

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

## EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN OPSONO FAGOCÍTICA DE LOS NEUTRÓFILOS EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH

Lic. Randelys Molina Castro, Dr. Alejandro Álvarez García, Lic. Liliana Pérez Toledo, Lic. Lizet Sánchez Valdés, Téc. Yondel Torranzo Soto y Téc. Caridad Luzardo Suárez

### RESUMEN

La disfunción de los neutrófilos podría contribuir a la susceptibilidad a infecciones observada en los pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Se realizó un estudio de corte transversal para evaluar la opsonofagocitosis de los neutrófilos en estos pacientes, en el que participaron 104 individuos: 25 donantes de sangre (grupo control) y 79 VIH positivos (+). Estos últimos se dividieron en 3 grupos según su conteo global de linfocitos T CD4 + (CGLCD4): grupo 1 compuesto por 24 individuos con CGLCD4  $\geq$  500 células/mm<sup>3</sup>; grupo 2 por 26 pacientes con CGLCD4 de 200 a 499 células/mm<sup>3</sup>; y grupo 3 por 29 casos con CGLCD4 < 200 células/mm<sup>3</sup>. Se realizó la determinación de los valores absolutos de leucocitos y granulocitos y los valores relativos de linfocitos, la cuantificación de subpoblación linfocítica T CD4 positiva (+) y la determinación del índice opsonofagocítico. Se encontró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del conteo absoluto de leucocitos y granulocitos, así como de la función opsonofagocítica, en los grupos de pacientes VIH+ con respecto al grupo control. Se constató una relación directa no lineal del conteo absoluto de linfocitos T CD4 + con el conteo global de leucocitos y de granulocitos y con la función opsonofagocítica.

*DeCS:* VIH/inmunología; NEUTROFILOS/inmunología; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA/inmunología; RECuento DE LINFOCITO CD4/análisis; FAGOCITOSIS; GRANULOCITOS/inmunología.

La fagocitosis mediada por polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, constituye una de las principales defensas del organismo hospedero en su lucha contra las infecciones producidas por bacterias y hongos. El proceso de fagocitosis comprende varios pasos secuenciales:

quimiotaxis, adherencia de las partículas antigénicas a la superficie de los fagocitos, captación/ingestión (fagocitosis) y muerte intracelular mediada por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno. Los fagocitos poseen receptores para el componente C3b del sistema de

complemento, así como para la región constante de la molécula de inmunoglobulina. Esto permite que los microorganismos opsonizados puedan adherirse a la superficie de estas células, facilitando la fagocitosis.<sup>1</sup>

Una actividad fagocítica anormal puede estar asociada con una gran variedad de enfermedades y puede estar ocasionada por un defecto de los neutrófilos, un problema fisiológico asociado con algún tipo de inmunoglobulina, con el sistema de complemento, o ambos. La mayoría de los artículos revisados coincide en reconocer que se produce una alteración de la función de los neutrófilos en el curso de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

*Dobmeyer* y otros.<sup>2</sup> comunicaron que los granulocitos y monocitos de los pacientes asintomáticos infectados por el VIH mostraron una capacidad bacteriófaga significativamente aumentada; sin embargo, los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) mostraron una reducción significativa de la fagocitosis, lo cual se correlacionó con el número de células T CD4 positivas (+). Además, *Shalekoff* y otros<sup>3</sup> observaron un aumento significativo de la fagocitosis en los granulocitos de individuos infectados por el VIH-1; pero aquellos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* solamente, o en combinación con el VIH-1, mostraron una capacidad significativamente disminuida para fagocitar. Por otra parte, en un trabajo de *Schaumann* y otros,<sup>4</sup> la fagocitosis de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resultó significativamente disminuida en los PMN de pacientes VIH + con bajos conteos de células T CD4+.

Otros autores<sup>5</sup> estudiaron la opsonización (OF) de *Candida albicans* empleando neutrófilos aislados de

individuos VIH + asintomáticos, pacientes con complejo relacionado con el SIDA, sometidos o no a tratamiento con zidovudina (AZT), así como pacientes con SIDA. Ellos observaron que esta actividad disminuye progresivamente y se correlaciona con la severidad de la infección por VIH. En contraste, *Wenisch* y otros<sup>6</sup> encontraron que los PMN de los pacientes con SIDA presentaban una actividad fagocítica aumentada contra *Candida spp.*

Según un estudio llevado a cabo por *Gruber* y otros,<sup>7</sup> las células viables de *C.albicans* tratadas con la gp160 o la gp41 y suero, son fagocitadas por los PMN en una menor cantidad que las *C.albicans* tratadas con la gp120 y suero, o suero solamente. Esto permite concluir que la interacción de la gp160 del VIH-1 con *C.albicans* puede aumentar la susceptibilidad a este hongo en los pacientes VIH-1+.

Debido a las discrepancias encontradas en la literatura revisada, y teniendo en cuenta que en Cuba no se han reportado estudios al respecto, nos propusimos evaluar la actividad opsonizadora de los neutrófilos frente a *C.albicans* en pacientes VIH +.

## MÉTODOS

*Población de estudio:* participaron 104 individuos: 25 donantes de sangre voluntarios (grupo control) y 79 pacientes seropositivos, que asistieron para realizarse exámenes inmunológicos al laboratorio clínico del IPK y tenían edades comprendidas entre 18 y 40 años. Los pacientes se dividieron en 3 grupos atendiendo a su conteo global de linfocitos T CD4+ (CGLCD4):

- Grupo 1: 24 individuos con CGLCD4  $\geq$  500 células/mm.<sup>3</sup>

- Grupo 2: 26 individuos con CGLCD4 de 200 a 499 células/mm.<sup>3</sup>
- Grupo 3: 29 individuos con CGLCD4 <200 células/mm.<sup>3</sup>

*Colección y manejo de las muestras:* a cada individuo se le extrajeron 15 mL de sangre periférica por punción venosa: 2 mL fueron colectados en tubos Vacutainer (*Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ*) con EDTA K<sub>3</sub> para la determinación de los valores absolutos de leucocitos y granulocitos, los valores relativos de linfocitos y para la cuantificación de subpoblación linfocitaria T CD4 +; 10 mL se colectaron en tubos Vacutainer con EDTA K<sub>3</sub> para la determinación del índice opsono fagocítico; del resto de la sangre se obtuvo suero para completar este estudio.

*Valores absolutos de leucocitos y granulocitos y valores relativos de linfocitos:* se obtuvieron los valores mediante un analizador hematológico de 18 parámetros (COBAS MICROS; Roche).

*Inmunofenotipaje por citometría de flujo:* los valores relativos de los linfocitos T CD4 + se cuantificaron por citometría de flujo (citómetro de flujo FACScan; *Becton Dickinson*) usando las técnicas estándares para triple marcaje y los anticuerpos monoclonales anti CD3, anti CD45 y anti CD4 de la casa comercial *Becton Dickinson*.<sup>8</sup>

Para determinar los valores absolutos de los linfocitos T CD4+ se tomaron los valores absolutos de leucocitos y los relativos de linfocitos.

*Índice opsono fagocítico:* la función opsono fagocítica se estudió según el método descrito por *Rivero* y otros,<sup>9</sup> con la modificación de que los PMN provenían del paciente y no de un donante sano de grupo sanguíneo O. Se aislaron los PMN a partir

de sangre periférica y se preparó una suspensión de estas células, así como otra de *C.albicans* a iguales concentraciones. Estos microorganismos se incubaron a 37 °C en suero del paciente (opsonización). Se añadieron los PMN y se incubó a 37 °C (fagocitosis). Inmediatamente, a los 15 y a los 60 minutos, se contaron las *C.albicans* extracelulares en cámara de Neubauer. Asumiendo que las *C.albicans* contadas en el tiempo cero constituyen el 100 %, los totales contados en los tiempos 15 y 60 representan, indirectamente, el porcentaje de OF a los 15 y 60 minutos, respectivamente.

*Análisis estadístico de los resultados:* los datos fueron almacenados como variables. Se aplicó el test de Kolomogorov-Smirnov para el análisis de la normalidad de estas. Se realizó una comparación entre los grupos de pacientes y entre estos y el control, para lo cual se empleó el test de Kruskal-Wallis. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar la relación entre todas las variables.

## RESULTADOS

En nuestro estudio se determinaron los valores absolutos de leucocitos y de granulocitos y el índice opsono fagocítico a los 15 y 60 minutos (tabla 1).

*Leucocitos:* los conteos de leucocitos de los grupos 1,2 y 3 fueron significativamente más bajos que los del grupo control ( $p_1=0,0015$ ;  $p_2=0,0003$ ;  $p_3=0,0000$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de los distintos grupos de pacientes VIH+ (tabla 1).

*Granulocitos:* el estudio de granulocitos reveló disminuciones significativas en los grupos 1,2 y 3 con respecto al grupo control ( $p_1=0,0002$ ;  $p_2=0,0000$ ;  $p_3=0,0013$ ). Entre los grupos de pacientes VIH+ no se observaron diferencias significativas (tabla 1).

TABLA 1. Conteo global de leucocitos y de granulocitos e índice opsono fagocítico en los diferentes grupos de estudio (media  $\pm$  desviación estándar)

Determinación	Grupo 1 n= 24	Grupo 2 n= 26	Grupo 3 n = 29	Grupo control n = 25
Leucocitos (10 <sup>9</sup> /L)	6,6 $\pm$ 1,8* p <sub>1</sub> =0,0015	6,2 $\pm$ 1,6* p <sub>2</sub> =0,0003	5,8 $\pm$ 1,7* p <sub>3</sub> =0,0000	7,8 $\pm$ 1,1
Granulocitos (10 <sup>9</sup> /L)	3,6 $\pm$ 1,8* p <sub>1</sub> =0,0002	3,2 $\pm$ 1,2* p <sub>2</sub> =0,0000	3,6 $\pm$ 1,5* p <sub>3</sub> =0,0013	4,8 $\pm$ 0,8
IOF 15 (%)	60,6 $\pm$ 13,9* p <sub>1</sub> =0,0000	60,4 $\pm$ 11,8* p <sub>2</sub> =0,0000	70,8 $\pm$ 13,0* p <sub>3</sub> =0,0000	42,6 $\pm$ 9,4
IOF 60 (%)	32,2 $\pm$ 15,3* p <sub>1</sub> =0,0004	35,2 $\pm$ 15,4* p <sub>2</sub> =0,0000	44,7 $\pm$ 15,0* p <sub>3</sub> =0,0000	19,4 $\pm$ 4,8

\* Diferencia significativa con respecto al grupo control.

IOF 15: índice opsono fagocítico a los 15 minutos; IOF 60: índice opsono fagocítico a los 60 minutos.

Grupo 1: 24 individuos con CGLCD4  $\geq$  500 células/mm.<sup>3</sup> Grupo 2: 26 individuos con CGLCD4 de 200-499 células/mm.<sup>3</sup> Grupo 3: 29 individuos con CGLCD4 < 200 células/mm.<sup>3</sup> Grupo control: 25 donantes de sangre.

TABLA 2. Coeficiente de correlación de Spearman entre las variables en los pacientes VIH+

Variables	Leucocitos	Granulocitos	IOF15	IOF60	CGLCD4
Leucocitos	-	R=0,796192 p=0,000000	R=-0,467608 p=0,000001	R=-0,533730 p=0,000000	R=0,423939 p=0,000011
Granulocitos	-	-	R=-0,415867 p=0,000031	R=-0,416040 p=0,000030	p=0,269165 p=0,008707
IOF15	-	-	-	R=-0,551048 p=0,000000	p=0,000000 R=-0,590544
IOF60	-	-	-	-	p=0,000000
CGLCD4	-	-	-	-	-

IOF 15: índice opsono fagocítico a los 15 minutos; IOF 60: índice opsono fagocítico a los 60 minutos; CGLCD4: conteo global de linfocitos T CD4+; NS: correlación no significativa; R: significativo cuando  $p < 0,05$ .

*Actividad opsono fagocítica:* se observó una disminución significativa de esta función en los pacientes VIH+ con respecto al grupo control (tiempo 15: p<sub>1</sub>=0,0000; p<sub>2</sub>=0,0000; p<sub>3</sub>=0,0000; tiempo 60: p<sub>1</sub>=0,0004; p<sub>2</sub>=0,0000; p<sub>3</sub>=0,0000) (tabla 1). Esta función resultó significativamente disminuida en el grupo 3 respecto al resto de los pacientes VIH+ (tiempo 15: p<sub>1-3</sub>= 0,0052; p<sub>2-3</sub>=0,0051; tiempo 60: p<sub>1-3</sub>=0,0032; p<sub>2-3</sub>=0,0209).

*Relación entre variables:* el estudio de correlación entre las variables indicó que estas están relacionadas, aunque no linealmente (-0,8 < coeficiente de correlación de Spearman > 0,8) (tabla 2).

El conteo absoluto de células T CD4+ se relacionó directamente con los conteos

globales de leucocitos y de granulocitos y con los valores de OF. Los conteos globales de leucocitos y de granulocitos mostraron una relación directa entre sí y con los valores de OF. Dichos valores correspondientes al tiempo 15 y al 60 se relacionaron directamente entre sí (tabla 2).

## DISCUSIÓN

Una característica común de la mayor parte de las inflamaciones agudas inducidas por procesos inmunológicos, es la acumulación de neutrófilos en los sitios de reacción en los que intervienen activamente para mediar estos procesos. Estas células

desempeñan un papel importante como primera línea de defensa contra las infecciones en el hospedero; en sangre y espacios extravasculares, ejercen su efecto antimicrobiano a través de la interacción con anticuerpos, complemento y factores quimiotácticos. Así, en la evaluación de la función de los neutrófilos no se puede considerar la célula como una entidad independiente, se debe tener en cuenta su dependencia de otros mecanismos inmunitarios, tanto celulares como humorales, que participan como un sistema bien engranado. La alteraciones de este sistema pueden ser cuantitativas y cualitativas, lo cual predispone a infecciones recurrentes en los pacientes infectados por el VIH.<sup>10</sup>

La disminución de leucocitos observada en los pacientes VIH+ (tabla 1) puede deberse a diversos factores que producen una caída en el número de linfocitos o de neutrófilos. Entre las causas de linfopenia se reportan: el efecto citolítico del virus sobre las células T CD4+, fenómenos autoinmunes, superantígenos y apoptosis.<sup>11-14</sup>

En la literatura revisada se reporta la existencia de neutropenia en los pacientes VIH+. Entre las causas descritas se encuentran: la exposición a ciertas drogas como AZT o ganciclovir y la infiltración de la médula ósea por células tumorales o agentes infecciosos.<sup>10</sup> Estos factores pueden haber influido en la disminución de los granulocitos que se detecta en los pacientes VIH+ (tabla 1).

La disminución de la actividad opsonofagocítica podría deberse a una deficiencia en la capacidad opsonizante del suero del paciente, a un defecto intrínseco de los neutrófilos, o a ambos factores.

En los individuos con infección por VIH-1 sintomática, se ha reportado la incapacidad de generar una respuesta

humoral de anticuerpos apropiada, lo cual puede contribuir a las alteraciones funcionales de los neutrófilos.<sup>6</sup> A pesar de que existen altos niveles de inmunoglobulinas, la respuesta de anticuerpos a antígenos específicos está marcadamente disminuida en los pacientes VIH+.<sup>10</sup> Este factor pudo haber influido negativamente en la opsonización de la *C.albicans* durante el ensayo de índice opsonofagocítico y, por lo tanto, haber contribuido a la disminución de la OF (tabla 1). La producción de una respuesta de anticuerpos inapropiada, posiblemente se agrave en los pacientes con conteos de células T CD4+ por debajo de 200 células/mm,<sup>3</sup> influyendo así en la marcada disminución de la función opsonofagocítica observada en estos casos (tabla 1).

Se ha reportado, además, que la disfunción de los neutrófilos puede ser un reflejo de la influencia de una serie de productos liberados por agentes infecciosos secundarios, o de citocinas producidas en el curso de la respuesta inmune del organismo contra ellos.<sup>15</sup> La frecuencia y la severidad de infecciones es mayor en aquellos pacientes con conteos globales de linfocitos T CD4+ inferiores a 200 células/mm,<sup>3</sup> lo que puede explicar la pronunciada disminución de la OF observada en estos individuos (tabla 1).

La disminución de la OF encontrada en los pacientes infectados por el VIH (tabla 1), también podría ser el resultado de la interacción que durante el ensayo se pudo establecer entre las proteínas del virus gp41 o gp160 y la *C.albicans* (microorganismo de prueba utilizado en nuestro estudio para la determinación del índice opsonofagocítico).<sup>7,16-18</sup> Esta interacción podría ocurrir con mayor probabilidad en los pacientes con los conteos de linfocitos T CD4+ por debajo de 200 células/mm,<sup>3</sup> debido a que en estos casos, usualmente se reporta

una carga viral más elevada, que proporciona una mayor antigenemia.<sup>19</sup>

Las variables estudiadas en este trabajo no se encontraron relacionadas linealmente, lo que se interpreta como evidencia de su carácter multifactorial.

Al disminuir el número de células T CD4+, aumenta la frecuencia de los diversos factores anteriormente mencionados, que pueden contribuir al descenso del número de leucocitos y de granulocitos, así como a la disfunción opsono fagocítica. Esto puede explicar la relación directa encontrada entre el conteo global de linfocitos T CD4+ y el de leucocitos y de granulocitos, así como con los valores de OF (tabla 2).

Como era de esperar, dada la estrecha relación que existe entre los factores que pueden influir en la disminución de leucocitos, incluyendo los granulocitos y de la OF, se observó una relación directa

entre los conteos globales de dichas células y entre cada uno de estos y los valores de OF (tabla 2).

Los factores involucrados en la disminución de la actividad opsono fagocítica inciden tanto en el incremento del índice opsono fagocítico para el tiempo de 15 minutos como para el de 60, lo que se refleja en la relación directa observada entre ambos valores (tabla 2).

Finalmente, puede concluirse que el deterioro paulatino de la OF detectado en los pacientes VIH+, así como las leucopenias y granulocitopenias, podrían provocar una mayor susceptibilidad a infecciones microbianas. Estas, aunque pueden presentarse desde el inicio de la infección por VIH, son más numerosas y frecuentes en las etapas más avanzadas de la enfermedad, en las que se acentúan dichas alteraciones.

## SUMMARY

---

The dysfunction of neutrophils could contribute to susceptibility to infections observed in HIV-infected patients. A cross-sectional study was conducted to evaluate the opsonophagocytosis of neutrophils in these patients. One hundred and four individuals participated in it: 25 blood donors (the control group) and 79 HIV-positive patients who were distributed into 3 groups according to the global count of CD4 lymphocytes (GLCCD4): Group 1 composed of 24 individuals with GLCCD4<sup>3</sup> 500 cell/mm<sup>3</sup> Group 2 with 26 patients with GLCCD4 of 200-499 cell/mm<sup>3</sup> and Group 3 composed by 29 patients with GLCCD4 < 200 cell/mm<sup>3</sup>. Absolute values of leukocytes and granulocytes and relative values of lymphocytes were determined, CD4+ lymphocyte T subset was quantified and the opsonophagocytic index was estimated. A significant reduction ( $p < 0,05$ ) in absolute count of leukocytes and granulocytes and in the opsonophagocytic function was found in HIV-infected patients compared with the control group. There was a non-linear direct relation of the absolute count of CD4+ T lymphocytes with global count of leukocytes and granulocytes and the opsonophagocytic function.

*Subject headings:* VIH/immunology; NEUTROPHILS/immunology; ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME/immunology; CD4 LYMPHOCYTE COUNT/analysis; PHAGOCYTOSIS; GRANULOCYTES/immunology.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología, 4ª ed. Madrid: Harcourt Brace; 1997:17.6-17.7.
2. Dobmeyer TS, Raffel B, Dobmeyer JM, Findhammer S, Klein SA, Kabelitz D, et al. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts. *Eur J Med Res* 1995;1(1):9-15.
3. Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, Martin DJ. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(1):41-4.
4. Schaumann R, Krosing J, Shah PM. Phagocytosis of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by neutrophils of human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur J Med Res* 1998;3(12):546-8.
5. Tachavanich K, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Suwannagool S, Suvattee V. Opsonophagocytosis and intracellular killing activity of neutrophils in patients with human immunodeficiency virus infection. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996;14(1):49-56.
6. Wenisch C, Parschalk B, Zedwitz-Liebenstein K, Graninger W, Rieger A. Dysregulation of the polymorphonuclear leukocyte-*Candida* spp interaction in HIV-Positive patients. *AIDS* 1996;10(9):983-7.
7. Gruber A, Lukasser-Vogl E, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, Wurzner R. Human immunodeficiency virus type 1 gp 160 and gp 42 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* 1998;177(4):1057-63.
8. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry* 1993;14:685-9.
9. Rivero RA, Villaescusa R, González C, Palma LE, Ballester JM. Estandarización de una técnica para evaluar la actividad opsonizante del suero humano fresco. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1985;1(2):200-8.
10. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention. 3ª ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1992.p.62.
11. Voss TG, Fermin CD, Levy JA, Vigh S, Choi B, Garry RF. Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations correlates with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus. *J Virol* 1996;70:5447-54.
12. Silvestris F, Williams RC, Dammacco F. Autoreactivity in HIV-1 infections: the role of molecular mimicry. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:197-205.
13. García S, Dadaglio G, Cilote V, Chenal H, Bondurand A, Gougeon ML. Evidence for an in vivo superantigenic activity in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood* 1996;88:2151-61.
14. Gougeon ML, Lecoer H, Dulioust A. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. *J Immunol* 1996;165:3509-20.
15. Wenisch C, Graninger W. Are extrinsic or intrinsic factors relevant for polymorphonuclear leukocyte dysregulation septicemia? *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:241-5.
16. Wurzner R, Gruber A, Stoiber H, Spruth M, Chen YH, Lukasser-Vogl E, et al. Human immunodeficiency virus type-1 gp 41 binds to *Candida albicans* via complement C3-like regions. *J Infect Dis* 1997;176(2):492-8.
17. Vartivarian SE. Virulence properties and non immune pathogenic mechanisms of fungi. *Clin Infect Dis* 1992;14(suppl 1):S30-6.
18. Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individual with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol* 1996;44:311-6.
19. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology. New York: Churchill Livingstone; 1997.p.718.

Recibido: 22 de junio del 2001. Aprobado: 1 de octubre del 2001.

Lic. *Randelys Molina Castro*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Dirección postal: P.O. Box: 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf. (537)22045. Fax (537)246051. e-mail:rande@ipk.sld.cu