de origen vírico (Citomegalovirus, virus de la hepatitis B, virus de Epstein-Barr) que son capaces de producir una reducción del cociente T4/T8 sobre todo por aumento de células T8. Más recientemente otros autores (LATORRE, X. y cols., 1.986) también encuentran entre los drogadictos con bastante frecuencia una inversión del cociente T4/T8 debido fundamentalmente al aumento de células T8, lo que

hace a este grupo de riesgo compararse en sus alteraciones inmunológicas a las que presentan homosexuales y hemofílicos asintómaticos.

Por otra parte los adictos a la heroína también presentan otra serie de alteraciones inmunológicas como son (DOMINGO, J., 1.985):

-Falsos positivos en los test para la lúes (RPR).
-Prueba de látex positiva.
-Reacción positiva en fijación del complemento para linfogranuloma venérea.
-Reacción positiva a los test de fijación del complemento para la fiebre Q.
-Elevación sérica de la IgM, debida a la gran exposición a antígenos por el drogadicto.
-Frecuente elevación de la IgG, especialmente entre sujetos tratados con metadona.
-Elevación de la alfa-2-microglobulina, sustancia inhibidora de la actividad proteolítica del suero.
-Presencia de anticuerpos antimúsculo liso.
-Presencia de anticuerpos linfocitotóxicos.

9. Alteraciones inmunológicas en el complejo relacionado con el SIDA:

El perfil inmunológico de estos sujetos resulta a menudo similar al de los pacientes con SIDA, aunque en principio suele ser menos dramático. Lo más impor-

tante es que este perfil no se normaliza a lo largo de un periodo de control de un año, a diferencia de los varones homosexuales asintomáticos con anomalías bien definidas en el número de linfocitos T (disminución del cociente T4/T8 debido al aumento de células T8 asociado a infecciones víricas).

También se ha encontrado anergia cutánea, disminución de la actividad celular NK y un déficit en la respuesta a mitógenos tanto en las células T como en las B.

Un grupo de sujetos perteneciente al Complejo Relacionado con el SIDA, acabará desarrollando el síndrome y se ha comprobado que son los que presentan una disfunción inmunológica contínua y progresiva (MATHUR-WAGH, U. y cols., 1.984).

10. Inmunopatogénesis:

El retrovirus denominado HTLV III es linfocitotrópico y linfocitopático de manera selectiva para el linfocito T4. El retrovirus puede actuar sobre esta célula de dos maneras: en algunos linfocitos induce la destrucción celular mediante la replicación del virus en el citoplasma, en otros linfocitos la infección resultaría en la incorporación de una secuencia provírica dentro del DNA celular sin que se produzca replicación vírica, lo que conllevaría la viabilidad del linfocito, aunque posiblemente con alguna altera-

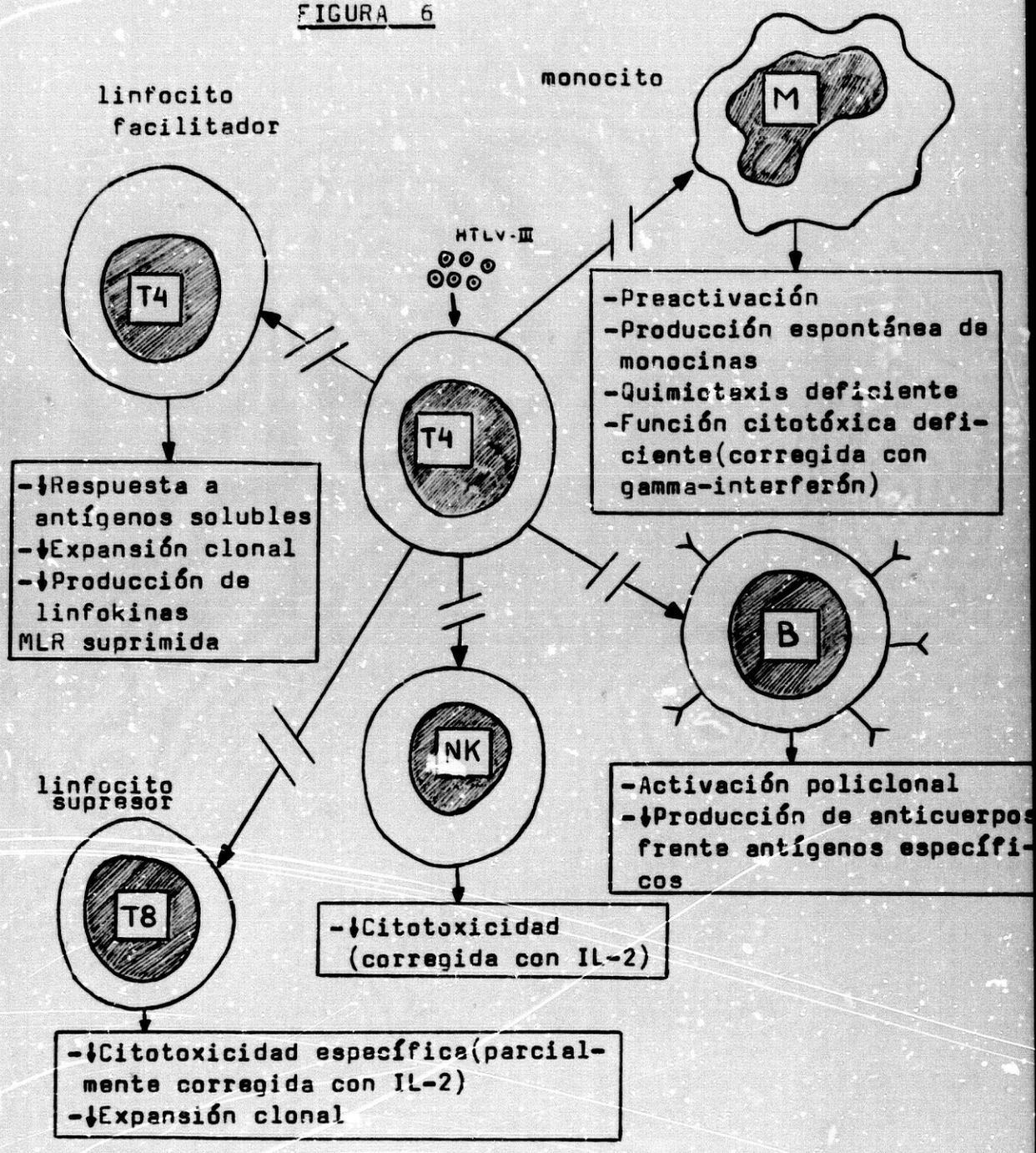
ción en sus funciones.

En caso de que el efecto sea predominantemente citopático, la deficiencia de la función inmune sería resultado de una deficiencia numérica, pero si el efecto es predominantemente infeccioso-no citopático la deficiencia inmune sería consecuencia del efecto cualitativo de las células en cuestión (GASCON, P. y cols., 1.986).

Recientemente han aparecido datos que sugieren que el antígeno de membrana T4, que define al linfocito helper/inductor, sería el receptor de membrana del retrovirus (DALGLEISH, A.G. y cols., 1.984).

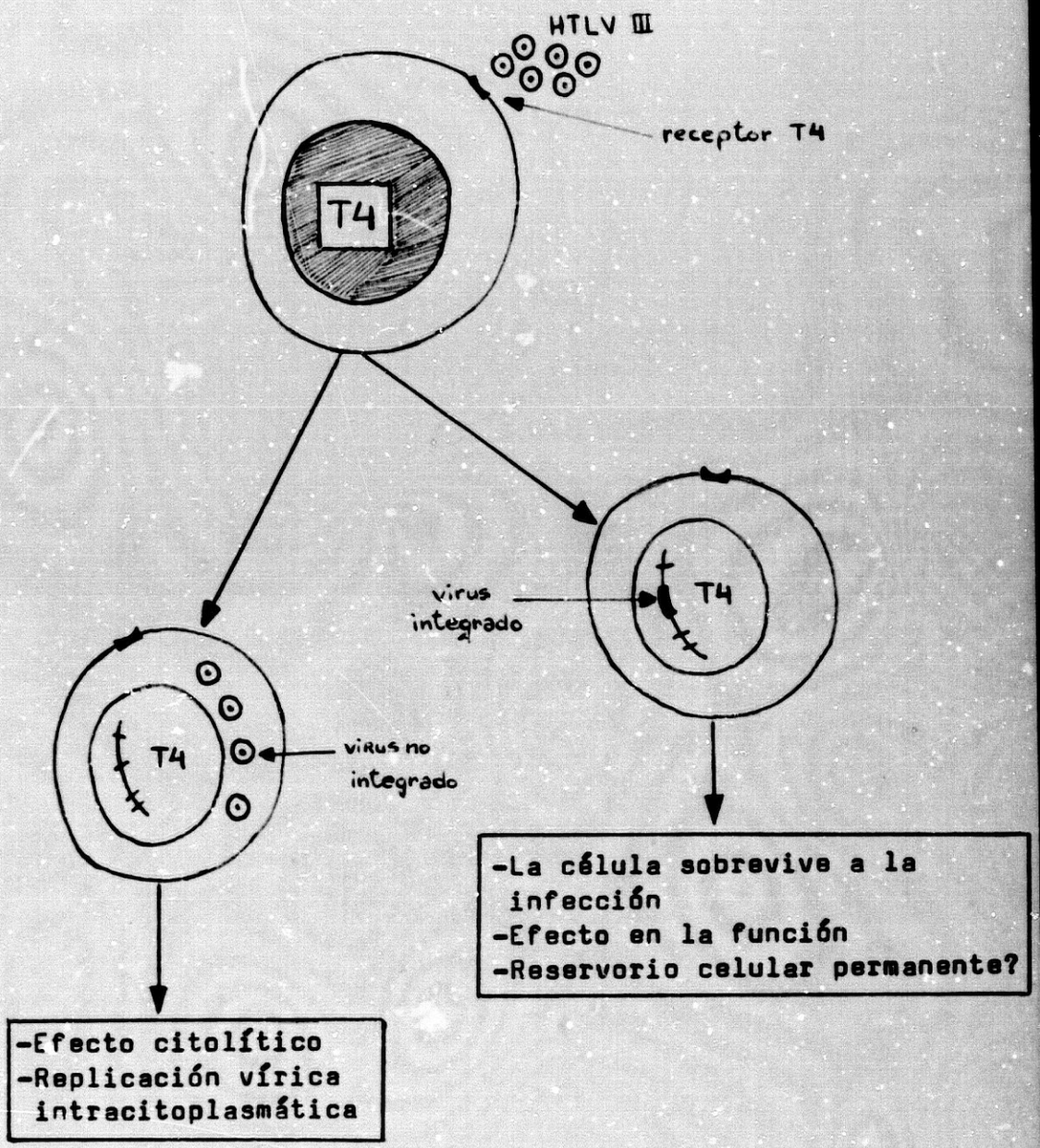
Hoy día es aparente que la disfunción o la disminución selectiva de los linfocitos T4 es probablemente el defecto fisiológico más importante en el SIDA y explicaría el porqué de la susceptibilidad de estos pacientes a sufrir infecciones oportunistas y neoplasias poco comunes.

FIGURA 6



Esquema de los múltiples efectos de la infección del linfocito facilitador (T4) por el virus HTLV-III. (Tomada de BOWEN, D.L. y cols., 1985)

FIGURA 7



Esquema teórico de la infección selectiva por el virus del SIDA en su célula diana, el linfocito T4. (Tomado de GASCON, P. 1986)

V. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1.975 Köhler y Milstein fusionaron células de mieloma de ratón (tumor productor de inmunoglobulinas sin actividad de anticuerpo) con células productoras de anticuerpos de la misma especie. Las células de mieloma poseen la capacidad de crecer indefinidamente en los cultivos celulares mientras que las células productoras de anticuerpos tienen una vida relativamente corta. Con la fusión de ambas líneas celulares consiguieron una línea celular híbrida capaz de crecer en los cultivos celulares usuales y productora de un solo anticuerpo definido. Habían inmortalizado una función específica diferenciada: la producción de anticuerpos monoclonales, y se introdujo la tecnología de los mielomas híbridos de linfocitos, hibridomas linfocitarios o, simplemente, hibridomas (KOHLER, G. y MILSTEIN, C., 1.975).

El proceso de fusión entre dos células en cultivo con aparición de un híbrido puede ocurrir de forma espontánea, aunque es extraordinariamente raro. En la actualidad se usa como agente fusionante el polietilenglicol.

En la formación de un hibridoma, alguna de las

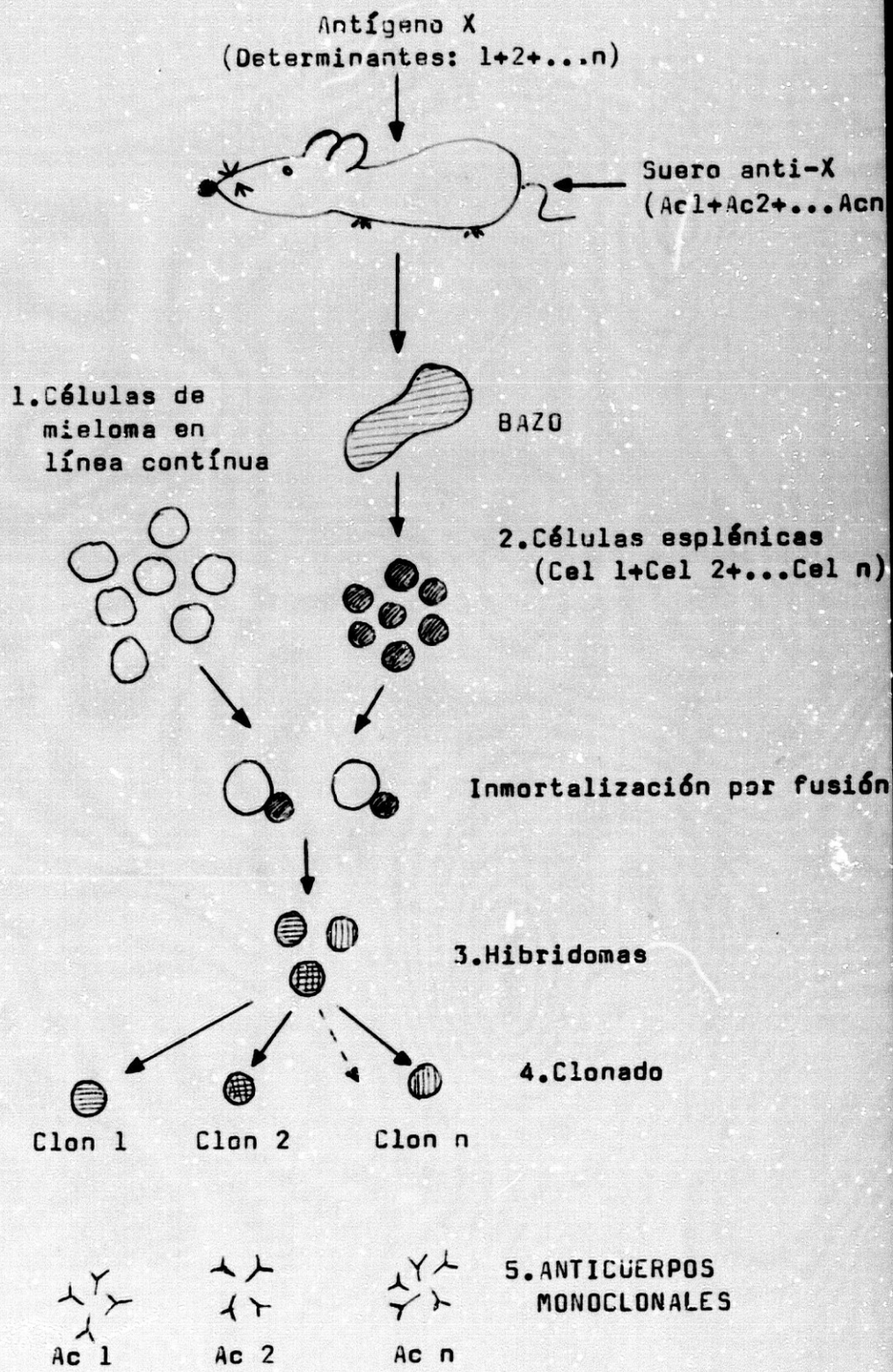
células presentes, fusionan sus núcleos y dan lugar a células híbridas tetraploides con variadas composiciones del DNA. Un pequeño número de estos híbridos son estables y viables, pueden multiplicarse indefinidamente y cada uno de ellos da lugar en su descendencia a un clon; otras células fusionadas son inviables y mueren rápidamente. Las células no fusionadas se eliminan en los subcultivos por dos mecanismos distintos: las células linfoides del animal inmunizado, porque son incapaces de multiplicarse, y las células mielomatosas, porque, si se seleccionó una mutante enzimo-dependiente, no se multiplicarán en un medio carente de dicha enzima.

En el hibridoma la célula mielomatosa parental proporciona la capacidad de secreción de inmunoglobulinas y la capacidad de multiplicarse indefinidamente en cultivo; la célula linfocitaria parental proporciona la información genética para la produción del anticuerpo específico y de la enzima en que era deficiente la célula del mieloma.

El protocolo general para la obtención de hibridomas y anticuerpos monoclonales se esquematiza en las siguientes etapas (fig. 8):

1. Como célula de mieloma parental se selecciona una mutante enzimo-dependiente de una línea celular de plasmocitoma. Habitualmente se seleccionan células deficientes en hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGRFT). Se cultivan en me-

FIGURA 8



Protocolo general para la obtención de hibridomas y de anticuerpos monoclonales.

dio que contiene dicha enzima.

2. Las células parentales productoras de anticuerpos se obtienen del bazo (o de la población linfocitaria de sangre periférica) de un animal inmunizado con el antígeno frente, a cuyos determinantes se desea obtener anticuerpos monoclonales.

3. Ambos tipos de células parentales se mezclan en polietilenglicol durante 1 minuto. Se produce la fusión celular y se originan los hibridomas.

4. Tras un lavado y unas horas de incubación, se procede a la dilución y clonado de la suspensión celular, subcultivando durante varias semanas en medio desprovisto de HGFRT.

5. Los sobrenadantes de cada clon celular son examinados periódicamente para determinar la presencia de anticuerpos frente al antígeno utilizado. Los clones identificados como productores de anticuerpos son clonados de nuevo, comprobada su capacidad de producción, establecida la línea celular correspondiente y determinadas las características del anticuerpo monoclonal obtenido (MILSTEIN, C. y cols., 1.980).

A partir de esta técnica se obtuvieron líneas celulares

de mieloma híbridas facultadas para la secreción de diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de histocompatibilidad y otros antígenos localizados en la superficie celular. (GALFRE, G. y cols., 1.977).

En la actualidad se producen hibridomas con células humanas capaces de producir anticuerpos que puedan ser utilizados experimentalmente en el hombre.

Bajo los mismos principios se han desarrollado hace pocos años hibridomas de células T mediante fusión de células de un linfoma de células T con células linfoides de un animal inmunizado. En este caso se consigue la inmortalización de los caracteres de la célula T parental. Estos hibridomas son los utilizados en la investigación de los marcadores de superficie y funciones de las subpoblaciones linfocitarias T.

Las ventajas de los anticuerpos monoclonales son considerables:

-Son inmunoglobulinas de una sola especie molecular con afinidad medible por el antígeno por lo que son útiles para la cuantificación precisa de las reacciones serológicas y como reactivos estándard de calidad constante.

-Se pueden seleccionar anticuerpos específicos frente a los diferentes determinantes de un antígeno complejo.

-La inmortalidad de las líneas celulares productoras garantiza el suministro continuo de anticuerpos con costos reducidos y de calidad constante.

Sus aplicaciones son diversas:

-Identificación de antígenos celulares: individualización de subpoblaciones celulares normales o patológicas.
-Reactivos de laboratorio.
-Caracterización de enzimas, neurotransmisores, etc.
-Purificación de antígenos.
-En un futuro podrán ser usados en inmunización pasiva.

A nosotros nos interesan los anticuerpos monoclonales en relación a la identificación de antígenos celulares (WILLIAMS, A.F. y cols., 1.977). Gracias a esta propiedad podemos identificar las subpoblaciones de células mononucleadas que forman parte del presente estudio.

Los anticuerpos monoclonales utilizados son los siguientes:

-OKT 3: reacciona con una estructura expresada por el 95% de los linfocitos de sangre periférica (KUNG, P.C. y cols., 1.979). Este anticuerpo monoclonal tiene capacidad mitogénica y también es capaz de inhibir

la proliferación de estos linfocitos frente aloantígenos, antígenos solubles y mitógenos. Esto ha hecho pensar que el antígeno T3 puede estar relacionado con una estructura de reconocimiento de los linfocitos T (CHANG, T.W. y cols., 1.981).

-OKT 4: reconoce las células OKT 4 positivas que, a pesar de ser un grupo heterogéneo, funcionan globalmente como células colaboradoras (helper) y son necesarias para la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B (THOMAS, Y. y cols., 1.980), para la generación de fenómenos de supresión y potencian los fenómenos de citotoxicidad, probablemente mediante la producción de factores solubles (interleukina 2). En sus dos últimas funciones, las células efectoras son células OKT 8 positivas (REINHERZ, E.L. y cols., 1.979; MORIMOTO, C. y cols., 1.983). Se las conoce como inductoras/helper.

-OKT 8: identifica los linfocitos OKT 8+ que son las células efectoras de la citotoxicidad específica. (VAN WAUVE, J.P. y cols., 1.981). De esta población también forman parte células encargadas de los fenómenos de supresión (de la diferenciación de las células B y de la producción de inmunoglobulinas). También se denominan supresoras/citotóxicas.

-B1: identifica exclusivamente un antígeno de super-

ficie que se encuentra únicamente en los linfocitos B(Mc KENZIE, I.F.C. y cols., 1.983).

-MO 2: identifica a células en cuya superficie se encuentra el antígeno mono-2. Este antígeno sólo está expresado en monocitos periféricos, es un antígeno que se adquiere de forma tardía en la diferenciación monocito-granulocitaria. (TODD, R.F. y cols. 1.981).

-BMA 070: identifica células NK,K y una porción de granulocitos. (ABO, T. y cols., 1.981).

La distribución de estas subpoblaciones celulares en sangre periférica es la siguiente:

-OKT 3 identifica el 95% de linfocitos periféricos T.
-OKT 4 identifica entre el 50-60% de los linfocitos T periféricos.
-OKT 8 identifica entre el 30-40% de los linfocitos T periféricos.

VI. METODOS DE DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV III

La infección por el virus del SIDA, como cualquier otra infección de tipo viral, da lugar a una respuesta inmunitaria de tipo humoral que se traduce en la aparición de anticuerpos dirigidos contra las distintas proteínas que forman parte del virus, anticuerpos que pueden ser detectados por diversas pruebas serológicas. Generalmente las proteínas que se hallan en mayor cantidad en el virus son las que dan lugar a mayores niveles de anticuerpos.

Las proteínas del HTLV III que inducen la aparición de anticuerpos en los sujetos expuestos al virus son:

-p 55, p 24 y pp 17: son proteínas del core o núcleo viral. El principal antígeno del core es una proteína de 24.000 daltons de peso molecular (p 24) fácil de aislar y de purificar.

-gp 160, gp 120 y gp 41: son proteínas de la cubierta o envoltura viral. Son glicoproteínas dificiles de aislar ya que con frecuencia se desprenden del virión o se desnaturalizan. La proncipal reactividad de los sueros de las personas expuestas al HTLV III parece orientarse hacia una glicoproteína de 41.000 daltons de peso molecular (gp 41), aunque en la mayoría de las ocasiones también reaccionan con la

p 24 (SCHUPBACH, J, y cols., 1.984; SARNGADHARAN, M.G. y cols., 1.984).

-p 27, codificada por el gen 3,orf tiene una muy baja inmunogenicidad.

Los test inmunodiagnósticos corrientemente usados para demostrar la exposición al HTLV III en pacientes, grupos de riesgo y donantes de sangre incluyen el ELISA o enzimoinmunoanálisis; el inmunoblot o Western Blot (GALLO, R.C. y cols., 1.984); el radioinmunoanálisis o RIA y la inmunofluorescencia (SANDSTROM, E.G. y cols., 1.985). A continuación los describimos brevemente:

a) Western Blot: Los lisados del virión se fijan a una placa del gel de poliacrilamida y sus proteínas se separan por electroforesis a la vez que se las hace reaccionar con el suero humano. Las manchas resultantes (blots) son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y los complejos antígeno-anticuerpo son identificados mediante el uso de una proteína marcada con un isótopo radioactivo y que presenta afinidad de unión a estos complejos. Se detectan, los anticuerpos frente a las proteínas víricas concretas.

Hasta ahora es la técnica más sensible, pues detecta anticuerpos en todos los pacientes de SIDA.

El Western Blot puede considerarse como una prueba confirmatoria cuando en el suero se detectan proteínas cuyo perfil se ajusta al rango de tamaños esperados (41 kd, 24 kd, etc). Sin embargo, cuando el Western Blot solo revela una o dos proteínas, o proteínas que varían en la intensidad o en los patrones de migración, puede resultar difícil establecer su especificidad con certeza. Cuando se utilizan homogeneizados de células infectadas como antígeno, es posible observar reacciones que incluyen a la gp 120, gp 160 o ambas, lo cual aumenta sustancialmente el nivel de confianza; pero con el inconveniente de que el test en mucho más embarazoso porque hay que mantener una fuente de células infectadas y no infectadas y por la difícil visualización de la reactividad frente a la gp 120 en el blotting.

b) Enzimoinmunoanálisis (ELISA): el virus HTLV III se propaga en la linea H9 de los linfocitos T, se fracciona y se inactiva mediante detergentes y ultrasonido. Una vez fraccionado se recubren esferas de plástico (ABBOTT) o bien pocillos labrados en placas de plástico (WELLCOME). Las esferas recubiertas o los pocillos con el virus adsorbido se incuban con suero humano. Si los anticuerpos frente al HTLV III están presentes, se unen al virus y permanecen después del lavado de la esfera o del pocillo. A continuación se aña-

de suero antiinmunoglobulina humana con enzima ligada y por último se añade un sustrato que es atacado por la enzima desarrollándose un color, que se registra como índice de la positividad de la prueba (CRUN-VEZINET, F. y cols., 1.984). Mide, pues, anticuerpos frente a todas las proteínas víricas. La prueba se realiza rápidamente y parece ser el método de elección para analizar la sangre de los donantes. Es el método más difundido para la detección de anticuerpos anti-HTLV III por su sensibilidad, fácil manipulación y posible automatización, siendo de gran utilidad en estudios epidemiológicos. Sin embargo, éste método no es suficientemente sensible para detectar la presencia de anticuerpos en todas las personas infectadas por el HTLV III, ya que en una pequeña proporción sólo pueden detectarse por técnicas más sensibles. Por otra parte, se ha descrito la existencia de reacciones falsamente positivas debido a la contaminación del extracto vírico con proteínas de origen celular como las moléculas de clase II del sistema HLA (KUHL, P. y cols., 1.985). Ello implica que toda reacción positiva por ELISA debe corroborarse con otra técnica (Western Blot, radioinmunoanálisis), especialmente en las personas pertenecientes a grupos de riesgo que, por su hábito de vida o como consecuencia de la terapéutica, están sometidas a continuos estímulos antigénicos.

Recientemente (ABBOTT, 1.986) se ha desarrollado un ELISA para la confirmación de las muestras encontradas positivas para los anticuerpos anti HTLV III. Este ELISA confirmatorio detecta los anticuerpos dirigidos directamente contra las proteínas de envoltura y del cuerpo viral. Se ha demostrado, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, que la gp 41 y la gp 160 comparten determinantes antigénicos, lo mismo que la p 24 y la p 55 (VERONESE, F.D. y cols., 1.985). En este test se utiliza la tecnología del DNA recombinante para codificar las proteínas que recubren las esferas utilizadas en el ELISA, de manera que hay dos sistemas en fase sólida, en uno las esferas están recubiertas por una proteína codificada que contiene todos los aminoácidos de la gp 41 y una parte de los de la gp 120; en el segundo la esfera está recubierta por una proteína que contiene una parte de los aminoácidos de la p 17, todos los aminoácidos de la p 24 y una parte de los aminoácidos de la p 55. La primera esfera detectará anticuerpos dirigidos contra la gp 160 y la gp 41. La segunda esfera detectará anticuerpos dirigidos contra la p 24 y la p 55. Además todas las muestras se prueban por duplicado.

Se han realizado estudios multicéntricos con las muestras encontradas en el ELISA anti-HTLV III

como positivas. Estras muestras fueron estudiadas posteriormente con Western Blot y con el ELISA confirmatorio. Todas las muestras encontradas positivas por el Western Blot fueron positivas en el ELISA confirmatorio. Un pequeño número de muestras resultaron positivas en el ELISA confirmatorio y negativas o indeterminadas en el Western Blot, estas muestras resultaron ser positivas al ser analizadas con inmunofluorescencia. Se estima, pues, que tanto la especificidad como la sensibilidad del ELISA confirmatorio se aproximan al 100%, superando pues, al Western Blot, en el que además se han encontrado resultados falsos positivos en estudios recientes (BIBERFELD, G. y cols; BURKE, D.S. y cols., 1.986).

c) Radioinmunoanálisis: se utiliza un extracto vírica, marcado con un isótopo radiactivo que se incuba con el suero y seguidamente se procede a una electroforesis en poliacrilamida que con el suero. También se pueden utilizar proteínas aisladas, habitualmente la p 24.

El radioinmunoanálisis es una técnica rápida y precisa (KALYANARAMAN, U.S. y cols; 1.984). Utilizando homogeneizados de virus completos aparece como el test disponible más específico porque permite la visualización de la reactividad frente a todas las proteínas del HTLV-III a la vez. Sin embargo es una prueba muy embarazosa y cara

y sólo podrá estar disponible en un próximo futuro, excepto en un limitado número de laboratorios de investigación que la realizan rutinariamente. Utilizando proteínas aisladas (p 24) la prueba se hace más sencilla pero sólo mide anticuerpos frente a una proteína vírica, disminuyendo su sensibilidad.

d) Inmunofluorescencia (de membrana y citoplasmática):

Se trata de una inmunofluorescencia indirecta en la cual se hace reaccionar el suero problema con células infectadas por el virus utilizando una antiinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína en forma de "sandwich" (CHEISONG-POPOV, R. y cols., 1.984). Fue la primera prueba definitiva que relacionó la reactividad sérica humana con las células infectadas por HTLV-III (ESSEX, M, y cols., 1.983).

Aunque las inmunofluorescencias de membrana y la citoplásmica aparezcan como un buen método de trabajo en laboratorios de investigación y de referencia, lo cierto es que son técnicas bastante embarazosas debido a la necesidad de mantener una fuente constante de células. La especificidad también puede constituir un problema, y el test puede ser que no sea conveniente para aquellos sueros que contienen anticuerpos frente a las células normales no infectadas.

Un pequeño porcentaje de portadores infectados con el HTLV III/LAV contienen virus en ausencia de anticuerpos que puedan ser detectados utilizando las técnicas reseñadas anteriormente (SALAHUDDIN; S.Z. y cols., 1.984). La razón de estos hallazgos no está clara, pero su conocimiento puede ser de gran interés puesto que representa una fuente potencial de sangre infectada en donaciones que no es detectada por los tests convencionales de anticuerpos.

e) Relación entre la seropositividad y la infección por HTL/ III: Una vez que se han detectado anticuerpos frente al HTLV III se nos plantea el problema de la relación existente entre la positividad de los anticuerpos y el desarrollo posterior de la enfermedad. Los estudios realizados sugieren que un alto porcentaje de sujetos seropositivos adquirirán inmunidad, como lo demuestra el hecho de que numerosos sujetos seropositivos seguidos durante años no han enfermado aún.

En el SIDA establecido puede aislarse el virus y en la mayoría de los casos se encuentran anticuerpos, por lo que puede deducirse que éstos no protegen al paciente de la enfermedad, en cuyos últimos estadios llegan incluso a desaparecer y cuando los hay son frente a la gp 41 sobre todo

(LAURENCE, J. y cols., 1.984).

En los pacientes con el síndrome linfadenopático se aísla con facilidad el virus y se encuentran anticuerpos de fácil detección. Parece que intentan controlar la infección mediante una hiperplasia ganglionar reactiva y, dado el pequeño número de estos sujetos que desarrollan SIDA con posterioridad, puede suponerse que algunos han vencido la enfermedad aunque hacen falta estudios más prolongados. De todas maneras es posible considerarlos como sujetos portadores al igual que otros sujetos pertenecientes a grupos de riesgo (BARRE-SINOUSSI, F. y cols., 1.983). Recientemente se ha visto que los anticuerpos anti-HTLV III pueden tener poder neutralizante sobre el virus (HO, D.D. y cols., 1.985). La producción de anticuerpos depende de la integridad del sistema inmune. Los pacientes de SIDA con sarcoma de kaposi tienen una prevalencia más alta de anticuerpos anti HTLV III que los pacientes de SIDA con infecciones oportunistas (KALYANARAMAN, V.S. y cols., 1.984) lo cual concuerda con la observación de que los pacientes con sarcoma de kaposi están menos inmunodeprimidos que los que padecen infecciones oportunistas.

Se ha calculado que la proporción de las

personas seropositivas que evolucionan a un SIDA en un período de 5 años es del orden del 4-19% (MELBYE, M. y cols., 1.984).

VII. SEROPREVALENCIA DEL HTLV-III.

A partir del aislamiento primero en Francia del LAV (BARRE-SINOUSSI, F. y cols., 1.983) y un poco más tarde en Estados Unidos del HTLV III (POPOVIC, M. y cols., 1.984) se desarrollaron rápidamente pruebas de detección de anticuerpos frente a estos virus.

Por su sencillez, ser rápida y de relativo bajo coste, se eligió el ELISA como prueba de detección de la seropositividad frente al HTLV III/LAV en pacientes de SIDA, sujetos con síndrome linfadenopático, sujetos de riesgo para SIDA y sobre todo en donantes de sangre como medio de eliminar a posibles sujetos transmisores del síndrome. (SARNGADHARAN, M.G. y cols., 1.984). Varios laboratorios se lanzaron a la fabricación de kits de ELISA anti HTLV III/LAV que han sido probados en numerosos estudios (ABB, J. 1.986; PETRICCIANI, J.C. 1.985) de los que se deduce una sensibilidad y especificidad con pocas diferencias entre las diversas marcas y que en todos los casos superan el 95%. Naturalmente los resultados positivos tienen que ser confirmados con pruebas más específicas y teniendo en cuenta que los sujetos seronegativos pueden ser portadores del virus.

Diversos autores han estudiado la prevalencia de anticuerpos anti HTLV III en pacientes con SIDA,

pacientes con el Complejo Relacionado con el SIDA, sujetos pertenecientes a diversos grupos de riesgo, donantes de sangre y personas sin factor de riesgo conocido (ESTEBAN, R. y cols., 1.986; CHEISONG-POPOV, R. y cols., 1.985; LATORRE, X. y cols., 1.985; MORTIMER, P.P. y cols., 1.985).

Los resultados de los análisis efectuados se resumen en que más del 90% de todos los pacientes de SIDA y CRS eran seropositivos, en contraste con lo encontrado en el caso de los donantes sanos y en personas con enfermedades no relacionadas con el SIDA, que eran seronegativos.

Los porcentajes de seropositividad encontrados en los distintos grupos de riesgo varían según los autores y los países estudiados aunque se observa un aumento a lo largo del tiempo, mucho más marcado en los drogadictos intravenosos (por ejemplo en Gran Bretaña se pasó del 1,5% de drogadictos seropositivos en 1.983 a un 6,4% en 1.985 y en el estado de Nueva York del 29-45% en 1.982 al 87% en 1.984).

En el momento actual se desconoce si la presencia de anticuerpos frente al HTLV III/LAV es un factor pronóstico, si está asociado a la capacidad de transmitir el SIDA o a una eventual predisposición a padecerlo. Sin embargo, es un indicativo de que ha exis-

TABLA 12

SEROPREVALENCIA DEL HTLV-III SEGUN GRUPOS DE RIESGO Y LOCALIZACION GEOGRAFICA

PAIS	AÑO	Nº TOTAL ESTUDIADO	SEROPOSITIVOS HTLV-III(%)
	HOMOSEXUALES		
Estados Unidos:			
Nueva York	1985	85	65
San Francisco	1984	435	67
Washington	1985	160	44
Boston	1982/3	160	21
Canadá:			
Montreal	1984	209	18
Vancouver	1984	318	25
Dinamarca	1984	131	26
Inglaterra(Londres)	1984	308	17
Holanda	1982	697	4
Noruega	1984	47	6
Alemania(Berlín)	1984	496	27
Finlandia	1983/4	175	15
Suecia	NE	78	8
Suiza	NE	40	10
Francia(París)	NE	44	18
Italia(Roma)	NE	70	9
Australia	1984	49	20

DROGADICTOS POR VIA PARENTERAL

Estados Unidos:			
Nueva York	1984	273	60
Nueva Jersey	1984	NE	50
Boston	1982/3	69	42
Italia:			
Roma	NE	128	20
Milán	NE	71	23
Cagliari	NE	30	17
Suiza	1985	37	32
Inglaterra	1985	236	6
España	1985	75	48
Alemania(Berlín)	1982	496	22
Australia	1984	126	33

HEMOFILICOS

Estados Unidos:			
Pennsylvania	1985	121	59
Los Angeles	1984	42	50
Georgia	NE	25	72
Massachussets	NE	47	64
Dinamarca	1984	22	64
Alemania	1984	40	53
Inglaterra	1982/4	184	34
Escocia	1984	77	16
Canadá	NE	54	56

DONANTES DE SANGRE

Estados Unidos:	1985	1.027.786	0,2
	1985	593.831	0,25
España	1985	2.142	0,23
Alemania:			
Hesse	1984	4.445	0,47
6 ciudades	1984	6.720	0,52
Suiza	NE	83	0,00
Suecia	NE	300	0,00
Dinamarca	1982	69	0,00
Finlandia	1985	20.000	0,005
Brasil	1985	1.469	0,13

(Tomada de MELBYE, M. en British Medical Journal.ED ESP. Volumen I. Jul-Ago 1986; pags 20-21)

tido una infacción previa por el virus, y su determinación puede ser de utilidad para identificar las personas posibles portadoras del mismo.

Una vez que se ha efectuado la prueba para los anticuerpos HTLV III/LAV y ésta ha resultado positiva, se nos plantea el problema de qué hacer con los sujetos seropositivos. En los Estados Unidos, país donde el SIDA constituye una verdadera epidemia y hay una gran concienciación pública, se siguen las siguientes recomendaciones (COUNCIL REPORT, 1.985):

-Los sujetos seropositivos deben ser informados de su condición y puestos en contacto con médicos dotados de práctica y experiencia que controlen la evolución del paciente vigilando la posible aparición de signos y síntomas de SIDA o alteraciones relacionadas.

-Serán informados de loa manifestaciones precoces de SIDA y de que si se presentan éstas, requieren atención médica.

-Se les comunicará que el pronóstico para un individuo infectado por el HTLV-III es desconocido. Sin embargo se les dirá que la mayoría de las personas permanecen infectadas, pero asintomáticas.

-Deberan pasar revisión médica por lo menos dos veces

al año y más frecuentemente si desarrollan sintomatología de SIDA o de complejo relacionado con el SIDA.

-Se les dirá que aunque no presenten síntomas, constituyen un riesgo de infección para otras personas a través de contactos sexuales e intercambio de agujas. Se les recomendará el uso del condón como prevención de la infección por vía sexual.

-No deben intercambiar cepillos de dientes, cuchillas de afeitar y utensilios que puedan estar contaminados con sangre.

-Las parejas sexuales de sujetos seropositivos tienen que ser informadas del riesgo que tienen de contraer la infección por HTLV-III a través de su pareja.

-Se les informará que los contactos normales entre familiares no se ha demostrado que supongan riesgo de infección.

-En caso de heridas sangrantes, las superficies contaminadas deben lavarse con lejía.

-Si utilizan agujas hipodérmicas o de acupuntura, éstas deben ser esterilizadas con autoclave o desechadas.

-En caso de que el sujeto reciba atención médica o

dental, debe comunicar su condición de seropositivo para el HTLV-III, para una correcta evaluación y para tomar las debidas precauciones.

-Se les debe avisar que en la mayoría de los casos no hace falta que cambien de empleo. Sin embargo, aquellas personas cuyo trabajo implica una exposición potencial de otras personas a su sangre o a otros fluidos corporales, deben tomar precauciones tales como usar guantes.

-Si trabajan en profesiones de asistencia médica o dental que implican la aparición de lesiones cutáneas, deben tomar precauciones como las recomendadas para la hepatitis B para proteger a sus pacientes del riesgo de infección.

-Por supuesto, no deben donar sangre, plasma, semen u órganos.

-Por último se les informará también del riesgo de transmisión del HTLV-III a su descendencia.

VIII. INSTITUCIONES PENITENCIARIAS

Debido a que nuestro estudio se llevó a cabo, principalmente, en internos de prisión, creemos que es obligado hacer referencia, aunque breve, a las principales características de los centros que acogen a éstos sujetos y a las de éstos últimos como integrantes de una colectividad bien definida.

En este caso el centro objeto de nuestro trabajo fue la Prisión Provincial de Granada, situada a escasa distancia de la Facultad de Medicina, condición que favoreció la realización inmediata de ensayos que no permiten una larga espera (ej. subpoblaciones linfocitarias). Pues bien, la Prisión Provincial de Granada, al igual que el resto de las Instituciones Penitenciarias de España, depende para su funcionamiento de la Dirección General de Instituciones Penitenciarias que, a su vez, está integrada en el Ministerio de Justicia. Esta dependencia se ha desviado desde hace algunos años de la capital a la periferia, puesto que ciertas competencias de orden administrativo se han ido transfiriendo progresivamente a las diferentes comunidades autónomas y, entre ellas, a Andalucía.

Las diversas funciones que cumplen las Instituciones Penitenciarias vienen fijadas por ley y se pueden resumir brevemente en:

-Hacer que se cumplan las penas impuestas por los jueces en las correspondientes sentencias (lo que no impide que las penas se vean frecuentemente reducidas por buen comportamiento y en ocasión de indultos).

-Procurar, en la medida de lo posible, la modificación de los hábitos de conducta (delictivos) de los reclusos con el fin de que se puedan reintegrar a la sociedad con la confianza de que no volverán a delinquir.

Naturalmente, el primer objetivo es relativamente fácil de cumplir y en años pretéritos la función de las cárceles españolas (y de los demás países) estaba reducida a conseguir que se cumplieran las penas ante todo. se tenía un concepto de la cárcel como lugar de castigo: eran simolemente lugares de reclusión, de privación de libertad, sin más.

Sin embargo, en nuestra actual legislación se da más importancia a la función "reeducadora" de la prisión, tomando conciencia de que hasta ahora, debido a sus peculiares características, las cárceles se convertían en verdaderas escuelas del acto delictivo y que la función de "castigo" no impedía que los reclusos, una vez en la calle, volvieran a cometer delitos.

En cuanto a la prisión de nuestra capital, la población reclusa que la compone consta de sujetos

que cumplen condenas más o menos largas y preventivos, sujetos que pasan a prisión a la espera de que se celebren los juiciosde la causa o causas en que están implicados.

Tanto penados como preventivos, en general, pertenecen a grupos marginados por la sociedad: suelen ser de clase socioeconómica baja, pobre nivel educativo, su situación laboral más corriente es la del paro o, como mucho, tienen empleos ocasionales. La situación familiar tampoco suele ser favorable, frecuentemente es origen de conflictos. Todo ello se enmarca en el lugar de residencia, pues suelen habitar en zonas o barrios de "mala reputación", donde abunda la delincuencia como forma corriente de vida y en todas sus variantes: droga, prostitución, robo,..

LLama la atención el alto porcentaje de individuos de raza gitana (con su eterno problema de marginación y automarginación) y de extranjeros. Estos últimos, desde hace algunos años, han empezado a constituir un grupo relativamente numeroso de reclusos en nuestra prisión provincial y en otras de nuestro país. Sus características difieren bastante de los internos indígenas (en cuanto a su nivel socioeconómico y cultural) y la mayoría de ellos se encuentran ingresados por delitos relacionados directamente con la drogadicción (Tráfico de drogas).

Las características de la mayoría de los internos de nuestras prisiones hacen que en un gran porcentaje sean reincidentes, repitiendo una y otra vez sus estancias en la institución, a la que progresivamente se adaptan, de forma que procuran no originar problemas buscando pasar la condena o el tiempo de prevención en las mejores condiciones posibles: saben que el buen comportamiento conlleva reducción de penas, mayor frecuencia de visitas y la posible salida bajo libertad vigilada.

Sin embargo, algunos intentan la fuga y como medio para conseguirlo no dudan en producirse autolesiones con el fin de obtener su traslado a centros sanitarios, en los que piensan que la huída, a veces contando con ayuda exterior, será más factible. Son frecuentes, pues, los cortes en venas y la ingestión de lo más diversos utensilios, así como el fingimiento de trastornos siquiátricos con este único fin.

Una característica que nos sorprendió enormemente de la población reclusa es la frecuentísima demanda de servicios médicos que plantea este colectivo. En la prisión de Granada cuentan con un médico (pronto habrá dos) que tiene consulta mañana y tarde y que está permanentemente localizado, 2 diplomados de enfermería (en turnos de mañana y tarde y estando siempre uno de los dos localizado), una auxiliar y un

dentista con una consulta a la semana. Pues bien, nos pareció verdaderamente poco corriente que poco más de 300 sujetos acudan con tanta frecuencia alla enfermería, cuando lo habitual estando en libertad, es que se olviden por completo de sus posibles dolencias. Deducimos que la explicación de este hecho no está en una salud deficiente de los reclusos sino que sus visitas tienen, en un alto porcentaje de casos, un motivo "interesado" como puede ser simplemente pasar el tiempo, preguntarle al médico cómo va su causa, pedir el traslado a un hospital general o psiquiátrico o incluso obtener alguna pastilla para venderla a algún compañero.

Por otra parte, la situación de aislamiento del exterior, el alejamiento de la familia y de los amigos, a veces el ambiente hostil que preside las relaciones entre reclusos y la constante sensación de encierro y coartación de libertades hacen que los internos caigan en situaciones emocionales proclives al consumo de sustancias tóxicas como forma de autoevasión. Para conseguirlas están dispuestos a cualquier cosa como fingir lesiones, dolores para obtener algún analgésico de la enfermería y también hay que contar con mecanismos poco claros, entre los que están el "hallazgo" de pequeños paquetes en los patios y que son arrojados desde fuera y otras formas de introducción de droga difíciles de detectar, pero que sin duda existen.

Este compulsivo consumo de tóxicos se enmarca dentro de una conducta que a veces es de autodestrucción, como lo revela los frecuentes intentos "de verdad" de suicidio y, la mayoría de las ocasiones, como única forma disponible de escapar a la realidad diaria y monótona de la prisión.

Así, en informe de Garcia Valdés al Congreso de los Diputados en 1.981, se recoge que entre el 60 y el 90% de los reclusos españoles consume drogas, principalmente haschiff, aunque no de forma habitual, sino ocasionalmente.

En un estudio realizado por nuestro Departamento durante el segundo semestre de 1.984 que comprendía las prisiones de Andalucía Oriental, se comprobó que sobre un total de 483 reclusos, 330 consumían algún tipo de droga (68,3%) y de ellos 166 (34,3%) utilizaban la vía parenteral para su consumo. Claro que los internos contestaban refiriéndose a que se drogaban en los períodos de tiempo en que se encontraban en libertad, retrayéndose a la hora de confesar que también consumían drogas en el interior de la prisión.

La situación en cárceles de otros países es similar y así en Italia, CHIARAMONTE en un estudio de 282 reclusos encuentra que se drogan el 21% y en Noruega Hurlen, B. y cols. (1.984) encuentran que en 138 reclusos hay 61 (45%) que se drogan.

Dentro de nuestro país, BARRERA, J.M. y cols. (1.986) estudian 100 presos en Barcelona de los que 48 son drogadictos intravenosos (48%).

La alta tasa de drogadicción presente en las cárceles puede también deducirse indirectamente por la alta prevalencia de marcadores de hepatitis B que se encuentra entre estos sujetos (61% de los reclusos pertenecientes al estudio llevado a cabo por nuestro Departamento en 1.984 los presentaban).

Está claro, por tanto, que la prisión supone un lugar de concentración de drogadictos parenterales, los cuales en Estados Unidos, constituyen el segundo grupo de riesgo en frecuencia (17% de los casos) para el SIDA (SELIK, R.M. y cols. 1.984) y en España constituyen el grupo de riesgo más importante para el padecimiento del síndrome, de modo que, hacia Marzo de 1.986, prácticamente el 50% de los casos de SIDA registrados en España se habían dado entre sujetos que eran drogadictos intra venosos como único factor de riesgo (Bol. epidem. semanal. nº 1.724).

Una vez conocida la enorme importancia que tenían los drogadictos parenterales españoles en la transmisión del virus del SIDA, se empezaron a realizar estudios de seroepidemiología en este colectivo (RODRIGO, J.M. y cols., MUGA, R. y cols., ESTEBAN, R. y cols. 1.986).

En todos estos estudios se han encontrado prevalencias elevadas de anticuerpos anti HTLV III en drogadictos, de hasta un 61% de seropositivos (ZULAICA, D. y cols., 1.985).

La alta prevalencia de anticuerpos anti HTLV III encontrada en drogadictos parenterales se explica por la vía de transmisión del virus y porque este colectivo tiene unas pautas de conducta que favorecen la infección por el HTLV III, como es el intercambio de jeringuillas (DES JARCAIS y cols., 1.985), práctica que se realiza con asiduidad a pesar de los años que se les viene insistiendo en el riesgo que ésto conlleva para la hepatitis B. El intercambio de jeringuillas es una práctica que se incrementa de forma extraordinaria en prisión, pues es notorio que no está al alcance de los internos conseguir jeringuillas desechables y no están dispuestos a desprenderse de las pocas que poseen. Por otra parte, el estado de apatía y desinterés en que se hallan inmersos hacen que se despreocupen de tomar medidas higiénicas que salvaguarden la salud de sus compañeros y la de ellos mismos.

OBJETIVOS

Debido a la creciente preocupación en nuestra sociedad y, más concretamente, en el medio penitenciario por el avance de la nueva enfermedad conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), nos propusimos investigar la difusión de su agente productor, el HTLV III (ahora denominado HIV) entre la población reclusa de la Prisión Provincial de Granada.

Los objetivos de nuestra tesis son:

1.Estudiar la prevalencia de anticuerpos frente al HTLV III entre los individuos de la muestra utilizando la técnica de ELISA y comprobando los resultados mediante una prueba confirmatoria.

2.Comprobar los factores de riesgo para la infección por el HTLV III presentes en la población estudiada, valorando su importancia relativa en relación con la aparición de anticuerpos frente al virus.

3.Establecer las posibles relaciones entre la seropositividad para el HTLV III y la presencia de sintomatología descrita para el Complejo Relacionado con el SIDA (CRS), haciendo un seguimiento clínico longitudinal de los sujetos seropositivos.

4.Investigar diversos parámetros serológicos

frente a los agentes patógenos más frecuentemente descritos en enfermos de SIDA, comparando los resultados obtenidos en los seropositivos para el HTLV III con los encontrados en los seronegativos.

5.Investigar el estado de la inmunidad celular en los individuos de la muestra mediante el estudio de las subpoblaciones linfocitarias, viendo las posibles diferencias entre seropositivos y seronegativos para el HTLV III.

6.Por último, nuestra tarea primordial fué reconocer a los sujetos portadores de anticuerpos, informar a los servicios médicos de los que dependen y proporcionar a los afectados los conocimientos preventivos oportunos con el fin de atajar en lo posible la progresiva difusión del HTLV III en nuestras prisiones.

MATERIAL

Y

METODOS

MATERIAL

Para realizar nuestro trabajo nos planteamos la necesidad de contar con una población minimamente estable en el tiempo y en el espacio, por lo que nos dirigimos a la Prisión Provincial de Granada. Esto no ocurrió casualmente, pues ya contábamos con dos experiencias anteriores en las que se nos ofreció colaboración desinteresada por parte de la dirección y de los servicios médicos de éste establecimiento penitenciario.

Nos pusimos en contacto con el médico de la prisión y, una vez que conoció nuestra idea, se ofreció a colaborar desde el primer momento, poniendo a nuestra disposición la enfermería del centro e informando a los internos de las características de nuestro estudio instándoles a que participaran en él.

Posteriormente, una circular de la Dirección General de Instituciones Penitenciarias, aconsejaba a los servicios médicos de prisiones que prestaran colaboración a todas aquellas entidades de ámbito sanitario que se ofrecieran a determinar anticuerpos anti HTLV/LAV entre la población reclusa, siempre que, una vez realizados los análisis, los resultados fueran comunicados a dichos servicios médicos y con carácter estrictamente confidencial.

Una vez en la prisión y, aunque los internos fueron previamente informados por el médico, comunicamos personalmente a cada sujeto el objetivo de nuestro estudio, explicando lo más claramente posible el significado de los resultados que pudiera deparar. Todos ellos se prestaron voluntariamente a la realización de los análisis. Así pues, contábamos ya con una población relativamente fácil de estudiar en su evolución clínica durante un tiempo más o menos extenso, que es lo que nos interesaba.

Al poco tiempo obtuvimos también la colaboración de un centro de deshabituación de toxicómanos, ya que estaban interesados en conocer los marcadores de hepatitis y anticuerpos anti-HTLV III/LAV en los miembros de su comunidad. El tratamiento de deshabituación tiene una duración de varios meses, durante los cuales son vigilados por el médico de que dispone el centro. Es por ello que esta población de ex-heroinómanos, aunque de pequeña magnitud, nos pareció interesante para nuestro estudio y hasta superponible con la población reclusa por la elevada incidencia de drogadicción en ésta última.

La población estudiada se compone, por tanto, de 120 individuos:

-108 internos de la Prisión Provincial de Granada.

- 12 exheroinómanos en tratamiento de deshabituación.

En cuanto a los primeros, y refiriéndonos a los aspectos socioculturales, hay que decir que la mayoría tiene un nivel de instrucción bajo pues casi la mitad son analfabetos y el resto sólo poseen estudios primarios, siendo pocos los que poseen estudios medios o título universitario. Su cualificación laboral es, por tanto, escasa o nula engrosando la mayoría de ellos las filas del paro (cuando no están en prisión).

La alta tasa de paro entre ellos y la necesidad de droga en muchos casos, son las causas que les inducen a delinquir (generalmente cometiendo robos) y a ingresar por tanto en prisión.

El medio ambiente que les rodea es la Prisión Provincial de Granada, construida en 1.931 y con una superficie total de 10.659 metros cuadrados. La capacidad real es de unos 200 reclusos, aunque lo más habitual es que convivan más de 300, lo que conlleva un cierto grado de hacinamiento aunque sin resultar agobiante.

En el caso de los sujetos en tratamiento de deshabituación, su medio ambiente se compone de una gran-

ja en la montaña y en un amplio apartamento en el extrarradio de nuestra ciudad. En ambos lugares se ven aislados de la heroína y se apoyan en el compañerismo y la comprensión mutua para conseguir pasar el duro síndrome de privación o "mono", siempre bajo la mirada atenta y los cuidados del médico con experiencia en estos casos.

Su estancia en el centro es totalmente voluntaria, lo cual es fundamental en el éxito posterior del tratamiento, ya que si el sujeto no se somete al mismo con la firme convicción de dejar para siempre la droga, recaerá en ella indefectiblemente. El tratamiento se prolonga durante varios meses y una vez que se encuentran física y mentalmente recuperados se reintegran a la convivencia en la sociedad, confiando en que son lo bastante fuertes como para resistir la tentación de caer nuevamente en la droga, aunque la verdad es que un elevado porcentaje de ellos reinciden.

Una vez seleccionada la población objeto de nuestro estudio, elaboramos el siguiente protocolo que consta de dos partes:

1ª Encuesta epidemiológica.
2ª Datos de laboratorio.

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA

Nº REGISTRO:

DATOS DE FILIACION:

1ºAPELLIDO:

2ºAPELLIDO:

NOMBRE:

SEXO: EDAD: ESTADO CIVIL:

HABITOS SEXUALES:

-Relación heterosexual:

1.Sólo con su pareja.

2.Promiscuidad .....

-Relación homosexual:

1.Sí 2.No .....

-¿Desde cuándo practica la homosexualidad?

(reseñar el nº de años) .....

-¿Las prácticas homosexuales comenzaron antes de ingresar en prisión?

1.Sí 2.No .....

-Actitud en el acto sexual(homosexual):

1.Pasiva 2.Activa .....

-Relación bisexual:

1.Sí 2.No .....

ANTECEDENTES DE CONTACTO:

-Ha donado sangre?

1.Sí 2.No .....

-¿Ha recibido alguna transfusión?

1.Sí 2.No .....

-¿Consume drogas por vía parenteral?

1.Sí 2.No .....

-En caso afirmativo: ¿inició su consumo antes de ingresar en prisión?

1.Sí 2.No

ESTADO ACTUAL: (los signos/síntomas deben estar presentes por 3 o más meses y sin causa conocida):

-Linfadenopatía generalizada:

1.Sí 2.No .....

-Pérdida de peso mayor de 7 Kg o mayor del 10% del peso normal:

1.Sí 2.No .....

-Fiebre mayor de 38ºC intermitente o contínua:

1.Sí 2.No .....

-Diarrea crónica:

1.Sí 2.No .....

1) En el apartado de hábitos, cuando preguntamos si su relación es heterosexual con promiscuidad, nos referimos a si habitualmente mantienen relaciones sexuales con diferentes (y múltiples) sujetos del sexo opuesto.

En el caso de que su tipo de relación sexual habitual ocurra con sujetos de su mismo sexo, preguntamos si su actitud durante el acto sexual es pasiva (entendiendo que la pareja introduzca su pene en el ano-recto del sujeto entrevistado), o activa cuando toma la actitud opuesta.

2) En el apartado de los antecedentes de contacto nos interesa, sobre todo, la posible vía de entrada parenteral: si es o ha sido donante o receptor de sangre o hemoderivados alguna vez, así como si se inyecta drogas. Igualmente nos interesa saber si lo hacía antes de ingresar por primera vez en prisión, en relación a saber si ésta es lugar de iniciación de toxicomanías o no.

También preguntamos si antes de hacerse drogadicto parenteral consumía otro tipo de droga, como pueden ser los "porros", "pastillas"...etc, como medio de conocer si realmente las llamadas "drogas blandas" constituyen en realidad el camino más corto y seguro hacia la heroinomanía.

También, en este mismo apartado, nos interesaron la presencia o no de tatuajes, considerándolos como vía de entrada de diversas infecciones.

3) En el tercer y último apartado hacemos referencia a la sintomatología y signos clínicos que forman parte del denominado " Complejo Relacionado con el SIDA " referido por el Center Disease Control de Atlanta, aunque teniendo en cuenta dos puntualizaciones:

1. No preguntamos si los sujetos presentaban debilidad o fatiga, pues comprobamos pronto que la respuesta tendía a ser positiva en la mayoría de los casos. Recogimos este dato si objetivamente lo reconocíamos.

2) Tampoco inquirimos por los sudores nocturnos por la misma razón; sólo lo constatábamos si el sujeto lo refería espontáneamente.

Por lo tanto, escogimos los datos más facilmente objetivables y que presentaban menor posibilidad de error. Los signos y sintomas deben estar presentes por lo menos desde hace 3 meses y son:

- Linfadenopatía generalizada: existencia de ganglios de más de 1 cm de diámetro en dos o más localizaciones extrainguinales.
- Pérdida de peso mayor de 7 u 8 Kg o más del 10% del peso corporal.
- Fiebre contínua o intermitente de 38ºC o más.
- Diarrea crónica: diarrea frecuente en los últimos tres meses.

La evolución de éstos sintomas y signos era controlada con asiduidad durante el tiempo que los reclusos permanecían en prisión y procurando, dentro de lo posible, la máxima objetividad en su recogida.

Esta encuesta epidemiológica fue realizada a todos los sujetos de nuestro estudio de forma individual, poniendo énfasis en que era voluntaria y absolutamente confidencial.

Debido a la concienciación general que ha motivado en la sociedad y, sobre todo, en grupos de alto riesgo la problemática del SIDA, no fue difícil obtener la colaboración de éste colectivo aunque a veces presentaban considerables dificultades en llegar a comprender el significado del estudio y de los posibles resultados.

Una vez realizada la encuesta, se procedia a la extracción, a cada uno de los sujetos, de 15 cc de sangre periférica para la realización de los correspondientes estudios sero, inmuno y hematológicos que se reflejan en la siguiente hoja de datos de laboratorio:

DATOS DE LABORATORIO

1)Anticuerpos frente al HTLV III/LAV:

1.Negativo 2.Positivo .....

2)Test confirmatorio (de los positivos en la prueba anterior):

1.Negativo 2.positivo .....

3)Marcadores de Hepatitis B:

3.1.Antígeno de superficie del VHB:

1.Negativo 2.Positivo .....

3.2.Anticuerpos frente al antígeno de superficie del VHB:

1.Negativo 2.Positivo .....

3.3.Anticuerpos frente al antígeno del core del VHB:

1.Negativo 2.Positivo .....

4)Anticuerpos frente a Citomegalovirus:

4.1.Título de IgG superior a 1/5.000:

1.Negativo 2.Positivo .....

4.2.Título de IgM superior a 1/40:

1.Negativo 2.Positivo .....

5)Anticuerpos frente al virus del Herpes simple:

5.1.Título de IgG superior a 1/2.000:

1.Negativo 2.Positivo .....

5.2.Título de IgM superior a 1/40:

1.Negativo 2.Positivo .....

6)Virus de Epstein-Barr:

6.1.Test de Paul-Bunnell:

1.Negativo 2.Positivo .....

6.2.Inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos frente al antígeno capsídico del EBV:

1.Negativo 2.Positivo .....

7)Serología de Lúes:

7.1.RPR:

1.Negativo 2.Positivo

7.2.Hemaglutinación:

1.Negativo 2.Positivo .....

7.3.FTA-ABS:

1.Negativo 2.Positivo .....

8)Anticuerpos frente a Toxoplasma gondii:

8.1.Aglutinación directa.Título .....

8.2.Aglutinación con 2-mercaptoetanol.....

8.3.Inmunofluorescencia indirecta(título mayor a 1/200):

1.Negativo 2.Positivo .....

9)Anticuerpos frente a Aspergillus(título mayor a 1/320):

1.Negativo 2.Positivo .....

10)Antígenos capsulares de Cryptococcus neoformans:

1.Negativo 2.Positivo.....

11)Anticuerpos frente a Candida albicans(título igual o mayor a 1/64):

1.Negativo 2Positivo .....

12)Poblaciones de células mononucleadas mediante el uso de los siguientes anticuerpos monoclonales:

12.1.OKT3.

12.2.OKT4.

12.3.OKT8.

12.4.B1.

12.5.M02.

12.6.BMA 070.

13)Estudio del cociente T4/T8.

14)Número de leucocitos totales por mm3.

15)Porcentaje de linfocitos.

16)Número de linfocitos por mm3.

METODOS DE LABORATORIO

A todos los sujetos objeto de nuestro estudio les fueron extraídos 15 ml de sangre mediante veni-puntura en el brazo:

-10 ml para determinaciones serológicas.

- 5 ml para determinaciones inmuno y hematológicas.

I. DETERMINACIONES SEROLOGICAS:

Una vez extraída la sangre (10 ml) y depositada en un tubo debidamente identificado, permanece unas 2 horas a temperatura ambiente para que se produzca la retracción del coágulo de fibrina y sea más fácil la separación del suero.

Una vez transcurrido este tiempo, los tubos son sometidos a centrifugación durante 10 minutos a 1500 r.p.m.

Una vez extraído, el suero (queda en la parte superior del tubo centrifugado) se deposita en pequeños tubos de 11 x 55 mm provistos de tapón y se conservan en nevera a 4ºC si van a ser examinadas esa misma semana.

En el caso de que su análisis vaya a demorarse por más tiempo son congelados a -60ºC.

La relación de pruebas serológicas a las que

fueron sometidos los sueros de los sujetos objeto de nuestro estudio es la siguiente:

I.1- Determinación de anticuerpos frente al virus T- linfotrópico humano tipo III (HTLV-III).

I.2- Test confirmatorio de las muestras encontradas positivas para el anticuerpo frente al HTLV-III.

I.3- Determinación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

I.4- Determinación del anticuerpo específico frente al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs).

I.5- Determinación del anticuerpo específico frente al antígeno del core del virus de la hepatitis B (anti-HBC).

I.6- Determinación de anticuerpos específicos (IgG e IgM) frente a Citomegalovirus. Herpes simplex.

I.7- Determinación de anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr.

I.8- Determinación de anticuerpos frente a Trepone-

ma pallidum (y detección de reaginas: RPR).

I.9- Determinación de anticuerpos frente a Toxoplasma gondii.

I.10-Determinación de anticuerpos frente a Aspergillus.

I.11-Determinación de antígenos capsulares de Cryptococo.

I.12-Determinación de anticuerpos frente a Candida.

II. DETERMINACIONES INMUNOLOGICAS:

Para éstas y para las determinaciones hematológicas vamos a utilizar 5 de los 15 ml de sangre extraída.

Estos 5 ml de sangre se depositan en un tubo de plástico con tapón (Soria-Greiner) dotado de EDTA-dipotásico como anticoagulante.

Se determinaron las subpoblaciones celulares por un ensayo de citotoxicidad directa con anticuerpos monoclonales mediada por complemento.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

- OKT_3
- OKT_4
- OKT_8
- B1
- MO 2
- BMA 070

III. DETERMINACIONES HEMATOLOGICAS:

III.1. Número total de células blancas por mm^3

III.2. Porcentaje de linfocitos con respecto a las células blancas totales.

III.3. Número absoluto de linfocitos por mm^3.

I. DETERMINACIONES SEROLOGICAS

Las determinaciones que conciernen al virus HTLV-III, al virus de la hepatitis B, al citomegalovirus y al virus del herpes fueron realizadas mediante el método de ELISA, que se destaca por su gran sensibilidad y especificidad, presentando otras ventajas notables como son el tener menos problemas en la manipulación de los reactivos, requerir equipos menos costosos y además la vida media de los reactivos es más larga.

En nuestro trabajo los reactivos eran proporcionados por Kits de ABBOT Diagnostics Division (Hepatitis B y HTLV-III) y del Instituto Behring (citomegalovirus y Herpes simple virus).

Métodos Elisa de ABBOT:

Precauciones generales:

-Tratar todos los materiales de los Kits como posibles transmisores de infecciones.
-No pipetear con la boca.
-No fumar o comer cuando se trabaja con muestras o con reactivos del Kits.
-Usar guantes de goma durante la manipulación de los materiales infecciosos y lavarse meticulosamente las manos una vez terminado su uso.
-Los materiales que puedan ser usados nuevamente debe-

rán descontaminarse rápida y meticulosamente con una solución de hipoclorito sódico al 5%.

-Los materiales contaminados y desechables deberán agregarse a los desechos biológicos infecciosos para su eliminación.

-Eliminar los materiales usados para la realización del test como si contuviesen agentes infecciosos. El método recomendado para la descontaminación es usar el autoclave como mínimo durante una hora a 121,5ºC. Los materiales desechables pueden ser incinerados. Los desechos líquidos que no contengan ácido y los desechos neutralizados pueden mezclarse con hipoclorito de sodio al 1%. Dejar 30 minutos para que la descontaminación sea completa.

-Evitar las salpicaduras y la formación aerosoles. Las salpicaduras deberán eliminarse a fondo usando un desinfectante yodóforo o solución de hipoclorito de sodio al 5%.

-No mezclar reactivos de lotes diferentes.

-Evitar la contaminación microbiana de los reactivos cuando se sacan alicuotas de los frascos de reactivos.

-Evitar el contacto de la OPD (o-fenilendiamina . 2 HCL) con la piel y las mucosas. Si ésto ocurre lavar meticulosamente con agua.

-El agua de lavado deberá guardarse en recipientes limpios para prevenir la contaminación con sustancias que inactivan la HRPO (peroxidasa de rábano picante).

-No exponer a los reactivos OPD a la luz fuerte durante la incubación o el almacenamiento.

I.1. Determinación de anticuerpos frente al virus T-linfotrópico humano Tipo III (HTLV-III) mediante ELISA:

Utilizamos para ello el Kit ABBOT HTLV III EiA.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS:

El virus HTLV-III se propaga dentro de la linea celular H9/HTLV-III de los T-linfocitos. El virus aislado se fracciona y se inactiva por detergentes y ultrasonido antes del recubrimiento de las esferas. Las esferas recubiertas se incuban con un diluyente de muestras y suero humano, y con controles adecuados.

En caso de estar presente, el anticuerpo contra los HTLV III se une a los antígenos HTLV-III en la fase sólida.

Después de la aspiración del material no unido y del lavado de la esfera, el anticuerpo IgG anti-humana de cabra, conjugado con peroxidasa de rábano picante (IgG anti-humana: HRPO), se incuba con el complejo esfera-antígeno-anticuerpo.

El conjugado enzimático no unido se aspira y las esferas se lavan. A continuación, se agrega a la esfera una solución de o-fenilendiamina (OPD), que contiene peróxido de hidrógeno.

Después de la incubación se desarrolla un color amarillo-anaranjado en proporción a la cantidad de anticuerpo contra HTLV-III que esté unido a la esfera.

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Esferas recubiertas de antígeno HTLV III (inactivado).
2) Conjugado anti-humana (cabra). IgG anti-humana (cabra) unida a peroxidasa (rábano picante). Concentración mínima de 0,01 mg/ml en tampón de HEPES. Medios de conservación: agentes antimicrobianos.
3) Control positivo: plasma humano inactivado, positivo para el anticuerpo contra el HTLV-III. Título mínimo: 1:2. Medios de conservación : agentes antimicrobianos y azida sódica al 0,1%.
4) Control negativo: plasma humano, negativo para el anticuerpo contra el HTLV III. Medios de conservación: agentes antimicrobianos y azida sódica al 0,1%.
5) Diluyente de muestras con suero de bovino y de cabra. Medio de conservación: azida sódica al 0,1%.
6) Tabletas de OPD: o-fenilendiamina. 2HCL .
7) Diluyente para OPD: tampón de citratos-fosfatos que contiene peróxido de hidrógeno al 0,02%.
8) Acido sulfúrico 1N.

MATERIALES SUMINISTRADOS (común para todos los Kits de ABBOT):

-Placas de reacción de 20 cavidades.

-Folios adhesivos.

-Tubos de ensayo (para transferencia de las esferas desde las placas de reacción).

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

-Pipetas de precisión con puntas desechables de diversas capacidades.

-Dispositivos para administrar la solución de lavado.

-Un sistema de aspiración para el lavado de esferas, como por ejemplo, un Pentamash, con una fuente de vacío, como la bomba de vacío Gast o equivalente, y una trampa doble para retener el aspirado y mantener el vacío adecuado.

-Baño-María capaz de mantener una temperatura entre 38º-41ºC.

-Un espectrofotómetro capaz de leer la absorción a

492 nm.

-Un distribuidor de esferas.

-Pinzas no metálicas.

-Tubos de ensayo y gradillas para la predilución de las muestras.

PROCEDIMIENTO DEL TEST:

Se deben ensayar dos controles negativos y tres controles positivos con cada conjunto de muestras. Asegurarse de que todas las placas de reacción sean sometidas a los mismos procesos y tiempos de incubación.

Los controles negativos y positivos se suministran en forma prediluida. No necesitan ser diluidos.

1) Aproximadamente 30 minutos antes de comenzar el procedimiento de ensayo, sacar los frascos de reactivos del Kit y llevarlos a la temperatura ambiente (15º a 30ºC). Agitar suavemente antes de usarlos. Ajustar la temperatura del baño-María entre 38º y 41ºC.

2) Identificar las cavidades de la placa de reacción

para cada muestra o control.

3) Distribuir 10 µl de cada muestra a analizar en el fondo de los tubos de ensayo apropiados. Agregar 0.2 ml de diluyente para muestras en cada tubo. Mezclar meticulosamente. No incluir los controles en este paso.

4) Distribuir 10 µl de cada control o muestra prediluida en el fondo de las cavidades apropiadas de la placa de reacción (2 controles negativos y 3 controles positivos).

5) Distribuir 0,2 ml de diluyente de muestras en cada cavidad que contenga un control o muestra diluida.

6) Agregar cuidadosamente una esfera a cada cavidad que contiene un control o una muestra diluida.

7) Cubrir con un folio adhesivo. Golpear suavemente la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.

8) Incubar a 40ºC durante 1 hora.

9) Retirar el folio adhesivo. Aspirar el liquido y lavar cada esfera tres veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

10) Pipetear 0,2 ml de conjugado en cada cavidad que contiene una esfera.

11) Cubrir con un nuevo folio adhesivo. Golpear suavemente la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar las burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.

12) Incubar a 40ºC durante 2 horas.

13) Retirar el folio adhesivo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

14) Transferir inmediatamente las esferas a los tubos de ensayo debidamente identificados.

Durante los últimos 5 a 10 minutos de la 2ª incubación se prepara la solución de sustrato del siguiente modo: usando una pipeta limpia, transferir 5 ml del diluyente de OPD por cada tableta de OPD a disolver. Usar siempre pipetas, recipientes y pinzas libres de metal. Dejar que la tableta se disuelva. Agitar suavemente para obtener una solución homogénea.

La solución no debe guardarse más de 60 minutos antes del uso. Mantener en oscuridad.

El color amarillo-anaranjado de la solución indica que el reactivo está contaminado y debe desecharse.

15) Pipetear 0,3 ml de solución de sustrato OPD recién preparada en dos tubos vacíos (blancos de sustrato) y después en cada tubo que contiene una esfera.

16) Cubrir e incubar a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Evitar la luz fuerte.

17) Después de transcurridos los 30 minutos de incubación, detener la reacción enzimática con 1 ml de ácido sulfúrico 1N en cada tubo. El ácido no debe estar en contacto con metales. Agitar los tubos para asegurar una mezcla completa. Las burbujas de aire deben eliminarse antes de leer la absorción.

18) Colocar el espectrofotómetro a 492 nm y ajustar el cero del aparato con un blanco de sustrato.

19) Determinar la absorción de cada control y muestra a analizar a 492 nm.

RESULTADOS:

La presencia o ausencia de anticuerpos contra el HTLV-III se determina comparando la absorción de la muestra con un valor límite. Este valor límite es igual a la absorción promedio de los controles negativos más 0,1 veces el valor promedio de los controles positivos.

Para que el ensayo sea válido, es necesario que la diferencia entre los valores promedio de los controles positivos y negativos (P-N) sea igual o mayor a 0,400. Si esto no ocurre, se sospechará una falla técnica y el ensayo deberá repetirse. Si el valor de (P-N) es persistentemente bajo, deberá sospecharse la descomposición de los reactivos.

Valor límite= $\overline{NCx} + (0,1 \times PCx)$

NCx = valor promedio de los controles negativos.

PCx = valor promedio de los controles positivos.

Los valores individuales de los controles negativos deberán ser iguales o inferiores a 0'100 o iguales a 0'10.

Los valores individuales de los controles positi-

vos deberán ser iguales o inferiores a 2'000 o mayores o iguales a 0'400.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

1. Las muestras con valores de absorción inferiores al valor límite son consideradas como negativas.
2) Las muestras con valores de absorción superiores al valor límite se consideran reactivas y deberán repetirse de modo que si se encuentran repetidamente reactivas se consideran positivas para el anticuerpo contra el HTLV-III.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

- La sensibilidad estimada es del 98,3%, sobre la base de una prevalencia presumible de anticuerpo contra el HTLV-III igual al 100% en pacientes con SIDA.

- La especificidad estimada es del 99,8% partiendo de la base de una prevalencia presumible de anticuerpo contra el HTLV-III igual a 0 en donantes de sangre randomizados.

I.2. Test confirmatorio (de las muestras encontradas positivas para el anticuerpo contra el HTLV-III).

Utilizamos el Kit ABBOT HTLV-III EiA CONFIRMATORIO.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS:

Este ensayo enzimático utiliza dos sistemas separados de detección para confirmar las muestras que han sido encontradas positivas para el anticuerpo contra el HTLV-III.

En un sistema, las esferas recubiertas del antígeno de envoltura (ENV) del HTLV-III, se incuban con las muestras (controles y muestras a analizar), y con anticuerpo humano contra el HTLV-III, conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-HTLV III humano: HRPO). El anticuerpo contra el antígeno ENV del

HTLV-III presente en la muestra compite con el anti-HTLV-III humano: HRPO por los puntos de unión para anticuerpo anti-HTLV-III (ENV) situados en la superficie de la esfera.

En el segundo sistema, las esferas recubiertas del antígeno del cuerpo viral (CORE) se incuban con las muestras (controles y muestras a analizar), y con anticuerpo humano contra el HTLV-III conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-HTLV-III humano: HRPO). El anticuerpo contra el antígeno HTLV-III (CORE) presente en la muestra, compite con el anti-HTLV-III humano: HRPO por los puntos de unión para el anticuerpo anti-HTLV III (CORE) situados en la superficie de la esfera.

Los materiales no unidos se eliminan mediante lavado de las esferas. Estas se incuban luego con solución de O-Fenilendiamina (OPD), que contiene peróxido de hidrógeno. La reacción entre la solución de sustrato OPD y la HRPO produce un color amarillo-anaranjado, cuya intensidad es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-HTLV-III presente en la muestra analizada.

La reacción enzimática se suspende con ácido sulfúrico 1N y se mide la intensidad del color desarrollado usando un espectrofotómetro ajustado a 492 nm.

Las muestras con absorciones iguales o inferiores al valor límite en cualquiera de los dos sistemas de análisis se confirman como positivas para el anticuerpo HTLV-III. La presencia del anticuerpo contra el HTLV-III no se considera como confirmada en aquellas muestras con valores de absorción superiores al valor límite para ambos replicados, en ambos sistemas de análisis.

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Esferas recubiertas de HTLV-III ENV (generado por DNA recombinante). Inactivado.

2) Anti-HTLV-III ENV (humano). Inactivado y conjugado con peroxidasa de rábano picante. Concentración mínima: 0,01 mg/ml en tampón de HEPES. Medios de conservación: agentes antimicrobianos.

3) Esferas recubiertas de HTLV-III CORE (generado por DNA recombinante). Inactivado.

4) Anti-HTLV-III CORE (humano). Inactivado y conjugado con peroxidasa de rábano picante. Concentración mínima: 0,01 mg/ml en tampón de HEPES. Medios de conservación: agentes antimi-

crobianos.

5) Control positivo. Plasma humano inactivado, positivo para el anticuerpo contra el HTLV-III. Medios de conservación: agentes antimicrobianos. Titulo mínimo: 1:2.

6) Control negativo. Plasma humano, negativo para el anticuerpo contra el HTLV-III. Medios de conservación: agentes antimicrobianos

7) Diluyente de muestras . Tampón de citrato sódico. Medios de conservación: agentes antimicrobianos.

8) Tabletas de OPD (o-fenilendiamina 2Hcl). OPD/Tableta: 12,8mg.

9) Diluyente para OPD. Tampón de citratos-fosfatos que contiene peróxido de hidrógeno al 0,02%.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

Los materiales fueron descritos para el ELISA HTLV-III.

PROCEDIMIENTO DEL TEST:

Los siguientes reactivos son comunes para ambos sistemas de fase sólida (ENV/CORE) del test confirmatorio:

-Control negativo.

-Control positivo.

-Diluyente de muestras.

-Tabletas de OPD y diluyente para OPD.

-Acido sulfúrico 1N.

Las esferas y los reactivos de conjugados son diferentes para cada sistema de fase sólida (ENV/CORE).

Cada sistema de fase sólida deberá ensayarse en su propia placa de reacción. Cada muestra deberá procesarse paralelamente en la placa ENV y en la placa CORE.

Asegurarse de que todas las placas de reacción (ENV/CORE) sean sometidas al mismo proceso y tiempo de incubación.

Cada muestra deberá analizarse en duplicado en cada uno de los sistemas de fase sólida. Por ejemplo usar 2cavidades/esferas ENV y 2 cavidades /esferas CORE

para cada muestra .

Aproximadamente 30 minutos antes de comenzar el procedimiento de ensayo, sacar los reactivos y llevarlos a la temperatura ambiente. Agitar suavemente antes del uso.

Identificar las cavidades de la placa de reacción para cada muestra o control.

A. Primera incubación-placa de reacción ENV:

1) Distribuir 20 µl de diluyente de muestras en el fondo de las cavidades correspondientes de la placa de reacción.

2) Distribuir 50 µl de cada muestra en duplicado en el fondo de las cavidades correspondientes de la placa de reacción.

3) Distribuir 50 µl de cada control (3 negativos y 2 positivos) en el fondo de las cavidades correspondientes de la placa de reacción.

4) Distribuir 0,2 ml del conjugado anti-HTLV-III ENV (humano) en cada cavidad que contiene un control o una muestra.

5) Agregar cuidadosamente una esfera recubierta de HTLV-III ENV en cada cavidad que contiene un control o una muestra.

6) Cubrir con un folio adhesivo. Golpear suavemente la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar las burbujas de aire atrapadas.

7) Incubar a temperatura ambiente durante 16 a 22 horas.

8) Retirar y eliminar el folio adhesivo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera 3 veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

B. Primera incubación-placa de reacción CORE:

1) Distribuir 20 µl de diluyente de muestras en el fondo de las cavidades correspondientes de la placa de reacción.

2) Distribuir 50 µl de cada muestra en duplicado en el fondo de las cavidades correspondientes de la placa de reacción.

3) Distribuir 50 µl de cada control (3 negativos

y 2 positivos) en el fondo de las cavidades correspondientes de la placa de reacción.

4) Distribuir 200 µl del conjugado anti-HTLV-III CORE (humano) en cada cavidad que contiene un control o una muestra.

5) Agregar cuidadosamente una esfera recubierta de HTLV-III CORE a cada cavidad que contiene un control o una muestra.

6) Cubrir con un folio adhesivo. Golpear suavemente la placa para que el líquido cubra las esferas y para eliminar burbujas de aire atrapadas.

7) Incubar a temperatura ambiente durante 16 a 22 horas.

8) Retirar el folio adhesivo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera 3 veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

C. Desarrollo del color (para ambas placas, ENV y CORE):

9) Transferir inmediatamente las esferas a tubos

de ensayo debidamente identificados.

10) Pipetear 0,3 ml de solución de sustrato OPD recién preparada en 2 tubos vacíos (blancos de sustrato) y en cada tubo que contiene una esfera.

11) Cubrir e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

12) Agregar 1 ml de ácido sulfúrico a cada tubo.

D. Lectura:

13) Ajustar el cero del espectrofotómetro con un blanco de sustrato.

14) Determinar la absorción de los controles y de las muestras.

RESULTADOS:

La presencia a ausencia de anticuerpos contra el HTLV-III ENV o contra el HTLV-CORE se determina comparando la absorción de la muestra con los valores límí-

tes correspondientes. Para cada sistema de ensayo el valor límite es igual a la suma de la absorción promedio del control positivo más el promedio del control negativo, dividida por 2.

Para que el ensayo sea válido, es necesario que la diferencia entre el valor promedio de los controles positivos y negativos (P-N) de ambos sistemas de fase sólida ENV y CORE sea igual o inferior a -0,400. Si esto no ocurre, se puede sospechar una falla técnica y el ensayo deberá repetirse. Si el valor P-N no es válido, puede sospecharse la descomposición de los reactivos.

.Cálculos:

Se deben calcular los siguientes resultados para ambos sistemas de fase sólida (ENV y CORE). Usar los valores de control de la placa de reacción ENV para el sistema de fase sólida ENV, y los valores de control de la placa de reacción CORE, para el sistema de fase sólida CORE, respectivamente.

1) Calcular los valores de absorción promedip de los controles positivos y negativos (PCx y NCx).

Por lo menos 2 valores de absorción del control negativo deben estar entre 0,400 y 1,999 y dentro del margen de 0,5 a 1,5 veces el pro-

medio del control negativo.

Los 2 valores individuales de absorción del control positivo deben estar entre 0,000 y 0,150.

2) Valor límite = $\frac{NCx + PCx}{2}$

3) P-N = PCx - NCx ; la diferencia entre el valor promedio de los controles positivo y negativo (P - N) de ambos sistemas ENV y CORE deberá ser igual o inferior a -0,400 para que el ensayo sea válido.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

		ENV		
		R/R	R/N	N/N
CORE	R/R	POS	POS	POS
	R/N	POS	REPETIR	REPETIR
	N/N	POS	REPETIR	NEG

R = muestra reactiva.
POS = muestra positiva confirmada.
N = muestra negativa.
NEG = muestra negativa confirmada.

A. Sistema de fase sólida ENV:

1) Las muestras con valores de absorción iguales o inferiores al valor límite son reactivas para los anticuerpos contra el HTLV-III (ENV). Las muestras con resultados reactivos duplicados son positivas, confirmadas para los anticuerpos contra el HTLV-III(ENV).

2) Las muestras con valores de absorción duplicados superiores al valor límite se consideran negativas para los anticuerpos contra el HTLV-III (ENV).

3) Las muestras con valores discordantes de los duplicados en el sistema de fase sólida ENV deben reanalizarse usando la muestra original, a menos que se obtenga un resultado positivo en el sistema de fase sólida CORE.

B. Sistema de fase sólida CORE:

1) Las muestras con valores de absorción iguales o inferiores al valor límite son reactivas para los anticuerpos contra el HTLV-III (CORE). Las muestras con resultados reactivos duplicados son positivas confirmadas para los anticuerpos contra el HTLV-III (CORE).

2) Las muestras con valores de absorción duplicados superiores al valor límite se consideran negativas para los anticuerpos contra el HTLV-III (CORE).

3) Las muestras con valores discordantes de los duplicados en el sistema de fase sólida CORE deben de reanalizarse usando la muestra original, a menos que se obtenga un resultado positivo en el sistema de fase sólida ENV.

En resumen: la presencia del anticuerpo contra el HTLV-III se confirma en las muestras que resultan positivas para el anticuerpo, ya sea en el sistema de fase sólida ENV y/o en el sistema de fase sólida CORE.

El resultado negativo del test no excluye la posibilidad de una infección por HTLV-III o de una exposición al virus.

I.3. Determinación del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg).

Utilzamos el Kit AUSZYME MONOCLONAL DE ABBOT.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

Las esferas recubiertas con el anticuerpo monoclonal de ratón contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBs) se incuban con suero o plasma, los controles apropiados y anti-HBs monoclonal de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-HBs:HRPO).

Durante el periodo de incubación, todo el HBsAG presente se une al anticuerpo en fase sólida y simultáneamente, se une al anti-HBs:HRPO. Entonces, el material no unido se aspira y las esferas se lavan.

A continuación, se añade a las esferas una solución de o-fenilendiamina que contiene peróxido de hidrógeno y, después de la incubación, se desarrolla un color amarillo-anaranjado que es proporcional a la cantidad de HBsAG que está unida a la esfera.

La reacción enzimática se suspende por adición

de ácido. La absorción de los controles y de las muestras se determina usando un espectrofotómetro con una longitud de onda colocada a 492 nm. Las muestras que den valores de absorción iguales o mayores que el valor de absorción del promedio de los controles negativos se consideran positivas para HBsAg.

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Esferas recubiertas de anti-HBs monoclonal de ratón. Anticuerpo contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

2) Anticuerpo monoclonal de ratón contra el antígeno de superficie de la hepatitis B conjugado con peroxidasa de rábano picante. Concentración mínima 0,2 µg/ml en tampón Tris con estabilizadores de proteína. Medio de conservación: sulfato de gentamicina y thiomersal. Colorante: rojo nº33.

3) Control positivo. HBsAg humano 9 ± 2 ng/ml en tampón Tris con estabilizadores de proteina. Medio de conservación: sulfato de gentamicina y thiomersal. Colorante: azul de bromofenol.

4) Control negativo. Plasma humano recalcificado, no reactivo para HBsAg y anti-HBs. Medio de conservación: sulfato de gentamicina y thiomersal.

5) Tabletas de OPD (o-fenilendiamina-2 HCL) 12,8 mg de OPD por tableta.

6) Diluyente para OPD. Tampón de citratos-fosfatos que contiene 0,02% de peróxido de hidrógeno.

7) Acido sulfúrico 1 N.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

Fueron descritos en el ELISA HTLV-III.

PROCEDIMIENTO:

1) Con cada conjunto de muestras deberán analizarse 3 controles negativos y 2 controles positivos. Asegurarse que todas las placas de reacción sean sometidas al mismo proceso y a los mismos tiempos de incubación.

2) Antes de comenzar el ensayo, dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (15 a 30º). Agitar suavemente antes del uso. Ajustar el baño María entre 38º y 41ºC.

3) Identificar las cavidades de la placa de reacción para cada muestra o control.

4) Distribuir 0,2 ml de cada control o muestra dentro de las cavidades de la placa de reacción.

5) Agregar 50 µl del conjugado a cada cavidad que contiene una muestra o control.

6) Agregar cuidadosamente una esfera dentro de cada cavidad que contiene una muestra o un control.

7) Cubrir con un folio adhesivo. Golpear ligeramente la placa para cubrir las esferas y eliminar cualquier burbuja de aire atrapado.

8) Incubar la placa a 40ºC durante 3 horas.

9) Retirar el folio adhesivo. Aspirar el líquido y lavar cada esfera 3 veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

10) Transferir inmediatamente las esferas a los tubos de ensayo debidamente identificados.

11) Pipetear 0,5 ml de solución de sustrato OPD recién preparada dentro de dos tubos vacíos (blancos de sustrato) y dentro de cada tubo que contiene una esfera.

12) Cubrir e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

13) Agregar 1 ml de ácido sulfurico 1N a cada tubo.

14) Ajustar el cero del espectrofotómetro con un blanco de sustrato a 492 nm.

15) Determinar la absorción de los controles y de las muestras analizadas a 492 nm.

RESULTADOS:

La presencia o ausencia de HBsAg se determina por comparación de la absorción de la muestra con el valor límite. El valor límite es la absorción del promedio de los controles negativos más el factor 0,050.

Las muestras con valores de absorción mayores o iguales al valor límite se consideran positivas para el HBsAg.

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre el valor promedio de los controles positivos y negativos (P - N) deberá ser igual o mayor que 0,400 Si no es así, hay que comprobar la técnica y repetir el ensayo. Si el valor P - N es persistentemente bajo, se puede suponer una descomposición de los reactivos.

- Cálculos:

1) Cálculo de la absorción promedio de los controles negativos: NCx.

Los valores individuales de los controles negativos deberán ser menores o iguales a 0,100 y mayores o iguales a -0,006. Los valores de los controles negativos deberán ser también mayores o iguales a 0,5 veces NCx y menores o iguales a 1,5 veces NCx.

Si un valor cae fuera del margen aceptable, se descarta ese valor y se vuelve a calcular el promedio . Si dos valores caen fuera de ese promedio el test deberá repetirse.

2) Cálculo de la absorción promedio de los controles positivos: PCx.

3) Cálculo del valor P - N = PCx - NCx.

Para que el test sea válido, P - N deberá ser 0,400 o mayor.

4) Cálculo del valor límite:
valor límite: NCx + 0,050

-Las muestras cuyo valor de absorción es igual o superior al valor límite se consideran positivas para el HBsAg.

-Las muestras cuyo valor de absorción es inferior al valor límite se consideran negativas para el HBsAg.

I.4. Determinación del anticuerpo específico frente al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (Ac anti-HBs).

Utilizamos para ello el Kit ABBOTT EIA AUSAB.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

El test inmunoenzimático para detectar anti-HBs utiliza el "principio sandwich", una técnica de unión enzimática de fase sólida para medir los niveles de anti-HBs en suero o plasma. Esferas de poliestireno recubiertas con el antígeno de sperficie del virus de la hepatitis B humano (HBsAg) se incuban con las muestras del paciente y los controles apropiados.

Durante la incubación el anticuerpo, si está presente, se une inmunológicamente al anticuerpo en fase sólida (unido a la esfera). Después de la aspiración del material no unido y del lavado de la esfera, el antígeno humano marcado con biotina (B-HBsAg) y avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante se incuban con el complejo anticuerpo-antígeno de la esfera.

El antígeno de superficie de la hepatitis B

(humano): conjugado de biotina se une al anticuerpo creando un "sandwich" antígeno-anticuerpo-antígeno.

La avidina-peroxidasa de rábano picante, se une a la esfera por medio de un puente avidina-biotina formando una red de fase sólida.

Los conjugados no unidos se aspiran y las esferas se lavan. A continuación, se agrega a la esfera una solución de o-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno y después de la incubación se desarrolla un color amarillo en proporción a la cantidad de anti-HBs que esté unido a la esfera, de modo que cuanto mayor sea la cantidad de anticuerpo en la muestra, mayor será la absorción.

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Esferas de poliestireno recubiertas con HBsAg humano, subtipos ad y ay.

2) Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humano, subtipos ad y ay, conjugado con biotina. Concentración mínima: 0,33 µg/ml en tampón Tris con estabilizadores de proteína. Medio de conser-

vación: sulfato de gentamicina al 0,01%.

3) Avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Concentración mínima: 0,2 µg/ml en tampón de fosfatos con estabilizadores de proteína. Medio de conservación: sulfato de gentamicina al 0,01%.

4) Control positivo (plasma humano normal recalcificado, reactivo para anti-HBs y HBsAg). Medio de conservación: azida sódica al 0,1%.

5) Control positivo(plasma humano normal recalcificado, reactivo para anti-HBs), 200 mUI/ml ± 15%, respecto al estándar de referencia del Paul-Ehrlich-Institut, RFA. Medio de conservación: azida sódica al 0,1%.

6) Tabletas de OPD (o-fenilendiamina 2 HCL), 12,8 mg de OPD por tableta.

7) Diluyente para OPD. Tampón de citratos-fosfatos que contiene 0,02% de peróxido de hidrógeno.

8) Acido sulfúrico 1 N.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

Fueron descritos para el ELISA HTLV III.

PROCEDIMIENTO DEL TEST:

Deben analizarse 3 controles negativos y 2 positivos cada vez que se realice el test. Asegurarse que todas las placas de reacción que contienen los controles y las muestras desconocidas sean sometidas al mismo procedimiento y a los mismos tiempos de incubación.

Una vez comenzado el ensayo deberán completarse todos los pasos sin interrupción. Agitar los reactivos suavemente antes de su uso.

1) Ajustar el baño-María a 40ºC.

2) Identificar las cavidades de la placa de reacción para cada muestra o control.

3) Pipetear 0,2 ml de control negativo en cada una de las 3 cavidades designadas en una placa de reacción y 0,2 ml de control positivo en 2 cavidades adicionales.

4) Pipetear 0,2 ml de cada muestra en una cavidad asignada de la placa de reacción.

5) Agregar una esfera recubierta del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (humano) en cada

cavidad que contenga un control o una muestra.

6) Cubrir las placas con un folio adhesivo. Golpear ligeramente las placas para asegurarse que las esferas estén cubiertas con la muestra y que salgan las burbujas de aire, cuidando de no salpicar líquido en el folio adhesivo.

7) Incubar las placas a temperatura ambiente durante 18 horas (16 a 20 horas).

8) Al final del periodo de incubación retirar los folios. Aspirar el contenido de las cavidades y lavar cada esfera 3 veces con 4 a 5 ml de agua desionizada o destilada.

9) Calcular cuidadosamente la cantidad de antígeno de superficie de la hepatitis B conjugado con biotina (B-HBsAg) necesaria para el número de Test a ser efectuados a partir de la siguiente fórmula:

nº de Tests x 0,11 ml = volumen de B-HBsAg necesario.

10) Calcular cuidadosamente la cantidad de avidina (clara de huevo) conjugado de peroxidasa (rábano picante) necesaria para el número de Test a ser efectuados a partir de la siguiente fórmula:

nº de Test x 0,11 ml = volumen de A-HRPO necesario.

11) Colocar las alícuotas de los volúmenes apropiados de B-HBsAg y A-HRPO dentro de un tubo limpio y mezclar suavemente.

12) Distribuir 0,2 ml de la mezcla de conjugado dentro de cada cavidad de reacción con cuidado de no salpicar los bordes (puede ocasionar interferencia en el Test).

13) Cubrir la placa de reacción con un folio adhesivo. Golpear suavemente para que salgan las burbujas de aire.

14) Incubar las placas en baño-María a 40ºC durante 2 horas.

15) Durante los últimos 5 a 10 minutos de incubación, preparar la solución de sustrato OPD.

16) Al final del período de incubación sacar las placas del baño-María y retirar los folios adhesivos. Aspirar el contenido de las cavidades y lavar cada esfera 3 veces con 4 a 5 ml de agua destilada o desionizada.

17) Transferir inmediatamente las esferas de las cavidades a tubos de ensayo debidamente identificados.

18) Pipetear 0,3 ml de la solución de sustrato OPD recién preparada dentro de cada tubo que contenga una esfera y dentro de dos tubos vacíos (blancos de sustrato).

19) Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos evitando la luz fuerte.

20) Después de los 30 minutos de incubación, suspender la reacción enzimática agregando 1 ml de ácido sulfúrico 1 N en cada tubo.

No permitir que la solución de ácido entre en contacto con metales. Agitar los tubos para asegurar una mezcla completa. Eliminar las burbujas de aire antes de leer las absorciones.

21) Colocar el espectrofotómetro a 492 nm y ajustar el 0 del instrumento usando uno de los dos blancos de sustrato. Determinar la absorción de los controles y las muestras . Las absorciones de las muestras deberán determinarse dentro de las 2 horas de haber sido agregado el ácido sulfúrico.

RESULTADOS:

La presencia o ausencia de anti-HBs se determina comparando la absorción de la muestra frente a un valor límite. Este valor se calcula sumando un factor a la absorción promedio de los controles negativos.

La diferencia entre el valor promedio de los controles positivos y el valor promedio de los controles negativos deberá ser 0,300 o mayor. Si la diferencia es inferior a 0,300 se pueden suponer problemas con la técnica y el ensayo deberá repetirse.

Valor límite = NCx (absorción promedio de los controles negativos) + 0,05.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Las muestras cuyos valores de absorción son inferiores al valor límite son consideradas negativas.

Las muestras cuyos valores de absorción son iguales o superiores al valor límite se consideran positivas para el anti-HBs.

I.5. Determinación del anticuerpo específico frente al antígeno "core" del virus de la hepatitis B (anti-HBc).

Utilizamos para ello el Kit de ABBOT denominado CORZYME.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS:

Esferas recubiertas con antígeno core (HBcAg) se incuban con suero o plasma o controles apropiados y anti-HBc humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-HBc: HRPO). Después de la incubación, el material no unido se elimina por lavado de la esfera. La presencia de anti-HBc en la muestra competirá con anti-HBc: HRPO por un número limitado de sitios de unión HBcAg en la esfera.

A continuación se agrega a la esfera solición de o-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno y, después de la incubación, se desarrolla un color amarillo. La reacción enzimática se suspende por adición de ácido sulfúrico 1 N. La absorción de los controles y las muestras se determina mediante espectrofotómetro: cuanto mayor sea la cantidad de anti-HBc en la muestra, tanto menor será la absorción.

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Esferas recubiertas con antígeno core del virus de la hepatitis B (origen: DNA recombinado).

2) Anticuerpo contra el antígeno core de la hepatitis B conjugado con peroxidasa de rábano picante. Concentración mínima: 0,2 µg/ml. Medio de conservación: sulfato de gentamicina.

3) Control positivo (plasma humano recalcificado, positivo para anti-HBs y anti-HBc. Título mínimo de anti-HBc humano 1:200. Medio de conservación: sulfato de gentamicina.

4) Control negativo. Plasma humano recalcificado, no reactivo para HBsAg, anti-HBs y anti-HBc. Medio de conservación: sulfato de gentamicina.

5) Tabletas de OPD (o-fenilendiamina),12,8 mg por tableta.

6) Diluyente para OPD. Tampón de citratos-fosfatos conteniendo 0,02% de peróxido de hidrógeno.

7) Acido sulfúrico 1 N.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS:

Fueron descritos para el ELISA HTLV-III.

PROCEDIMIENTO DEL TEST:

Deben analizarse tres controles negativos y dos controles positivos en cada análisis de muestras desconocidas. Todos los controles y las muestras desconocidas deben someterse a los mismos períodos de incubación y al mismo tratamiento.

Una vez comenzado el ensayo, completar todos los pasos subsiguientes sin interrupción.

Antes de comenzar el procedimiento de análisis, llevar todos los reactivos a la temperatura ambiente (15º a 30ºC) y mezclar suavemente.

1) Ajustar la temperatura del baño-María a 40ºC.

2) Identificar las cavidades de la placa de reacción para cada control y muestra a analizar.

3) Pipetear 0,2 ml de solución del conjugado del anti-

cuerpo en cada cavidad.

4) Pipetear 0,1 ml de los controles o las muestras en las cavidades adecuadas de las placas de reacción. Mezclar a fondo golpeando la placa con cuidado de no salpicar.

5) Agregar una esfera recubierta con antígeno core en cada cavidad.

6) Aplicar el folio adhesivo. Golpear ligeramente la placa.

7) Incubar las placas a temperatura ambiente(15º a 30ºC) durante 12 a 20 horas.

8) Quitar el folio adhesivo, aspirar el líquido y lavar cada esfera tres veces con 4 a 6 ml de agua destilada o desionizada.

9) Transferir inmediatamente las esferas a los tubos de ensayo adecuadamente etiquetados.

10) Pipetear 300 µl de la solución de sustrato de OPD en dos tubos vacíos (blancos de sustrato) y después en cada tubo que contenga una esfera. El sustrato no debe entrar en contacto con metales.

11) Cubrir e incubar durante 30 minutos entre 15º y 30ºC.

12) Agregar 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo.

13) Ajustar el blanco del espectrofotómetro.

14) Determinar la absorción a 492 nm.

Inspeccionar visualmente los dos blancos y descartar aquel que esté contaminado (indicado por un color amarillo-anaranjado). Si los dos blancos están contaminados debe repetirse el análisis.

Ajustar el blanco del instrumento utilizando uno de los dos tubos de blanco de sustrato. Leer los controles positivos y negativos. Leer después las muestras a analizar.

Determinar todos los valores de absorción dentro de dos horas después de la adición de ácido.

RESULTADOS:

La presencia o la ausencia de anti-HBc se determina comparando la absorción de la muestra con un valor límite. Este valor límite se calcula a partir del promedio de la absorción de los controles negativos (NCx) y del promedio de absorción de los controles positivos (PCx). Las muestras desconocidas con un valor de absorción igual o inferior que el valor límite se consideran reactivas para el anti-HBc. Las muestras con un valor de absorción mayor que el valor límite se consideran negativas para el anti-HBc.

- Calcular la absorción promedio de los controles negativos (NCx). Todos los valores de los controles negativos deben caer dentro de 0,5 a 1,5 veces el promedio.

- Calcular la absorción promedio de los controles positivos (PCx).

- Valor límite = 0,4 (NCx)+ 0,6 (PCx).

La diferencia entre el valor promedio de los controles negativos y el valor promedio de los controles positivos debe ser mayor que 0,300. Si no es así

deben sospecharse problemas técnicos o descomposición de los reactivos y el ensayo debe repetirse.

I.6. Determinación de anticuerpos específicos (IgG e IgM) frente a Citomegalovirus y frente a virus Herpes simplex.

Para ambos casos vamos a utilizar las técnicas del Instituto Behring (Enzygnost), consistentes en procedimientos de enzimoinmunoensayo (ELISA).

MATERIALES Y REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Placas de Enzygnost (de Citomegalovirus y Herpes simple): Contienen 96 pocillos en 6 tiras de 8 pares de pocillos. Cada una de estas tiras es desmontable. Cada tira posee 8 pares de pocillos en 2 hileras: la de la izquierda lleva adherido el antígeno correspondiente (células Hela infectadas con Citomegalovirus o Herpes simple) y la de la derecha se usa como control (células Hela no infectadas).

Antes de iniciar la técnica se deben lavar dos veces con líquido de lavado (0,2 ml en cada pocillo cada vez que se laven).

2) Solución de lavado:

Se compone de tampón fosfato estéril, concentrada 20 veces al cual se agrega 200 ml de Tween-20 por litro.

Hay que usarla diluida al 1 : 20 en agua destilada. Una vez diluida se conserva 2 meses a temperatura ambiente.

3) Sueros controles positivos (de Citomegalovirus y Herpes simple): se reconstituyen con 0,5 ml de agua destilada alcanzando así una dilución 1 : 5.

Una vez reconstituido es estable una semana a 4-6ºC y 3 meses a -20ºC.

4) Conjugados:

Se trata de anti-IgG y anti-IgM marcados con fosfatasa alcalina.

Para usar diluir según lo que indique la etiqueta en tampón de dilución.

Se puede fraccionar en partes alícotas y conservarse a -20ºC durante 3 meses sin pérdida de actividad.

Para una placa hacen falta 5 ml de conjugado.

5) Tabletas de sustrato:

Se componen de p-nitrofenilfosfato.

6) Tampón de sustrato:

Contiene 100 ml de dietanolamina y 102 mg de $Cl_2Mg.6H_2O$ (0,5 mmol) por litro de agua destilada y un pH de 9,8.

La solución sustrato se prepara disolviendo 2 tabletas de sustrato en 10 ml de tampón de sustrato (suficiente para una placa).

Una vez preparada se conserva 12 horas a 4-6ºC.

Prepararla al menos 15 minutos antes de su uso.

7) Tampón de dilución:

Consta de tampón de fosfato estéril, pH 7,0 al que se le han agregado 40 ml de Tween 20 y 0,2 gr de azida sódica por litro, así como proteína vacuna.

Se conserva 8 semanas a 4-6ºC.

8) Liquido de parado: NaOH 2 N.

FUNDAMENTO:

El anticuerpo envestigado en el suero problema, si está presente, se unirá al antígeno fijado en los pocillos de la placa.

A este complejo antígeno-anticuerpo se unirá posteriormente la anti-IgG o anti-IgM con fosfatasa alcalina.

Posteriormente y tras la adición del sustrato se forma un cuerpo coloreado amarillo verdoso cuya intensidad de color será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero.

A. TECNICA (Para determinar anticuerpos tipo IgG):

1) Dejar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

2) Lavar la placa 2 veces con liquido de lavado (0,2 ml por cada pocillo cada vez). Conviene dejar la solución de lavado que actúe durante 1 a 2 minutos.

3) Depositar en todos los pocillos 0,15 ml de tampón de dilución.

4) Preparar las diluciones madres de los sueros problemas o testigos según los distintos títulos que queramos obtener:

Ejemplo: para comenzar por 1 : 20 diluir el suero a 1 : 5, es decir, 0,100 ml de suero en 0,5 ml de tampón de dilución.

5) Añadir 50 µl de las diluciones problemas en el primer pocillo de cada serie de dilución prevista para el antígeno y el antígeno control.

6) Pasar 50 µl desde el primer pocillo al segundo, mezclar. Pasar 50 µl del segundo al tercero, mezclar. Así sucesivamente hasta llegar al último pocillo de la serie del que desecharemos los últimos 50 µl.

7) Incubar a 37ºC durante una hora o a temperatura ambiente durante 18 a 22 horas. Evitar el contacto con metales y con papeles húmedos.

8) Aspirar y lavar la placa 2 veces (200 µl).

9) Añadir 50 µl de conjugado enzimático en cada pocillo. Incubar en cámara húmeda durante una hora a 37ºC.

10) Aspirar y lavar la placa 2 veces (200 µl).

11) Añadir 0,1 ml de sustrato preparado recientemente en cada pocillo. Preparar el Blanco (utilizar 2 pocillos vacíos añadiéndoles 0,1 ml de sustrato).

12) Incubar a temperatura ambiente y oscuridad durante 45 minutos.

13) Parar la reacción enzimática agregando 50 µl de Na OH 2N en cada pocillo (también el Blanco).

14) Leer usando el espectrofotómetro con el filtro de 405 nm. Ajustar el cero del aparato usando como Blanco dos pocillos a los que se han agregado 0,1 ml de sustrato y 50 µl de Na OH 2N.

Leer dentro de la primera hora de haber concluido el ensayo.

15) Valoración: se considera positivo cuando la absorción en la hilera con antígeno problema es superior en 0,2 a la absorción en la hilera de control.

B. TECNICA (para la determinación de anticuerpos IgM)

I. Eliminación del Factor Reumatoide:

1º) Disolver el absorbente de Factor Reumatoide en 5 ml de agua destilada. Una vez reconstituido se congela a -20ºC en partes alícuotas.

2) Prediluir el suero problema al 1 : 21 en tampón de dilución: 20 µl de suero + 400 µl de tampón de dilución.

3) Añadir a 0,2 ml de absorvente de Factor Reumatoide, 0,2 ml de suero prediluido al 1 : 21.

4) Incubar la mezcla 15 minutos a temperatura o toda la noche a 2-8ºC.

5) Mezclar bien. Se obtiene así una dilución 1 : 42.

II. PROCEDIMIENTO:

Es similar que para la determinación de anticuerpos tipo IgG excepto:

1) Llenado de la placa: se debe dejar vacía la primera fila de cada serie de diluciones.

2) En la primera fila se añaden 100 µl del suero tratado con absorbente de Factor Reumatoide diluido al 1 : 42.

3) Pasar 50 µl de la primera fila a la segunda y así sucesivamente, desechando los últimos 50 µl.

El resto es igual que para la determinación de anticuerpos tipo IgG.

I.7. Determinación de anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr.

I. Test de Paul-Bunnell-Davidsohn:

Para esta prueba utilizamos el Kit denominado Monosticon suministrado por Organon.

FUNDAMENTO:

Durante el transcurso de la mononucleosis infecciosa aparece en la sangre del paciente un anticuerpo heterófilo específico de dicha enfermedad. Este anticuerpo, de tipo IgM, posee la propiedad de aglutinar tanto los eritrocitos de oveja como los de caballo. En la sangre de la mayor parte de individuos sanos se encuentran, sin embargo, otros tipos de anticuerpos heterófilos, los llamados anticuerpos de Forssman, que también pueden aglutinar los eritrocitos de oveja y de caballo.

Para diagnosticar la mononucleosis infecciosa, es preciso distinguir entre los anticuerpos de Forssman y el anticuerpo de la mononucleosis infecciosa.

Con tal fin se emplea un método de absorción basado en el hecho de que, al añadir extracto de riñón de cobayo a el suero, son absorbidos los anticuerpos de Forssman de todo tipo y ya no reaccionan.

Los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa no son absorbidos y continúan aglutinando los eritrocitos de oveja y de caballo.

Los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa pueden aparecer en el cuarto día de la enfermedad y están presentes en la mayoría de los pacientes hasta el día veintiuno de la misma. Pueden seguir en la sangre durante períodos de 8 semanas o más prolongados.

REACTIVOS:

Antígeno de oveja y de caballo: una suspensión estable de eritrocitos de oveja y de caballo previamente sometidos a un proceso adecuado en tubo gotero de plástico.

Antígeno de cobayo: extracto estable de tejido de riñón de cobayo, en un tubo gotero de plástico.

SENSIBILIDAD:

La sensibilidad de la prueba está ajustada de tal modo que un suero que, después de la absorción con el cobayo, siguiendo la prueba original de Davidsohn, tiene un título de anticuerpos de 1 : 56 o superior, dé un resultado positivo.

PROCEDIMIENTO:

1) Déjese caer una gota de suero o plasma (0,03 a 0,04 ml) en el interior del círculo de la placa de cartón correspondiente.

2) Añádase una gota de extracto de riñón de cobayo y mézclese bien con un agitador.

3) Añádase una gota de la mezcla de antígeno de oveja y de caballo y mézclase bien con el agitador.

4) Muévase lentamente la placa, de modo que se obtenga un suave flujo circular de la mezcla en el interior del círculo. Obsérvese si se presenta aglutinación al cabo de dos minutos de haber iniciado esta operación.

RESULTADOS:

La aglutinación queda demostrada por la aparición de manchitas azul oscuro en la mezcla de la reacción. Estas manchitas se ven mejor sosteniendo la placa balo luz directa. La aglutinación acostumbra a presentarse al cabo de 30 segundos y durante el transcurso de dos minutos los grumos aglutinados se hacen más pronunciados.

-Test positivo: aparición de grumos azules.
-Test negativo: ausencia de aglutinación.

II. Detección de anticuerpos frente al antígeno capsídico del virus de Epstein-Barr mediante inmunofluorescencia.

Utilizamos el EB-VCA IFA kit II de Litton Bionetics, Inc.

FUNDAMENTO:

Es una inmunofluorescencia indirecta. El suero procedente de pacientes sospechosos de mononucleosis infecciosa se dispensa sobre un porta con una serie de pocillos cubiertos por células infectadas con el virus de Epstein-Barr. Si el suero contiene anticuerpos, éstos se unen a las células infectadas, produciéndose la unión antígeno-anticuerpo que puede ser detectada mediante la adición de una antiinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína.

Al microscopio de fluorescencia, la presencia de anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr se detecta por la aparición de una fluorescencia de color verde manzana en el citoplasma y periferia de las células infectadas.

Los sueros carentes de anticuerpos no presentan fluorescencia.

MATERIALES Y REACTIVOS SUMINISTRADOS:

1) Portas, cada uno con 10 pocillos, cada uno de los cuales contiene células linfocíticas infectadas por el virus de Epstein-Barr y fijadas con acetona. Conservar a 2-8ºC.

2) Inmunoglobulina antihumana (de cabra) conjugada con fluoresceína conteniendo azul de Evans. Esta preparación es una combinación de azul de Evans (0,004%) e isocianato de fluoresceína que está marcando una gammaglobulina específica (de cabra) que reconoce las inmunoglobulinas humanas.

Para reconstituir, añadir 2,5 ml de PBS y agitar suavemente. Una vez reconstituida es estable unas 4 semanas cuando se conserva a 2-8ºC.

3) Control positivo (para el anticuerpo contra el antígeno capsídico del virus de Epstein-Barr). Se prepara a partir de un pool de sueros humanos conteniendo dicho anticuerpo. Se reconstituye añadiendo 1 ml de PBS y agitando suavemente hasta que se completa la dilución. Esta dilución al 1 : 10 es la dilución inicial usada en el test. El suero control positivo es estable al menos 6 semanas cuando se conserva a 2-8ºC.

4) Control negativo: es un pool de sueros humanos que tiene un título inferior a 1 : 10 para el anticuerpo contra el antígeno capsídico del virus de Epstein-Barr(comprobado por éste mismo test de inmunofluorescencia). Se reconstituye añadiendo 1 ml de PBS y la dilución de 1 : 10 que se consigue es la que se utiliza en el test. Se conserva estable al menos 6 semanas a 2-8ºC.

5) Tampón fosfato salino (PBS)30x concentrado: cada uno de los dos viales suministrados se diluyen con un litro de agua destilada. El PBS diluido contiene 0,15 M NaCl, 0,01 M tampón fosfato, pH 7,5 con thimerosal al 0,01%. El PBS diluido es estable 6 semanas a temperatura ambiente.

El PBS diluido contiene:

-Na2 HPO4---------1,236 gm.
-Na2 H2 PO4.H2O---0,18 gm.
-NaCl------------- 8,5 gm.
-Thimerosal------- 0,1 gm.

6) Liquido de montaje:

-Glicerina----------9 volúmenes.
-Tampón fosfato salino pH 7,5 --1 volumen.

Conservar a 2-8ºC.

MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

-Tubos pequeños para las diluciones de los sueros.
-Micropipetas.
-Cámara húmeda para la incubación de los portas.
-Estufa a 37ºC.
-Recipiente de lavado.
-Cubres de 24 x 50 mm.
-Microscopio de fluorescencia.

PROCEDIMIENTO:

1) Sacar los portas necesarios, los controles y los sueros problemas del refrigerador. Llevarlos a temperatura ambiente antes de iniciar el test.

2) Colocar cada porta en cámara húmeda.

3) Realizar diluciones del suero control positivo desde 1 : 10 hasta 1 : 2560 en PBS.

4) Realizar diluciones del suero control negativo: 1 : 10 y 1 : 40 en PBS.

5) Diluir el suero problema en PBS (para una prueba

screening como es nuestro caso utilizamos la dilución 1 : 10 ya que los adultos con una historia de mononucleosis infecciosa habitualmente tienen títulos de anticuerpo frente al antígeno capsídico del virus de Epstein-Barr entre 1 : 10 y 1 : 80 .

6) Colocar una gota de cada suero o control diluido en su pocillo correspondiente. Poner también una gota de PBS solo en un pocillo (control del conjugado).

7) Incubar a 37ºC durante 30 minutos en cámara húmeda.

8) Lavar los portas 2 veces 5 minutos con PBS dentro de un recipiente adecuado. Lavar con agua desionizada.

9) Secar a temperatura ambiente.

10) Añadir una gota de anti-IgG marcada con fluoresceína en cada pocillo.

11) Incubar en cámara húmeda a 37ºC durante 30 minutos.

12) Lavar los portas como en el punto 8.

13) Secar a temperatura ambiente.

14) Añadir líquido de montaje.

15) Cubrir con un cubre.

16) Observar con microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS E INTERPRETACIONES:

El control negativo está compuesto de sueros que presentan distintos tipos de reactividades no específicas con las células. Una de estas reacciones da una tinción blanquecina de alguno de los linfocitos pequeños a altas concentraciones de suero (por ejemplo 1 : 10). Esta tinción no específica con el suero control negativo puede ser considerada negativa para anticuerpos frente al virus de Epstein-Barr.

Una reacción positiva viene indicada por una coloración brillante verde manzana en la periferia y citoplasma de las células infectadas.

La intensidad del control positivo es de 3-4 cruces con la dilución 1 : 10 y va descendiendo hasta 1 : 640.

Si el control negativo se ve positivo a 1 : 10 o si el control positivo tiene un título inferior a

1 : 320 se debe considerar el test como inválido y repetirlo de nuevo.

I.8. Determinación de anticuerpos frente a Treponema pallidum.

Hacemos uso de las pruebas no treponémicas (RPR) y de las pruebas treponémicas (Hemaglutinación y FTA-ABS).

I. RPR (Rapid Plasma Reagin).

PRINCIPIO:

Se trata de una prueba no treponémica para la detección serológica de sífilis.

Se utiliza como antígeno la cardiolipina unida a partículas de carbón y detecta "reagina", una sustancia semejante a los anticuerpos que está presente en el suero de sujetos sifilíticos y, ocasionalmente, en sueros de personas con otras enfermedades agudas o crónicas (mononucleosis infecciosa, lepra, malaria, lupus eritematoso, neumonías virales...). Es una sustancia que reacciona con los lípidos hísticos.

Cuando un especimen contiene reagina, ocurre una floculación con una conglutinación de las partículas de carbón apareciendo como puntos negros que contras-

tan con el fondo blanco de la tarjeta de reacción. Por el contrario, los especímenes no reactivos aparecen de color gris brillante.

TECNICA:

Con el tubo capilar se recogen 0,3 ml de suero problema y se depositan en una zona de la tarjeta de reacción con fondo de color blanco y forma de lágrima.

A continuación se deposita, junto a la gota de suero, una gota de antígeno (cardiolipina unida a partículas de carbón). Se mezclan ambas gotas con un palillo de madera. Agitar de forma circular durante 4 minutos.

RESULTADOS:

-Positivo: aparición de grumos de color negro.
-Negativo: color gris brillante uniforme.

II. Hemaglutinación:

Hacemos uso del SERA-TEK de Ames Division, Miles Lab.Inc.

Se trata de una prueba treponémica usada para la confirmación de la existencia de anticuerpos frente a la sífilis.

Tiene una alta especificidad para detectar anticuerpos frente a T.pallidum.

Para la realización de esta prueba es necesario un cierto conocimiento de las técnicas de microtitulación.

PRINCIPIO:

El test está basado en la aglutinación de eritrocitos de oveja sensibilizados por anticuerpos frente a T. pallidum. Antes de comenzar el test las muestras de suero se mezclan con un absorbente que elimina los reactantes inespecíficos. El suero que contenga los anticuerpos específicos reaccionará con las células sensibilizadas (cubiertas con antígeno de T. pa-

llidum) y se formará una red uniforme de células aglutinadas en el pocillo de la placa de microtitulación.

Las reacciones negativas se caracterizan por un botón compacto formado en el fondo del pocillo por el depósito de las células no aglutinadas.

REACTIVOS:

A-Absorbente: solución salina fosfatada y tamponada (pH 7,2) conteniendo componentes solubles de membranas de eritrocitos de oveja (0,5%), componentes solubles de membranas de eritrocitos bovinos (0,25 %), extracto testicular de conejo (0,1%), treponemas de Reiter (0,125%), suero de conejo (1%) y estabilizadores.

B-Células sensibilizadas: eritrocitos de oveja sensibilizados con antígeno de T.pallidum (cepa Nichols).

C-Células no sensibilizadas: eritrocitos de oveja.

D-Control positivo: suero humano y/o de conejo que contiene anticuerpos frente a T.pallidum.

E-Control negativo: suero humano normal.

F-Agua de rehidratación: agua destilada y pasada por autoclave.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

Los reactivos vienen liofilizados y hay que rehidratarlos con agua de rehidratación:

1. El Absorbente no requiere rehidratación.
2. Células sensibilizadas: rehidratar cada frasco con 0,8 ml de agua.
3. Células no sensibilizadas: rehidratar cada frasco con 0,5 ml de agua.
4. Control positivo: rehidratar con 0,5 ml de agua.
5. Control negativo: rehidratar con 0,5 ml de agua.

DILUCIONES DE TRABAJO:

Preparar las diluciones de Trabajo de las células sensibilizadas y no sensibilizadas añadiendo una parte de suspensión de células rehidratadas a 5,5 partes de Absorbente. Preparar solamente la cantidad necesaria para ese día.

Volumenes de reactivos necesarias: las cantidades siguientes de reactivos se necesitan para probar cada muestra o control:

A-Absorbente: 0,38 ml.
B-Dilución de trabajo de células sensibilizadas: 0,075 ml.
C-Dilución de trabajo de células no sensibilizadas: 0,075 ml.
D-Suero control positivo: 0,020 ml.
E-Suero control negativo: 0,020 ml.

Todos los reactivos deben estar a la temperatura ambiente cuando vayan a ser usados.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

1) Poner un tubo debidamente identificado para cada muestra a probar y para cada uno de los 2 controles.

2) Pipetear 0,38 ml de absorbente en cada tubo.

3) Añadir 0,02 ml de muestra (suero problema) o control en cada tubo. Obtenemos así una dilución al 1 : 20 en Absorbente.

4) Usandc una pipeta mezclar 8 veces cada suero diluido e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Las diluciones de los sueros problemas y de los controles están ya en condiciones de ser testadas.

PROCEDIMIENTO:

Son necesarias pipetas calibradas para administrar volúmenes de 0,025 ml y placas de microtitulación de plástico.

Para los controles se necesitan 12 pocillos y 2 pocillos para cada muestra (uno para ver si es positivo y otro para ver si el suero presenta una aglutinación inespecífica).

1. Controles:

   a. En la fila de pocillos destinada a los controles (12 pocillos), añadir 0,025 ml de Absorbente en los pocillos del 2 al 7, 9 y 10.

   b. Añadir 0,05 ml de control positivo en el pocillo 1 y 0,025 ml en el pocillo 11.

   c. Preparar una dilución en serie del control positivo mezclando el pocillo 1, de éste sacar 0,025 ml y pasarlos al pocillo 2, mezclar; y así sucesivamente hasta el pocillo 7 donde se desechan los últimos 0,025 ml.

   d. Añadir 0,025 ml de control negativo en los pocillos 8 y 12.

2. Sueros problema:

   a. Agregar 0,02 ml de cada suero diluido en absorbente en dos pocillos debidamente identificados.

Para los controles se necesutan 12 pocillos y 2 pocillos para cada muestra (uno para ver si es positivo y otro para ver si el suero presenta una aglutinación inespecífica).

1. Controles:

   a. En la fila de pocillos destinada a los controles (12 pocillos), añadir 0,025 ml de Absorbente en los pocillos del 2 al 7, 9 y 10.

   b. Añadir 0,05 ml de control positivo en el pocillo 1 y 0,025 ml en el pocillo 11.

   c. Preparar una dilución en serie del control positivo mezclando el pocillo 1, de éste sacar 0,025 ml y pasarlos al pocillo 2, mezclar, pasar 0,025 ml al pocillo 3, mezclar; y así sucesivamente hasta el pocillo 7 donde se desechan los últimos 0,025 ml.

   d. Añadir 0,025 ml de control negativo en los pocillos 8 y 12.

2. Sueros problema:

   a. Agregar 0,025 ml de cada suero diluido en absorbente en dos pocillos debidamente identificados.

3. Dispensar 0,075 ml de la dilución de trabajo de hematíes sensibilizadas en los pocillos 1 a 9 de la hilera correspondiente a los controles y en el primer pocillo del par que corresponde a cada suero problema.

4. Dispensar 0,075 ml de la dilución de trabajo de hematíes no sensibilizados en los pocillos 10 a 12 de la hilera correspondiente a los controles y en el segundo pocillo del par que corresponde a cada suero problema.

5. Agitar la placa suavemente y tapar.

6. Incubar las placas a temperatura ambiente unas 4 horas como mínimo.

CONTROL DE CALIDAD:

Los controles positivo y negativo deben ser procesados con cada batería de test. El control positivo no debe variar más de una dilución (arriba o abajo) de la indicada en la etiqueta y debe ser no reactivo con las células no sensibilizadas.

Los controles negativo y de Absorbente deben ser negativos con las células sensibilizadas y con las no sensibilizadas.

RESULTADOS:

-Positivo: red uniforme de eritrocitos en el fondo del pocillo.

-Negativo: botón de eritrocitos sedimentados formando un punto en el centro del fondo del pocillo.

En caso de ser positivo se puede cuantificar el título de anticuerpos presentes en el suero haciendo diluciones del mismo tal como se hace con el control positivo.

III. FTA-ABS

Usamos el kit de la casa CLINICAL SCIENCES.

1. PRINCIPIOS:

El FTA-ABS se basa en una inmunofluorescencia indirecta. Los sueros de los pacientes se diluyen en el sorbente para extraer los anticuerpos inespecíficos y luego son incubados con antígeno de T. pallidum. Si están presentes los anticuerpos específicos en el suero del paciente, se forman complejos antígeno-anticuerpo estables. Los complejos formados captan inmunoglobulina antihumana marcada con fluoresceína.

El resultado positivo de la reacción se observa como una fluorescencia verde manzana de los treponemas cuando se observan bajo un microscopio de fluorescencia.

2. REACTIVOS:

-Portas: cada uno con 10 pocillos que contienen espiroquetas de T. pallidum fijadas (cepa Nichols).
-Conjugado: inmunoglobulina antihumana conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) liofilizada. Como conservante se añade Thimarosal al 0,01%. Se reconstituye con 3 ml de diluyente.
-Diluyente del conjugado: contiene un 2% de Tween 80 en PBS (solución tampón fosfato salina).
-Suero control positivo: suero humano que contiene anticuerpos específicos frente a T. pallidum.
-Suero control inespecífico: suero humano que contiene anticuerpos inespecíficos frente a treponemas.
-Sorbente: preparado a partir de cultivos de treponemas de Reiter.
-PBS: sllución salina tamponada y fosfatada. pH:7,2.

-Medio de montaje: glicerol tamponado y fosfatado. pH:8,4.