

BIOLOGÍA MOLECULAR Y VIH: PRUEBAS VIROLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS

María Lilia Díaz B.

Médica Internista Infectóloga

Profesora de la Universidad del Cauca

Introducción

Las técnicas de Biología Molecular han permitido el conocimiento de la estructura, biología, metabolismo, patogénesis, evolución de una gran variedad de agentes infecciosos relacionados con enfermedad, así como establecer medidas de diagnóstico, prevención, tratamiento y seguimiento de las infecciones causadas por dichos gérmenes, entre ellos el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En la presente revisión se resumen las pruebas inmunológicas usadas para el diagnóstico y seguimiento, lo mismo que algunas de las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cuantificación de ARN viral mediante PCR, la tecnología del ADN ramificado y sus aplicaciones en el diagnóstico, establecimiento del pronóstico, resistencia del virus a los anti-retrovirales y evaluación de la respuesta al tratamiento.

1. Diagnóstico de la infección por VIH

El diagnóstico de la infección por el VIH puede establecerse mediante:

- 1.1. La demostración de anticuerpos (Ac) específicos.
- 1.2. Detección de antígeno (Ag) del virus.
- 1.3. Aislamiento del virus en cultivo.
- 1.4. Identificación de material genético del virus.

1.1. *Anticuerpos específicos al VIH*

Las pruebas para determinar la presencia de Ac anti VIH en el suero fueron ideadas desde finales de 1983, poco después del aislamiento del virus, y tienen uso comercial desde 1985.

1.1.1. *Técnicas inmunoenzimáticas (Enzyme Immuno Assay, EIA)*

Son de las más utilizadas, el Ag va unido a una fase sólida y se expone al suero del paciente. Los Ac pegados al Ag son detectados por una inmunoglobulina (Ig) de cabra anti IgG humana marcada con una enzima. La reacción se revela con el substrato de la enzima, produciéndose color detectable mediante el lector de *Elisa*, expresada en OD proporcional a la cantidad de Ac presente en el suero.

Las pruebas inmunoenzimáticas de primera generación utilizan como Ags proteínas del lisado del cultivo viral, tienen una alta sensibilidad, del 97.2% al 100%, pero baja especificidad con alta proporción de falsos positivos y valor predictivo positivo bajo del 28% en población, con prevalencia de infección por VIH baja (0.2 %). En población con alta prevalencia de la infección la especificidad es alta, del 99.6 - 100%.

Las pruebas comerciales varían en la clase de fase sólida y la línea de células para el cultivo del virus que usan. Ver Tabla 1.

TABLA 1. Algunas pruebas de EIA comerciales de primera generación.

Marca	Línea celular	Fase sólida	Observación
Abbott	H9	Látex	Más sensible para Ac anti-p24 y productos del gene pol. En fase temprana es menos sensible.
Genetic systems*	CME-F	Pozo	El más sensible, específico y reproducible.
Ortho	H9	Pozo	
Organon-teknika	H9	Pozo	Más sensible para Ac anti-productos del gene pol.
Organon teknika	H9	Esferas de metal.	
Cellular Products*	H9	Pozo	

* 91% sensibilidad para VIH-2

Las pruebas de segunda generación se utilizan como Ags proteínas o péptidos recombinantes o sintéticos, en lugar del lisado viral, tienen una mejor sensibilidad y especificidad que las de primera generación, con menos proporción de falsos positivos, adicionalmente la cantidad de Ag es estandarizada, con mejor reproducibilidad. Pueden tener algunas limitaciones, como la falta de detección de algunos subtipos de VIH por carencia de reacción cruzada con los Ags de la prueba y pobre interacción de estos Ags no glicosilados con los anticuerpos. Las pruebas comerciales de segunda generación se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2. Pruebas de segunda generación

Marca	Antígeno	Fase sólida	Observación
Cambridge Biotech	p24, gp41, gp120 recombinantes de VIH-1	Pozo	Más sensible para Ac anti gp120 y gp41 que aparecen primero.
United Biomedical Inc.	p24, gp 41, sintéticos	Pozo	Sensibilidad 100%, Especificidad 99.7%
Smith Kline	Proteínas de genes gag, pol y env		Sensibilidad 99.7% Especificidad 99.9%

La prueba de tercera generación utiliza un Ag específico marcado con la enzima en lugar de un Ac a IgG humana, tiene las siguientes características, que se observan en la Figura N° 1.

Marca	Antígeno	Fase sólida	Observación
Abbott	p24, gp41 DE VIH-1 gp 41 DE VIH-2 recombinantes	Látex	Mejor capacidad para unir IgM e IgA., mayor sensibilidad en fase temprana.

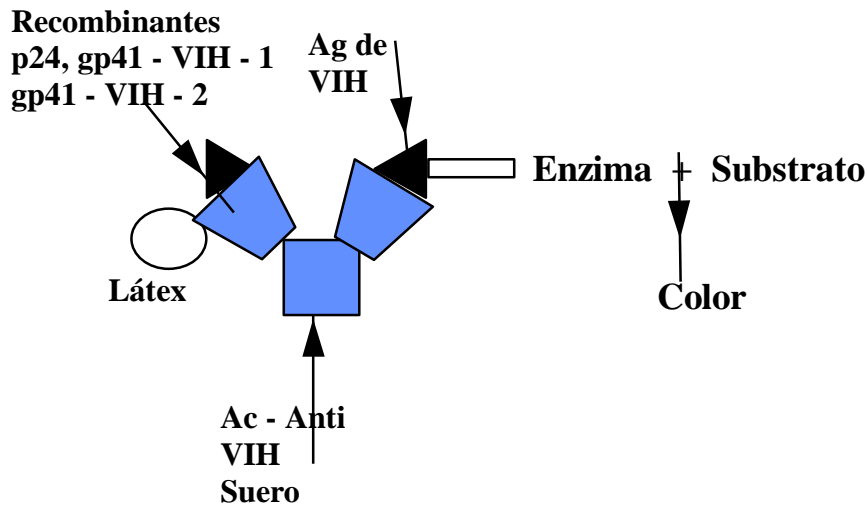


Figura 1. Esquema de prueba de E.I.A. de 3a. generación

Debido a las limitaciones de la especificidad en poblaciones de bajo riesgo de VIH, una prueba positiva para VIH requiere repetirse y, en caso de reactividad, confirmación con otra técnica para ello, como el western blot (WB).

Las causas de falsos positivos en pruebas de EIA pueden ser la presencia de Acs antinucleares, Ac antimitocondria, músculo liso, células parietales, leucocitos y células T; IgM antihepatitis A, y anti C de hepatitis B; Ac contra Ags leucocitarios clase II, especialmente en múltiparas y multitransfundidos; enfermedades hepáticas como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante y cirrosis alcohólica; inactivación del suero por calentamiento antes de la prueba, o presencia de RPR (Abbott); enfermedad hematológica maligna, infecciones virales agudas por virus de ADN o VIH-2 o inmunización contra la influenzae; insuficiencia renal crónica o trasplante renal; Ac a VIH pasivos como en la aplicación de Ig anti hepatitis B.

Las causas de falsos negativos pueden ser el período de ventana inmunológica, neoplasia maligna, terapia inmunosupresora intensa o prolongada, transfusión masiva o trasplante de médula ósea, pruebas que sólo detectan Ac contra el Ag p24 y el factor reumatoideo en las pruebas competitivas.

1.1.2. Pruebas rápidas para la búsqueda de anticuerpos

La mayoría de pruebas de EIA se demoran 1 a 3.5 horas, requieren equipo, mantenimiento de equipo y personal entrenado que las hace costosas, sobre todo para laboratorios donde se procesan pocas muestras. Las pruebas rápidas pueden obviar estos problemas ya que la lectura puede ser visual y no requiere equipos.

Una prueba de EIA rápida es la Murex SUDS, utiliza Ag p24 purificado y un péptido de gp41 recombinante, unidos a partículas de látex. La reacción enzimática produce coloración azul que se observa con un aparato de microfiltración. La sensibilidad y especificidad es del 99.9% y 99.6%.

Aglutinación del látex. En esta prueba, proteínas altamente conservadas de gp 120 y gp 41 recombinantes de VIH (unidas a esferas de poliestireno) se ponen en contacto con el suero del paciente. Cuando hay presencia de Ac específicos se observa aglutinación, ésta es una técnica fácil y la sensibilidad es del 99%, la especificidad del 100% comparada con el WB en población de alto riesgo de VIH (18% de prevalencia).

Dipstick. Las células infectadas se fijan a poliestireno grueso al que se adiciona el suero del paciente y un reactivo para EIA modificado. La reacción colorimétrica es observada en 15', tiene 98% de sensibilidad y 90% de especificidad con falsos positivos en forma importante.

Prueba de autoaglutinación de glóbulos rojos. Usa un Ac monoclonal de ratón contra los glóbulos rojos humanos no aglutinante unido a un péptido recombinante de gp41 que se adiciona a la sangre del paciente y en presencia de Ac contra la envoltura de VIH ocurre aglutinación. La prueba se demora dos minutos y requiere sólo 10 µl de sangre. La sensibilidad es del 98% y los falsos positivos de 0.1%.

La prueba de aglutinación utilizando partículas de gelatina (serodia) tiene sensibilidad y especificidad mayores al 94%.

Dot blot immunobinding. Consiste en utilizar el lisado viral fijo en papel de nitrocelulosa para ponerlo en contacto con el suero del paciente e identificar los Ac mediante un Ac anti Ig G humana marcado con enzima. Se evalúa la reacción colorimétrica sobre el papel. La técnica es simple, rápida y no requiere de equipo. Hay alguna variabilidad dependiendo del observador. La sensibilidad y especificidad son comparables al EIA genetic system. Se puede realizar para IgA en niños con buenos resultados donde 50% a 93% de los niños fueron detectados a los seis meses, al tiempo que el cultivo o un poco antes. Un dot inmuno blot (Hivchek Dupont) con proteínas recombinantes (segunda generación) tiene 87% - 99% de sensibilidad y 97% a 99% de especificidad, es fácil de realizar y se demora 5'.

En una prueba para detectar la producción de Ac por las células mononucleares de sangre periférica, el Elispot utiliza Ag gp41 recombinante fijo en papel de nitrocelulosa en un pozo de placa de microelisa al cual se adiciona el suero del paciente y se incuba toda la noche. La producción de Ac se mide mediante EIA.

Citometría de flujo. Para este método, células H9 infectadas con VIH o perlas de poliestireno de varios tamaños con Ag recombinantes se exponen al suero del paciente, se marcan con Ig anti IgG humana fluorescente y se someten a Citometría. Wen Hu et al. usaron una prueba recombinante de citometría de flujo con proteínas p45, gp45, gp120 y pol 97 que se exponen al suero del paciente y se detectan con Ac de cabra anti IgG, anti Ig M y anti IgA fluorescentes, detectando Ac en muestras de seroconvertidores 20 días antes que el método de EIA. Esta metodología, que se encuentra en desarrollo, podría acortar en forma importante el período de ventana inmunológica.

1.1.3. Pruebas en saliva o líquido crevicular

Las pruebas de EIA y algunas de los otros métodos pueden ser realizadas en otro tipo de muestras diferentes del suero, entre ellas en sangre fijada en papel de filtro, orina, LCR y saliva o líquido crevicular. En la saliva, Soto L. et al. encontraron Ac anti-VIH con una prueba de *Elisa* (Organon teknika) en el líquido crevicular recogido con un dispositivo (OraSure de Epitepe, Beaverton, Oreg.) en 354 de 356 individuos positivos en el suero. Los autores

también realizaron WB en 355 muestras de ambas, suero y líquido crevicular, siendo positivos todos los sueros y 301 líquidos creviculares, 52 líquidos fueron indeterminados y dos negativos. La sensibilidad fue del 99.5%, la especificidad del 100%, el VPP del 100% y el VPN del 99.9%.

Una prueba rápida (Test Pack) para realizarla en saliva recogida con el dispositivo salivette mostró 99% de sensibilidad y especificidad. Dado el hallazgo de falsos negativos en estos estudios, estas pruebas tienen utilidad para vigilancia epidemiológica de la infección y no se han recomendado para establecer el diagnóstico.

Con otro dispositivo el Omni-sal y pruebas de EIA de Abbot, Organon teknika y Murex Gacelisa, la sensibilidad de las pruebas en saliva fue del 100% y la especificidad fue de 89.6, 96.5 y 97.8 % respectivamente. Cuando la prueba se repitió, la especificidad fue para todas del 99.3%. Adicionalmente, los WB en la saliva y suero de 149 muestras positivas fueron idénticos. La sensibilidad con el EIA Wellcozyme Gacelisa en otro estudio de 133 muestras positivas fue del 100% y la especificidad en 153 muestras fue del 98.7%. Estos últimos estudios indican que con estas pruebas comerciales la saliva puede ser una buena primera muestra para el establecimiento del diagnóstico con una sensibilidad del 100%.

En la actualidad las pruebas de EIA son las más utilizadas con los propósitos siguientes: tamizaje de muestras de donadores en bancos de sangre y tejidos, vigilancia de la infección en determinada población, diagnóstico de pacientes con síntomas e investigación. En el tamizaje de muestras de donadores en EE.UU. se recomiendan los pasos seguidos en la Figura 2.

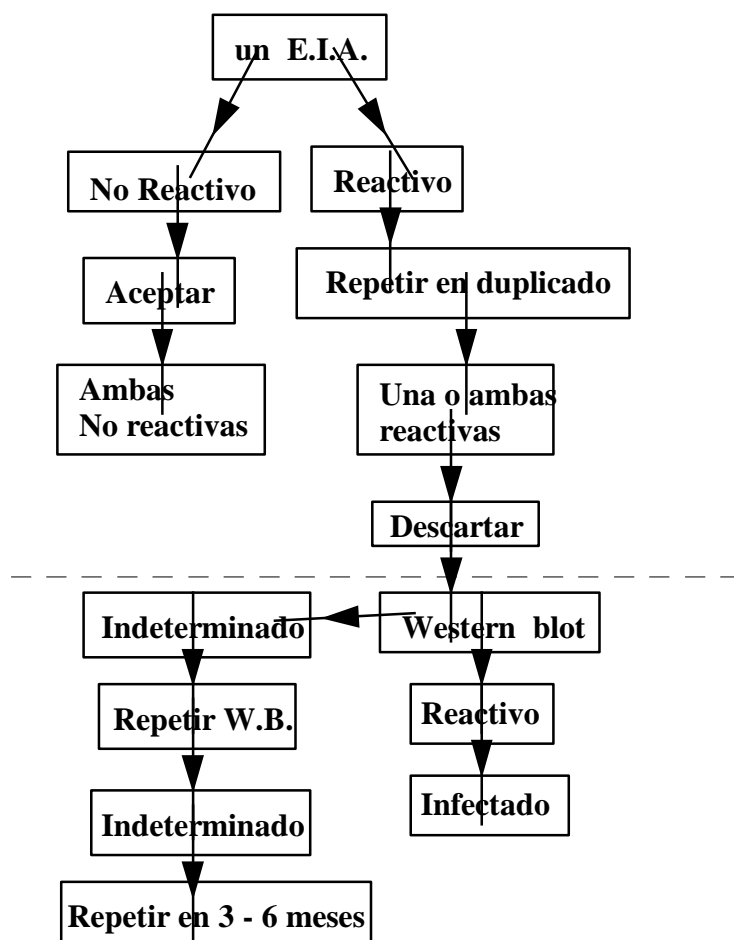


Figura 2 . Esquema para el tamizaje de VIH en sangre o plasma

Aunque el test de EIA es probablemente la mejor prueba para el estudio de muestras donadas cuando se requiere el procesamiento de gran número de ellas diariamente, la OMS ha sugerido para lugares con poca disponibilidad de equipos, personal entrenado y recursos económicos limitados, el empleo en bancos de sangre de una prueba en una muestra que puede ser un EIA o prueba rápida, descartando las sangres reactivas y aceptando las negativas. (Estrategia I.)

Con el propósito de vigilancia de la infección la OMS recomienda una sola prueba en poblaciones de alta prevalencia de infección mayor al 10% (Estrategia II) y en población con prevalencia menor al 10% dos pruebas con diferente preparación o método cuando la primera es reactiva, interpretando como positivas aquellas reactivas en las dos pruebas y negativas el resto. De esta manera la primera prueba debe tener alta sensibilidad y la segunda alta especificidad.

Para el establecimiento del diagnóstico en pacientes con síntomas de infección por VIH o Sida, o en los menos sintomáticos pero en áreas de alta prevalencia, repetir la primera reactiva con diferente método o preparación interpretando positivo cuando ambas son

reactivas (Estrategia II), y en casos menos sintomáticos pero en zonas con baja prevalencia, cuando ambas pruebas son reactivas se deben confirmar con una tercera diferente y si los resultados no son concordantes tomar nueva muestra con al menos dos semanas de intervalo. (Estrategia III.)

En agosto de 1985 la administración de alimentos y drogas de los EE.UU. recomendó, debido a un estimado de una transfusión sanguínea infectada en cada 450.000 a 660.000 transfusiones, o sea 18 a 27 por año, la realización de la prueba de Ag p24 a todas las donaciones con el objeto de disminuir estas cifras en un 25%. La interpretación de los resultados se describe en la Figura 3 de la página siguiente.

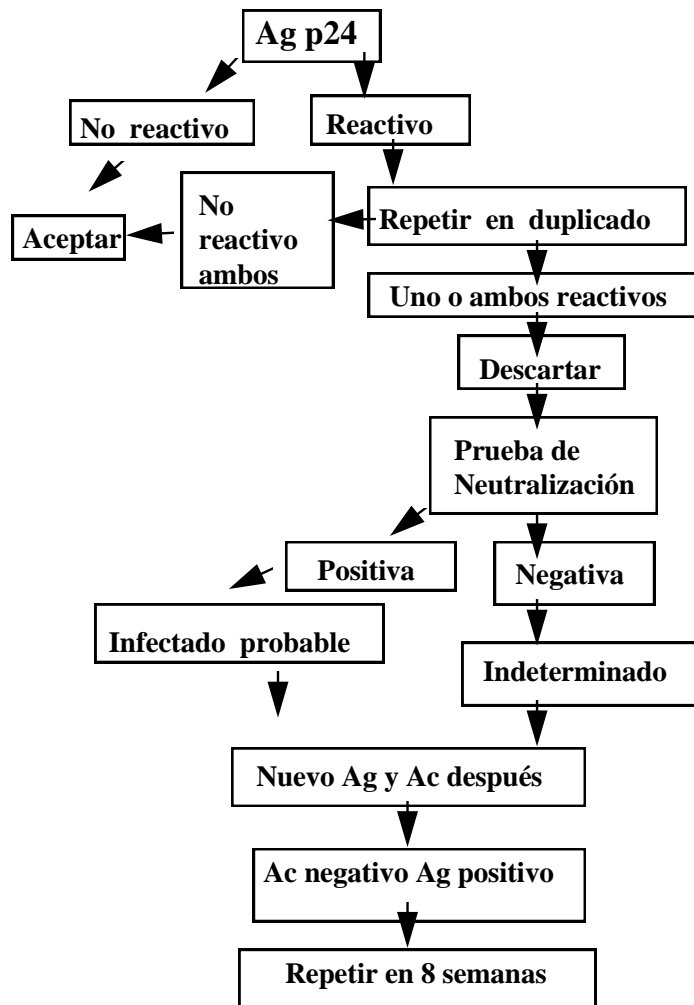


Figura 3 . Interpretación de la prueba de Ag p24 en el tamizado para VIH de muestras donadas

1.1.4. Pruebas confirmatorias

1.1.4.1. Western Blot (WB)

Este método permite detectar Ac específicos contra las diferentes proteínas del VIH, consiste en poner a reaccionar el suero del paciente con las proteínas del lisado viral que han sido

separadas por medio de electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa con la cual se pone en contacto el suero a investigar. La presencia de Ac a VIH se revela adicionando un Ac anti IgG humana marcado con enzima que al adicionar el substrato colorea los sitios de los antígenos para los cuales hay anticuerpos. Figura 4.

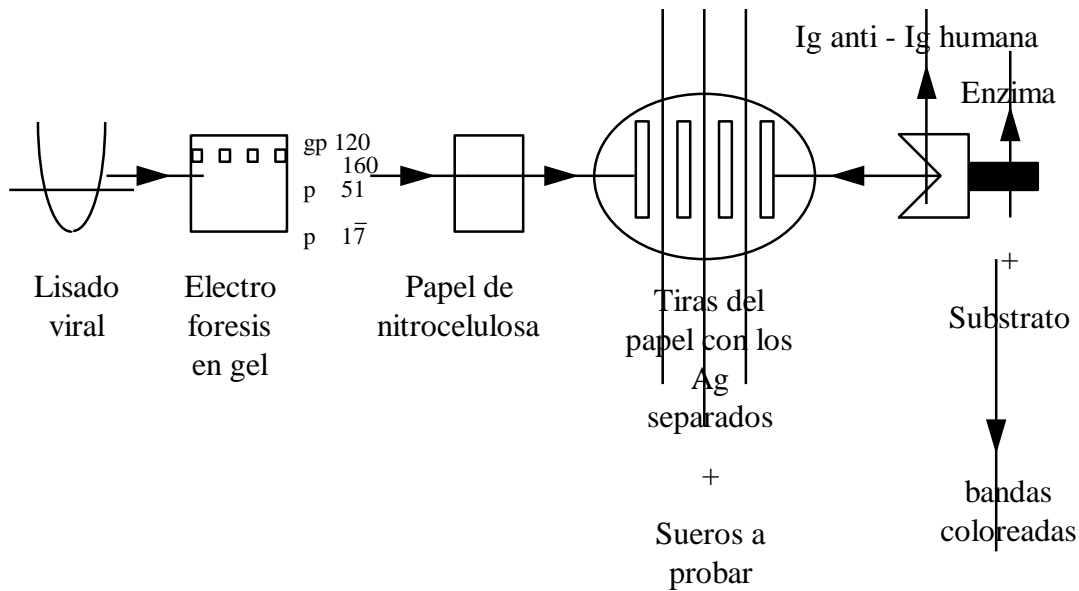


Figura 4. Técnica de Western

El WB es más sensible para identificar anticuerpos contra el Ag p24 que el anti gp41 y menos sensible que la radioinmunoprecipitación para identificar anticuerpos contra gp 160/120 debido a que las proteínas glicosiladas no transfieren bien al papel de nitrocelulosa y tienen menos poder de resolución. El WB no es sensible en etapa temprana de la infección dado que los Ac anti- Ag p24 se demoran más en aparecer y también en etapa avanzada donde estos Acs tienden a desaparecer.

Las pruebas son distribuidas por BIO - RAD, Organon Teknika y Dupont, el último con mayor especificidad por carecer de reacción contra Ag HLA I y II que cruzan con gp41 y p31.

Para la interpretación del WB se considera el WB positivo cuando se encuentran Ac contra al menos dos de las proteínas mayores específicas de VIH p24, gp41 o gp160/gp120. El WB es no reactivo cuando no hay ninguna banda específica e indeterminado cuando hay combinaciones de Ac que no lo definen como positivo. Figura 5.

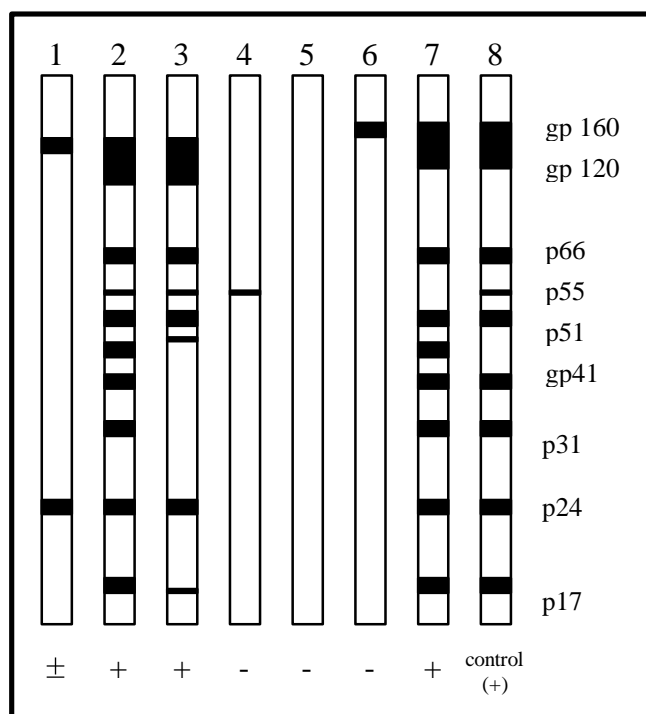


Figura 5. Resultados de diferentes sueros por Western blot para VIH

El 20-30% de personas con EIA y PCR negativos pueden tener una o más bandas inespecíficas contra proteínas virales o celulares. Los WB indeterminados deben repetirse a los tres meses o confirmarse con otra prueba como inmunofluorescencia indirecta o radioinmunoprecipitación, constituyen del 2-49% de los WB y son causados por Ac contra p24, p55 o p66. En población de bajo riesgo muy rara vez un WB indeterminado se debe a infección y la seroconversión es variable en los de alto riesgo.

El valor predictivo positivo del WB después de 2 EIA positivos es del 99.5% en población de bajo riesgo y del 99.6% en población de alto riesgo. La probabilidad de falsos positivos es de 1-5 en 100.000. La probabilidad de falsos negativos es de 1:40 a 1:1000000. Las causas de falsos positivos pueden ser la presencia de Ac contra ribonucleoproteínas humanas, otros retrovirus, Ac antimitocondrias, Ac antinucleares, antileucocitos, anticélulas T, anti-HLA I y II y en la gammopatía policlonal.

1.1.4.2. Inmunofluorescencia indirecta

En esta prueba se utiliza una placa con células infectadas con VIH, a las que se les adiciona el suero del paciente, y la presencia de Ac contra VIH se detecta con Ac anti IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína. Mide IgG más temprano que el Elisa (11 días de los síntomas agudos vs 31). Puede realizarse para Ac IgM, caso en el cual detecta la infección más tempranamente (cuatro días después de los síntomas agudos). La inmunofluorescencia

puede ser cualitativa o cuantitativa, es más rápida, fácil y menos costosa que el WB pero se necesita entrenamiento y experiencia para una adecuada lectura.

Es útil para diagnosticar la infección tempranamente y para confirmarla o descartarla en casos de WB indeterminado.

1.1.4.3. Radioinmunoprecipitación - RIPA

Requiere el cultivo de VIH en linfocitos (células H9) en presencia de aminoácidos marcados con radioisótopos, metionina ^{35}S y cisteína ^{35}S que son incorporados en las proteínas del virus. Al lisado viral se le adiciona el suero del paciente y los complejos inmunes formados en caso de presencia de Ac contra VIH se fijan con proteína A a sefarosa, se separan por centrifugación, se eluyen y se separan de nuevo por electroforesis. Se autorradiografían revelándose las bandas correspondientes a Acs contra las diversas proteínas.

Da una mejor resolución para las proteínas de alto peso molecular que el WB y es más sensible y específico tempranamente en la infección y en etapa tardía por detectar en forma adecuada Ac contra gp 120/160. Está indicado en casos de WB indeterminado o en casos con bajo nivel de anticuerpos. Las limitaciones de la técnica son la necesidad de cultivo viral y manejo de radioisótopos, es demorada, requiere personal experto y es costosa.

1.1.4.4. Otras pruebas confirmatorias

La prueba de inmuno blot recombinante (Chiron) utiliza proteínas recombinantes (segunda generación) pasadas a nitrocelulosa después de separación por electroforesis para colocarlas en contacto con el suero del paciente e identificación similar al WB.

El inmuno blot recombinante gp41 es más sensible que el WB o la IFA detecta anti gp41 que aparece antes que anti-p24 y carece de falsos positivos.

1.2. *Detección de antígeno viral p24*

Se realiza por el método de EIA, mide la presencia o ausencia de la proteína mayor del corazón viral que circula libre en el plasma o unida al anticuerpo formando complejos inmunes. La prueba puede medir el Ag libre si se realiza la simple o el que está formando complejos inmunes si se realiza pretratamiento de la muestra con ácido que degrada el Ag libre y disocia los complejos inmunes. Esta última muestra mayor sensibilidad.

El Ag p24 circula libre en el plasma durante la infección primaria antes de la aparición del Ac y tardíamente cuando este último desaparece y la carga viral aumenta. El Ag p24 no es detectable en el período asintomático, reflejando la baja carga viral o su circulación en forma de complejos inmunes.

Algunas de las pruebas comerciales para medir el Ag p24 son de Abbott con Ac policlonal, Coulter y Dupont con Ac monoclonales. Estas pruebas detectan hasta 6-12 pg/ml de suero, tienen alto nivel de reproducibilidad, baja variabilidad interlaboratorios y facilidad en la realización, puede detectar un 50% o más grande disminución en la concentración de Ag en forma confiable. Las muestras positivas deben confirmarse con la prueba de neutralización.

La utilidad de la medición del Ag p24 en suero es clara en el diagnóstico de la infección temprana en el período de ventana inmunológica cuando los Ac son aún negativos, por

ejemplo en pacientes con síndrome retroviral agudo o en expuestos a VIH, también en el tamizaje de muestras donadas a bancos de sangre como se describió arriba; sin embargo, esta prueba es menos sensible que el cultivo. Igualmente, tiene utilidad en el diagnóstico del neonato y niños menores de seis meses nacidos de madres seropositivas. Durante los dos primeros meses de vida el Ag es positivo en el 50%, y a los seis meses en el 90%. Es menos sensible que el cultivo o el PCR para identificar niños infectados antes de los seis meses de edad. Ver Figuras 6 y 7.

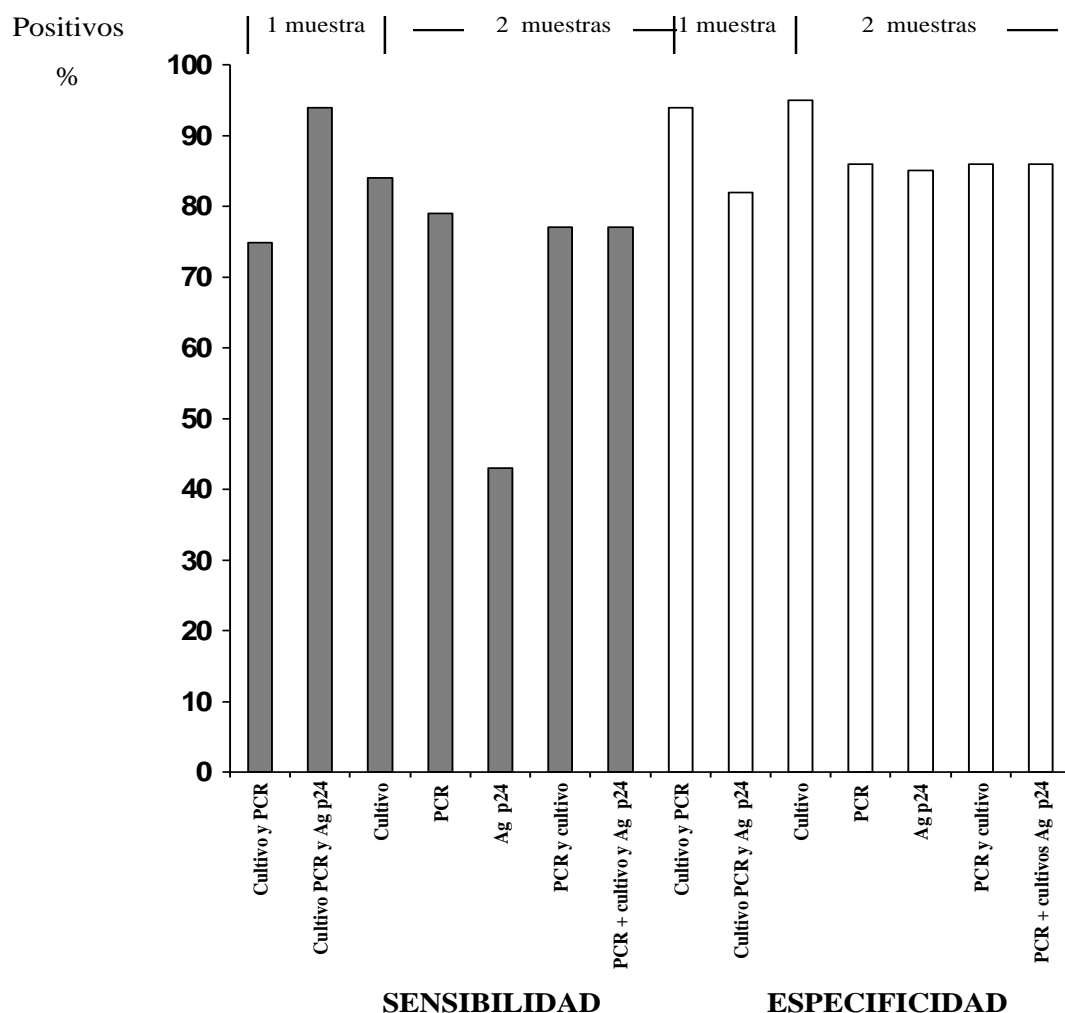


Figura 6. Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas de VIH en 1o 2 muestras de 32 niños infectados y 176 no infectados ≤ 3 meses

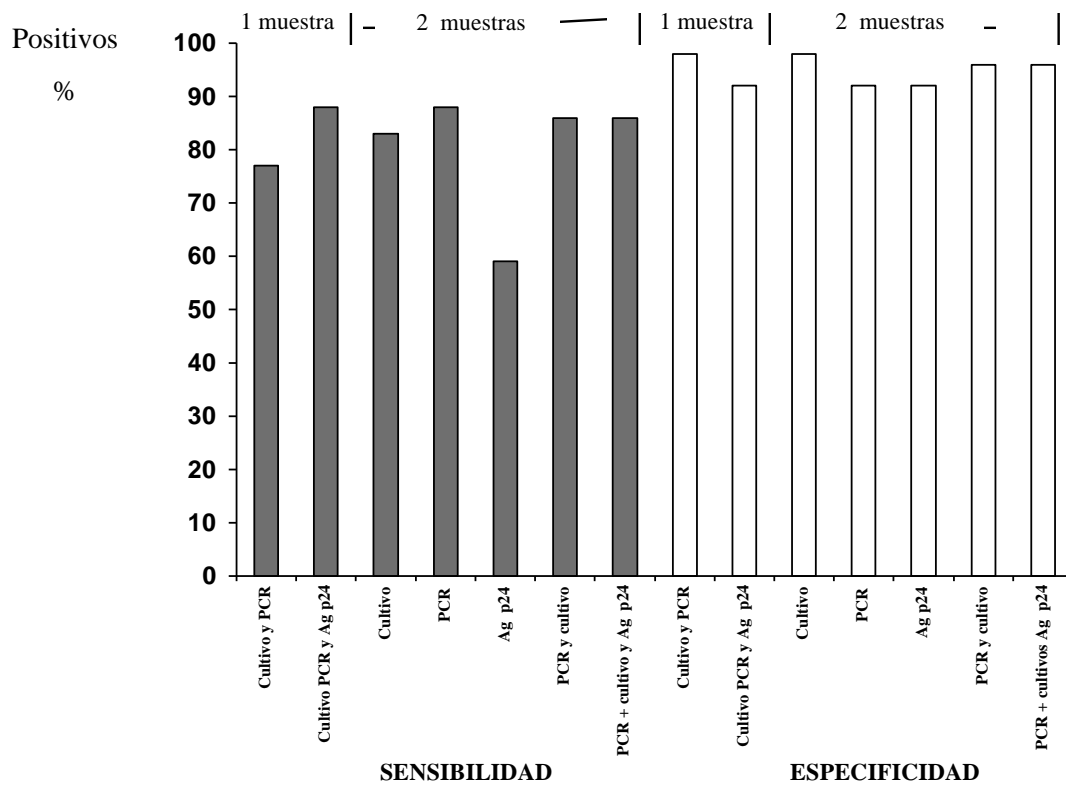


Figura 7. Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas de VIH en 1 o 2 muestras de 32 niños infectados y 176 no infectados \leq 6 meses

Otras utilidades son en el establecimiento del pronóstico, el estudio de medicamentos, seguimiento de la respuesta a tratamiento y monitoría de la aparición de resistencia, aunque no es aplicable a todos los pacientes por la baja sensibilidad de la prueba en los diferentes grupos, así: entre pacientes con 200-500 CD4 /ml el Ag p 24 es positivo en el 17-25% con la prueba estándar y 45-70% con la prueba después de tratamiento para disociación de complejos inmunes. En pacientes con CD4 < 200 / ml o CRS el Ag p24 es positivo en 40-50% con la prueba estándar y 75-100% con la prueba post-disociación de los complejos.

En la monitorización de la respuesta al tratamiento con antivirales, Chaisson y col. demostraron una disminución del Ag P24 en los pacientes tratados con AZT y esto correlacionó con el aumento de CD4, lo que ha sido confirmado en estudios posteriores del grupo de trabajos clínicos en SIDA (ACTG) de EUA. Un cambio del 50% en su nivel se considera significativo. De otra manera los niveles de Ag p24 se incrementan con la aparición de resistencia.

El Ag p24 es más frecuentemente positivo desde el primer año de la seroconversión en los pacientes que desarrollarán Sida que en los asintomáticos con descenso de CD4 o en los que el CD4 permanece estable pero sólo se detecta en 36% en el primer año en el grupo que desarrolla Sida y tampoco discrimina entre asintomáticos con deterioro inmunológico y asintomáticos con CD4 estables. Figura 8.

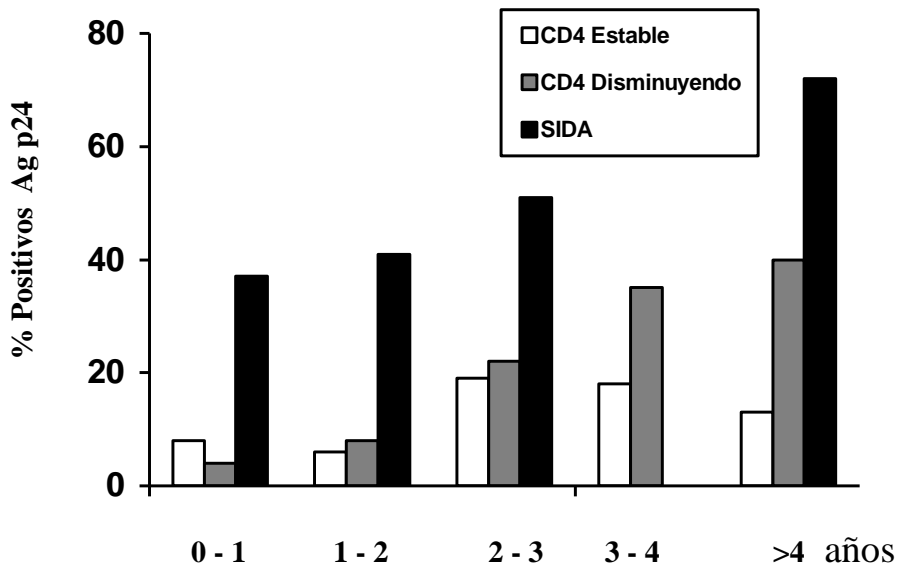


Figura 8. Positividad del Ag p24 en pacientes VIH positivos, primeros años post- seroconversión

1.3. *Cultivo viral*

El cultivo se realiza en células mononucleares de sangre periférica. El cuantitativo mide el número de células mononucleares del paciente necesarias para producir infección de células en cultivo y se informa en unidades infecciosas por 10^6 células. La utilidad del cultivo es para diagnóstico y para monitorización de la viremia.

El número de células mononucleares infectadas en sangre periférica varía con el estado de la enfermedad, así: en pacientes con Sida o CRS se encuentran entre 2200-2700 Udes infecciosas/ 10^6 células y en los asintomáticos 10^2 Udes infecciosas/ 10^6 células. Para monitoría del tratamiento anti-retroviral la disminución de un \log_{10} sostenido en dos muestras es considerada una respuesta positiva.

Para el cultivo plasmático se adiciona el plasma en diferentes diluciones al cultivo de células mononucleares VIH negativas. El cultivo plasmático rara vez es positivo en pacientes con CD4 mayor a 500/ml, su positividad aumenta a medida que el recuento de CD4 disminuye. En pacientes en tratamiento con AZT la viremia plasmática ha disminuido en 1-2 \log_{10} pero no es de mucha utilidad por su baja positividad, especialmente en estados tempranos.

1.4. *Determinación de material genético*

1.4.1. *Reacción en cadena de la polimerasa*

Consiste en la replicación *in vitro* de fragmentos de ADN mediante el uso de oligonucleótidos que hibridizan específicamente el fragmento blanco y la enzima taq polimerasa que incorpora dinucleótidos fosfatados al extremo de los iniciadores para replicar el resto del fragmento blanco. La reacción se logra mediante cambios de temperatura sucesivos que permitan separar

las cadenas de ADN, después hibridizar los iniciadores y luego incorporar los nucleótidos por parte de la enzima. La repetición de estos ciclos 30 a 40 veces genera millones de moléculas del ADN blanco que puede ser detectado por su peso molecular en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio o hibridizándolo con sondas de ADN específicas que pueden ser marcadas con isótopos radiactivos, substratos de enzimas, enzimas medibles por reacción de Ac, colorimétricas o quimioluminiscentes.

El PCR puede ser realizado para detectar ADN proviral o para buscar ARN después de transcripción reversa a cADN. La última permite medir el ARN y por consiguiente la actividad viral. La técnica puede ser cualitativa o cuantitativa. Existen pruebas caseras y comerciales que pueden ser realizadas en células mononucleares de sangre periférica, plasma, suero, LCR, sangre total. Las muestras pueden ser frescas o conservadas en fase líquida, generalmente congeladas a menos 70°C o fijadas en papel.

Dependiendo de la sensibilidad de la prueba el PCR puede detectar ADN de VIH en pacientes negativos para Ac antes de la seroconversión, o correlacionar con la positividad del cultivo o los Ac en casos de enfermedad aguda o con la positividad del Ag p24.

Existen pruebas de PCR caseras y comerciales para ADN proviral en células, para ARN en células y en plasma, con diferencias en métodos de extracción, secuencia de iniciadores, volumen de la muestra y método de detección del producto, algunos cualitativos y otros cuantitativos. Ver Tabla 3.

TABLA 3. Métodos de PCR y b-DNA.

Prueba		Iniciadores	Identificación de producto	Volumen (µl)
Perkin Elmer /gen probe		SK 38/39 115pb de gag	sonda quimio luminiscente	200
Amplicis (ADN pro viral)		gag, pol y tat externos e internos	conteo de radia- ción gamma	500
Amplicor Monitor test Roche	Transcripción inversa	gag SK431/462 Control interno	EIA en microplaca colorimétrica	200
Digene Sharp Signal System	Transcripción inversa	gag Control externo	EIA en microplaca	
WRAIR	Transcripción inversa	gag 1547/14212 Control externo	Sonda radioisotópica	500
NASBA	Transcripción	gag	Sonda con rutenio	100
Organon teknika	RNAsa y polime- rasa simultáneas	Control interno	electroquimiolumi- niscencia	
Chiron V.1 Chiron V2	No amplifica- ción	pol	oligos ramificados quimioluminiscencia	2000

Abbott	Transcripción inversa	gag SK38/39	Autorradiografía	100
Baylor College Medicine	Transcripción inversa	gag SK 38/39	quimioluminiscencia	200
Stanford University	Transcripción inversa	gag SK38/39	EIA colorimétrica	450

La sensibilidad y la especificidad son variables dependiendo de cada prueba y también de las condiciones del laboratorio y la posibilidad de contaminación. El Amplicis puede detectar hasta una copia de ADN proviral, es altamente sensible, con los tres pares de iniciadores se detectaron 54 de 54 muestras positivas para Ac anti-VIH y 53 fueron positivas por al menos dos pares de iniciadores.

El grupo ACTG evaluó el desempeño de 12 laboratorios para realizar pruebas de PCR con tres kits comerciales y encontró que 10 de 11 laboratorios participantes identificaron adecuadamente las muestras positivas y negativas de un panel preparado para ello. En el procesamiento de 392 muestras posteriores la sensibilidad fue del 94.8% y especificidad del 97.4%. La sensibilidad varió entre 86.4 y 100% con tres laboratorios que informaban falsos negativos y la especificidad varió entre 75 y 100% con tres laboratorios informando falsos positivos. De los doce laboratorios ocho tuvieron sensibilidad y especificidad del 100% detectando entre 10 y 50 copias.

Los métodos de amplificación que utilizan iniciadores internos para realizar PCR anidado muestran mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas simples.

4.2. Usos del PCR

4.2.1. *Diagnóstico de la infección en adultos.* Puede ser útil en el período de ventana, en la identificación temprana de infectados entre expuestos y en caso de WB indeterminado. Para establecer el diagnóstico mediante PCR se recomienda que las muestras sean procesadas en duplicado y que se tomen dos muestras de sangre al paciente en diferente tiempo.

Debido a la alta sensibilidad y especificidad de pruebas más fáciles y disponibles como el EIA, pruebas rápidas y confirmatorias para establecer la infección por VIH y de otra manera la posibilidad de falsos positivos por contaminación, la necesidad de equipo, laboratorio separado y personal experto para la realización del PCR, esta técnica es de poca utilidad en el diagnóstico en general en la población adulta, excepto en los grupos ya mencionados.

4.2.2. *Diagnóstico de la infección en niños.* El diagnóstico de la infección en niños tempranamente es de vital importancia para establecer la continuación del tratamiento anti-retroviral, evitar profilaxis innecesaria para *P. carinii* a los no infectados y las implicaciones familiares y sociales de la espera.

La demostración de la infección en niños nacidos de madres seropositivas mediante la detección de Ac IgG requiere el seguimiento hasta los 18 meses, debido a la interferencia de los Ac provenientes de la madre. La búsqueda de IgA y Elispot descrito previamente para evaluar la producción de Ac *in vitro* son menos sensibles que el cultivo y el PCR

tempranamente y no son ampliamente disponibles. La sensibilidad de la IgA fue del 83% en 12 niños comparada con el cultivo y empieza a detectarse después de los dos meses.

Las pruebas virológicas, incluyendo cultivo, Ag P24 y el ADN o ARN viral permiten hacer el diagnóstico de niños infectados con sensibilidad del 50% y especificidad cercana al 100% antes de los tres meses y sensibilidad y especificidad mayor al 90% a los seis meses de edad. (Figuras 6 y 7.)

El amplicor de Roche en sangre fijada en papel de filtro identificó 100% de niños infectados entre los días 15 y 47, 88.9% entre los días 10 y 15, y 27.3% entre el nacimiento y los cuatro días de vida. En niños menores de seis meses el PCR es tan sensible o más que el cultivo, con la ventaja de que el PCR se demora un día, mientras que el cultivo toma semanas.

Para la clasificación de los menores a dieciocho meses como infectados el CDC recomienda en los que no tienen los criterios de Sida el uso de dos determinaciones separadas por uno o dos métodos virológicos, cultivo, PCR o Ag p24. Esta estrategia muestra sensibilidades y especificidades algo variables, dependiendo de la combinación que se utilice. El estudio de Paul M.O. et al. para establecer los procedimientos que con mayor seguridad hacen el diagnóstico tempranamente en 32 niños infectados y 176 no infectados nacidos de madres seropositivas reveló que dos muestras en lugar de una son más sensibles y específicas. La mayor sensibilidad y especificidad antes de los tres meses es para el cultivo 83% y 95% respectivamente. El PCR tuvo 79% de sensibilidad y 89% de especificidad, y el Ag p24, 44% de sensibilidad y 88% de especificidad. A los seis meses el PCR fue el más sensible (89%) pero también el menos específico (90%), el cultivo tuvo sensibilidad del 85% y especificidad del 95% y el Ag p24 fue el menos sensible, 58% y 90% de especificidad. La utilización de una sola muestra con una sola prueba o combinaciones de dos o las tres pruebas tuvieron menos sensibilidades y especificidades. Figuras 6 y 7.

Los autores sugieren el PCR en dos muestras como prueba inicial, con confirmación de los resultados positivos mediante cultivo debido a los falsos positivos que pueden presentarse. El tiempo mejor para la toma de las muestras es probablemente a los tres meses y los no infectados deben confirmarse a los seis meses y después.

4.2.3. *Detección de resistencia*

La secuenciación del gene de la transcriptasa reversa y la proteasa de VIH resistente a medicamentos ha determinado que ciertas mutaciones en estos genes se relacionan con alto nivel de resistencia a determinado anti-retroviral. Las mutaciones relacionadas con resistencia a la azidotimidina (AZT) se localizan en el codon 215, 70, 67 y 219.

El PCR puede aplicarse para la identificación de las mutaciones relacionadas con resistencia. En el estudio de Richman et al. la amplificación por PCR de un fragmento de 535 pb que contiene los cuatro codones relacionados con resistencia a AZT e hibridizando el producto con sondas para la secuencia inicial y mutada se pudo identificar que 67 muestras tomadas de pacientes antes del tratamiento con AZT mostraron todas el genotipo inicial, mientras que en 60 pacientes que habían recibido AZT se encontraron mutaciones que correspondieron al codon 67 en cinco pacientes, codon 70 en 23, codon 215 en 31 y codon 219 en un paciente. Otras 277 muestras tenían mutaciones en más de un codon. De manera similar se conocen las mutaciones específicas relacionadas con otros análogos de nucleósidos y los inhibidores de la

proteasa de VIH, por lo que pruebas de PCR pueden tener utilidad en la comprobación de la resistencia a medicamentos.

5. Cuantificación de la carga viral

Los métodos empleados inicialmente para el seguimiento de la enfermedad, determinación del pronóstico y evaluación de la respuesta al tratamiento tienen limitaciones, así:

El cambio en el recuento de CD4 no correlaciona bien con la respuesta clínica a los anti-retrovirales, el Ag P24 es positivo sólo en una pequeña parte de los pacientes que están asintomáticos y aun utilizando la prueba con disociación previa de los complejos inmunes no se encuentra en todos los enfermos con menos de 200 CD4/ μ l. El microcultivo cuantitativo en plasma es positivo sólo en 23% de los infectados asintomáticos y tiene una variabilidad de 1.2 log 10 y el microcultivo cuantitativo en células mononucleares de sangre periférica es más sensible pero también más variable.

La cuantificación de la carga viral mediante el PCR u otros métodos que no amplifican el ADN blanco como la técnica del ADN ramificado muestran presencia de material genético en casi todos los individuos infectados (>96% incluyendo los asintomáticos). Tanto el ADN proviral como el ARN celular y plasmático aumentan con el progreso de la enfermedad, sufren cambios significativos con el tratamiento (descensos en 2-3 log 10) y con la emergencia de resistencia. El ARN plasmático correlaciona bien con el recuento de CD4. Estas características han convertido la cuantificación, especialmente del ARN, en la herramienta más útil para el manejo de los pacientes. De otra manera contribuyen al entendimiento de la patogénesis de la enfermedad; por ejemplo, midiendo carga viral por estos métodos se determinó que después de la infección la replicación viral es persistente en todas las etapas en lugar de entrar en período de latencia como se creía.

La detección de ARN plasmático correlaciona con el conteo de CD4 aunque con alguna variabilidad. Por ejemplo, pacientes con 400-800 CD4 tuvieron concentraciones de ARN entre menos de 500 a 192.200 copias/ml de plasma y 50% de los 180 pacientes estudiados tuvieron más de 500 CD4/ μ l (promedio 780) con carga viral mayor a 10.900 copias/ml y habían fallecido dentro de los seis años de seguimiento mientras que la muerte sólo ocurrió en el 5% de los que con similar recuento de CD4 tenían carga viral menor a 10.900 copias/ml (Mellors JW et al.). El ARN plasmático también correlaciona con el ADN proviral y débilmente con el cultivo cuantitativo en células.

Los pacientes seropositivos tienen un amplio rango de valores de carga de ARN viral desde no detectable hasta mayor 10^6 copias/ml de plasma, dependiendo del estado de enfermedad y probablemente de la respuesta inmune. La concentración de ARN no varía con el sexo y éste tampoco influye en el porcentaje de cambio con el tratamiento. La presencia de altos niveles de ARN $> 10^5$ copias/ml de plasma es un fuerte predictor de progresión rápida a Sida, mientras que niveles por debajo de 10^4 se relacionan con buen pronóstico.

La mayoría de los métodos descritos en la Tabla 3 pueden cuantificar ARN de VIH en forma adecuada en diferentes laboratorios. Entre los más sensibles por detectar menor número de copias están el Amplicor de Roche, que detecta hasta 200 copias /ml, el b-DNA V. 2 hasta 390 copias/ml y el NASBA 4.000 copias /ml. El b-DNA de Chiron V.1 es

menos sensible, detecta hasta 10.000 copias /ml. Las pruebas con ADN ramificado tienen la ventaja de mayor especificidad por evitar los problemas de contaminación que ocurren con las pruebas de PCR, son más reproducibles, consumen menos tiempo y la lectura de la prueba es similar a un EIA que manejan muchos laboratorios.

Las técnicas comerciales que utilizan ADN ramificado b-DNA (Quantiplex HIV RNA assay de Chiron) y versión 2 de sensibilidad realzada (Figura 9) consisten en detectar la presencia de ARN viral mediante el uso de oligonucleótidos ramificados de ADN marcados con fosfatasa alcalina, dichos oligonucleótidos hibridizan a otros oligonucleótidos blancos que han hibridizado específicamente al gene pol del ARN viral fijo mediante sondas de captura al pozo de una placa de *Elisa*. La cuantificación de la cantidad de ARN viral se realiza adicionando el substrato dioxetano y midiendo la quimioluminiscencia en un luminómetro. La concentración de ADN se da en equivalentes genómicos /ml de plasma de acuerdo con curva estándar con concentraciones conocidas por ml. Las técnicas son rápidas reproducibles y sensibles para detectar ARN en todos los estados de la enfermedad, con una mayor sensibilidad (20 veces) para la segunda versión (hasta 390 equivalentes genómicos /ml). La comparación de ambas técnicas muestra correlación en los niveles medidos. La versión 2 identifica ARN de subtipos de VIH-1 de la A a la F.

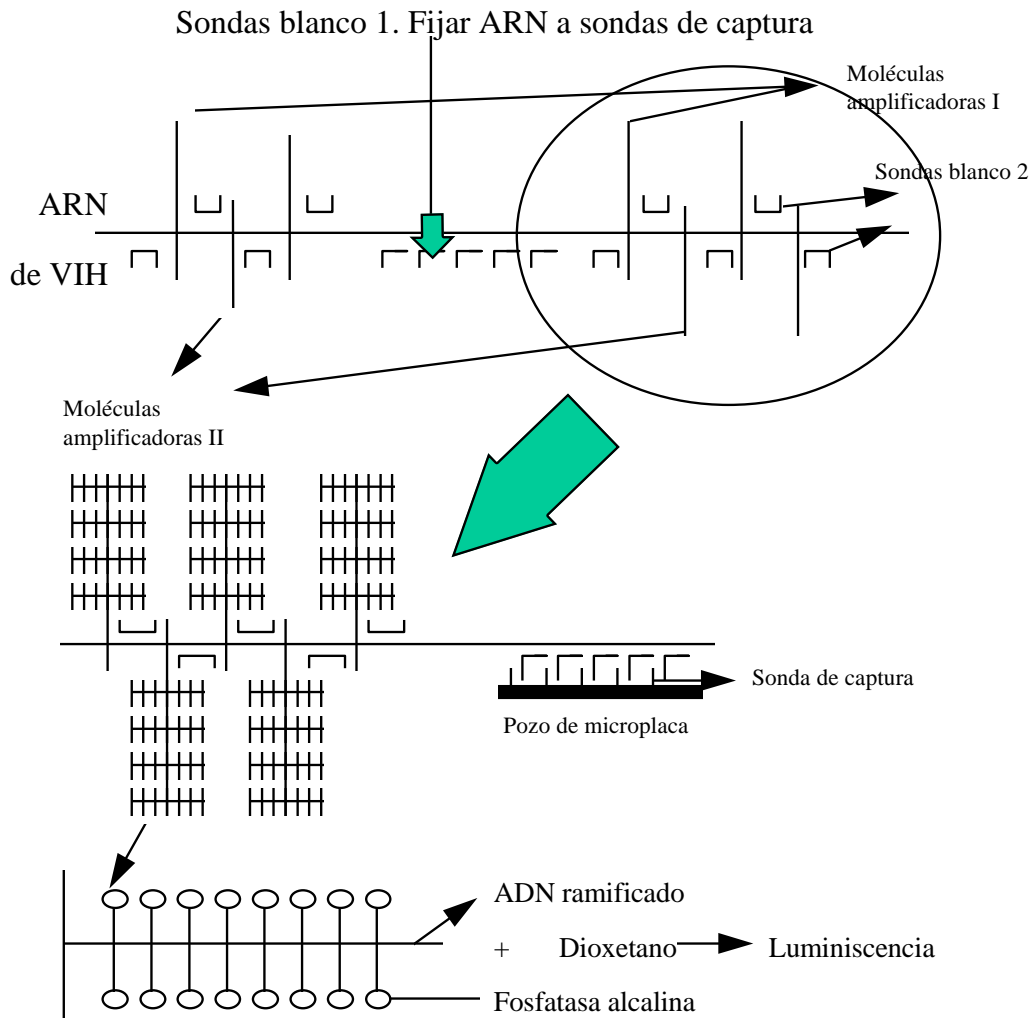


Figura 9. Esquema de Cuantificación del ARN mediante técnica de ADN ramificado (b - DNA. Chiron)

5.1. Utilidad de la cuantificación de la carga viral

5.1.1. Determinación del estado de la enfermedad

La aplicación del Quantiplex en la medición del ARN viral en pacientes infectados por VIH mostró que la viremia correlaciona con el estado de la enfermedad así: de 35 pacientes con < 200 CD4 / μ l, el 83% tenían la prueba positiva con valor promedio de 145.000 equivalentes genómicos/ml de plasma. De 49 pacientes con CD4 de 200-400/ μ l el 76% tuvieron la prueba positiva con un valor promedio de 81.000 equivalentes genómicos/ml y entre 18 pacientes con > 400 CD4 μ l el 50% fueron positivos, su promedio fue 25.000 equivalentes genómicos/ml. Este ensayo fue más sensible que el cultivo para detectar carga viral; 89% de los 56 pacientes incluidos fueron positivos mientras que por cultivo de plasma sólo 61% fueron positivos. Adicionalmente el Quantiplex fue positivo en 73% de los 22 pacientes cultivo negativo e igualmente más sensibles que la medición de Ag p24 después de disociación de los complejos inmunes.

5.1.2. *Determinación del pronóstico*

Dado que la infección por VIH tiene un curso variable con un promedio de tiempo en adultos para el desarrollo de Sida entre diez y once años y un estimado de 12% de personas que permanecerán sin desarrollar Sida por al menos veinte años mientras que otros muestran progresión rápida en menos de cinco años, se han buscado marcadores de progresión que permitan predecir el pronóstico, entre ellos la sintomatología clínica, el recuento de células CD4, la alergia cutánea, los niveles de B2 microglobulina y neopterina, el nivel de Ag p24 y el fenotipo de VIH inductor de sincitio.

Los niveles de CD4 se vienen usando para clasificación del estado de la infección, el riesgo de infección oportunista, determinar el pronóstico, decidir el tratamiento antiviral o profilaxis de determinadas infecciones, vigilar la respuesta al tratamiento y definir el Sida.

El estudio de Saravolatz L et al. realizado en 5.204 pacientes seguidos durante un promedio de 23.6 meses mostró que la mortalidad acumulada después de los 24 meses fue de 72% para los pacientes con < de 50 CD4; 58% entre 25 y 49; 47% entre 50 y 99; 27% entre 100 y 199, y 10% entre 200 y 499 CD4/ μ l. La supervivencia media fue de 15 meses para pacientes con menos de 25 CD4, 21 meses entre 25 y 49 CD4, y 40 meses entre 100 y 199 CD4, demostrando utilidad en determinar el pronóstico especialmente en pacientes con CD4 por debajo de 100.

La medición de este marcador presenta variabilidad interlaboratorios, aun realizándose por citometría de flujo. En el estudio de Sax PE el 58% de 24 pacientes evaluados por cuatro laboratorios en las mismas muestras tuvieron variaciones en sus informes que llevan a diferentes recomendaciones; también hubo desacuerdo en el 37.5% en si hubo incremento o disminución en el recuento posterior.

El recuento de CD4 varía con la edad, la estación, hora del día, origen técnico, esplenectomía y uso de medicamentos. Los factores del procesamiento que generan variabilidad son la temperatura de la muestra, tiempo entre la colección de la muestra y el procesamiento, anticoagulante usado, manejo de la muestra, método de preparación, reactivos usados, instrumento y método de estandarización del instrumento, el hecho que el conteo no pueda ser medido directamente y deba ser calculado del total de leucocitos y el total de linfocitos. Parte de esta variabilidad puede disminuirse con la elaboración de dos recuentos y cálculo del promedio, uso del mismo laboratorio acreditado y con control de calidad que siga las normas establecidas por el CDC y organismos pertinentes para la citometría de flujo. Los programas rigurosos de control de calidad y entrenamiento redujeron la variabilidad interlaboratorio del 29.4% en 1987 al 8.4% en 1991. En conclusión, aunque el mejor predictor de progresión a Sida entre los métodos más ampliamente disponibles es el recuento de CD4, tiene todavía limitaciones de variabilidad por condiciones del laboratorio y del paciente.

Los niveles de neopterina y B2 microglobulina, aunque desde el primer año de la seroconversión son más altos en pacientes que desarrollan Sida que en los asintomáticos con CD4 en descenso o con CD4 estables, no aumentan con el progreso de la enfermedad y no pueden diferenciar entre el grupo que disminuye sus CD4 y el que permanece estable. Figuras 10 y 11.

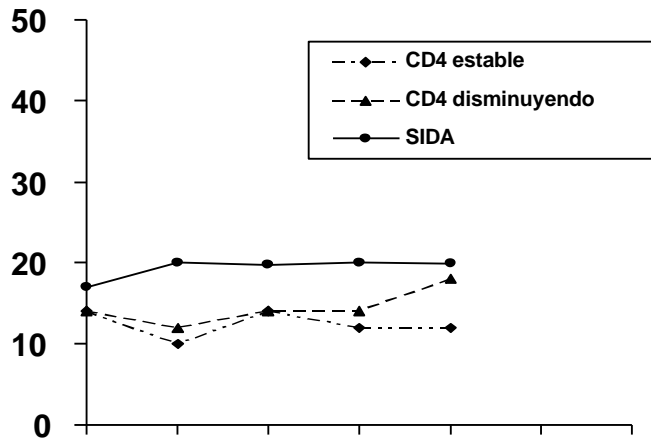


Figura 10. Niveles de neopterina en pacientes VIH positivos primeros años post-sero conversión.

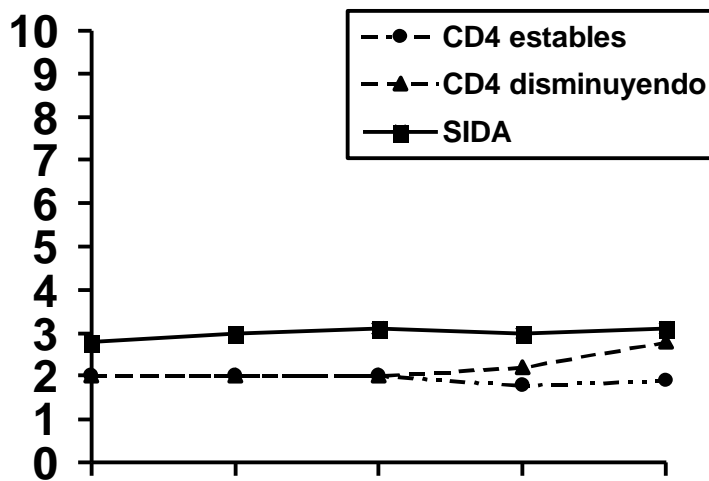


Figura 11. Niveles de β_2 microglobulina en pacientes VIH positivos primeros años post - sero conversión.

La medición del material genético viral ha mostrado que sus niveles en células o plasma correlacionan con el estado de enfermedad. Saksela K et al. mostraron que el aumento en el ARN mensajero en células mononucleares de sangre periférica precede al deterioro inmunológico en 1-2 años.

Igualmente se determinó que el nivel de ARN viral en el primer año se relaciona con la evolución posterior. El estudio de Mellors JW et al. mostró que los pacientes que no tuvieron niveles detectables de ARN viral en los primeros dos años después de la seroconversión, sólo 6% desarrollaron Sida en 4-5 años, mientras que cuando se detectó ARN en más de una

muestra durante los dos años iniciales la progresión a Sida en 4-5 años fue del 45% si su CD4 a la seroconversión fue > a 500 CD4/ μ l y 86% si fue < a 500 CD4/ μ l. Tabla 4 y Figura 12.

Tabla 4 . Progresión a SIDA de acuerdo a niveles de ARN plasmático y CD4 en sangre periférica entre 0 y 2 años post-seroconversión

CD4 a la seroconversión Células/ μ l	% de progresión a SIDA según ARN plasmático	
	ARN (+)	ARN (-)
>500	45	6
< 500	86	0

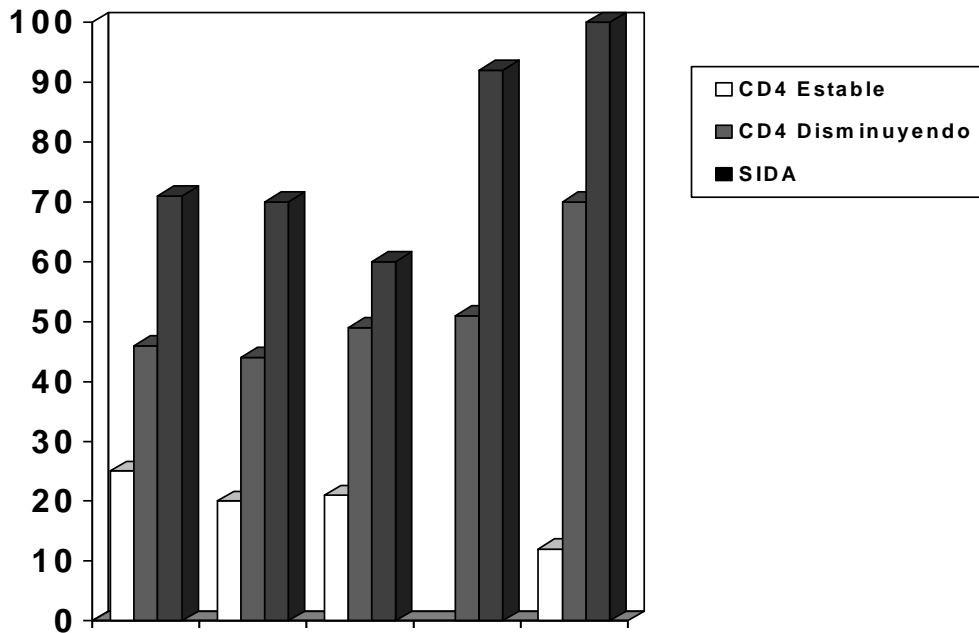


Figura 12 . Positividad de ARN viral en pacientes VIH Positivos primeros años post-seroconversión

Cuando se comparan progresores a Sida en un promedio de 59 meses de seguimiento con no progresores seguidos en promedio de 56 meses, los no progresores (5 pacientes) tuvieron niveles de ARN siempre no detectables mientras que los progresores tuvieron al inicio del seguimiento más que 1×10^4 (3 de 5 pacientes) equivalentes genómicos por ml de plasma y un incremento (2 de 5 pacientes) a más que ese valor. En general el incremento en niveles de ARN fue de 30-50 veces antes del desarrollo del Sida.

En otro estudio realizado por Mellors JW et al. en 180 pacientes comparando las concentraciones de ARN plasmático al inicio del estudio con la supervivencia libre de Sida y la mortalidad encontró una correlación entre los niveles de ARN y la progresión a Sida a los cinco años, siendo ésta de 8% con ARN menor a 4.530, del 26% con ARN entre 4.531 y 13.020 copias/ml, 49% con ARN entre 13.021 y 36.270 y 62% con mayor concentración. Figura 13.

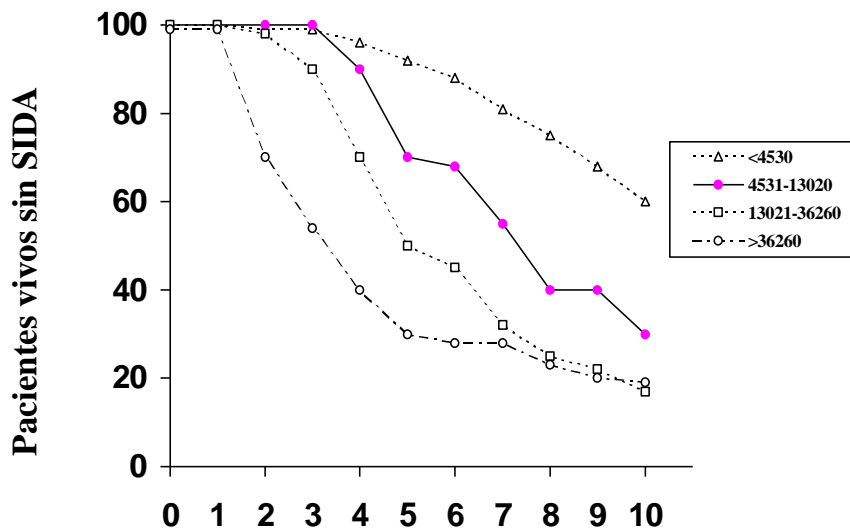


Figura 13. Proporción de pacientes sobreviviendo sin SIDA según niveles de ARN de VIH en plasma al ingreso al estudio

El tiempo promedio en el cual ocurrió la progresión fue más corto entre individuos con mayor carga viral (mayor a 10, 7.7, 5.3 y 3.5 años respectivamente). Adicionalmente los pacientes con más de 500 CD4 tuvieron mayor progresión a Sida si el ARN era mayor a 10.900 copias/ml. La mortalidad a los cinco años fue igualmente relacionada con la carga viral, siendo 5, 10, 25, y 49% respectivamente.

5.3.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento

El quantiplex demostró su utilidad en la monitorización de la respuesta al tratamiento con anti-retrovirales: En el estudio de Dewar R.L. et al. de 23 pacientes tratados con AZT, DDI y un inhibidor no nucleósido de transcriptasa inversa 18 bajaron en promedio cinco veces la carga viral a la semana del tratamiento. Los niveles de Ag p24 y el cultivo plasmático sólo disminuyeron en siete pacientes.

Una prueba cuantitativa de PCR después de transcripción a cADN demostró en 11 pacientes que iniciaron tratamiento con AZT que los niveles de ARN sérico cayeron rápidamente en uno a dos días con una máxima caída a los siete días y retorno al nivel basal en pocas semanas o lentamente en siete pacientes.

La prueba de Chiron V2. de sensibilidad realizada usada para monitorizar seis pacientes tratados con mesylato de nelfinavir mostró un descenso rápido de los niveles de ARN en el plasma desde el cuarto día, con un pico de respuesta a los 7 -14 días y descenso de 2-2.5 log 10 en la carga viral. Adicionalmente se detectaron niveles por debajo de 500 copias/ml en algún momento del tratamiento en todos los pacientes, independientemente del nivel inicial. Los niveles permanecieron bajos en cuatro pacientes seguidos por 28 días y en dos seguidos hasta 60 días. Figura 14.

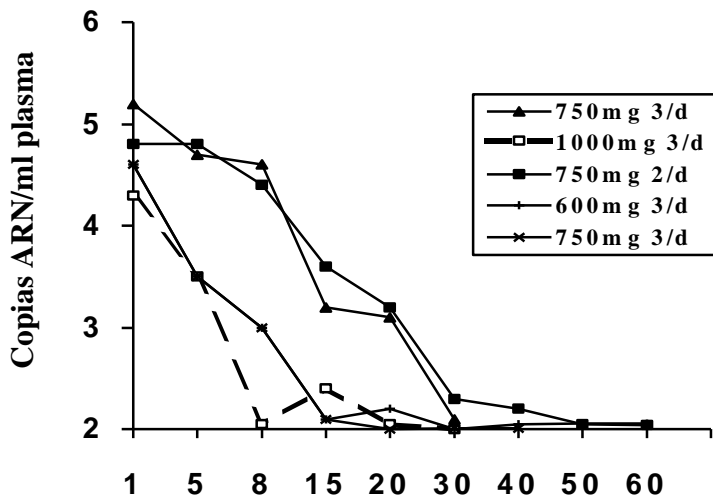


Figura 14. Cambios en el ARN de VIH en pacientes recibiendo mesylato de Nelfinavir (b- DNA Versión 2)

La misma prueba aplicada para monitorizar respuesta al tratamiento con combinaciones de medicamentos mostró que más del 80% de los pacientes que recibían indinavir 800 mg/8h, AZT 200 mg/8h y 3TC 150 mg/12h alcanzaron niveles no detectables (límite inferior de detección: 500 copias/ml) a las 12 semanas de tratamiento y permanecieron así a las 48 semanas de seguimiento. Figura 15.

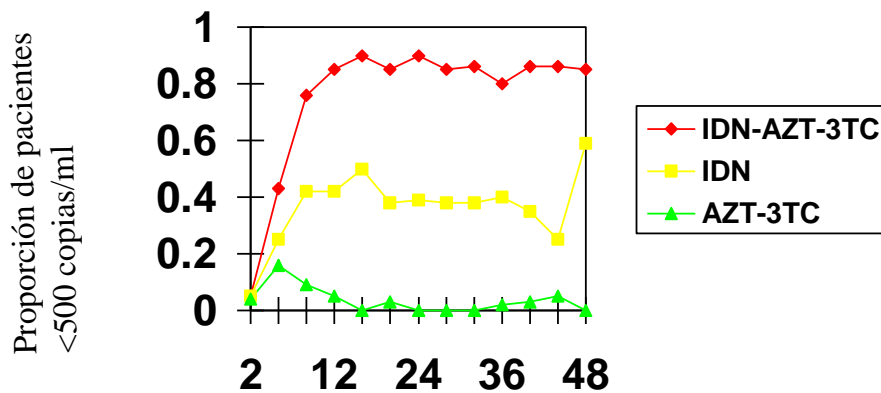


Figura 15. Descenso de ARN de VIH en plasma-tratamiento combinado

5.3.2. Identificación de riesgo de transmisión materno fetal

El riesgo de transmisión de VIH perinatalmente ha variado del 15 al 45% y ha sido disminuido en forma significativa por la profilaxis con AZT. En un estudio de 97 niños nacidos de 92 madres seropositivas se encontró que entre las madres de 20 niños que adquirieron la infección el 75% tenían más de 50.000 copias de ARN viral/ml de plasma medidas por PCR, mientras que sólo el 5.3% de las no transmisoras tenían más de este valor. Ninguna de las 63 mujeres que tenían al momento del parto menos de 20.000 copias/ml transmitieron la infección y el tratamiento con AZT de 22 madres mostró un descenso de ocho veces la concentración de ARN plasmática al momento del parto en relación con la medida hecha antes del tratamiento.

En resumen, las técnicas cuantitativas del ARN de VIH permitirán continuar avanzando en el conocimiento de la patogénesis, profilaxis post-exposición, profilaxis de transmisión fetal, el manejo de los pacientes en los diferentes estadios de la infección permitiendo el estudio de los efectos del tratamiento temprano de la infección, así como el estudio de nuevos medicamentos y alternativas terapéuticas. El nivel de ARN sérico es el mejor indicador aislado del estado y pronóstico de la infección por VIH, desde el primer año de la seroconversión y en cualquier momento después. Junto con el conteo de CD4 determinan una predicción mejor del pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

DAVEY RT Jr and H. CLIFFORD. Laboratory methods in the diagnosis and pronostic staging of infection with human immunodeficiency virus type 1 Rev. Infect. Dis. 1990; 12: 912

KERCKHOVEN IV, G VERCAUTERN, P PIOT and G van der GROEN. Comparative evaluation of 36 commercial assays for detecting antibodies to HIV. Bulletin of The World Health Organization. 1991; 69: 753

TAMASHIRO H, W MASKILL, J EMMANUEL, A FAQUEx, P SATO and D HEYMANN. Reducing the cost of HIV antibody testing Lancet 1993; 342: 87

HU Y W, P BIRCH, E BALASKAS, A ZEIBAWI, V SCALIA, THERIAULT SA, P GILL and MT AYE. Flow cytometric immunofluorescence assay for detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 using insoluble precursor forms of recombinant polyproteins as carriers and antigens J Clin Microbiol 1996; 34: 1412

TONGCHAROEN P, C WASI, S LOUSIROATCHANAKUL, J PARRY, J CONNEL and P MORTIMER. Immunoglobulin G antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay: a versatile assay for detection of anti human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies in body fluids J Clin Microbiol 1992; 30: 3288

TAMASHIRO H and NT CONSTANTINE. Serological diagnosis of infection using oral fluid samples. Bulletin of The World Health Organization. 1994; 72: 135.

SOTO LE, L HERNÁNDEZ, J SIFUENTES, G BARRIGA, D DUARTE, M LÓPEZ, and GM RUIZ. Detection of specific antibodies in gingival crevicular transudate by enzyme-linked

immunosorbent assay for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection J Clin Microbiol 1992; 30: 2780

MILLES SA, E BALDEN, L MAGPANTAY, L WEI, A LEIBLEIN, G TOEDTER et al. Rapid serologic testing with immune-complex dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates N Engl J Med 1993; 328: 297

CHANDAWANI S, T MORE, A KAUL, K KRASINSKI and W BORKONWSKY. Early diagnosis of human immunodeficiency virus type 1- infected infants by plasma p24 antigens assay after immune complex dissociation Pediatr Infect Dis J. 1993; 12:96

HAMMER S, C CRUMPACKER, R D'AQUILA, B Jackson, J LATHEY, D Livnat and P REICHELDERFER. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials group virology committee. J Clin Microbiol 1993; 31: 2557

LIFSON AR, SP BUCHBINDER, JW SHEPPAR, AC MAWLE, JC WILBER, M STANLEY, CE Hart et al. Long term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4 lymphocyte counts: Immunologic and virology characteristics J Infect Dis 1991; 163: 959.

CAO Y, L QIN, L ZHANG, J SAFRIT and DD HO. Virologic and immunologic characterization of long term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection N Engl J Med 1995; 332: 201

PANTALEO G, S MENZO, M VACCAREZZA, C GRAZIOSI, OJ COHEN, JF DEMAREST, D MONTEFFIORI, JM ORESTEIN et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1995; 332: 209.

CSSOL Sh, A BUTCHER, Sh KINARD, J SPADORO, SY TIDIANE, N LAPOINTE, S READ et al. Rapid screening for early detection of mother to child transmission of human immunodeficiency virus type 1. J Clin Microbiol 1994; 32: 2641.

MONTOYA JG, R WOOD, D KATZENSTEIN, M HOLODNY. and TC MERIGAN. Peripheral blood mononuclear cell human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA quantification by polymerase chain reaction: Relationship to immunodeficiency and drug effect. J Clin Microbiol 1993; 31: 2692.

SARAVOLATZ L, JD NEATON, L SACKS, L DEYTON, F RHAME and R SHERER. CD4 T lymphocyte counts and patterns of mortality among patients infected with human immunodeficiency virus who were enrolled in community programs for clinical research on Aids. Clin Infect Dis 1996; 22: 513

SETHOE SY, AE LING, EH SNG, EH MONTEIRO, and RKW. PCR as confirmatory test for human immunodeficiency virus type 1 infection in individual with indeterminate western blot (immunoblot) profiles. J Clin Microbiol 1995; 33:3034.

SAUVAIGO S, V BARLET, N GUETTARI, P INNOCENTI, F PARMENTIER, C BASTARD, JM SEIGNEURIN et al. Standardized nested polymerase chain reaction-based assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in whole blood lysates. J Clin Microbiol 1993; 31: 1066

JACKSON JB, J DREW, HJ LIN, P OTTO, JW BREMER, FB HOLLINGER and SM WOLINSKY. Establishment of a quality assurance program for human immunodeficiency virus type 1 DNA polymerase chain reaction assay dy AIDS clinical trials group. *J. Clin Microbiol* 1993; 31: 23

OWENS DK, M HOLODNIY, AM GARBER, J SCOTT, S SONNAD, L MOSES, B Kinosian and J SANFORD. Polymerase chain reaction for the diagnosis of HIV Infection in adults. A meta-analysis with recommendations for clinical practice and study design. *Ann Intern Med.* 1996 ;124: 803.

YOURNO J. Direct polymerase chain reaction for detection of human immunodeficiency virus in blood spot residues on filter paper after elution of antibodies: an adjunct to serological surveys for estimating vertical transmission rates among human immunodeficiency virus antibody newborns *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1364

Center for Diseases Control and Prevention. 1994 Revised Classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age *MMWR.* 1994; 43: 1.

MORRIS P, S TETALI, ML LESSER, EJ ABRAMS, XP WANG, R KOWALSKI, M BAMJI et al. Laboratory diagnosis of infection status in infants perinatally exposed to human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1996; 173: 68.

MELLORS JW, LA KINGSLEY, Ch R RINALDO, JA TODD, BS HOO, RP KOKKA and P GUPTA. Quantification of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122: 573

HOGERVORST E, S JURRIAANS, F de WOLF, A van WIJK, A WIERSMA, M VALK, M Roos et al. Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. 1995; 171: 811.

RVEST H, D MARISSENS, S de WIT, P LACOR, M CLUMECK, S LAWERS, and G ZISSIS. Comparative evaluation of NASBA HIV-1 RNA QT, AMPLICOR-HIV and Quantiplex HIV RNA assay, three methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin Microbiol* 1996; 34: 1058

MELLORS JW, Ch R RINALDO, P GUPTA, RM WHITE, JA TODD and LA KINGSLEY. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the Quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167

O'BRIEN WA, PM HARTIGAN, D MARTIN, J ESINHART, A HILL, Sh BENOTT, M RUBIN, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to Aids. *N Engl J Med* 1996; 334: 426.

HJ LIN, MYERS LE, LIEBERMAN BY, HOLLINGER FB, HENRARD, D, HOOPER CJ, Kokka R et al. Multicenter evaluation of quantification methods for plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA *J Infect Dis* 1994; 170:553.

SCHUURMAN R, D DESCAMPS, GJ WEBERLING, S KAYE, J TIGNAGEL, Y WILLIAMS, R van LEEUWEN et al. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3016.

YEN-LIEBERMAN B, D BRAMBILLA, B JACKSSON, J Bremen, R COOMBS, M CRONIN, S HERMAN et al. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the Aids clinical trials group virology laboratories. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2695

DEWAR RL, HC HIGHBARGER, MD SARMIENTO, JA TODD, MB VASUDEVACHARI, RT DAVEY Jr, JA KOVACS et al. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma *J Infect. Dis* 1994; 170: 1173.

KERN D., M. COLLINS, T FULTZ, J DETMER, S HAREM, JJ PETERKIN, P Sheridan et al. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3196

RICHMAN DD, JC GUATELLI, J GRIMES, A TSIATIS and T GINGERAS. Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 164: 1075

BAGNARELLI P, S MENZO, A VALENZA, S PAOLUCCI, S PETRONI, G SCALISE, R SAMPAOLESI, A MANZIN, P VARALDO and M CLEMENTI. Quantitative molecular monitoring of human immunodeficiency virus Type 1 during therapy with specific antiretroviral compounds. *J Clin Microbiol* 1995;33:1

LOVEDAY C, S KAYE, M TENAN-FLOWERS, M SEMPLE, U AYLIFFE, IVD WELLER and RS TEDDER. HIV-1 serum load resistant viral genotypes during early zidovudine therapy. *Lancet.* 1995; 345: 820.

DICKOVER RE, EM GARRATTY, SA HERMAN, M SIM, S PLAEGER, PJ BOYER, M KELLER et al. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. Effect of maternal zidovudine treatment on viral load. *JAMA* 1996; 275: 599