

TRABAJOS ORIGINALES

Laboratorios de Investigaciones del SIDA (LISIDA)
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

MARCADORES DE PROGRESIÓN SEROLÓGICOS Y CELULARES EN PACIENTES CUBANOS INFECTADOS POR VIH-1

Dr. Héctor Manuel Díaz Torres,¹ Dra. María de los Ángeles Ribas Antúnez,² Dra. Ana Luisa Lubián Caballero,³ Lic. Liliana Pérez Toledo,⁴ Lic. Maricela Izquierdo Márquez⁵ y Dr. Eladio Silva Cabrera⁶

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de marcadores de progresión serológicos y celulares en un grupo de pacientes cubanos con infección por VIH-1 confirmada serológicamente. Se seleccionaron, al inicio, de forma aleatoria, 228 individuos en diferentes estadios clínicos. Se determinó en cada caso el nivel de anticuerpos contra la proteína de 24 kD del VIH-1 y se observó la evolución clínica durante 26,5 meses. Al comienzo del seguimiento, se comprobó que el 65 % de los pacientes con infecciones oportunistas menores y el 98 % de los enfermos con SIDA presentaron títulos bajos de anticuerpos anti p24 y que la tasa de progresión clínica fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que entraron al estudio con titulaciones bajas o ausencia de anticuerpos anti p24 detectables. Al final del seguimiento, en 100 de los 228 pacientes inicialmente incluidos se realizó un estudio de corte transversal con la determinación de títulos de anticuerpos anti p24, detección de antigenemia p24 y conteo de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo. Se observó correlación entre las pruebas serológicas, el conteo de células CD4 + y el estadio clínico. La disminución del título de anticuerpos anti p24 se comportó como un marcador precoz. Se señaló la utilidad del uso combinado de estos marcadores en el seguimiento clínico de nuestros pacientes.

DeCS: VIG; INFECCIONES OPORTUNISTAS RELACIONADAS CON SIDA; INFECCIONES POR VIH/diagnóstico; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA/diagnóstico; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA/microbiología; TESTS SEROLOGICOS; TEST DE ELISA; PROGRESION DE ENFERMEDAD; AGENTES ANTIVIRALES/uso terapéutico; LINFOCITOS TCD4-POSITIVOS; PROTEINA P24 DEL NUCLEO DEL VIH.

¹ Especialista de I Grado en Medicina Interna. Master en Infectología. Investigador Auxiliar (LISIDA).

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar (IPK).

³ Especialista de I Grado en Epidemiología. Investigadora Agregada (LISIDA).

⁴ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada (IPK).

⁵ Licenciada en Biología. Investigadora Auxiliar (LISIDA).

⁶ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar (LISIDA).

La mayoría de los individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) cursan un largo período de incubación antes de la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).¹ Sin embargo, actualmente se sabe que la latencia clínica no se corresponde con un período de latencia virológica.^{2,3} Esta observación refuerza la tendencia al inicio temprano de la terapéutica antirretroviral;⁴ que va acompañada de la necesidad de contar con marcadores de progresión y para el monitoreo del tratamiento. Entre los marcadores más usados se encuentra el conteo total de linfocitos CD4+, que se correlaciona muy bien con la progresión de la enfermedad;⁵ pero no es un marcador precoz ni se modifica siempre junto con la respuesta clínica a la terapéutica.⁶

En la búsqueda de mayor eficiencia se ha recurrido al uso combinado de marcadores.⁷ Aún cuando la determinación de la carga viral sobre la base de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) esté disponible no puede obviarse el valor independiente, del conteo de linfocitos CD4+ y la utilidad de combinar ambos estudios en los algoritmos de tratamiento. La detección de antígeno p24 del VIH-1 (Ag p24) y de niveles de anticuerpos anti-p24 (Ac anti p24) se han usado ampliamente como marcadores de progresión a SIDA y también para el monitoreo de la terapéutica.^{5,8-10} Pocas veces el estadio clínico de un individuo escapa del poder predictivo de la combinación de Ac anti p24, Ag p24 y conteo total de linfocitos CD4+.¹¹

La caída de Ac anti p24 precede a la antigenemia en meses o años y también constituye un predictor de la disminución del conteo total de linfocitos CD4+, se comporta como un marcador precoz.¹² La detección y cuantificación de Ag p24 es útil en el estudio de la retrovirosis aguda,

seguimiento de seropositivos asintomáticos, monitoreo de la terapia antirretroviral, evaluación de pacientes con conteos de linfocitos CD4+ < 200 células/mm³ y en el pronóstico y seguimiento de la infección por VIH durante el período perinatal y en la edad pediátrica.^{7,10,13-15}

En Cuba, se cuenta con sistemas de ELISA para detectar y cuantificar Ag p24 y niveles de Ac anti p24 con los que se complementa el seguimiento clínico a todos los individuos infectados por el VIH. Además, se estudian las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

En el presente trabajo nos planteamos el objetivo de analizar el comportamiento de las determinaciones serológicas y la cuantificación de subpoblaciones celulares en un grupo de pacientes en diferentes estadios de la infección por VIH-1.

MÉTODOS

Para realizar un estudio longitudinal de seguimiento clínico-serológico se seleccionaron, de forma aleatoria, 228 individuos con infección por VIH-1 confirmada en el Laboratorio de Referencia Nacional, de acuerdo con criterios de diagnóstico aprobados por la OMS.¹⁶

Para definir el estadio clínico del paciente en la fecha de entrada al estudio y toma de la muestra se tuvo en cuenta la clasificación clínica de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC), revisada en 1987.¹⁷ La muestra incluyó 104 personas asintomáticas (grupo II), 28 con diagnóstico de linfadenopatía generalizada persistente (grupo III) y 96 del grupo IV. Este último grupo de 96 pacientes incluye 42 enfermos de SIDA.

A los 26,5 meses como promedio de la toma de muestra inicial se revisó el estadio clínico de cada paciente y se compa-

ró con los datos obtenidos en la fecha de entrada al estudio.

El análisis serológico inicial y las determinaciones de seguimiento se realizaron, según instrucciones del fabricante, con el ELISA DAVIH Ac p24 (Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba), ELISA de inhibición para detectar anticuerpos contra la p24 del VIH-1, cuyos resultados se expresan como no reactivo (NR), reactivo en el suero puro o reactivo en las diluciones: 1/50, 1/250, 1/1250 y 1/6250. Las titulaciones $\leq 1/250$ se consideran bajas y altas las titulaciones $> 1/250$.

Posteriormente, en un análisis de corte transversal, se compararon los resultados de las determinaciones serológicas con el conteo de subpoblaciones linfocitarias de un subgrupo de 100 pacientes tomados al azar integrado por 28 asintomáticos, 4 del grupo III, 31 del grupo IVC2 y 37 pacientes con SIDA. El conteo celular y las determinaciones serológicas se realizaron con la misma muestra o con muestras tomadas con intervalos de menos de un mes entre las mismas. Se usaron, según el manual de instrucciones de estos estuches, los sistemas de ELISA DAVIH Ac p24 y DAVIH Ag p24 de Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba. El ELISA DAVIH Ag p24 detecta concentraciones de antígeno p24 desde valores inferiores a 16 pg/mL y está dotado de un sistema de neutralización (DAVIH Ag p24 RN) para confirmar las muestras positivas. El conteo de linfocitos se realizó con anticuerpos monoclonales anti CD3, CD4 y CD8 de la casa comercial DAKO y se utilizó un citómetro de flujo *Ortho Cytoron Absolute* de la compañía *Johnson and Johnson*.

Para procesar la información se empleó el programa Epi Info 5,01B con el que se hizo el análisis univariado y se compararon medias, proporciones y grupos

según diferentes variables. Se emplearon ANOVA y los estadígrafos Z, T y chi cuadrado.

RESULTADOS

Las titulaciones de anticuerpos anti p24 por grupos clínicos de estudio en la fecha de inicio del seguimiento se muestran en la tabla 1. En los 104 individuos asintomáticos se observaron titulaciones altas y bajas en proporciones, sin diferencia estadísticamente significativa. En los grupos con manifestaciones clínicas se observó un aumento del porcentaje de titulaciones bajas con la progresión de la enfermedad. Mientras que la frecuencia de titulaciones bajas en individuos asintomáticos fue sólo del 52 % (54 de 104), casi todos los pacientes con SIDA (41/42, 98 %) presentaron titulaciones bajas; esta diferencia resultó estadísticamente significativa ($p < 0,0005$).

TABLA 1. Resultados del ELISA DAVIH Ac p24 en 228 pacientes, según grupo clínico y titulación alta o baja de Ac anti p24 al inicio del estudio

	Títulos de anticuerpos anti p24 Titulaciones bajas $\leq 1/250$	Titulaciones altas $> 1/250$
II	54/104 (52 %)	50/104 (48 %)
III	15/28 (54 %)	13/28 (46 %)
IV(No SIDA)	35/54 (65 %)	19/54 (35 %)
IV(SIDA)	41/42 (98 %)	1/42 (2 %)

Fuente: Laboratorio de Investigaciones del SIDA.

La tabla 2 muestra la progresión clínica de los individuos durante el período de observación de 26,5 meses y su relación

con la titulación inicial de anticuerpos anti p24. La tasa de progresión clínica, incluyendo la frecuencia de fallecimientos por SIDA, resultó significativamente mayor en los grupos de personas que iniciaron el estudio con titulaciones bajas. Entre los pacientes con titulaciones altas no se presentaron fallecimientos y la tasa de progresión fue significativamente menor ($p < 0,0005$).

En la tabla 3 se puede observar que la antigenemia p24 resultó detectable en 25 de 37 pacientes con SIDA (68 %), significativamente mayor que en el resto

de los grupos estudiados ($p < 10^{-6}$). En cuanto a la relación entre conteo total de linfocitos CD4+, antigenemia y títulos de anticuerpos anti p24 en los diferentes estadios clínicos, se puede observar que tanto la frecuencia de titulaciones bajas de anticuerpos anti p24 como la frecuencia de antigenemia son más altas en el subgrupo de pacientes con conteos bajos de células CD4+ (< 200 cél/mm³). En todos los casos con antigenemia detectable, los títulos de Ac anti p24 resultaron $\leq 1/250$. No se detectó antígeno p24 en los individuos con titulaciones altas de Ac anti p24.

TABLA 2. Progresión de los pacientes durante el tiempo de seguimiento (media 26,5 meses), agrupados según titulación inicial de Ac anti p24

Título inicial	n	Pacientes con progresión clínica		Tipo de progresión clínica	
				Vivos	Fallecidos
No reactivo	n=27	19/27	(70 %)	IV C2 (1) SIDA (1)	17
Puro	n=61	34/61	(56 %)	IV C2 (6) SIDA (13)	15
1/50	n=34	16/34	(47 %)	IV C2 (4) SIDA (5)	7
1/250	n=23	11/23	(48 %)	IV C2 (2) SIDA (4)	5
1/1 250	n=35	7/35	(20 %)	IV C2 (2) SIDA (5)	-
1/6 250	n=48	10/48	(20 %)	IV C2 (5) SIDA (5)	-
Total	228	97/228	(43 %)	IV C2 (20) SIDA (33)	44

Fuente: Laboratorio de Investigaciones del SIDA.

TABLA 3. Conteo total de linfocitos CD4+, titulaciones altas o bajas de anti p24 y detección de Ag p24 en un subgrupo de 100 pacientes

Conteo total de linfocitos CD4+	Grupo clínico	Ag p24 + *	Ac anti p24	
			$\leq 1/250$	$> 1/250$
< 200 cél/mm ³	SIDA (25)	19	23	2
	IVC2 y III (12)	1	10	2
	II (-)	-	-	-
Subtotal	n=37	-	33 (89 %)	4 (11 %)
200-499 cél/mm ³	SIDA (11)	6	10	1
	IVC2 y III (14)	2	10	4
	II (7)	1	4	3
Subtotal	n=32	-	24 (75 %)	8 (25 %)
≥ 500 cél/mm ³	SIDA (1)	-	-	1
	IVC2 y III (9)	-	6	3
	II (21)	3	12	9
Subtotal	n=31	-	18 (58 %)	13 (42 %)
Total	n=100	32	75	25

*Los resultados de Ag p24 + se incluyen en el grupo de casos con títulos de Ac anti p24 $\leq 1/250$.

Fuente: Laboratorio de Investigaciones del SIDA.

DISCUSIÓN

La frecuencia de títulos bajos de anticuerpos anti p24 en estadios avanzados de la enfermedad y la tasa de progresión observada a partir del título inicial se corresponde con lo observado por varios autores acerca de la asociación de la caída de anticuerpos anti p24, la detección de antígeno p24 y el desarrollo posterior de SIDA.^{11,18,19}

Aunque en poblaciones africanas se ha reportado un comportamiento diferente, con títulos altos de anticuerpos y ausencia de antigenemia en enfermos que han progresado a SIDA; en pacientes europeos, así como en grupos de individuos cubanos y norteamericanos, se ha observado que la disminución de los títulos de anticuerpos anti p24 se correlaciona con la progresión clínica.²⁰⁻²²

En el corte transversal de 100 individuos infectados por VIH-1, la detección de antígeno p24 se correlacionó con titulaciones bajas o ausencia de anticuerpos anti p24 y con manifestaciones clínicas relacionadas con la infección por VIH, como se ha reportado antes.^{18,19} La mayor prevalencia de antigenemia observada en el grupo de pacientes con SIDA, en comparación con la del resto de los individuos incluidos en el estudio, se corresponde con lo señalado por otros autores que han usado diferentes sistemas de ELISA en distintas poblaciones de personas infectadas por VIH-1.^{7,23,24} La antigenemia también resultó más frecuente en individuos con conteos de linfocitos CD4+ < 200 cél/mm³ ($p < 0,0005$); aunque no todos los pacientes con ese conteo celular presentaron antigenemia p24, observación que también ha sido reportada con anterioridad sin explicación clara acerca de la causa, pero con implicaciones sobre el pronóstico porque

los individuos con antigenemia detectable progresaron más rápidamente a SIDA que el resto, independientemente de que todos tenían conteos bajos de células CD4+.¹³

Se ha reportado que la caída de anticuerpos anti p24 precede a la disminución del conteo total de linfocitos y se comporta como un marcador precoz de la progresión a SIDA.¹² Esta observación ha determinado que en la actualidad se le continúe prestando atención a la determinación de anticuerpos anti p24.^{25,26}

Según la literatura revisada y los resultados del presente estudio, se debe esperar que los pacientes del grupo II (asintomáticos) con títulos bajos de anticuerpos anti p24 progresen clínicamente en los próximos meses o años. La disminución del título indica también mayor probabilidad de que la antigenemia resulte detectable y se comporte como un marcador precoz que predice la caída del conteo de linfocitos CD4+, de manera que los pacientes con conteos celulares relativamente altos que presenten bajos títulos de anticuerpos anti p24 tienen mayor probabilidad de experimentar disminución de dichos conteos en los meses siguientes en comparación con los pacientes que mantienen conteos celulares y títulos de anticuerpos con valores altos.

En la actualidad, la medición de la carga viral mediante técnicas de Biología Molecular y el conteo total de linfocitos CD4+ por citometría de flujo son las pruebas más usadas como marcadores de progresión y para el monitoreo de la terapéutica antirretroviral;²⁶ sin embargo, la posibilidad de usar sistemas de ELISA para la detección de la antigenemia p24 y la titulación de anticuerpos anti p24 también constituyen alternativas útiles en el seguimiento clínico de individuos infectados por VIH-1.

SUMMARY

The behavior of serologic and cell markers for disease progression in a group of Cuban serologically-confirmed HIV-infected patients was studied. Firstly, 228 subjects at different clinical stages were randomly selected. The level of antibodies to HIV-1 24 kd protein was determined in every case which were followed-up for 26.5 months to observe their clinical progression. At the beginning of the follow-up period, it was confirmed that 65 % of patients with minor opportunistic infections and 98 % of AIDS patients had low anti p24 antibody titers and that the clinical progression rate was significantly higher in the group of patients that entered the study with low titers or lack of detectable anti p24 antibodies. At the end of the follow-up period, a cross sectional study was performed on 100 of the 228 patients, which included determination of anti p24 antibody titers, p24 antigenemia detection and lymphocyte sub-population count through flow cytometry. There was a correlation among serologic tests, CD4+ cell counts and clinical staging. The reduction of anti p24 antibodies titers was seen as an early marker. The usefulness of the combined use of these markers in the clinical follow-up of those patients was pointed out.

Subject headings: HIV; AIDS-RELATED OPPORTUNISTIC INFECTIONS; HIV INFECTIONS/diagnosis; ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME/diagnosis; ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME/microbiology; SEROLOGIC TESTS; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY; DISEASE PROGRESSION; ANTIVIRAL AGENTS/therapeutic use; CD4-POSITIVE T-LYMPHOCYTES; HIV CORE PROTEIN P24.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson RM. Mathematical and statistical studies of epidemiology of HIV. *AIDS* 1989;3:333-46.
2. Ho DD. Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996;272:1124.
3. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362(6418):355-8.
4. Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Recommendations of an international panel. *JAMA* 1997;277:1962-9.
5. Lillo FB, Maillard M, Saraco A, Varnier OE. Monitoring antiretroviral activity using ICD p24 and CD4 counts in HIV infection. *J Infect* 1997;35(1):67-71.
6. Choi S, Lagakos SW, Schooley RT, Volberding PA. CD4+lymphocytes are an incomplete surrogate marker for clinical progression in persons with asymptomatic HIV infection taking Zidovudine. *Ann Intern Med* 1993;118:742-3.
7. Mac Donell KB, Chmiel JS, Poggensee L, Wu S, Phair JP. Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte counts and p24 antigenemia. *Ann J Med* 1990;89(6):706-12.
8. Stiehm ER, Fletcher CV, Mofenson LM, Palumbo PE, Kang M, Fenton T, et al. Use of human immunodeficiency virus (HIV) human hyperimmune immunoglobulin in HIV Type 1-infected children (Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 273). *J Infect Dis* 2000;181(2):548-54.
9. Sheppard HW, Ascher MS, Mc Rae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J Acquir Immun Syndr* 1991;4:704-12.
10. Pedersen C, Nielsen CM, Vestergaard BF, Gerstoft J, Krosgaard K, Nielsen JO, et al. Temporal relation of antigenemia and loss of antibodies to core antigens to development of clinical disease in HIV infection. *Br Med J* 1987;295:567-9.
11. De Wolf F, Lange JMA, Houweling JTM. Numbers of CD4+ cells and the levels of core antigens and antibodies to the HIV as predictors of AIDS among seropositive homosexual men. *J Infect Dis* 1988;158:615-22.
12. Morand-Joubert L, Bludau H, Luable J, Petit JC, Lefrere JJ. Serum anti-p24 antibody concentration has a predictive value on the decrease of CD4 lymphocyte count higher than acid-dissociated p24 antigen. *J Med Virol* 1995;47(1):87-91.
13. Keet IPM, Krol A, Koot M, Roos M, Wolf F, Miedema F, et al. Predictors of disease progression in HIV-infected homosexual men with CD4+cells <200.10⁶/but free of AIDS-defining clinical disease. *AIDS* 1994;8:1577-83.
14. Papaevangelou V, Pollack H, Rigaud M, Arlievsky N, Lu ML, Rochford G, et al. The amount of early p24 antigenemia and not the time of first detection of infants vertically infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1996;173:574-8.

15. Mofenson LM, Harris DR, Rich K, Meyer WA, Read JS, Moya J. Serum HIV-1 p24 antibody, HIV-1 RNA copy number and CD4 lymphocyte percentage are independently associated with risk of mortality in HIV-1 infected children. *AIDS* 1999;13(1):31-9.
16. WHO. Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV I/HTLV- II. *Wkly Epidem Rec* 1990;65(37):281-3.
17. CDC. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1987;36:1-15 S.
18. Lange J, Wolf F, Goudsmit J. Markers for progression in HIV infection. *AIDS* 1989;3(Suppl):S 153-60.
19. Rubio M, Nogues B, Falguera S, Puig G. The prognostic markers of HIV infection progression. A study of the p24 antigen in a cohort of 251 patients. *An Med Intern* 1999;16(9):447-50.
20. Prazuck T, Troisvallets D, Vallantin X, Patey O, Matta M, Fisch A, et al. Lack of predictive value for progression of dissociated circulating p24 antigen in human immunodeficiency virus type 1-infected black patients. *J Med Virol* 1996;50(2):181-7.
21. Díaz HM, Silva E, Rodríguez O, Barcenás J, Lubián AL. Detección de anticuerpos contra la proteína de 24 kd del VIH-1. Correlación clínico-serológica. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(3):188-91.
22. Brown AE, Lane JR, Wagner KF, Zhou S, Chun R, Ray KL. Rates of p24 antigenemia and isolation in comparable white/black HIV infected subjects. *AIDS* 1995;9(4):325-9.
23. Kenny C, Parkin J, Underhill G, Shah N, Burnell B, Osborne E, et al. HIV antigen testing. *Lancet* 1987;1:565-6.
24. Lathey J, Hughegs M, Fiscus S, Pi T, Jackson B, Rasheed S, et al. Variability and prognostic values of virologic and CD4 cell measures in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with 200-500 cd4 cells/mm³ (ACTG 175). *J Infect Dis* 1998;177(3):617-24.
25. Strathdes SA, Frank JW, McLaughlin J, Leblanc M, Mayor C, O'Shaughnessy, et al. Quantitative measures of human immunodeficiency virus specific antibodies predict progression to AIDS. *J Infect Dis* 1995;172(5):1275-9.
26. CDC. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescent. *MMWR* 1988;47:RR-5.

Recibido: 16 de agosto del 2000. Aprobado: 2 de noviembre del 2000.

Dr. *Héctor Manuel Díaz Torres*. Laboratorio de Investigaciones del SIDA, Carretera de Tapaste y Ocho Vías, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.