



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.**

**Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.**

**[Ir directamente al índice](#)**

**Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores**

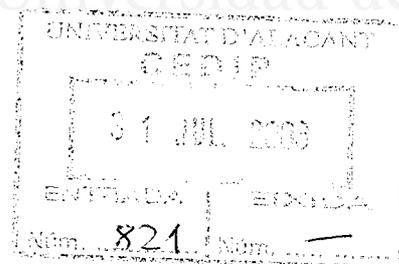
**Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .**

**[Anar directament a l'índex](#)**

**Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.**

UNIVERSIDAD DE ALICANTE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



NIVELES Y AFINIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTICAPSULARES  
FRENTA A *Streptococcus pneumoniae* EN PACIENTES CON  
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA  
HUMANA

JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ NAVAJAS

ALICANTE-2003



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Memoria presentada para optar**

**al grado de Doctor en Biología**

**por**

**José Manuel González Navajas**

**Dirigida por:**

**Dr. Carlos Muñoz Ruiz**

**Dr. José Sánchez Payá**



**D. Carlos Muñoz Ruiz**, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario de Alicante, y **D. José Sánchez Payá**, Responsable de la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Alicante,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**NIVELES Y AFINIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTICAPSULARES FRENTE A *Streptococcus pneumoniae* EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**” presentada por **D. José Manuel González Navajas** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección y consideramos que reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

Y para que así conste, firmamos el presente en Alicante en Julio del 2003.

Fdo: D. Carlos Muñoz Ruiz

Fdo: D. José Sánchez Payá



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

*A Beatriz, a la que también  
quiero dedicar el resto de mi vida*



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## AGRADECIMIENTOS

No quisiera terminar este trabajo sin antes dedicar unas breves palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que con su apoyo y su confianza han hecho posible su realización. Para mí ha sido un enorme placer, además de un gran honor, convivir y trabajar con todos ellos. Así, deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Carlos Muñoz, porque con su estímulo y su apoyo, ha hecho posible que terminara este trabajo. Por sus valiosos consejos. Por su amistad y sus enseñanzas.

A la Dra. M<sup>a</sup> Luz De la Sen, por enseñarme a dar mis primeros pasos en un laboratorio. Por no decir nunca que no en todas y cada una de las veces (y han sido muchas) en las que le he pedido ayuda. Por su enorme calidad humana, que no deja de sorprendernos a todos aquellos que la conocemos.

Al Dr. José Sánchez Payá, por la ayuda incondicional que me ha prestado desde el principio. Porque siempre ha sacado tiempo de donde no lo tenía. Porque sin su ayuda todo hubiera sido mucho más difícil.

A todo el personal del Servicio de Inmunología del Hospital General de Alicante, porque desde el primer día hicieron que me sintiera como uno más. Porque las horas de trabajo son mucho más agradables en su compañía.

A mi novia Bea, porque siempre ha estado a mi lado, dándome su cariño en los momentos malos y compartiendo mi alegría en los buenos. Por quererme, por ser como eres, porque sin ti nada tendría sentido.

A mis padres, por la confianza que han depositado en mi apoyándome en todas mis decisiones. Por su educación y sus consejos en los momentos difíciles. Por enseñarme el camino.

A mis hermanos, porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado y porque sé que lo seguirán estando. Por cuidar de mi.

A mis amigos, a todos aquellos que no necesito nombrar porque se saben incluidos en estas líneas. Por los momentos vividos juntos, por su amistad.

Por último, quisiera rendir un pequeño homenaje a todas aquellas personas que, dando su sangre primero y sometiéndose a vacunación después, han contribuido de forma totalmente altruista a la realización de este trabajo. Sin ellos no hubiera sido posible realizarlo.

A todos, muchas gracias.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ÍNDICE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. VIH.....	pag 1
1.1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.....	pag 1
1.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RETROVIRUS.....	pag 4
1.1.3. ESTRUCTURA DEL VIH.....	pag 9
1.1.4. ORGANIZACIÓN GENETICA.....	pag 10
1.1.4.1. Repeticiones terminales largas.....	pag 11
1.1.4.2. Genes estructurales.....	pag 12
1.1.4.3. Genes reguladores y accesorios.....	pag 15
1.1.4.4. Importancia de las proteínas accesorias.....	pag 17
1.1.5. CICLO VITAL DEL VIH.....	pag 20
1.1.5.1. Infección.....	pag 20
1.1.5.2. Retrotranscripción e integración nuclear.....	pag 21
1.1.5.3. Replicación, transcripción, traducción y ensamblaje.....	pag 22
1.1.6. VARIABILIDAD GENETICA.....	pag 24
1.1.7. EPIDEMIOLOGIA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.....	pag 25
1.1.7.1. Mecanismos de transmisión.....	pag 25
1.1.7.2. Epidemiología.....	pag 27
1.1.8. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VIH.....	pag 29
1.1.8.1. Respuesta humoral frente al VIH.....	pag 30
1.1.8.2. Respuesta celular frente al VIH.....	pag 33
1.1.9. DISFUNCIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	pag 34
1.1.9.1. Depleción de los linfocitos T CD4+.....	pag 35



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

1.1.9.2. Alteración de los linfocitos T CD8+ .....	pag 36
1.1.9.3. Alteración de los linfocitos B .....	pag 37
1.1.9.4. Alteración de monocitos y macrófagos .....	pag 38
1.1.9.5. Alteración de las células NK.....	pag 38
1.1.9.6. Autoinmunidad.....	pag 39
1.1.10. ASPECTOS CLINICOS DE LA INFECCIÓN POR VIH.....	pag 39
1.1.10.1. Infección primaria .....	pag 39
1.1.10.2. Infección crónica .....	pag 40
1.1.10.3. SIDA.....	pag 41
1.2. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> .....	pag 44
1.2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS .....	pag 44
1.2.2. CLASIFICACION DE LOS ESTREPTOCOCOS .....	pag 46
1.2.3. MICROBIOLOGIA Y ESTRUCTURA DEL NEUMOCOCO .....	pag 49
1.2.4. EPIDEMIOLOGIA .....	pag 52
1.2.5. MECANISMOS PATOGENICOS DEL <i>S. pneumoniae</i> .....	pag 53
1.2.5.1. Escape de la fagocitosis .....	pag 54
1.2.5.2 Activación del complemento .....	pag 55
1.2.5.3. Otros factores de importancia .....	pag 55
1.2.6. MANIFESTACIONES CLINICAS.....	pag 56
1.2.6.1. Otitis media.....	pag 56
1.2.6.2. Sinusitis .....	pag 56
1.2.6.3. Meningitis .....	pag 57
1.2.6.4. Neumonía.....	pag 57



1.2.6.5. Otros síndromes.....	pag 59
1.2.7. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A <i>S. pneumoniae</i> .....	pag 60
1.2.7.1. Opsonización y anticuerpos frente a la cápsula.....	pag 60
1.2.7.2. Inmunidad frente a la colonización.....	pag 62
1.2.7.3. Papel del bazo en la defensa frente al neumococo.....	pag 63
1.2.8. FACTORES QUE PREDISPONEN A LA INFECCIÓN.....	pag 64
1.2.9. ESTADO ACTUAL DE LAS VACUNAS NEUMOCOCICAS.....	pag 67
1.2.9.1. Vacuna neumocócica polisacárida.....	pag 67
1.2.9.2. Vacuna neumocócica conjugada.....	pag 71
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1. OBJETIVOS PRINCIPALES.....	pag 75
2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	pag 76
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>pag 77</b>
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b>	
4.1. AMBITO DEL ESTUDIO.....	pag 79
4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	pag 79
4.3. SUJETOS DE ESTUDIO.....	pag 79
4.3.1. Criterios de inclusión.....	pag 79
4.3.2. Criterios de exclusión.....	pag 80
4.3.3. Tamaño muestral.....	pag 80



4.3.4. Descripción de los grupos de estudio .....	pag 81
4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO .....	pag 83
4.4.1. Variables de identificación.....	pag 83
4.4.2. Variables inmunológicas.....	pag 83
4.5. MATERIAL .....	pag 87
4.5.1. Material inventariable.....	pag 87
4.5.2. Material fungible .....	pag 88
4.6. METODOLOGÍA.....	pag 89
4.6.1. Obtención de las muestras.....	pag 89
4.6.2. Inmunización con polisacáridos capsulares .....	pag 90
4.6.3. Determinación de los anticuerpos mediante ELISA .....	pag 90
4.6.4. Adsorción de los anticuerpos frente al CWPS.....	pag 92
4.6.5. Determinación de la avidéz de los anticuerpos.....	pag 94
4.7. ESQUEMA DE TRABAJO .....	pag 96
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ETAPAS Y TESTS UTILIZADOS.....	pag 97

## **5. RESULTADOS**

5.1. VARIABLES ESTADÍSTICAS .....	pag 101
5.2. PRUEBA DE AJUSTE A UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL.....	pag 103
5.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO .....	pag 105
5.4. ESTUDIO DE ANTICUERPOS Y AVIDEZ EN EL GRUPO 2.....	pag 109
5.4.1. Estudio del incremento de anticuerpos totales a los 2 meses.....	pag 109
5.4.2. Estudio del incremento de anticuerpos capsulares a los 2 meses ....	pag 111



5.4.3. Adsorción pre y postvacunal en el Grupo 2.....	pag 113
5.4.4. Avidéz pre y postvacunal en el Grupo 2.....	pag 115
5.5. ANTICUERPOS Y AVIDEZ EN EL GRUPO 3.....	pag 118
5.5.1. Incremento de anticuerpos totales en el Grupo 3.....	pag 118
5.5.2. Incremento de anticuerpos capsulares en el Grupo 3.....	pag 120
5.5.3. Adsorción pre y postvacunal en el Grupo 3.....	pag 122
5.5.4. Avidéz pre y postvacunal en el Grupo 3.....	pag 124
5.6. CONTRASTE DE ANTICUERPOS ENTRE LOS GRUPOS 2 Y 3.....	pag 126
5.6.1. Comparación de los niveles prevacunales totales.....	pag 126
5.6.2. Comparación de los niveles prevacunales capsulares.....	pag 128
5.6.3. Comparación del porcentaje de adsorción prevacunal.....	pag 130
5.6.4. Comparación de la avidéz prevacunal.....	pag 132
5.6.5. Comparación de los niveles postvacunales totales.....	pag 134
5.6.6. Comparación de los niveles postvacunales capsulares.....	pag 136
5.6.7. Comparación del porcentaje de adsorción postvacunal.....	pag 138
5.6.8. Comparación de la avidéz postvacunal.....	pag 140
5.7. ESTUDIO DEL INCREMENTO DE ANTICUERPOS “DOBLE O MÁS” Y “TRIPLE O MÁS” EN LOS GRUPOS 2 Y 3.....	pag 142
5.7.1. Incremento de anticuerpos al “doble o más”.....	pag 142
5.7.2. Incremento de anticuerpos al “triple o más”.....	pag 144
5.8. NIVELES POSTVACUNALES A CORTO Y MEDIO PLAZO.....	pag 146
5.8.1. Anticuerpos postvacunales totales en los Grupos 1 y 2.....	pag 147
5.8.2. Anticuerpos postvacunales capsulares en los Grupos 1 y 2.....	pag 149



5.8.3. Porcentaje de adsorción en los Grupos 1 y 2.....	pag 151
5.8.4. Comparación de la avidéz postvacunal en los Grupos 1 y 2 .....	pag 153
5.9. ASOCIACIÓN DE LA RESPUESTA CON LAS CIFRAS DE CD4.....	pag 155
5.9.1. Relación de las cifras de linfocitos CD4+ con el incremento de anticuerpos totales al “doble o más” en el Grupo 2.....	pag 155
5.9.2. Relación de las cifras de linfocitos CD4+ con el incremento de anticuerpos capsulares al “doble o más” en el Grupo 2.....	pag 157
5.9.3. Correlación de las cifras de CD4 con el resto de variables.....	pag 159
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>pag 161</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>pag 177</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>pag 179</b>



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 1. INTRODUCCIÓN



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **1.1 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

### **1.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

A partir de la demostración por Temin y Mizutani<sup>1</sup> y Baltimore<sup>2</sup> de la existencia de la transcriptasa inversa, se inició durante los años setenta la búsqueda de los retrovirus humanos que culminó, en 1980, con el aislamiento del virus linfotrófico de la leucemia de células T humanas (HTLV-I) como el primer retrovirus humano. Para este hallazgo fue muy importante la descripción previa del cuadro clínico de la enfermedad, realizada por Takatsuki y colaboradores en Japón, con una distribución geográfica que hacía pensar en la posibilidad de que ésta fuera debida a un agente transmisible, así como el descubrimiento de la interleucina 2 o factor de crecimiento de células T, que permitió mantener estas células en cultivo durante largos periodos de tiempo.

En 1982 se aisló otro virus muy relacionado, pero diferente, el HTLV-II, a partir de un enfermo afectado de leucemia de células peludas y que hoy todavía se puede considerar como un virus huérfano, en el sentido de que no se ha identificado con seguridad ninguna enfermedad asociada con su infección. Sin embargo, la infección por este virus está ampliamente diseminada en usuarios de drogas por vía intravenosa.

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue reconocido como una entidad nueva en 1981 debido a la aparición repentina de enfermedades hasta entonces consideradas raras, como el sarcoma de Kaposi o la neumonía por *Pneumocystis carinii*. La observación de que la mayoría de pacientes con SIDA eran hombres homosexuales parecía indicar que la enfermedad podía estar causada por un agente infeccioso, aunque no estaba clara la vía de transmisión. Posteriormente, los casos entre hemofílicos receptores de transfusiones y drogadictos por vía intravenosa fue la prueba definitiva para afirmar que la epidemia estaba causada por un agente infeccioso transmitido por la sangre. En 1982, cuando se descubrió que los linfocitos T CD4+ eran la principal línea celular involucrada en el SIDA, el agente infeccioso se atribuyó a un nuevo virus linfotrófico de células T humanas, el HTLV III, hoy día conocido como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

El VIH-1<sup>3,4</sup> en 1983 y el VIH-2<sup>5</sup> en 1986 fueron, respectivamente, el tercero y el cuarto retrovirus humano identificados en forma inequívoca. El primero en aislar el virus fue Françoise Barré-Sinoussi, en el laboratorio de Jean-Claude Chermann, colaborando con un grupo liderado por Luc Montagnier del Instituto Pasteur de Paris, a partir de un ganglio linfático de un paciente con linfadenopatía. La importancia de este descubrimiento se hizo más relevante cuando, al año siguiente, Robert Gallo, del Instituto

Nacional de Salud de Estados Unidos, aisló un retrovirus linfotrófico de células T a partir de un combinado de células sanguíneas de pacientes de SIDA. Prácticamente al mismo tiempo, Jay Levy, de la Universidad de California, aisló un retrovirus similar. Como suele suceder en estos casos, cada laboratorio le dio un nombre diferente a su virus: LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) el grupo de Montagnier; HTLV-III (Human T-cell Lymphotropic Virus type III) el grupo de Gallo; y ARV (AIDS Associated Retrovirus) el grupo de Levy. Pruebas de microscopía electrónica revelaron que estos virus eran morfológicamente similares a un grupo conocido de retrovirus, los lentivirus, y poco después se confirmó esta relación. En 1986, el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus recomendó el nombre actual.

### 1.1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RETROVIRUS

Los retrovirus poseen envoltura, tienen un diámetro aproximado de 100nm y su material genético está constituido por dos cadenas positivas idénticas de RNA. Los retrovirus, a diferencia del resto de virus RNA, poseen una fase de ADN provirus dentro de su ciclo vital, aunque esto no fue totalmente aceptado hasta que en 1970 se demostró la existencia de actividad de ADN polimerasa dependiente de RNA (transcriptasa inversa). La transcriptasa inversa realiza una copia de ADN a partir de RNA vírico. La existencia de dos cadenas de RNA reduce significativamente el número de viriones defectuosos ya que la transcriptasa inversa puede saltar de una cadena a la otra evitando los defectos en cualquiera de las dos cadenas. A continuación, gracias a la acción de otro tipo de enzimas, las integrasas, el ADN intermediario se integra en el genoma de la célula huésped evitando así la acción de las nucleasas. Una célula infectada debe dividirse para que esta integración pueda llevarse a cabo: por lo tanto, los blancos para la mayoría de los retrovirus son células que se dividen activamente.

La estructura básica y el ciclo vital del VIH-1 es similar a la de otros retrovirus, incluyendo la organización genómica de los principales genes estructurales *gag*, *pol* y *env*. Sin embargo, el VIH-1 posee varios genes extra de función reguladora o accesoria. Genes similares aparecieron por

primera vez en los HTLV y recibieron el nombre de *tax* y *rex*, y son esenciales para la replicación de estos virus. Se han descubierto genes muy similares en los VIH, denominados *tat* y *rev*, que poseen funciones **reguladoras** esenciales para la replicación viral. Además de estos genes reguladores, se han descubierto otros cuatro genes conocidos como **accesorios** (*nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) que no son esenciales para la replicación “in vitro”

Después de conocerse estos resultados se demostró que los retrovirus pertenecientes a la subfamilia de los lentivirus tenían una organización genética similar. Esos análisis y posteriores estudios de microscopía electrónica definieron a los VIH como miembros de la subfamilia de los lentivirus<sup>6</sup>.

#### 1.1.2.1 *El VIH es un lentivirus*

Dentro de la familia *Retroviridae* podemos distinguir tres subfamilias distintas de virus: los Espumavirus, los Oncornavirus y los Lentivirus. Los espumavirus inducen vacuolización de las células en cultivo y producen infecciones inaparentes; los oncornavirus transforman las células en cultivo y producen tumores en sus huéspedes, y los lentivirus se fusionan con las células, produciendo infecciones lentas que finalmente destruyen las células en cultivo<sup>7</sup>. Estas infecciones son prolongadas y progresivas, e

incluyen deterioro del sistema inmunitario y hematopoyético y del sistema nervioso central, y en ocasiones, artritis y autoinmunidad.

Dentro de los lentivirus, el virus de la anemia equina fue uno de los primeros en ser identificados. Descubierto en 1904, este virus da lugar a episodios autoinmunes de anemia hemolítica en caballos. También son ampliamente conocidos desde hace años los lentivirus de ovinos, como el virus Visna-Maedi que produce infecciones de los pulmones y del sistema nervioso central en ovejas, y el CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) que produce infecciones en cabras.

El descubrimiento de que el SIDA es una infección lenta causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que está relacionado con los agentes de visna y maedi<sup>8,9</sup> intensificó ampliamente el estudio de estos agentes y lideró la búsqueda de nuevos lentivirus. De esta forma se aislaron lentivirus a partir de gatos, como el FLV (Feline Leukemia Virus), y de una amplia variedad de primates, los SIV (Simian Immunodeficiency virus) (Fig.1). En 1986 se descubrió un tipo distinto de VIH, que es prevalente en determinadas regiones de África Occidental. A este virus se le llamó VIH-2, y los individuos infectados por él también desarrollan SIDA, pero con un periodo de latencia más largo y con menos morbilidad.

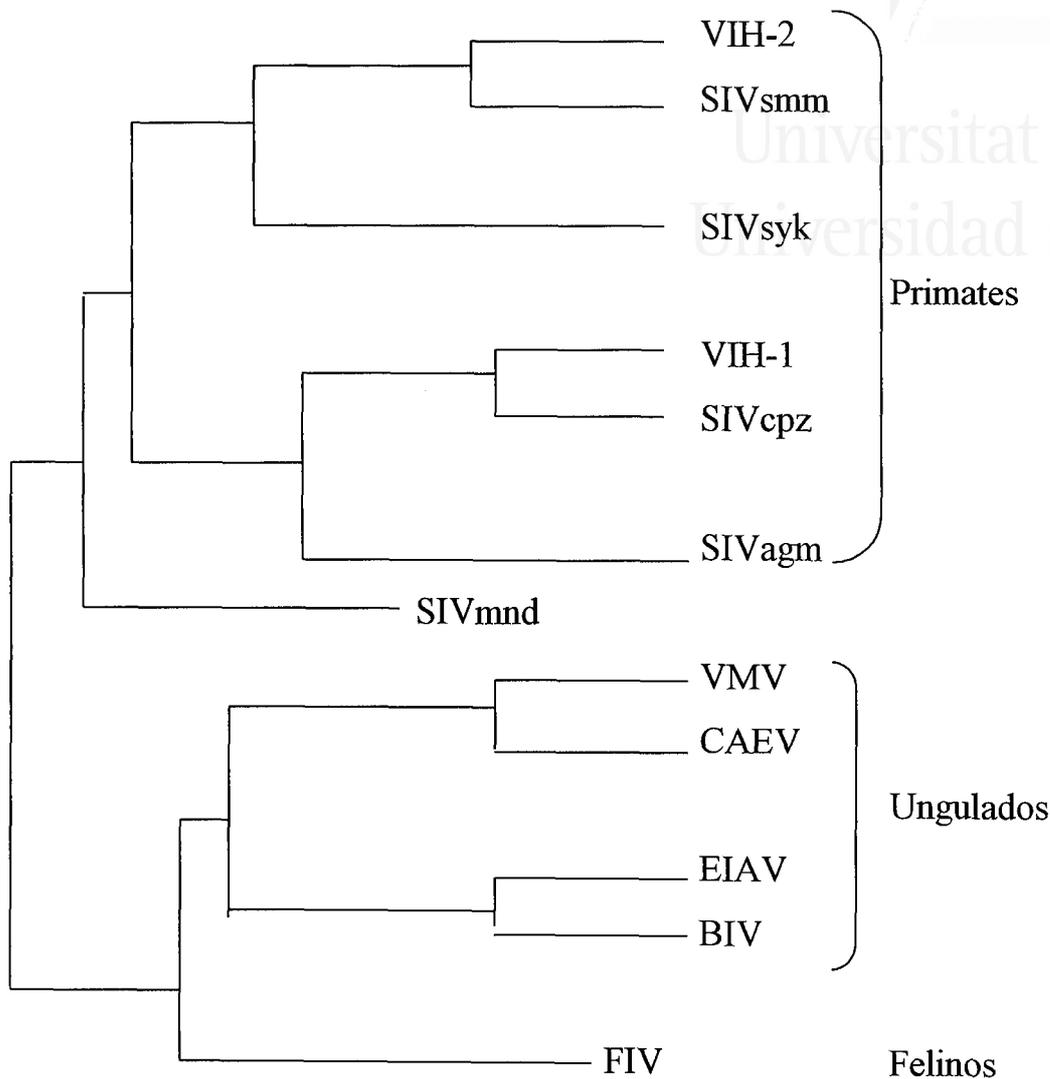


Fig.1. **Relaciones filogenéticas entre Lentivirus.** Se muestran los miembros de la subfamilia lentivirus agrupados con relación a las secuencias de nucleótidos del gen *pol*. Se muestran cinco grupos de virus en primates: SIV aislado de chimpancés (cpz), de monos mangabey (smm), de monos verdes de África (agm), de monos de Sykes (syk) y de mandriles (mnd). Los lentivirus de ungulados son el Visna-Maedi (VMV), un virus que produce artritis y encefalitis en cabras (CAEV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV). El último es el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)

Como se observa en la figura, el VIH-1 es más próximo genéticamente al virus de la inmunodeficiencia simiana aislado de chimpancés (SIV<sub>cpz</sub>), mientras que el VIH-2 está relacionado con el virus aislado de monos mangabey fuliginosos (SIV<sub>smm</sub>)<sup>10</sup> Durante la última

década se han caracterizado varias cepas distintas tanto de VIH-1 como de VIH-2. Las comparaciones de las secuencias de nucleótidos entre estas cepas permitió distinguir tres grupos principales dentro del VIH-1: el Grupo **M**, que incluye la mayoría de los VIH-1 aislados, el Grupo **O** que representa las cepas que aparecen mas raramente, y un grupo intermedio filogenéticamente, el Grupo **N**. Se han encontrado al menos siete subtipos distintos dentro del grupo M (A, B, C, D, E, F y G), cada uno de ellos prevalente en un área geográfica determinada.

A pesar de la similitud de secuencias dentro de los virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV) se ha observado que cada tipo de virus es endémico de la especie a partir de la cual ha sido aislado y no produce enfermedad en dicha especie. Sin embargo, si un SIV de un mono africano es inoculado en un primate asiático sí se produce una enfermedad de características similares al SIDA. Este fenómeno junto con la amplia similitud de secuencias entre los VIH y algunos SIV, (algunos VIH-2 aislados son prácticamente indiferenciables en la secuencia de nucleótidos en comparación con el SIVsmm), apoyan la hipótesis de que los VIH surgieron debido a una transmisión interespecie entre primates y humanos.

### 1.1.3 ESTRUCTURA DEL VIH

#### 1.1.3.1 *Estructura de la partícula viral*

La partícula viral madura del VIH es una esfera compuesta por una membrana bicapa lipídica externa y una nucleocápside con un core denso interno. La envoltura viral se forma a partir de la membrana de la célula huésped donde se han insertado las proteínas gp41 y gp120 y pueden incluir otras de la célula huésped como HLA-DR,  $\beta$ -2 microglobulina y HLA de clase I cadena  $\alpha$ <sup>11</sup>. Existen 72 proyecciones de la membrana externa compuesta por la proteína gp120, unida de forma no covalente a la porción transmembrana gp41. La nucleocápside (la matriz que se encuentra entre la envoltura lipídica y el core donde se halla el material genético) esta compuesta principalmente por la proteína Gag p17, también denominada antígeno o proteína de la matriz, que rodea al core denso que lleva al RNA. Este core tiene una superficie externa compuesta por las proteínas Gag p24 y p6 y en su interior se encuentran dos cadenas positivas del RNA viral completo, íntimamente asociado a la proteína Gag p7. Dentro del core también se encuentran las enzimas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa, así como dos productos de clivaje de la proteína precursora Gag (p1 y p2).

Hasta mediados de los noventa, se creía que la síntesis de ADN a partir del RNA molde (transcripción inversa) se producía únicamente en el citoplasma después de que el virus infectaba a la célula. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que los viriones maduros también poseen copias pequeñas de ADN que han sufrido transcripción inversa de forma parcial y variable.<sup>12,13</sup> No obstante, estas copias de ADN no están completas hasta que la célula comienza su ciclo de división.

#### 1.1.4 ORGANIZACIÓN GENÉTICA

El genoma del VIH tiene una longitud de 9,7 kb y contiene los genes estructurales estándar de todos los retrovirus: *env*, *gag* y *pol*. El gen *gag*, que codifica las proteínas del core y de la matriz del virus se encuentra en el extremo 5' del genoma. Luego está el gen *pol*, que codifica las enzimas virales (transcriptasa inversa, integrasa y proteasa). Le sigue el gen *env*, que codifica las proteínas transmembrana y de envoltura. Además de estos genes estructurales comunes a la mayoría de los retrovirus, el VIH y el SIV poseen otros seis genes de función reguladora, una característica que los hace únicos entre los retrovirus. Estos genes están codificados por dos regiones, una entre *pol* y *env* (los genes *vif*, *vpr* y *vpu*) y otra en el extremo 3' del genoma (el gen *nef*)<sup>14-16</sup>. Los genes reguladores *tat* y *rev* están codificados por zonas localizadas en las dos regiones.

#### 1.1.4.1 *Repeticiones terminales largas*

Dentro del ADN provirus, los genes virales están flanqueados por unas secuencias repetidas idénticas, ambas en los extremos 5' y 3' del genoma, que reciben el nombre de repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR contienen las secuencias necesarias para la iniciación y terminación de la transcripción del ADN, la transcripción inversa, integración y unión del activador viral Tat. La expresión del ADN integrado en la célula huésped también está regulada por secuencias localizadas en las LTR que son reconocidas por la maquinaria transcripcional de la célula huésped. Estas LTR se pueden dividir en 3 zonas funcionales separadas denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene el promotor viral y varias zonas aumentadoras de la transcripción, la región R incluye el sitio de iniciación del ARN mensajero (RNAm), y la región U5 separa la región R del sitio de unión iniciador del RNA transferente (RNAt) empleado en la transcripción inversa del RNA viral a ADN<sup>6</sup>.

La estructura de la LTR del VIH-2 es sensiblemente distinta de la del VIH-1, lo cual influye en las diferencias biológicas existentes entre estos dos retrovirus.

#### 1.1.4.2 *Genes estructurales*

Los genes estructurales del VIH comparten la estructura básica de todos los retrovirus, con las secuencias *gag*, que codifican las proteínas estructurales; las secuencias *pol* que codifican las proteínas víricas transcriptasa inversa, proteasa e integrasa; y las secuencias *env* que codifican las glucoproteínas de la envoltura del virus.

**Gag:** El gen *gag* se encuentra a continuación de la LTR y sintetiza una poliproteína precursora única, la p55<sup>6</sup>. A continuación, esta poliproteína es clivada por la proteasa del VIH para dar lugar a las proteínas Gag p1, p2, p6, p7, p17 y p24. A estas proteínas se las conoce como proteínas del core y de la matriz y son esenciales en la formación del virión. La proteína p7, o proteína de la nucleocápside, se une a secuencias específicas del RNA vírico. La proteína p24 rodea el complejo p7/RNA y está envuelta, a su vez, por la proteína p6 dando lugar al core del virus. Las otras proteínas Gag restantes forman la matriz que se encuentra rodeando al core. La p17 es la principal proteína estructural de la matriz, y también interactúa con el dominio intracelular de la proteína de la envoltura gp41 formando la conexión entre el core y la envoltura.

**Pol:** En posición distal a *gag* se encuentra el gen *pol* que codifica las enzimas víricas proteasa, transcriptasa inversa e integrasa que son

codificadas por ese orden (en sentido 5'-3'). Estas enzimas son sintetizadas a partir del mismo mRNA que los productos del gen *gag*, a través de un desplazamiento del marco ribosómico<sup>6</sup>. Esto suele ocurrir con una frecuencia aproximada del 10% y se genera una poliproteína precursora de 160 kD cuyo clivaje se produce por la propia proteasa del VIH y es esencial para la viabilidad del virus.

La proteasa es una pequeña proteína dimérica de 99 aminoácidos y 10 KD<sup>6</sup>. La principal función de esta proteína es la de liberar las proteínas *gag* y *pol* de sus moléculas precursoras (poliproteína *Gag* y poliproteína *Pol*). Los mutantes con defectos en la proteasa producen partículas inmaduras en las que el core no se condensa y, por tanto, se vuelven no infecciosas. Esta característica ha hecho que, durante los últimos años, la proteasa se convirtiera en un blanco para posibles agentes antiretrovirales.

La integrasa es una proteína de 288 residuos aminoacídicos y unos 36 KD que facilita la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped<sup>6</sup>.

Por último, la transcriptasa inversa es la enzima encargada de transformar el ARN<sub>1c</sub> del virión en ADN<sub>2c</sub>. La transcriptasa inversa está formada por dos subunidades diferenciadas, la p66 y la p51, y es la

principal responsable de la amplia variación del VIH debido a las mutaciones que se producen por los errores que comete la enzima durante la síntesis de ADN. También es probable que incorpore análogos de nucleósidos como AZT y ddI.<sup>17,18</sup> Todo esto, junto con la extensa tasa de replicación del VIH, son los responsables de tanta variación.

**Env:** El gen *env* codifica una única glucoproteína precursora, la gp160, que va a dar lugar a las proteínas de la envoltura gp120 y gp41. El clivaje proteolítico de la gp160 en gp120 y gp41 es llevado a cabo por una proteasa de la propia célula huésped (en el retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi) y es fundamental para el virus.

La gp120 posee cinco regiones variables denominadas: V1, V2, V3, V4 Y V5, responsables en gran medida de la variación entre las distintas cepas de VIH-1 (aumentando la dificultad del desarrollo de vacunas) y cuatro dominios constantes imprescindibles para la funcionalidad del virus. El grado de conservación de estas regiones se asocia al mantenimiento de la estructura de la gp120 requerida para la infectividad del virus, como el mantenimiento del sitio de fijación a CD4. La función principal de la gp120 es facilitar la entrada del virus en la célula huésped mediante el reconocimiento y unión al CD4, este sitio de unión a CD4 se ha localizado entre las regiones V3 y V4.

La gp41 es una glucoproteína transmembrana compuesta por unos 340 aminoácidos<sup>6</sup> que se puede dividir en tres dominios principales: el extracelular, el transmembrana y el intracelular. En el dominio extracelular se encuentra el sitio de unión a gp120, el sitio de multimerización (a través del cual las moléculas de gp41 se agregan a la superficie del virión) y el péptido de fusión, que facilita la fusión de la membrana vírica a la membrana de la célula huésped una vez que la gp120 se une a CD4. Por otro lado, el dominio intracelular es fundamental para la asociación de la envoltura con el core y es un blanco importante para los anticuerpos frente a VIH-1 en los individuos infectados<sup>6</sup>.

#### 1.1.4.3 *Genes reguladores y accesorios*

El VIH-1 tiene seis genes accesorios, algunos de los cuales con funciones reguladoras claramente identificadas: *tat*, el gen activador trans; *rev*, el regulador de la expresión de la proteína del virión; *vif*, el factor de infectividad del virión; *vpr*, la proteína viral r; *vpu*, proteína viral u y *nef* o factor regulador negativo. Los dos primeros se pueden clasificar como genes “reguladores” ya que las proteínas que codifican tienen funciones reguladoras en la expresión del VIH, mientras que los cuatro últimos se podrían clasificar como genes “accesorios” y aunque no son esenciales para la replicación viral si que juegan un papel importante en el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad. El VIH-2 tiene genes accesorios

funcionalmente similares pero carece de *vpu* y tiene un gen único, el *vpx* (proteína viral x)<sup>6</sup>.

El primero de los genes accesorios en ser descubierto fue el **gen *tat***, cuyo producto génico es la proteína transactivadora Tat. Esta proteína es un regulador de retroalimentación positiva de la replicación del VIH, que es capaz de aumentar en mil veces la producción de las proteínas virales<sup>19</sup>. La proteína Tat se une a unas estructuras conocidas como TAR (respuesta transactivadora), dentro del dominio R de las LTR tanto a nivel del ADN como RNA. Esta interacción aumenta el ritmo de transcripción de la LTR viral y la elongación del RNAm viral y estabiliza al RNAm.

El gen ***rev*** codifica las proteínas Rev, que regulan la expresión de RNAm viral. La proteína Rev es una proteína esencial que aumenta la expresión de las proteínas codificadas por RNAm no empalmado, entre las que se incluyen las proteínas Gag, Pol, Env, Vpr, Vpu y Vif<sup>6</sup>. Sin embargo, las proteínas expresadas a partir de RNAm con empalme múltiple (como Tat, Rev y Nef) son expresadas en ausencia de Rev. Esta proteína Rev se une al “elemento de respuesta a Rev” o RRE que se encuentra localizado dentro del gen *env* del RNAm no empalmado<sup>19</sup>. Esta unión fomenta el transporte de estos RNA desde el núcleo y aumenta la estabilidad y la traducción de estos RNA. Para que la función de Rev se lleve a cabo es

necesario que se unan varios monómeros de la proteína al RRE, es decir, es necesario que se produzca la multimerización del RRE.

#### 1.1.4.4 *Importancia de las proteínas accesorias*

Además de las proteínas estructurales y reguladoras requeridas para la replicación viral, el VIH expresa varias proteínas adicionales que son factores importantes en el desarrollo de la patogénesis. Estos factores, conocidos como proteínas accesorias, incluyen las proteínas Nef, Vpr, Vpu y Vif<sup>20</sup>. Debido a que juegan un papel importante en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, estas proteínas se han convertido en dianas potenciales de varias terapias antivirales y se han realizado numerosos estudios con el objetivo de comprender plenamente su modo de acción<sup>20</sup>.

**Nef:** La proteína Nef es la primera proteína viral que alcanza niveles detectables en la célula tras la infección por VIH<sup>20</sup>, lo cual pone en evidencia que Nef es necesaria para mantener alta la carga viral y la patogénesis en los individuos infectados por VIH. La importancia de Nef ya fue demostrada en 1991 en un estudio en el que se usó el modelo de VIH producido por SIV, en el cual los simios infectados por un virus mutante en la proteína Nef no desarrollaban la enfermedad<sup>21</sup>.

Nef es claramente la más versátil de las proteínas accesorias y se ha demostrado que posee varias actividades que influyen en la replicación del VIH después de la infección<sup>20</sup>. Estas actividades se pueden dividir en tres grupos, de origen genéticamente distinto ya que responden de forma diferente a mutaciones concretas dentro de la proteína. Estas funciones de Nef se pueden definir como; la *activación celular mediada por Nef*, la *alteración del tráfico normal de las proteínas de superficie celular* y la *estimulación de la infectividad de los viriones producida después de la infección*.

**Vpr:** La proteína Vpr, al igual que la proteína Nef, está presente en las partículas virales. Su incorporación a los viriones está mediada por interacciones específicas con la región carboxilo terminal de la proteína Gag p55, la cual se corresponde con la p6 en el procesado proteolítico de la proteína<sup>20</sup>. La Vpr también es una proteína con múltiples funciones en la replicación del VIH, entre las que se encuentran; *la detención del ciclo celular*, *la transactivación de la expresión de los genes celulares y virales*, *la participación en la importación al núcleo del genoma del VIH*, *la modulación de la replicación viral y la inducción de apoptosis*<sup>20</sup>. Aunque en principio se creía que estas funciones se debían a una única actividad de la proteína, recientemente se ha comprobado que estas actividades se pueden separar mediante determinadas mutaciones en la proteína<sup>20</sup>.

**Vpu:** La proteína Vpu es una fosfoproteína de membrana, localizada en la membrana interna de la célula<sup>20</sup>. Al igual que las anteriores proteínas accesorias, sus dos funciones principales; *la modulación negativa de la expresión de CD4 y el aumento de la liberación de los viriones* se pueden separar genéticamente en distintas zonas de la proteína por mutaciones concretas. La Vpu facilita la degradación de las moléculas de CD4 mediada por ubiquitina en el retículo endoplasmático. Adicionalmente, la Vpu facilita la liberación de los viriones de la superficie de las células infectadas. En ausencia de Vpu se pueden observar un gran número de viriones “pegados” en la superficie de las células infectadas.

**Vif:** La proteína Vif es esencial para la replicación del VIH en linfocitos de sangre periférica, macrófagos y ciertas líneas celulares<sup>22</sup>. En muchas otras líneas celulares la presencia de Vif no es necesaria para la replicación. A estas líneas se las conoce como “permisivas”. Los viriones generados en estas líneas permisivas pueden infectar células no permisivas pero el virus producido como consecuencia no es infectivo. Resultados obtenidos recientemente por Pomerantz y col. proponen un papel de Vif en la transcripción inversa<sup>23</sup>. Estos autores sugieren un modelo en el que Vif facilitaría un paso esencial para la completa retrotranscripción.

### 1.1.5 CICLO VITAL DEL VIH

El ciclo vital del VIH-1 comienza cuando se une a su principal receptor, la molécula CD4, que se encuentra en la superficie de los linfocitos T helper, células del sistema monocito-macrófago, células dendríticas y células de Langerhans. Al igual que otros virus, el VIH en su ciclo vital pasa por una serie de fases: la infección de la célula diana, replicación del genoma, producción de las proteínas de la cápside, formación de la partícula vírica y salida de la célula para infectar nuevas células.

#### 1.1.5.1 *Infección.*

En el reconocimiento de la célula diana, la interacción predominante es la que se produce entre la glucoproteína 120 y la molécula CD4. Cuando la gp120 se une a CD4 se produce un cambio conformacional de forma que el péptido de fusión de la proteína transmembrana gp41 entra en contacto con la membrana de la célula. La envoltura del virus y la membrana celular se fusionan permitiendo la liberación del core viral en el citoplasma, un complejo de proteínas Gag y Pol acompañando al genoma viral.

Aunque el principal receptor para el VIH es la molécula CD4, recientemente se han aislado virus con capacidad para usar la molécula

CD8 como receptor y, lo que es más interesante aún, manteniendo su capacidad de utilizar el CD4 como receptor<sup>24</sup>. Es decir, este clon de virus puede infectar tanto células CD8+/CD4- como CD4+/CD8-.

También se han descrito otras moléculas de la superficie celular que pueden actuar como correceptores. Los receptores para quimiocinas CCR5 y CXCR4 son los más importantes de estos correceptores. Cuando se produce la unión de la gp120 y el CD4 se produce un cambio estructural en la gp120 que permite su unión a CCR5 o CXCR4<sup>19</sup>. Otras moléculas, incluyendo receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y receptores para el complemento también pueden actuar como receptores accesorios en determinadas células<sup>19</sup>.

#### 1.1.5.2 *Retrotranscripción e integración nuclear.*

Una vez en el interior de la célula huésped, se inicia la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral mediante la acción de una enzima, la transcriptasa inversa. La retrotranscripción se realiza en el citoplasma de la célula por la unión de desoxinucleótidos a la cadena de RNA viral formándose un híbrido ARN/ADN. Posteriormente se produce la degradación de la cadena de ARN del híbrido por la acción de otra enzima del virus, la ribonucleasa H, y la síntesis de otra cadena de ADN complementaria a la previamente formada.

A continuación, el ADN bicatenario completo ingresa en el núcleo de la célula huésped para integrarse en el genoma celular formando el “provirus”. Para la integración del ADN viral son necesarias dos enzimas víricas; la endonucleasa que rompe de forma específica tanto el ADN viral como el ADN celular, y la integrasa que acopla a ambos por sus extremos.

La integración también depende del estado de activación de la célula. Aunque el virus puede infectar linfocitos quiescentes, la transcripción inversa en estas células es incompleta y la integración, por tanto, resulta ineficiente.

#### **1.1.5.3 *Replicación, transcripción, traducción y ensamblaje***

Una vez integrado, el genoma puede permanecer latente o pasar a una producción viral continua, la cual depende de diversos factores celulares y virales homólogos (del propio virus) y heterólogos (de otros virus). El principal factor involucrado en la activación del provirus latente es el factor nuclear kappa-B (NF-kB)<sup>6</sup>. La activación del linfocito y la diferenciación del monocito produce una actividad elevada de NF-kB que se une al promotor del VIH localizado en las LTR y aumenta su expresión.

Como consecuencia del estímulo, el ADN vírico se va a transcribir al ARNm. En este paso es fundamental otra proteína del virus, la proteína Tat,

que aumenta la tasa de transcripción hasta 1000 veces permitiendo la síntesis total del ARN viral. En ausencia de esta proteína no se puede transcribir el ARN viral de manera completa.

Una vez sintetizado el ARNm se transporta al citoplasma celular mediante la proteína Rev, participando a su vez junto con otras proteínas víricas como Vif, Vpu y la proteasa viral en el proceso de traducción a las proteínas estructurales del virus.

Por último se produce el ensamblaje de las proteínas estructurales englobando al genoma vírico y formando un virión intracelular que abandona la célula mediante un proceso de gemación en el que incorpora parte de la membrana plasmática de la célula huésped. Estos nuevos viriones ya son capaces de infectar nuevas células.

### 1.1.6 VARIABILIDAD GENÉTICA

Uno de los mayores problemas que se han encontrado los investigadores de todo el mundo a la hora de desarrollar terapias contra el SIDA ha sido la gran variabilidad genética de este virus, que ha obstaculizado el desarrollo de vacunas y agentes antivirales. Como es lógico, la diversidad genotípica influye notablemente en la diversidad fenotípica afectando al tropismo celular, los ritmos de replicación y la evasión del sistema inmune.

Esta diversidad genética se debe fundamentalmente a la transcriptasa inversa, que tiene una de las tasas de errores más altas descritas al fabricar la hebra de ADN complementario<sup>25</sup>, sobretodo a nivel de la proteína gp120 del gen *env*. Esta tasa de error, junto con ritmos de replicación altos en la evolución de la enfermedad conduce a la gran heterogeneidad del VIH. Además, esta heterogeneidad se puede encontrar tanto en un individuo, donde pueden hallarse virus estrechamente relacionados genéticamente pero no idénticos (cuasiespecies) como entre individuos distintos.

En pacientes infectados no sometidos a terapia antirretroviral pueden producirse hasta  $10^{10}$  partículas virales por día. La vida media de los linfocitos T infectados es de un día y la del virus en plasma de unas 6 horas<sup>26</sup>. Todo esto confiere al VIH una gran capacidad de evolución frente

a presiones del propio organismo (anticuerpos, linfocitos citotóxicos) y externas (tratamientos antirretrovirales).

### 1.1.7 EPIDEMIOLOGÍA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

#### 1.1.7.1 *Mecanismos de transmisión*

La transmisión del VIH de un individuo a otro se puede producir por una serie de mecanismos similares a los del virus de la hepatitis B (VHB).

1. **Transmisión sexual:** la transmisión del VIH se puede producir por contacto sexual, tanto homosexual como heterosexual y por la inseminación artificial de semen infectado. En África y Asia la transmisión heterosexual (especialmente de prostitutas infectadas a sus clientes) es la principal causa de la mayoría de los casos de infección por VIH<sup>19</sup>. La transmisión heterosexual es más común de la mujer al hombre y los factores de riesgo incluyen; un amplio número de parejas sexuales, prostitución, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual (gonorrea, sífilis) y presencia de ulceración de las mucosas por cualquier causa.
2. **Transmisión parenteral:** es la transmisión que se produce a través de la sangre. Las transfusiones de sangre o de los productos derivados de la sangre como plasma o células sanguíneas son potencialmente peligrosas, aunque el nivel de

seguridad alcanzado en los últimos años es altísimo. Así mismo, los usuarios de drogas por vía intravenosa expuestos a agujas o jeringas usadas son los que tienen un mayor riesgo de infección por el virus. Otras prácticas de riesgo relacionadas con este tipo de transmisión serían todas aquellas en las que se usaran instrumentos no esterilizados y que entraran en contacto con la sangre como la realización de tatuajes o piercing.

3. **Transmisión perinatal:** es la infección que se transmite de una madre infectada a su hijo. Se puede producir *intraútero*, por contacto sanguíneo directo durante el parto, o por la ingesta de leche materna. El porcentaje de transmisión del virus de la madre al hijo puede variar entre un 15-30%, aunque la terapia antiviral suministrada tanto a la madre como al niño puede reducir ese riesgo de transmisión vertical hasta el 5%.<sup>19</sup>

No existen datos epidemiológicos que apoyen la transmisión del VIH por contacto casual, por vectores (insectos), por compartir utensilios (toallas, cepillos, etc.) o transmisión por aerosoles. Si es cierto que el VIH se ha detectado en la saliva de pacientes infectados, pero en una cantidad muy baja (menos de una partícula infecciosa por mililitro), por lo cual se puede decir que el virus no se transmite por la saliva. Algo similar ocurre

con la orina, heces, sudor y fluido amniótico en los que la carga viral es tan reducida que se consideran insuficientes para transmitir la enfermedad.

#### 1.1.7.2 *Epidemiología*

El creciente número de personas infectadas por VIH en el mundo (sólo en el año 2000 se produjeron 5,3 millones de nuevas infecciones<sup>27</sup>), parece dejar claro que la epidemia no puede ser detenida únicamente con medidas sociales y de conducta. Cada día que pasa, hay un mayor consenso en la comunidad científica por el cual, las intervenciones biomédicas para la prevención primaria de la infección se revelan como la mejor solución a largo plazo para detener la epidemia.

En España, el número de casos de SIDA se estima por encima de 52.000 con más de 125.000 personas seropositivas. Y en el mundo, el número de personas infectadas por VIH se estima por encima de los 40 millones.<sup>28</sup> La Organización Mundial de la Salud ha definido tres patrones geográficos de transmisión del VIH.(tabla 1)

**Tabla 1.** Patrones geográficos de transmisión del VIH<sup>29</sup>

1. Patrón I: en Europa y EE.UU. donde los homosexuales y los usuarios de drogas por vía intravenosa constituyen la mayor proporción de individuos infectados.
2. Patrón II: en África y en algunos países centroamericanos y asiáticos donde la transmisión se produce principalmente por vía heterosexual.
3. Patrón III: en el Este de Europa y en muchos países asiáticos existe una baja prevalencia de la infección por VIH y no se dispone de suficiente información.

La exposición al virus no siempre da lugar a la infección, esto depende del tamaño del inóculo, la ruta de entrada, y también diversos factores propios del hospedador. La dosis necesaria para infectar al 50% de los individuos expuestos (ID<sub>50</sub>) no está clara todavía, pero se cree que es muy baja (10-100 viriones)<sup>19</sup> y aproximadamente la mitad de los individuos infectados que no reciban terapia antiviral contraerán el SIDA en unos 10 o 12 años, aunque este periodo de latencia depende del inóculo, la virulencia de la cepa, la ruta de entrada y la edad del paciente.

También se ha comprobado que los individuos homocigotos para una delección en el gen del correceptor CCR5 son extremadamente resistentes a la infección. Sólo unos cuantos casos de SIDA en todo el mundo se han detectado entre todos los individuos con el gen CCR5 mutado; estos individuos habían sido infectados por cepas de VIH que usan el correceptor CXCR4 (cepas X4).

### 1.1.8 RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VIH

Hay dos tipos fundamentales de respuestas inmunitarias frente a los microorganismos: la *respuesta innata o natural* y la *respuesta adquirida o específica*.

Las respuestas innatas incluyen a las barreras físicas (piel y mucosas), células fagocíticas, células mediadoras de la inflamación (basófilos, eosinófilos y mastocitos), células NK, complemento, proteínas de fase aguda y citoquinas. Todos estos mecanismos ya están presentes en el organismo antes de su exposición al antígeno y no son específicos.

Las respuestas adquiridas incluyen la proliferación de células B y T antígeno-específicas, lo cual ocurre cuando los receptores de estas células se unen a un antígeno, y los productos que secretan, los anticuerpos. Se

pueden clasificar en dos tipos, en función de los componentes que median las respuestas:

- Inmunidad humoral: mediada por las células B y los anticuerpos que secretan.
- Inmunidad celular: mediada por un grupo concreto de células, los linfocitos T.

#### 1.1.8.1 *Respuesta humoral frente al VIH*

Los anticuerpos frente al VIH pueden ser detectados poco tiempo después de la infección, aproximadamente entre 1 y 3 meses. Entre todos los isotipos, los IgG1 son los que juegan un papel más relevante en todos los estados de la infección, aumentando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente de complemento y las respuestas neutralizantes. Los niveles del resto de anticuerpos (IgM, IgA, IgD y resto de IgG) pueden variar según los diferentes estadios de la infección.

Los anticuerpos neutralizantes limitan la replicación viral durante la fase temprana asintomática de la infección. Sin embargo, los títulos de estos anticuerpos suelen ser bajos debido a que los epítomos que reconocen (normalmente proteínas de la superficie) pueden esconderse del sistema inmune creando “mutantes resistentes”. De hecho, muchos individuos

producen anticuerpos que neutralizan virus aislados en la primera fase de la infección, pero son ineficaces con los virus obtenidos de fases más avanzadas, sugiriendo un escape efectivo por parte del virus del sistema inmune.

Los anticuerpos neutralizantes se suelen unir a zonas específicas de la envuelta del virus. La región variable 3 (V3) de la gp120 es una de las dianas iniciales para estos anticuerpos. Los anticuerpos antiV3 parecen bloquear las interacciones con el correceptor que se producen después de que el virus se una al CD4. El problema es que la variación en la secuencia del asa V3 es muy grande, por lo que no es una buena diana para el desarrollo de vacunas o drogas antivirales específicas.

También se ha detectado actividad neutralizante frente a regiones ricas en carbohidratos de la envuelta del virus y frente las moléculas de adhesión ICAM y LFA-1. los anticuerpos frente a estas moléculas de adhesión podrían inhibir la formación de sincitios.

Además de los anticuerpos neutralizantes, también se ha detectado respuestas de citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento en los individuos infectados por VIH-1. En esta reacción, el sistema del complemento destruye aquellas células recubiertas de anticuerpos que se

hayan unido a las proteínas virales expresadas o asociadas a la superficie celular. Estas células también pueden ser eliminadas por células NK y por monocitos o macrófagos que expresen receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas.

Otros tipos de anticuerpos que se unen al VIH no tienen efectos tan beneficiosos. Algunos anticuerpos, llamados *anticuerpos interferentes*, son anticuerpos de baja afinidad que no bloquean al virión pero impiden la interacción de los anticuerpos neutralizantes con el virión causando un efecto perjudicial para el organismo. En el mismo sentido, otro tipo de anticuerpos conocidos como *anticuerpos aumentadores* (del inglés enhancing antibodies) pueden incluso facilitar la infección permitiendo a los viriones unidos a ellos penetrar en las células susceptibles a través de los receptores para la porción Fc o receptores para complemento.

Curiosamente, algunos anticuerpos (como los anticuerpos policlonales frente al asa V3) poseen las dos actividades; neutralizante y aumentadora, y no se puede saber con exactitud cual de las dos predominará. Aunque parece que el hecho de que se desarrolle una actividad u otra depende de la afinidad del anticuerpo. De esta manera, los anticuerpos que tengan una alta afinidad por el virus neutralizarían su unión a las células, mientras que los de baja afinidad facilitarían esa unión.

De hecho, se ha comprobado la existencia de complejos virus-anticuerpo circulantes que pueden ser infecciosos.<sup>19</sup> Además, también se ha mostrado la correlación entre un aumento de los síntomas de la enfermedad y el aumento de este tipo de anticuerpos.

#### 1.1.8.2 *Respuesta celular frente al VIH*

Las respuestas celulares antígeno-específicas incluyen la actividad tanto de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) como de los T helper (CD4+). Los linfocitos CD4+ se pueden dividir en dos tipos; TH1 y TH2. Los TH1 son células cooperadoras que producen IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  que van a actuar sobre las células CD8+ y macrófagos estimulando la inmunidad celular. Los TH2 también son células cooperadoras pero que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que van a actuar sobre los linfocitos B estimulando la inmunidad humoral y las respuestas alérgicas. Las citoquinas producidas por ambos tipos de linfocitos CD4 se inhiben recíprocamente. En infecciones parasitarias víricas (como la del VIH) se produce un aumento de la respuesta de tipo TH2 y una disminución en la de tipo TH1.

Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) son capaces de reconocer todas las proteínas del VIH-1 que han sido detectadas en los individuos infectados<sup>19</sup>. Además, existe una correlación directa entre una buena respuesta citotóxica con una baja carga viral y una progresión lenta de la

enfermedad. Sin embargo esta respuesta citotóxica falla, y este fallo se debe a la reducida expresión de citoquinas por parte de las células CD4 infectadas. Esta disminución de la respuesta de tipo TH1 parece indicar que el VIH infectaría preferentemente clones TH1 con la consecuente disminución de la actividad citotóxica y el aumento de la replicación vírica. Además, la pérdida de reconocimiento de los péptidos por parte del receptor de las células CD8+ debido a mutaciones del virus, también puede contribuir a este fallo. De esta forma, la fase final de la enfermedad está caracterizada por un rápido descenso en la actividad citotóxica de las células CD8+.

#### 1.1.9 DISFUNCIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR VIH

La característica principal de la infección por VIH es la alteración en la función del sistema inmune celular. Este efecto es devastador para el organismo ya que estas defensas son imprescindibles en la lucha del organismo frente a los patógenos.

En un primer momento, el sistema inmune parece controlar la infección. Sin embargo, el virus no es eliminado y la infección persiste en un estado latente asintomático hasta que al final, en las últimas fases del SIDA, el individuo sucumbe ante infecciones oportunistas causadas por

microorganismos que no suponen gran problema para los individuos inmunocompetentes.

#### 1.1.9.1 *Depleción de los linfocitos T CD4+*

Como ya se ha comentado, el virus infecta principalmente a las células T CD4+, por lo tanto, la principal característica asociada a la infección por VIH es el descenso en los niveles y en la función de estas células. Más concretamente, en la infección avanzada, los linfocitos de tipo TH1 son los que están más marcadamente disminuidos.

Como consecuencia se produce una disminución en la síntesis de IL-2 y del receptor para la IL-2 y una alteración en la respuesta proliferativa frente a antígenos y mitógenos. Esta pérdida de función se debe a la eliminación directa de los linfocitos por el virus y a la alteración en la presentación de antígenos por los monocitos y macrófagos. Las respuestas a antígenos requieren la interacción de la molécula CD4 de la superficie del linfocito con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) de las células presentadoras de antígeno. Debido a la presencia de proteínas víricas, como la gp120, que están unidas a CD4 se impide la interacción con la molécula del MHC-II explicando porqué están disminuidas las respuestas proliferativas a los antígenos. Las respuestas a mitógenos no dependen de la interacción con las moléculas del MHC-II,

por tanto, aunque están alteradas su alteración no es tan severa. Adicionalmente, se han comprobado cambios en la secreción de citoquinas por los macrófagos infectados que pueden desencadenar reacciones de apoptosis en linfocitos T CD4 no infectados.

Por todo esto, los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen un valor pronóstico claro; el riesgo de progresión del SIDA en un intervalo de tiempo dado aumenta a medida que descienden las cifras de células CD4.

#### 1.1.9.2 *Alteración de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>*

Las cifras de linfocitos CD8<sup>+</sup> varían a lo largo de la infección por VIH. En la fase aguda, las cifras de CD8 aparecen anormalmente elevadas (probablemente debido a que el sistema inmune intenta recuperar la homeostasis entre las CD8<sup>+</sup> y las CD4<sup>+</sup> en el momento que empiezan a destruirse estas últimas), mientras que durante la fase final de la enfermedad decrecen rápidamente. Este reducido número de células CD8<sup>+</sup> en las últimas etapas de la enfermedad se debe a la infección de estas células por parte del virus, y lo que es más importante, debido a que la proliferación y función de estas células depende de las señales inducidas por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuya población se encuentra gravemente alterada.

Además, durante la infección por VIH las células T CD8<sup>+</sup> presentan un fenotipo anormal expresando algunos marcadores de activación pero careciendo de la molécula CD25, el receptor de la IL-2

### 1.1.9.3 *Alteración de los linfocitos B*

Las alteraciones que sufren las células B en los pacientes infectados por VIH se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Activación policlonal de los linfocitos B dando lugar a una hipergammaglobulinemia, aumentando los niveles en suero de IgG1, IgG3 e IgM principalmente. Curiosamente en los niños se puede producir el efecto contrario, una hipogammaglobulinemia.
2. Secreción de autoanticuerpos frente a eritrocitos, plaquetas, linfocitos, neutrófilos, proteínas nucleares y mielina. En algunos casos asociados a enfermedad.
3. Altos niveles de anticuerpos que reaccionan frente a la forma monomérica de la gp120, pero que no reaccionan frente a la forma oligomérica que es la que está presente en la superficie del virión.
4. Como ya se ha comentado anteriormente, existen anticuerpos que tienen un efecto aumentador de la infección por VIH

5. Las respuestas proliferativas de las células B a los mitógenos también están alteradas.

#### 1.1.9.4 *Alteración de monocitos y macrófagos*

Macrófagos infectados por VIH pueden ser detectados rápidamente en tejidos después de la infección. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de ellos se encuentra infectados en sangre.

Las alteraciones de los monocitos-macrófagos producen defectos en la quimiotaxis, alteración en la presentación de antígeno a las células T, y en la fagocitosis mediada por receptores para Fc y complemento. Los macrófagos juegan un papel importante en la patogénesis del VIH ya que constituyen un reservorio in vivo para el virus.

#### 1.1.9.5 *Alteración de las células NK*

Aunque el número de células NK es relativamente normal en los pacientes infectados por VIH, su capacidad citotóxica está gravemente alterada. Esto se debe a que esta capacidad depende directamente de la IL-2 secretada por los linfocitos T CD4+, que como ya hemos dicho están gravemente afectados por el virus. Esta disminución en la función de las células NK merma considerablemente la capacidad de respuesta a la infección por parte del sistema inmune innato.

### 1.1.9.6 *Autoinmunidad*

Debido a estas alteraciones, no es extraño que se produzcan desórdenes en el sistema inmune, como en la capacidad de distinguir lo propio de lo extraño. En individuos infectados por el virus se han encontrado autoanticuerpos frente a un gran número de proteínas celulares normales. La razón concreta para la aparición de estos anticuerpos no está clara, pero su presencia supone un problema añadido para las personas afectadas por el virus.

## 1.1.10 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR VIH: SIDA

### 1.1.10.1 *Infección primaria*

La infección por el VIH va seguida de una rápida diseminación del virus por el organismo. Las células dendríticas son las responsables de esta diseminación, transportando el virus desde la zona de entrada hasta los órganos linfoides, donde infectan a los linfocitos T CD4+ que lo extienden por todo el organismo<sup>30</sup>. La respuesta inicial es rápida, eliminando gran cantidad de virus circulantes. Esta respuesta del organismo está caracterizada por la presencia de anticuerpos específicos contra el virus, por respuestas de citotoxicidad celular (aumenta el número de clones de linfocitos T CD8+)<sup>31</sup> y por un aumento de determinadas citoquinas, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 principalmente. A pesar de esta respuesta, el VIH consigue

escapar mediante alguna de sus cepas, comportándose la respuesta inmune como un filtro en la selección de cepas del VIH<sup>31</sup>.

En esta fase, el individuo puede permanecer asintomático o desarrollar una enfermedad aguda muy similar a la mononucleosis infecciosa. Los síntomas de esta enfermedad aguda son; fiebre, dolor de cabeza, dolor de garganta y erupción cutánea. Los hallazgos clínicos incluyen faringitis, linfadenopatía generalizada y erupciones en cara, tronco y miembros. Esta infección aguda por VIH también se ha asociado a enfermedades neurológicas, incluyendo meningitis y encefalitis.

#### 1.1.10.2 *Infección crónica*

Al igual que el resto de lentivirus, el VIH se caracteriza por una infección persistente crónica (que puede durar más de 10 años) que provoca una potente respuesta humoral y celular. A pesar de esta respuesta, el virus sobrevive en determinadas células que actúan como reservorio. Entre estas células se encuentran los macrófagos, determinadas poblaciones de linfocitos CD4+ y las células de la microglía del sistema nervioso central, donde se encuentran gran cantidad de células infectadas tras la fase aguda. De hecho, muchos pacientes infectados presentan demencia y otros síndromes neurológicos debido a este hecho<sup>32</sup>. Además, la respuesta citotóxica por parte de los linfocitos CD8 se produce en sangre, pero no en

tejido linfático, lo cual permite al virus evadir la respuesta inmune por esta vía.

Los síntomas y signos que se producen en esta etapa de la enfermedad incluyen; fiebre persistente, sudores nocturnos, pérdida de peso, diarrea crónica, eczemas, psoriasis, herpes zoster y candidiasis oral<sup>19</sup>.

### 1.1.10.3 **SIDA**

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es la última fase de la infección por VIH, y se caracteriza por un alto riesgo de aparición de las enfermedades oportunistas, las responsables finales del desenlace fatal de la enfermedad. En 1982 los CDC definen el SIDA como *“la existencia de una enfermedad que indique una inmunodeficiencia celular subyacente o una infección oportunista, en pacientes sin causa aparente de deterioro de su inmunidad.”* Dichas enfermedades se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2:** Infecciones oportunistas en el SIDA. (CDC 1982)

- Neumonía, meningitis o encefalitis por; *Aspergillus sp*, *Cándida albicans*, *Cryptococcus sp*, *Citomegalovirus*, *Nocardia sp*, *Strongyloides sp*, *Toxoplasma gondii*.
- Esofagitis por; *Cándida albicans*, *Citomegalovirus*, *Herpes simplex*.
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
- Diarrea crónica por *Cryptosporidium*
- *Herpes simples* mucocutáneo crónico.
- Sarcoma de Kaposi
- Linfoma cerebral primario.

Los CDC han actualizado esta definición para incluir a los adultos y adolescentes con infección diagnosticada por VIH con un recuento de linfocitos CD4 inferior a 200 células/ $\mu$ L. Además, la tuberculosis pulmonar, la neumonía bacteriana recurrente y el cáncer invasivo cervical se han añadido a la lista anterior.

En esta etapa de la enfermedad el sistema inmune tiene muy disminuidos los niveles de linfocitos T CD4+. Cuando los recuentos de linfocitos CD4 se encuentran en el rango de 250-500 células/ $\mu$ L es frecuente la aparición de candidiasis oral y tuberculosis. Con recuentos por

debajo de 200 células/ $\mu\text{L}$  se aísla frecuentemente *Cryptosporidium*. Cuando la inmunodeficiencia es más severa aparecen otras infecciones como la neumonía por *Pneumocystis carinii* (la infección oportunista más común en el SIDA), la infección por micobacterias (tanto tuberculosis como infección por *Mycobacterium avium complex*), criptococosis, y toxoplasmosis. Los pacientes de SIDA también tienen alta incidencia de bacteriemia por *Salmonella*, infecciones estafilocócicas y neumonías neumocócicas.

Por último, el cáncer diagnosticado de forma más común en los pacientes de SIDA es el sarcoma de Kaposi, una neoplasia del endotelio y el estroma mesenquimal. Actualmente se sabe que esta neoplasia está producida por un herpesvirus, el HHV-8<sup>19</sup>.

## **1.2 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

### **1.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

El *S. pneumoniae* es un patógeno importante en el ser humano y desde hace tiempo se lo conoce como una causa mayor de neumonía, meningitis, sinusitis y otitis media, así como una causa menos frecuente de endocarditis, artritis séptica y peritonitis.

El estudio del *S. pneumoniae* a lo largo de la historia ha sido fundamental para el desarrollo de la microbiología y la inmunología. La bacteria fue identificada simultáneamente, por Sternberg en los EE.UU. (quién la denominó *Micrococcus pasteurii*) y por Pasteur en Francia (que la llamó *Microbe septicémique du salive*). A finales de esa década se la llamaba de forma general *neumococo*, ya que era la causa más frecuente de neumonía lobular. Fue en 1974 cuando recibió el nombre de *Streptococcus pneumoniae* debido a su aspecto durante el crecimiento en medio líquido.

Este microorganismo fue el primero en el que se descubrió un comportamiento de patógeno extracelular típico, capaz de replicarse fuera de las células y de resistir la fagocitosis en ausencia de anticuerpos.

A finales del siglo XIX ya se demostró que la inmunización con neumococos muertos protegía a los animales de experimentación y que esta protección podía transferirse de unos a otros mediante el suero. Posteriormente se comprobó que el suero de personas que se habían recuperado de una neumonía neumocócica también otorgaba dicha protección. Neufeld y Rimpau demostraron que esta protección se debía a la presencia de determinados factores del suero que facilitaban la fagocitosis, proceso que denominaron *opsonización* (que en griego significa preparación del alimento). Estas observaciones establecieron las bases de lo que hoy conocemos como inmunidad humoral.

En la década de 1920 se demostró que el anticuerpo que proporcionaba dicha inmunidad reaccionaba frente a determinados polisacáridos de la cápsula de la bacteria<sup>33</sup>. Posteriormente, Felton<sup>34</sup> preparó los primeros polisacáridos capsulares purificados para la inmunización de seres humanos abriendo un nuevo campo en el desarrollo de vacunas.

Adicionalmente, el *S. pneumoniae* también desempeñó un papel en el descubrimiento del ADN. Los experimentos de Griffith en la década de 1920 demostraron que la inyección en ratones de neumococos vivos sin cápsula (mutantes) junto con neumococos encapsulados pero muertos, daba

lugar a la aparición de nuevos organismos vivos y encapsulados. A este fenómeno lo denominó *transformación*, pero permaneció sin explicación hasta que, en los años 40, Avery, MacLeod y McCarty<sup>35</sup> explicaban que estos mutantes recuperaban la capacidad de producir la cápsula por transferencia de ADN.

### 1.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS

Los estreptococos son bacterias esféricas u ovaladas que se desarrollan en pares o cadenas de longitud variable. La mayoría son anaerobios facultativos, aunque algunos son anaerobios obligados. Son Gram-positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos y generalmente no móviles. Dentro del género *Streptococcus* hay más de 30 especies, algunas de ellas patógenas para el ser humano.

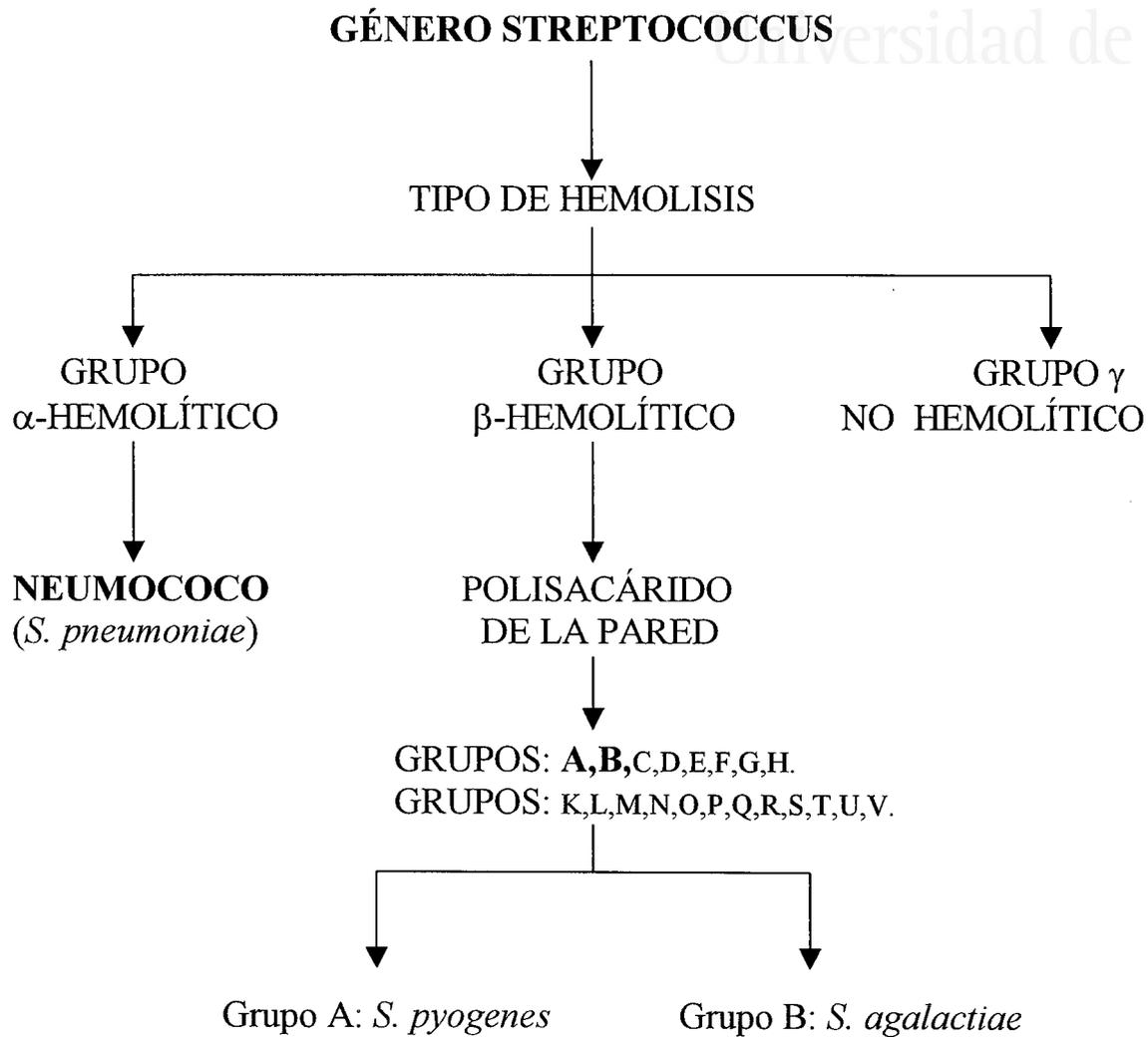
Al cultivar los estreptococos en agar-sangre se observan zonas de lisis de los eritrocitos del medio de cultivo. Dependiendo del tipo de hemólisis que producen, se pueden clasificar en tres grupos distintos:

- **$\beta$ -hemolíticos:** Producen la lisis completa de los eritrocitos presentes en el medio de cultivo. Las cepas se observan rodeadas de zonas claras incoloras de lisis completa. Dentro de este grupo se encuentran diversos patógenos del ser humano como el *S. pyogenes*.

- **$\alpha$ -hemolíticos:** Los microorganismos de este grupo producen lisis parcial de los eritrocitos del medio de cultivo. Alternan las zonas de hemólisis con otras de células no hemolizadas, dando un aspecto verdoso al medio. Este aspecto puede variar en función del tipo de sangre presente en el medio y de la duración de la incubación, lo que dio lugar al término estreptococos *viridans*, con el que se designaba a estas cepas  $\alpha$ -hemolíticas. Dentro de este grupo destaca el *S. pneumoniae*, al igual que otras cepas que normalmente residen en el tracto respiratorio superior y gastrointestinal del ser humano.
- **$\gamma$ -hemolíticos:** Los estreptococos  $\gamma$ -hemolíticos son cepas que no producen hemólisis, aunque es preferible designarlos con el término estreptococos no hemolíticos<sup>6</sup>.

Lancefield<sup>36</sup> realizó una clasificación más detallada de los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos y los clasificó en serogrupos distintos según las diferencias antigénicas de los polisacáridos de la pared celular. Hasta el momento se han identificado 20 grupos<sup>6</sup> que van desde la A a la H y de K a V. Los grupos A (*S. pyogenes*) y B (*S. agalactiae*) son los más frecuentemente aislados en el hombre, aunque también son frecuentes los

grupos C, D y G. Mientras tanto, los grupos E, L, P, U y V muy rara vez se encuentran en el ser humano<sup>6</sup>.



### 1.2.3 MICROBIOLOGÍA Y ESTRUCTURA DEL NEUMOCOCO

*S. pneumoniae* es un coco grampositivo, catalasa negativo que se replica en forma de cadenas en medio líquido. Los neumococos producen una sustancia denominada  $\alpha$ -hemolisina que degrada la hemoglobina e induce una coloración verdosa durante su desarrollo en agar-sangre. Esta propiedad se conoce con el nombre de  $\alpha$ -hemólisis, aunque en realidad no es una consecuencia de la lisis de eritrocitos ya que se observa el mismo color verdoso cuando se cultiva en agar-chocolate (en el cual todos los eritrocitos han sido lisados durante su preparación)

En el laboratorio, los neumococos se identifican por cuatro reacciones:

- Por la  $\alpha$ -hemólisis en placas de agar-sangre.
- Por su negatividad en la prueba de la catalasa.
- Por su solubilidad en sales biliares.
- Por su susceptibilidad a la etil hidrocupreína (optoquina).

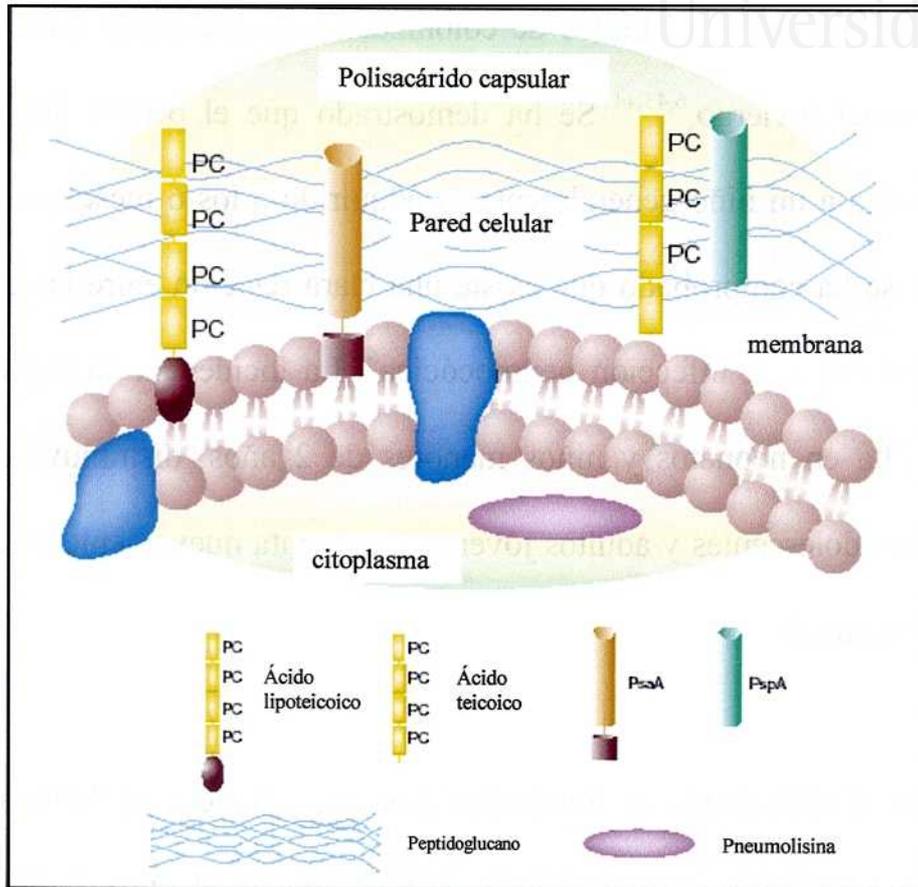
A finales de los ochenta y principios de los noventa se aislaron cepas resistentes a la optoquina<sup>37,38</sup> lo que determinó que se confiara más en la solubilidad en sales biliares para su identificación definitiva.

La bacteria está constituida por una membrana plasmática, una pared celular y una cápsula polisacárida. La pared celular está compuesta por un esqueleto de peptidoglicano, que fija la cápsula polisacárida y está unido al ácido teicoico. Un constituyente importante del ácido teicoico es el polisacárido C, que contiene fosfato de colina y está unido de forma covalente con el peptidoglicano. Estos residuos de fosfato de colina son los responsables de la unión de los neumococos con ciertas proteínas que aparecen en sangre en ciertas enfermedades (denominadas proteínas de fase aguda o proteínas C reactivas).

La membrana plasmática también ancla otras moléculas como el ácido lipoteicoico (igual que el teicoico pero con una zona lipídica hidrofóbica, también contiene residuos de fosfatidilcolina) o la PsaA (pneumococcal surface adhesin A). Otra molécula, la PspA (pneumococcal surface protein A) se encuentra anclada al peptidoglicano de la pared celular (Fig. 2).

Casi todos los aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* son capsulados, muy raramente se han encontrado cepas sin cápsula implicadas en una infección y casi siempre en casos de conjuntivitis<sup>39,40</sup>. La cápsula está compuesta por secuencias repetidas de oligosacáridos sintetizados en

el interior del citoplasma y polimerizados mediante transferasas unidas a la membrana celular<sup>41</sup>



**Fig.2 Características estructurales del *Streptococcus pneumoniae***

Las diferencias en la composición de esta cápsula han permitido la diferenciación serológica entre aproximadamente 90 tipos capsulares distintos<sup>42</sup>, algunos de los cuales se asocian frecuentemente con enfermedades neumocócicas. En el sistema de numeración usado en EE.UU. los serotipos se designan con números en el orden que fueron descubiertos. El sistema Danés, más aceptado, agrupa los serotipos según sus semejanzas antigénicas.

#### 1.2.4 EPIDEMIOLOGÍA

*S. pneumoniae* es un colonizador habitual del tracto respiratorio superior humano, se ha aislado en un 5-10% de los adultos sanos y en un 20-40% de los niños. El índice de colonización es estacional y aumenta a mediados del invierno.<sup>6,43,44</sup> Se ha demostrado que el primer neumococo que coloniza a un niño generalmente es adquirido a los 6 meses de edad.<sup>45</sup> También se ha comprobado que existe una clara relación entre la edad y la susceptibilidad a la infección neumocócica<sup>6</sup>. La incidencia de bacteriemia es muy alta en neonatos y niños menores de 2 años, disminuye a bajos niveles en adolescentes y adultos jóvenes y aumenta nuevamente en adultos de edad avanzada.

Los neumococos se transmiten por un contacto prolongado, por tanto, en los núcleos cerrados como guarderías, en el caso de los niños pequeños, y campamentos militares, prisiones o refugios para personas sin techo, en el caso de los adultos, el porcentaje de contagios y epidemias es mucho mayor que en zonas urbanas.

La neumonía neumocócica es una enfermedad asociada en muchos casos a portadores con alteración de los mecanismos pulmonares de defensa, lo que interfiere con el aclaramiento bacteriano. Debido a que esta

infección es habitualmente endógena, los pacientes hospitalizados no requieren aislamiento y las epidemias son infrecuentes.

### 1.2.5 MECANISMOS PATOGENICOS DEL *S. PNEUMONIAE*

*S. pneumoniae* posee la capacidad de producir enfermedad debido a su facilidad para escapar a la acción de los fagocitos del huésped. A diferencia de otras bacterias de su mismo género, como *S. pyogenes*, el neumococo produce pocas toxinas y el factor patogénico principal es su capacidad de replicarse en los tejidos generando una intensa respuesta inflamatoria<sup>6</sup>.

En condiciones normales, los neumococos llegan hasta la trompa de Eustaquio, los senos o los bronquios, donde la permeabilidad de la trompa de Eustaquio o los orificios nasales y los mecanismos de defensa normales dan lugar a una eliminación rápida del microorganismo. La presencia de un edema, causado por alergia o por infección vírica, que obstruya la desembocadura de la trompa de Eustaquio en la faringe, así como los defectos en los mecanismos de defensa pulmonares, ya sea crónicos (tabaquismo) o agudos (por infección viral, etc.) posibilitan la replicación de los microorganismos y la aparición de enfermedad.

### 1.2.5.1 *Escape de la fagocitosis*

Los neumococos son capaces de evadir la fagocitosis in vivo en huéspedes sin previa exposición inmunológica. El factor primordial que posibilita esta evasión es la cápsula polisacárida que rodea al neumococo. Los mecanismos que se han propuesto, por los cuales la cápsula impide la fagocitosis son los siguientes:

- 1) La ausencia de receptores en los fagocitos capaces de reconocer los polisacáridos de la cápsula.
- 2) La presencia de fuerzas electroquímicas que repelen a las células fagocíticas.
- 3) Los antígenos de la pared bacteriana son “tapados” por la cápsula, que los rodea haciéndolos inaccesibles para los anticuerpos y las células fagocíticas.

Este papel fundamental de la cápsula para la patogenicidad del neumococo ha quedado demostrado por estudios que revelan una relación directamente proporcional entre los niveles de anticuerpos anticapsulares y el nivel de protección frente a la enfermedad neumocócica<sup>46</sup>. En este mismo sentido, estudios de mutagénesis han demostrado que las cepas no capsulares producidas pierden su virulencia<sup>47</sup>.

Aún no se sabe con exactitud cual es el nivel de anticuerpos anticapsulares capaces de proporcionar inmunidad frente al neumococo en

individuos inmunocompetentes, y por tanto, mucho menos aún en los individuos inmunocomprometidos (como en el caso de la infección por VIH). Además, resulta aún más desconocido el grado de afinidad de dichos anticuerpos necesario para otorgar una respuesta eficaz.

#### 1.2.5.2 *Activación del Complemento*

La infección neumocócica de un huésped no expuesto previamente, se asocia con una respuesta inflamatoria intensa producida por la activación del sistema del complemento.

Por un lado, el ácido teicoico y los peptidoglicanos de la pared celular de *S. pneumoniae* activan la vía alternativa del complemento, mientras que por otro, los polisacáridos de la cápsula activan la vía clásica.

#### 1.2.5.3 *Otros factores de importancia*

Otros componentes neumocócicos como las proteínas de superficie, la neumolisina, la autolisina y la  $\alpha$ -hemolisina también desempeñan un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Se ha comprobado que mutantes que carecen de la capacidad de sintetizar alguna de estas sustancias en general pierden cierto grado de virulencia<sup>48</sup>.

## 1.2.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

*S. pneumoniae* puede provocar infección por propagación directa desde el lugar de colonización nasofaríngeo o por la diseminación a través de la circulación sanguínea. Por propagación directa puede infectar al oído medio, los senos, la tráquea, los bronquios y los pulmones, mientras que mediante la diseminación sanguínea puede provocar infección en el sistema nervioso central, las válvulas cardíacas, huesos y articulaciones.

### 1.2.6.1 *Otitis media*

*S. pneumoniae* es la bacteria más frecuente, junto con *Haemophilus influenzae*, en casi todos los cultivos de material proveniente de una infección del oído medio. En niños de 6 meses a 4 años, el neumococo aparece en un 40-50% de los casos en los que se aísla el agente etiológico. De la misma manera, los neumococos también predominan en la otitis media del adulto<sup>49</sup>.

### 1.2.6.2 *Sinusitis*

Al igual que en el caso anterior, *S. pneumoniae* junto con *H. influenzae* son los microorganismos predominantes en la infección de los senos. En la patogenia de esta infección es muy importante la congestión alérgica o viral de las mucosas.

### 1.2.6.3 *Meningitis*

El neumococo también es la causa más frecuente de meningitis bacteriana en los adultos<sup>50</sup> (salvo que se de una epidemia meningocócica). El mecanismo patogénico de esta enfermedad se puede deber a la extensión directa de los microorganismos desde el oído medio o los senos, o por la diseminación sanguínea por la aparición de bacteriemia.

Una vez que los microorganismos se encuentran en el espacio subaracnoideo, su capacidad para producir inflamación es el factor principal para la evolución de la enfermedad. El examen de una muestra de LCR teñida con la técnica de Gram permite un diagnóstico correcto excepto en el caso en el que el paciente haya sido tratado con antibióticos, en cuyo caso sería necesaria la detección inmunológica de material capsular.

### 1.2.6.4 *Neumonía*

**Síntomas.** Los síntomas distintivos de la neumonía neumocócica consisten en:

- Tos productiva que refleja la proliferación bacteriana y la respuesta inflamatoria resultante a nivel alveolar.
- Fiebre, consecuencia de la liberación de citoquinas.

**Hallazgos físicos.** Los pacientes con este tipo de neumonía presentan un aspecto desmejorado, con la piel de color grisáceo y anóxica que contrasta con los pacientes con neumonía viral o por micoplasmas. La temperatura oscila entre 38,5 y 39,5°C , el pulso varía entre 90-110 latidos por minuto y la frecuencia respiratoria entre 20 a 24 respiraciones por minuto<sup>6</sup>. Los pacientes de edad avanzada pueden presentar poca fiebre o incluso mantenerse afebriles. En un pequeño grupo de casos se observa la aparición de herpes labial

**Hallazgos Radiográficos.** En la mayor parte de los casos, la radiografía del tórax revela un área de infiltración que no llega a comprometer a un segmento completo. En los pacientes con enfermedad pulmonar crónica subyacente se muestra un aspecto menos homogéneo del pulmón afectado, mientras que en los pacientes con bacteriemia se aprecia una consolidación que afecta a un segmento o un lóbulo completos.

**Hallazgos de laboratorio.** Los pacientes presentan leucocitosis, con un recuento de leucocitos  $>12.000/\mu\text{L}$ . Esta situación sería consecuencia de la acumulación de casi todos los leucocitos en el área de infección. Los niveles de bilirrubina aumentan hasta 3-4 mg/dL debido a factores como la hipoxia, la inflamación del hígado y la ruptura de los eritrocitos en el pulmón.

**Diagnóstico Microbiológico.** El origen neumocócico de la neumonía se sospecha por la presencia en el esputo de gran cantidad de PMN y cocos grampositivos formando pares y cadenas cortas. El diagnóstico se confirma mediante la identificación de *S. pneumoniae* en el cultivo de esputo. La presencia de un hemocultivo positivo confirmaría el diagnóstico, pero no es imprescindible ya que un gran porcentaje de casos de neumonía neumocócica no presenta bacteriemia detectable.

**Diagnóstico Serológico.** Actualmente se ha desarrollado un método específico y sensible para detectar antígenos neumocócicos en suero durante el curso de la bacteriemia, lo que convierte a esta prueba en un test adecuado para la confirmación de la infección.

#### 1.2.6.5 *Otros síndromes*

El neumococo puede estar implicado en otras infecciones menos frecuentes, pero que merece la pena mencionar como la peritonitis bacteriana, endocarditis neumocócica (generalmente en alcohólicos), la artritis séptica que afecta a las prótesis articulares y las infecciones de tejidos blandos sobretodo en pacientes con enfermedad en el tejido conectivo<sup>6</sup> o con infección por VIH.

En este sentido, es necesario destacar que el desarrollo de una enfermedad neumocócica poco usual en un individuo joven puede ser indicativo de infección por VIH<sup>51</sup>.

### 1.2.7 MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A *S.PNEUMONIAE*

#### 1.2.7.1 *Opsonización y anticuerpos frente a la cápsula*

El principal mecanismo de defensa frente al neumococo es la fagocitosis mediada por complemento y por anticuerpos frente a la cápsula de *S. pneumoniae*. Existen muchos datos que indican la eficacia de los anticuerpos anticapsulares en la protección frente al neumococo, y muy pocos que demuestren la participación de anticuerpos frente a otros componentes bacterianos. *S. pneumoniae* no es susceptible de lisis mediada por complemento, y los polisacáridos capsulares contribuyen a la virulencia del organismo inhibiendo la fagocitosis. Por tanto, la defensa frente a la infección neumocócica depende de la opsonización de la bacteria por los anticuerpos anticapsulares específicos y el complemento, seguido de fagocitosis por PMN y macrófagos.

Estudios realizados en animales han demostrado una correlación directa entre el grado de protección y la cantidad de anticuerpos de tipo IgG anticapsulares<sup>46</sup>. En el mismo sentido, ensayos de fagocitosis han

demostrado un aumento de la opsonización de neumococos en presencia de estos anticuerpos anticapsulares<sup>52,53</sup>. Aunque algunos estudios<sup>54-56</sup> han sugerido un efecto protector de los anticuerpos frente al polisacárido de la pared (es importante no confundir los anticuerpos frente a los polisacáridos de la *cápsula*, con los anticuerpos frente al polisacárido de la *pared*), otros estudios efectuados en animales<sup>46,57</sup> y en humanos<sup>58</sup> no confirmaron estos datos.

La mayoría de los resultados sobre respuesta de anticuerpos, ya sea a la vacunación o a una infección, publicados durante los últimos años se han basado en un radioinmunoensayo (RIA) que no permitía diferenciar los anticuerpos contra polisacáridos capsulares (anticuerpos protectores) de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared bacteriana (anticuerpos no protectores). Debido a que en casi todos los sujetos normales existen estos anticuerpos no protectivos (probablemente por la presencia continua de cocos grampositivos en el organismo), estos resultados no pueden utilizarse para estimar el grado de protección frente a las enfermedades neumocócicas. Además, las vacunas comerciales contienen una cantidad contaminante de este polisacárido de la pared, que es lo suficientemente grande como para generar la producción de anticuerpos.<sup>59-61</sup> Por este motivo, el RIA descrito originalmente no puede considerarse en la evaluación de la respuesta a la vacunación.

En este sentido, la especificidad de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) junto con la preadsorción del suero para eliminar los anticuerpos frente al polisacárido de la pared, hacen de esta técnica la alternativa correcta para este tipo de estudios. El uso de este ensayo está contribuyendo a resolver discrepancias entre los niveles de anticuerpos y la actividad opsonofagocítica. Con esta técnica, Vidarsson y Jonsdottir<sup>52</sup> demostraron que la relación entre la opsonización y los niveles de anticuerpos antineumococo aumentaba marcadamente tras la adsorción de los anticuerpos frente a la pared.

#### 1.2.7.2 *Inmunidad frente a la colonización*

La aparición rápida de anticuerpos posterior a la colonización por parte del neumococo (entre 2 y 3 semanas<sup>6</sup>) explica el hecho de que no se observe neumonía neumocócica con más frecuencia. Es decir, en ausencia de condiciones especiales que predispongan a la infección, la inmunidad aparece antes de que se puede desarrollar la enfermedad.

Evidentemente, las personas que tiene una menor capacidad para formar anticuerpos permanecerán susceptibles mientras dure la colonización, lo que explica el alto índice de neumonía en pacientes con mieloma múltiple o SIDA.

### 1.2.7.3 *Papel del bazo en la defensa frente al neumococo.*

De forma general se considera que el bazo es el órgano principal para la eliminación de los neumococos circulantes. La sangre circula rápidamente a través del hígado, el cual elimina las partículas altamente opsonizadas pero no elimina eficientemente las partículas menos opsonizadas. Sin embargo, la sangre circula más despacio en su paso por el bazo, lo que permite un mayor tiempo de exposición para capturar esas partículas que no se han eliminado de forma eficiente en el paso rápido por el hígado.

Se han observado infecciones neumocócicas muy graves después de una esplenectomía tanto en adultos como en niños, mientras que la incidencia de bacteriemia o meningitis neumocócica aumenta unas 100 veces en niños con anemia falciforme<sup>6</sup>, debido a una disfunción esplénica.

### 1.2.8 FACTORES QUE PREDISPONEN A LA INFECCIÓN

*Streptococcus pneumoniae* es el paradigma del patógeno bacteriano extracelular, en el cual, las defensas del huésped dependen fundamentalmente de factores humorales (anticuerpos y complemento) y de la actividad fagocítica, sobretodo por parte de los PMN.

La producción defectuosa de anticuerpos, ya sea de origen congénito o adquirido, es el factor principal del aumento de la susceptibilidad a la infección neumocócica. Debido a esto, los pacientes VIH positivos manifiestan una predisposición muy grande a la infección por el neumococo. A medida que la infección por VIH progresa y los niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> caen por debajo de 500 células/ $\mu$ L se manifiesta un considerable deterioro en la producción de anticuerpos frente a la cápsula<sup>62,63</sup>. De esta forma, la incidencia de bacteriemia neumocócica aumenta unas 200 veces<sup>64</sup> en la población infectada por VIH, y es posible predecir que 1 de cada 25 personas infectadas por VIH padecerá infección en el curso de un año.

En cuanto a los defectos del complemento, sólo aquellos que afecten a C3 se asocian con un mayor riesgo de infección neumocócica. Esto es debido a que los neumococos no son destruidos por el suero, por tanto los defectos en los factores C6, C7, C8 o C9 formadores del CAM (complejo

de ataque a membrana) no afectan significativamente a la inmunidad frente al neumococo. En cuanto a las deficiencias de C1, C2 o C4 si se asocian con un leve aumento de la susceptibilidad, pero raramente se encuentran casos que confirmen esta asociación<sup>6</sup>.

Como se observa en la tabla 3, el resto de factores que predisponen la infección neumocócica son muy variados. Desde la edad avanzada (por el envejecimiento del sistema inmune), la diabetes (por disminución de la quimiotaxis para los leucocitos y una alteración en la función de los PMN), el alcoholismo, la exposición al frío, estrés, infecciones virales previas o tabaquismo.

**Tabla 3.** Condiciones que predisponen a la infección neumocócica.

- Formación defectuosa de anticuerpos:
  - Primaria
    - Agammaglobulinemia congénita
    - Hipogammaglobulinemia variable común (adquirida)
    - Deficiencia selectiva de las subclases IgG
  - Secundaria
    - Mieloma múltiple
    - Leucemia linfocítica crónica
    - Linfoma
    - Infección por VIH
- Defectos del complemento
  - Disminución o ausencia de C1, C2, C3 o C4
- Cantidad insuficiente de PMN
- Depuración defectuosa de la bacteriemia neumocócica
  - Esplenectomía
  - Anemia falciforme
- Factores diversos
  - Infancia y vejez
  - Tratamiento con glucocorticoides
  - Desnutrición
  - Cirrosis hepática
  - Insuficiencia renal
  - Diabetes
  - Alcoholismo
  - Ingreso hospitalario
  - Fatiga
  - Estrés
  - Exposición al frío
- Mayor probabilidad de exposición
  - Guarderías
  - Campamentos militares
  - Penitenciarias
- Infección respiratoria previa
  - Influenza
- Condiciones agravantes
  - Tabaquismo
  - Asma

### 1.2.9 FACTORES PROTECTORES: ESTADO ACTUAL DE LAS VACUNAS NEUMOCÓCICAS

Como ya se ha comentado, los anticuerpos protectores frente al neumococo son fundamentalmente de tipo IgG, con una elevada actividad opsonizante al unirse a los polisacáridos capsulares. La eficacia de esta unión depende de la afinidad o avidéz de estos anticuerpos. Estudios recientes indican que una elevada avidéz de los anticuerpos se relaciona con una alta actividad opsonizante (OPA)<sup>65,66</sup>. Por tanto, una vacuna neumocócica óptima debería inducir un incremento significativo de anticuerpos de tipo IgA e IgG, incluyendo IgG1 e IgG2, una elevada avidéz y una alta actividad funcional.

#### 1.2.9.1 *Vacuna neumocócica polisacárida.*

En la actualidad se encuentra disponible una vacuna que contiene 25µg de polisacárido capsular de cada uno de los 23 serotipos que causan infección neumocócica con mayor frecuencia. Existen dos preparados comerciales, Pneumovax (Merck, Sharp & Dohme) y Pnu-Inmune (Lederle) que se consideran equivalentes, aunque no se han realizado estudios comparativos.

Alrededor del 95% de los adultos normales responden a la vacuna elaborando anticuerpos frente a tres cuartas partes de los 23 antígenos presentes. Estos anticuerpos alcanzan un pico alrededor de los dos meses después de la vacunación y caen a niveles muy bajos después de transcurridos 5 años. Se piensa que la protección perdura mientras sea posible detectar anticuerpos, pero no se ha establecido un límite cuantitativo que nos permita establecer un punto de corte de inmunidad.

Los CDC<sup>67</sup> recomiendan la vacunación de adultos inmunocompetentes pero asociados a un mayor riesgo de padecer infección neumocócica, como por ejemplo; pacientes con enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, alcoholismo, cirrosis, insuficiencia renal y personas mayores de 65 años. Otro grupo recomendado para la vacunación es el compuesto por personas inmunocomprometidas como pacientes con disfunción esplénica, mieloma múltiple, linfoma, enfermedad de Hodgkin, trasplante de órganos o infección por VIH. Por último, la vacunación también está recomendada para todas aquellas personas que deban permanecer en condiciones de hacinamiento, como campamentos militares o penitenciarias.

En cuanto a los pacientes VIH positivos, la vacuna está recomendada cuando presentan unas cifras de linfocitos T CD4+  $\geq 200$  células/ $\mu\text{L}$  y es opcional para pacientes con cifras inferiores a 200 células/ $\mu\text{L}$ <sup>68</sup>.

**Inmunobiología.** Los antígenos pueden ser clasificados, según su capacidad de activar a las células T, en T dependientes (TD) y T independientes (TI). Debido a que los polisacáridos capsulares del neumococo no pueden ser unidos por las moléculas del MHC-II en las células presentadoras de antígeno, pertenecen al grupo de los TI. A su vez, los antígenos TI se pueden dividir en TI-1 y TI-2<sup>69</sup>. Dentro de los TI-1 se incluyen varios productos bacterianos que funcionan como activadores policlonales de las células B sin la implicación de los linfocitos T. Los TI-2 incluyen a los polisacáridos neumocócicos, los cuales activan a las células B con la participación de las células NK y de los linfocitos T<sup>70</sup>. En respuesta a estos TI-2 las células NK y T secretan IFN- $\gamma$  aumentando la producción de anticuerpos y dando lugar al cambio de clase de las inmunoglobulinas a IgG2.

Esta inmunidad independiente de MHC no genera memoria inmunológica, induce el cambio de isotipo de los anticuerpos, la maduración de la afinidad, y se desarrolla de forma más tardía que las

respuestas TD<sup>69</sup>. Los antígenos TI-2 solo activan células B maduras, lo que explica la carencia de respuesta a polisacáridos en la edad temprana<sup>70</sup>.

**Seguridad y Tolerabilidad.** La vacuna neumocócica polisacárida es segura y bien tolerada por niños, adultos y personas mayores. Reacciones locales y fiebre por encima de 38,5°C ocurren con baja frecuencia y principalmente en adultos con un elevado nivel de anticuerpos neumocócicos preexistentes (2% en niños y 12% en adultos). La revacunación también se asocia con un incremento en este tipo de reacciones.

**Inmunogenicidad.** La vacuna polisacárida es inmunogénica entre los adultos sanos y personas mayores, aunque las respuestas de anticuerpos son ampliamente variables entre individuos. Estas respuestas son principalmente de tipo IgG2. Sin embargo, no está claro el efecto de la vacuna en la avidéz de los anticuerpos. En niños, la vacuna es poco inmunogénica y los niveles de anticuerpos decrecen rápidamente pocos meses después de la vacunación. En cuanto a los pacientes VIH positivos, se piensa que la inmunogenicidad de la vacuna está relacionada con las cifras de linfocitos CD4<sup>70</sup>, y es a menudo inferior a la de los individuos sanos.

**Eficacia.** En adultos, la vacuna ha demostrado una eficacia del 81% en la prevención de las infecciones producidas por los serotipos incluidos<sup>71,72</sup>. En niños entre 2 y 5 años, la eficacia es del 63%<sup>73</sup> pero sin embargo, no ha demostrado eficacia en niños menores de 2 años.

La vacuna también se ha revelado eficaz en pacientes con enfermedades tales como la diabetes mellitus, enfermedades coronarias, pulmonares y asplenia. Sin embargo, los datos clínicos que demuestren la eficacia de la vacuna neumocócica entre personas infectadas por VIH son escasos y conflictivos<sup>71</sup>, y la vacunación neumocócica se ha convertido en una cuestión de cierta controversia.

#### 1.2.9.2 *Vacuna neumocócica conjugada.*

En las vacunas conjugadas, los carbohidratos están covalentemente unidos a una proteína carrier. Este antígeno proteico altera la respuesta inmune transformándola en TD, aumentando la inmunogenicidad de los antígenos TI como los polisacáridos neumocócicos.

El desarrollo de las vacunas conjugadas comenzó con formulaciones 1-valentes (un único serotipo capsular incluido) y fue aumentando gradualmente hasta las presentes vacunas 11-valentes<sup>70</sup> (11 serotipos incluidos). Se han utilizado distintas proteínas carrier, incluyendo la

proteína D de *H. influenzae*, la OMPC de *Neisseria meningitidis* (outer-membrane protein complex), variantes no tóxicas de la toxina diftérica 197 (CRM) y toxoide tetánico (T) y diftérico (D).

La respuesta a este tipo de vacunas comienza cuando las células dendríticas de los tejidos capturan los conjugados polisacárido-proteína. A continuación, las células dendríticas migran hacia el tejido linfático secundario para interactuar con los linfocitos T. Durante la migración, las estas células procesan la proteína del conjugado para presentarla en forma de péptidos en el seno de las moléculas del MHC-II. Las células T reconocen el complejo péptido-MHC-II mediante su receptor (TCR) y expresan CD40L. Además, las células dendríticas aumentan la expresión de moléculas B7 que se unen al CD28 de las células T amplificando la señal del TCR. Como ya se comentó anteriormente, las células T helper activadas se pueden diferenciar en Th1 y Th2 y aunque producen un efecto inhibitorio las unas sobre las otras, las vacunas conjugadas han demostrado inducir una respuesta mixta Th1/Th2, como lo indica la producción de IL-2,-5,-10 e IFN $\gamma$ <sup>70</sup>.

Por otro lado, las células B también pueden actuar como células presentadoras de antígeno, procesando las proteínas del conjugado capturado por endocitosis mediada por receptor, y presentándolas a los

linfocitos T en el seno de las moléculas del MHC-II. Además, se produce un contacto directo entre las células B y T y la expresión de IL-4 por parte de las células T que va a producir la activación y proliferación de las células B en los centros germinales. Durante esta proliferación en presencia del antígeno, los genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos sufren hipermutación somática y los clones con alta afinidad por el antígeno son seleccionados. Sin embargo, una vez que desaparece el antígeno en forma libre, las células dendríticas foliculares continúan con el proceso (lo que no ocurría con la vacuna polisacárida) de forma que las células B con elevada afinidad por los antígenos presentes en la superficie de las células dendríticas sobreviven, mientras que las que tienen baja afinidad son destruidas por apoptosis y fagocitosis por macrófagos. Esta es la base del desarrollo de la avidéz de los anticuerpos y produce la formación de un reservorio de células B de memoria de alta afinidad.

El punto débil de las vacunas conjugadas actuales es su incapacidad de generar células Th de memoria. Esto se debe a que las células T de memoria, al contrario de lo que sucedía con las células B, sí requieren la presencia del antígeno específico.

Por último, la inmunogenicidad de los conjugados depende de las características químicas de los mismos y de la longitud de los carbohidratos (los polisacáridos son más inmunogénicos que los oligosacáridos). También se pueden utilizar adyuvantes para aumentar y modular la respuesta inmune a la vacuna. Las sales de aluminio como el fosfato de aluminio o el hidróxido son los únicos adyuvantes usados en humanos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **2. OBJETIVOS**



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 2.1 OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Evaluar la tasa de vacunación efectiva frente a *S. pneumoniae*, a corto plazo (1-2 meses), en pacientes VIH positivos, determinando el porcentaje de pacientes que responden así como el nivel de anticuerpos anticapsulares que producen.
2. Evaluar la eficacia de la vacunación a medio plazo en pacientes VIH positivos, determinando el porcentaje de pacientes que mantienen la respuesta al cabo de dos años y el nivel de anticuerpos anticapsulares que conservan.
3. Evaluar el nivel de afinidad de los anticuerpos anticapsulares frente a *S. pneumoniae* en los pacientes infectados por VIH.

## 2.2 OBJETIVO SECUNDARIO

1. Correlacionar la cifra de linfocitos CD4 positivos con el nivel de anticuerpos anticapsulares, clasificando los pacientes en los diferentes estadios clínicos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### 3. HIPÓTESIS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

La mayor parte de los datos publicados parece confirmar que existe un menor porcentaje de respuesta antineumocócica en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, mientras que por otra parte, la intensidad de esta respuesta en aquellos que responden es similar a la de los sujetos control sanos.

Sin embargo, la gran mayoría de estos datos no discriminan entre los anticuerpos dirigidos frente a la cápsula y los anticuerpos frente al polisacárido de la pared, lo cual es muy importante ya que se ha demostrado que estos últimos no participan en la inmunidad frente al neumococo. Si los pacientes infectados por VIH sufren una mayor tasa de infección por *S. pneumoniae* debe ser porque sus niveles de anticuerpos anticapsulares no alcancen cifras protectoras, o bien, porque la calidad de los mismos (que podríamos definirla en términos de afinidad) es deficiente. Ninguno de estos supuestos está demostrado en pacientes VIH positivos y es lo que se pretende evaluar con este trabajo.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

#### 4.1 ÁMBITO DEL ESTUDIO

Estudio clínico realizado en la población de pacientes VIH positivos atendidos en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Alicante. El estudio experimental se ha realizado en la sección de Inmunología de dicho hospital.

#### 4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio clínico observacional, de tipo prospectivo, en el que se pretende medir la evolución de los anticuerpos antineumococo en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana que hayan recibido la vacuna frente a los 23 serotipos.

#### 4.3 SUJETOS DE ESTUDIO

Pacientes con infección por VIH que se encuentran en seguimiento en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General de Alicante. La selección de los pacientes se ha realizado de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

##### 4.3.1 **Criterios de inclusión:**

1. Pacientes adultos con infección por VIH diagnosticada mediante ELISA y confirmada por inmunoblot.

2. No inmunización previa frente a *S. pneumoniae*, en el caso de los pacientes pertenecientes al Grupo 2.
3. Inmunización previa frente a *S.pneumoniae* dos años antes de su entrada en el estudio, en el caso de los pacientes pertenecientes al Grupo 3.
4. Disponibilidad para recibir la vacunación con polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* para los pacientes del Grupo 2.

#### **4.3.2 Criterios de exclusión**

1. Pacientes con expectativa de vida inferior a 2 meses
2. Pacientes que no hayan completado el protocolo.
3. Pacientes del grupo 3 que muestren cifras de anticuerpos prevacunales anormalmente elevadas.

#### **4.3.3 Tamaño muestral.**

Los pacientes se fueron seleccionando, según los criterios de inclusión y exclusión, de entre todos aquellos que acudieron a la unidad de Enfermedades Infecciosas durante la etapa comprendida entre Enero de 1999 y Febrero del 2002.

La selección de individuos control sanos se realizó considerando las características poblacionales de los pacientes incluidos en el estudio como edad y sexo. Además, los sujetos control han de estar libres de infección por VIH así como de cualquier enfermedad que suponga una depresión del sistema inmunológico.

#### 4.3.4 Descripción de los grupos de estudio.

Se establecieron tres grupos de estudio:

1. **Grupo I.** 109 pacientes VIH positivos, 74 hombres (68%) y 35 mujeres (32%), previamente inmunizados frente a *S. pneumoniae*, en los cuales se estudiará la eficacia de la vacunación a medio plazo (2 años). El rango de edad de estos pacientes, en el momento de la vacunación, abarca desde los 16 hasta los 59 años, con una media de edad de 33,21 años. el 83% estaban recibiendo terapia HAART (terapia antiretroviral de alta actividad) durante el periodo de duración del estudio. Por último, el 70,6% de los pacientes estaban clasificados dentro de los estadios de enfermedad A1 y A2 (35,77% A1 y 34,86% A2), perteneciendo el resto de pacientes a los estadios: A3 (7,95%), B1 (1,13%), B2 (7,95%), C1 (1,13%), C2 (1,13) y C3 (5,68%).

2. **Grupo II.** 44 pacientes VIH positivos, 36 hombres (82%) y 8 mujeres (18%), no inmunizados frente a *S. pneumoniae*, en los cuales se estudiará la eficacia de la vacunación a corto plazo (2 meses). El rango de edad de este grupo, en el momento de la vacunación, está comprendido entre los 21 y los 54 años, con una media de edad de 34,72 años. El 79,4% estaban recibiendo terapia HAART durante su estancia en el estudio y, al igual que en el grupo I, la gran mayoría de pacientes (68,1%) están clasificados dentro de los estadios de enfermedad A1 y A2 (31,8% en A1 y 36,3% en A2). El resto de pacientes están clasificados en los estadios: A3 (11,7%), B2 (5,88%), B3 (8,82%) y C3 (5,88%).
3. **Grupo III.** 22 voluntarios sanos, 12 hombres (54,5%) y 10 mujeres (45,5%), no inmunizados frente al neumococo que servirán como grupo control. Las edades están comprendidas entre los 19 y los 63 años, con una media de 34,86 años. En este grupo, al no estar prescrita médicamente la vacunación, se solicitó su autorización por escrito para la administración de dicha vacuna y se contrató un seguro médico para cubrir las posibles reacciones adversas.

#### 4.4 VARIABLES DEL ESTUDIO

##### 4.4.1 Variables de identificación

1. **Número de registro:** variable asignada al sujeto, en cada uno de los grupos, por orden de entrada en el estudio.
2. **Número de historia:** asignado por la unidad de admisión para la identificación y atención hospitalaria de cada paciente.
3. **Nombre y Apellidos:**
4. **Edad**

##### 4.4.2 Variables Inmunológicas.

1. **Niveles de anticuerpos prevacunales totales:** anticuerpos totales frente al neumococo (sin distinguir los dirigidos frente a la pared y frente a la cápsula) previos a la vacunación. Expresados en  $\mu\text{g}$  equivalentes con respecto a una curva de Flebogamma.
2. **Niveles de anticuerpos prevacunales capsulares:** anticuerpos frente a los polisacáridos capsulares (anticuerpos específicos) previos a la vacunación. Expresados en  $\mu\text{g}$  equivalentes/mL

3. **Niveles de anticuerpos postvacunales totales:** anticuerpos antineumococo totales, posteriores a la administración de la vacuna. Expresados en  $\mu\text{g}$  equivalentes/mL
4. **Niveles de anticuerpos postvacunales capsulares:** anticuerpos anticapsulares posteriores a la administración de la vacuna. Expresados en  $\mu\text{g}$  equivalentes/mL.
5. **Avidez de los anticuerpos:** medida de calidad de los anticuerpos. Es la afinidad del anticuerpo por su antígeno específico (polisacárido de la cápsula neumocócica). Expresada en función de la concentración de Tiocianato amónico necesaria para reducir a la mitad el número de anticuerpos unidos a antígeno, es decir, cuanto mayor sea la concentración de tiocianato necesaria para reducir el número de complejos antígeno-anticuerpo a la mitad, mayor será la avidéz de los anticuerpos. La avidéz se medirá en todos los grupos tanto en los sueros prevacunales como en los postvacunales.
6. **Porcentaje de adsorción:** porcentaje de anticuerpos adsorbidos con el polisacárido común de la pared neumocócica (CWPS) con respecto al total de anticuerpos. La adsorción o eliminación de estos anticuerpos irrelevantes con el CWPS se realizará para todos los grupos tanto antes como

después de la vacunación, posteriormente a la medición de las cifras totales, así como para la determinación de la avidéz de los anticuerpos. De esta forma, cuanto mayor sea la diferencia en el número de anticuerpos antes y después de la adsorción, mayor será el porcentaje de anticuerpos irrelevantes.

7. **Vacunación eficaz:** se considera que un sujeto vacunado, tanto del grupo problema como del grupo control, se ha inmunizado eficazmente cuando la cifra de anticuerpos anticapsulares sea igual o mayor a dos veces la que tenía previamente a la vacunación
8. **Niveles de linfocitos CD4+:** cifras de linfocitos T CD4+ medidas en el momento de la vacunación. Expresado en células CD4/mm<sup>3</sup>.

Las determinaciones realizadas a cada sujeto de estudio variaron en función del grupo en el cual estaban enclavados.

A los individuos del grupo I (VIH positivos inmunizados frente al neumococo hace 2 años) se les realizó la determinación tanto de los anticuerpos capsulares (anticuerpos específicos frente a los polisacáridos de la cápsula) como de los totales (incluyendo los anticuerpos frente al polisacárido de la pared), así como el porcentaje de adsorción que se

producía (porcentaje de anticuerpo retirado tras la adsorción con el CWPS con respecto al total). Adicionalmente se les realizó la determinación de la avidéz de los anticuerpos capsulares a los dos años y se recuperaron las cifras de linfocitos T CD4+ que presentaban en el momento de la vacunación.

Tanto en los individuos incluidos en el grupo II (VIH positivos no inmunizados frente al neumococo), como los incluidos en el grupo III (sanos) se realizaron casi las mismas determinaciones. En ambos grupos se midieron las cifras de anticuerpos antineumococo prevacunales totales y capsulares, las cifras de anticuerpos antineumococo postvacunales totales y capsulares, el porcentaje de adsorción observado tanto en los anticuerpos prevacunales como en los postvacunales y la avidéz de los anticuerpos capsulares pre y postvacunales. Adicionalmente, en los individuos del grupo 2 se obtuvieron las cifras de linfocitos T CD4+ en el momento de la vacunación.

## 4.5 MATERIAL

### 4.5.1 Material inventariable.

1. Cabina de flujo laminar (Gelaire<sup>®</sup> BSB-4) para la preparación de reactivos.
2. Medidor de pH. (Schott<sup>®</sup> CG840)
3. Vortex.
4. Pipetas de precisión y pipetas multicanal.
5. Incubador de placas de ELISA a 37°C. (Sorin Biomedica<sup>®</sup>)
6. Colorímetro para la lectura de las placas de ELISA.  
(Thermo Max Molecular Devices)
7. Lavador de placas. (Sanofi Pasteur<sup>®</sup> LP35)
8. Nevera de 4°
9. Congelador (-40°C) para la conservación de las muestras.
10. Agitador magnético para la disolución de los reactivos.
11. Agitador de placas de ELISA.
12. Equipo informático y software necesario para la interpretación cuantitativa de los resultados.

#### 4.5.2 Material fungible

1. Agua estéril y apirógena. (Laboratorios Grifols SA)
2. Albúmina sérica bovina (BSA). (Sigma<sup>®</sup>)
3. Conjugado para ELISA (anti-IgG humana preoxidada). (Tago<sup>®</sup>)
4. Sustrato-Cromógeno para ELISA (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB) (Bio-Rad<sup>®</sup>)
5. Pastillas de PBS. Dulbecco A (OXOID<sup>®</sup>)
6. Polisacárido común de la pared neumocócica (CWPS) (Serum Institut, Copenhague –Dinamarca-)
7. Carbonato sódico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Merck<sup>®</sup>)
8. Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (Merck<sup>®</sup>)
9. Tiocianato amónico (NH<sub>4</sub>SCN). (Sigma<sup>®</sup>)
10. Tiras de poliestireno para ELISA. (Costar<sup>®</sup>)
11. Tween<sup>®</sup> 20. (Merck<sup>®</sup>)
12. Viales de vacuna Pneumo 23 (Aventis-Pasteur MSD)
13. Material vario (puntas de pipeta estériles, tubos Eppendorf, pipetas Pasteur, parafilm, etc.)

## 4.6 METODOLOGÍA

### 4.6.1 **Obtención de las muestras.**

1. Extraer 10 ml de sangre venosa en un tubo con gelosa.
2. Mantener la sangre a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la retracción del coágulo.
3. Centrifugar a 2100g durante 5 minutos y recoger el suero.
4. Usar o almacenar los sueros en tubos Eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de utilizarlos.

La extracción de suero de los pacientes del grupo II y de los individuos sanos control (grupo III) se realizó previamente a la administración de la vacuna para determinar el nivel de anticuerpos antineumococo prevacunal, y aproximadamente 2 meses después de la vacunación para determinar las cifras postvacunales.

Aquellos individuos sanos que presentaron unas cifras prevacunales anormalmente altas fueron excluidos del estudio para evitar cualquier reacción adversa que pudiera ocasionar la administración de la vacuna.

#### **4.6.2 Inmunización con polisacáridos capsulares.**

Se inyectaron 0,5 ml de la vacuna neumocócica polisacárida (Pneumo23), por vía subcutánea a los sujetos de los grupos 2 y 3 posteriormente a la medición de los niveles de anticuerpos totales y anticapsulares prevacunales.

#### **4.6.3 Determinación de los anticuerpos antineumococo totales (IgG) mediante ELISA.**

1. Sensibilizar una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, durante toda la noche a 4°C, añadiendo 100µL/pocillo de una dilución 1/100 de la vacuna en tampón carbonato 0,05M - pH 9,6.
2. Lavar la placa en el lavador de ELISA con solución de lavado (PBS-0,05% Tween 20), en ciclo de 5 lavados.
3. Neutralizar la placa añadiendo 200 µL/pocillo del tampón de dilución (TD) (PBS-BSA 1%-0,05%Tween 20). Incubar durante 1 hora a 37°C.
4. Lavar la placa de igual forma que en el paso 2.
5. Preparar la dilución adecuada de los estándares, con una cantidad conocida de IgG antineumococo, de los controles positivo y negativo (sueros previamente titulados), y de los sueros problema (una vez adsorbido el polisacárido de la pared)

en tampón de dilución (TD). La dilución de los sueros varía en función de si el suero es prevacunal (dilución 1/100 y 1/400) o postvacunal (dilución 1/400 y 1/1600).

6. Dispensar 100 $\mu$ L/pocillo de cada dilución por duplicado, incluyendo la curva estándar, los controles, los sueros problema y dos pocillos de blanco (solo TD). Incubar toda la noche a 4°C.
7. Lavar la placa.
8. Añadir 100 $\mu$ L/pocillo de un antisuero de cabra antiIgG humana, conjugado con peroxidasa (conjugado TAGO), diluido 1/6000 en TD. Incubar 1 hora en agitación a 37°C.
9. Lavar la placa
10. Añadir 100  $\mu$ L/pocillo de la mezcla de sustrato-cromógeno e incubar a temperatura ambiente en oscuridad hasta que se observe diferencias de color entre el punto más diluido de la curva estándar y el blanco.
11. Parar la reacción con ácido sulfúrico 1N.
12. Leer en el colorímetro, a 450nm de longitud de onda de lectura y 650nm de longitud de referencia, la absorbancia de los sueros y los estándares. Extrapolar la concentración de IgG antineumococo presente en las muestras utilizando una curva semilogarítmica.

#### 4.6.4 Adsorción de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared bacteriana.

Como ya se ha comentado, en la vacuna polisacárida frente a *S. pneumoniae* se incluyen los epítomos específicos de los 23 tipos capsulares que provocan la mayoría de infecciones neumocócicas, pero también existe contaminación por polisacáridos de la pared bacteriana. Por tanto, en respuesta a la vacuna se generarán anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares pero también frente al polisacárido común (anticuerpos irrelevantes para la respuesta frente al neumococo).

Previamente a la medición de la cifra de anticuerpos es necesario retirar los respondedores frente al polisacárido común y, de esta forma, medir únicamente los anticuerpos específicos frente a cada uno de los 23 tipos capsulares. Esta adsorción se llevó a cabo para la determinación de las cifras de anticuerpos anticapsulares, así como para la determinación de la avidéz de los mismos.

Los pasos a seguir para la adsorción son los siguientes:

1. Sensibilizar dos placas de 96 pocillos; una con tampón de dilución únicamente (Placa neutralizada) y la otra con el polisacárido común de la pared, esta última placa nos servirá

para comprobar si se han adsorbido todos los anticuerpos frente al polisacárido común.

2. Añadir 100 $\mu$ L de suero problema a cada pocillo de la placa neutralizada, junto con 100 $\mu$ L del polisacárido común (CWPS) a una concentración de 100 $\mu$ g/mL, a las diluciones adecuadas en cada caso. Incubar durante 2 horas a 37°C y posteriormente durante toda la noche a 4°C.
3. Pasar 50 $\mu$ L de esta mezcla adsorbida más 50 $\mu$ L de TD a cada pocillo de otra placa pegada con la vacuna neumocócica y a la placa pegada con el CWPS. De esta forma se comprueba la eficacia de la adsorción ya que si se han adsorbido todos los anticuerpos frente al CWPS no se podrán pegar a esta última y no habrá lectura colorimétrica. Por el contrario, si al final de la técnica aparece lectura en esta placa significa que no se han eliminado todos los anticuerpos anti-CWPS del suero problema y se han unido al polisacárido de la placa. La solución ha dicho problema es fácil, simplemente habría que aumentar la concentración de CWPS usado para adsorber el suero.
4. Continuar a partir del paso 5 de la técnica de ELISA descrita previamente en el punto 5.6.3

De esta forma se consigue que los anticuerpos irrelevantes se peguen al CWPS y no interfieran en la medición al no poder unirse a los antígenos pegados en la placa incubada con la vacuna.

#### **4.6.5 Determinación de la avidéz de los anticuerpos (IgG) mediante la prueba del tiocianato amónico.**

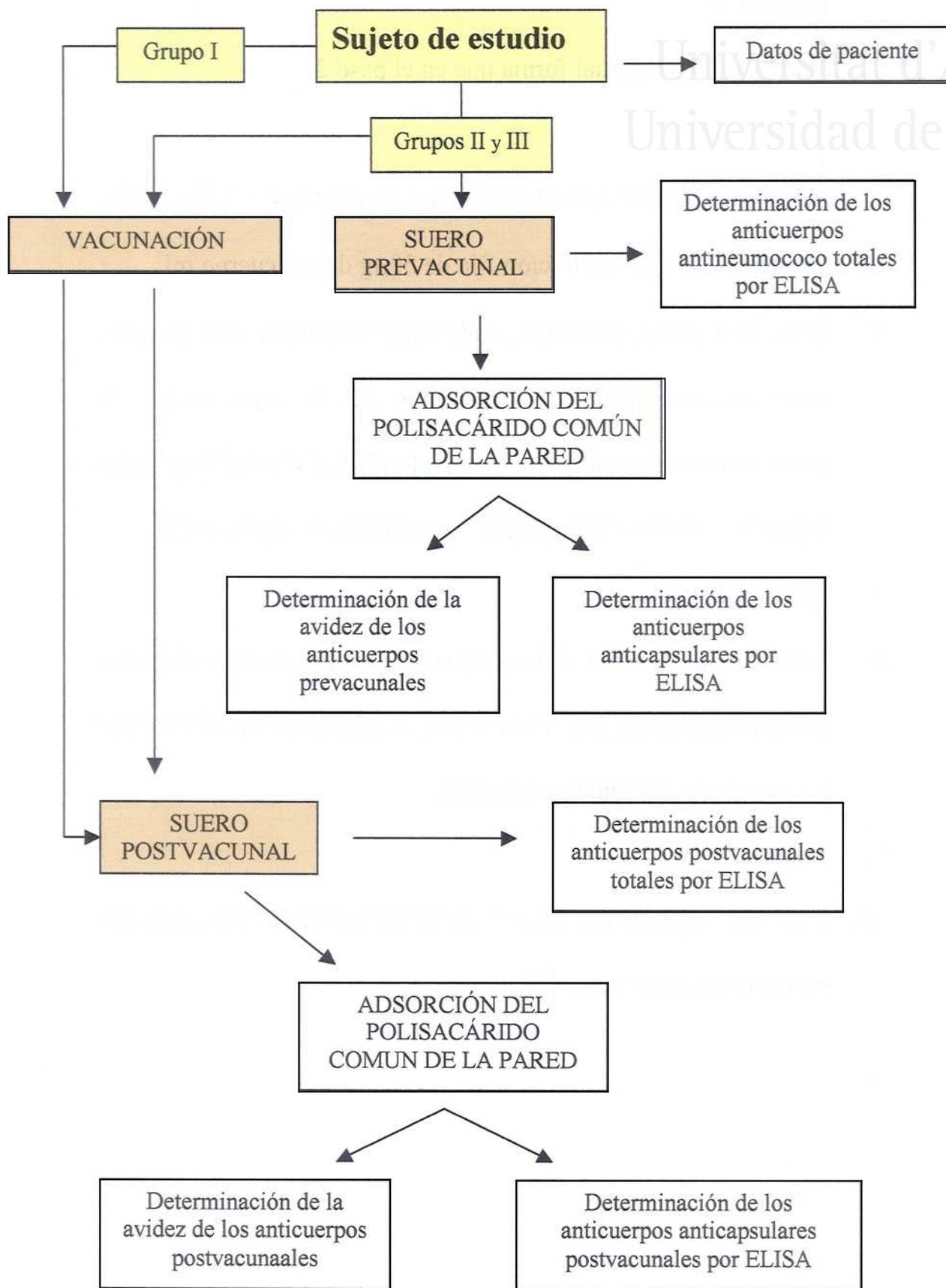
El tiocianato amónico es un agente químico que rompe los enlaces no covalentes que se forman en la interacción antígeno-anticuerpo. De esta forma, podemos definir la afinidad de los anticuerpos de un suero problema según la concentración de tiocianato necesaria para que se rompan la mitad de los enlaces formados. Así, los anticuerpos de un determinado suero problema tendrán mayor avidéz cuanto mayor sea la concentración de tiocianato amónico necesaria para producir dicha disociación.

La prueba del tiocianato se realiza tan solo con una pequeña modificación del ELISA ya descrito para determinar los niveles de anticuerpos antineumococo:

1. Sensibilizar una placa de 96 pocillos de fondo plano, durante toda la noche a 4°C, añadiendo 100µL/pocillo de una dilución 1/100 de la vacuna en tampón carbonato 0,05M - pH 9,6.
2. Lavar la placa en el lavador de ELISA, en ciclos de 5 veces.

3. Neutralizar la placa añadiendo 200 $\mu$ L/pocillo de TD. Incubar 1 hora a 37°C.
4. Lavar la placa de igual forma que en el paso 2.
5. Diluir los sueros (ya titulados previamente por ELISA) para conseguir una concentración fija de 50 $\mu$ g de anticuerpo/mL
6. Dispensar 100 $\mu$ L/pocillo de cada suero problema en 8 pocillos (una tira completa), en 4 grupos de 2, para probar 3 concentraciones distintas de tiocianato (2M, 1M y 0,5M) y dejar 2 pocillos control sin tiocianato. Incubar toda la noche a 4°C.
7. Lavar la placa.
8. Añadir 100 $\mu$ L/pocillo de una disolución de tiocianato amónico a concentraciones de 2M, 1M y 0,5M. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y agitación.
9. Lavar la placa.
10. Continuar a partir del paso 8 de la técnica de ELISA descrita previamente en el punto 5.6.3

4.7 ESQUEMA DE TRABAJO



#### 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ETAPAS Y TESTS UTILIZADOS

1. **Prueba de ajuste a una distribución normal:** Utilizaremos el contraste de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si las variables se ajustan a una distribución paramétrica o si por el contrario tendremos que utilizar tests no paramétricos. En las distribuciones no paramétricas los descriptivos de elección son la Mediana como medida de centralización, los Percentiles como medida de posición y los Rangos Intercuartílicos como medida de dispersión.

2. **Descripción de los grupos:** Se presentarán las tablas con los descriptivos generales dentro de cada grupo de estudio.

3. **Incremento de anticuerpos y avidéz en los grupos II y III:** Se estudiará el incremento de anticuerpos tras la vacunación, tanto totales como capsulares, así como los niveles de avidéz y el porcentaje de adsorción de anticuerpos frente al polisacárido común, tanto antes como después de la vacunación. El test estadístico a utilizar será la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (ya que son variables dependientes que no se ajustan a una distribución normal).

4. **Comparación entre los grupos II y III:** Se compararán los niveles de anticuerpos prevacunales (para ver la homogeneidad) y postvacunales (para observar la diferenciación en la respuesta), tanto totales como capsulares en ambos casos. Del mismo modo se compararán los niveles de avidéz y los porcentajes de adsorción. En este caso el test utilizado será el de Mann-Whitney ya que se trata de dos variables independientes.

5. **Evaluación de la respuesta en los grupos II y III. Eficacia:** Se usarán las tablas de incremento de anticuerpos al “doble o más” y al “triple o más” para evaluar y comparar la eficacia de la vacunación en ambos grupos. El test utilizado para comparar este incremento será el de la Chi-Cuadrado, ya que se trata de dos variables cualitativas.

6. **Estudio de los niveles de anticuerpos que se mantienen a los dos años:** Realizaremos la comparación de los niveles de anticuerpos postvacunales, tanto totales como capsulares, a los dos meses de la vacunación (Grupo II) y a los dos años (Grupo I). De esta forma pretendemos comprobar el grado de conservación de los anticuerpos en los pacientes VIH positivos a medio plazo (2 años). Al igual que en el punto 4, el test utilizado será el de Mann-Whitney ya que se trata de dos variables independientes y no paramétricas.

7. **Estudio de correlación con los niveles de CD4+:** Con este estudio pretendemos comprobar si existe relación entre la eficacia de la vacuna y las cifras de linfocitos CD4+ en el momento de la vacunación. Para ello se compararán las cifras de CD4+ entre los individuos que aumentaron sus cifras de anticuerpos, totales y capsulares, al “doble o más” y los que no. En este caso, al igual que en el anterior, el test estadístico utilizado será el de Mann-Whitney.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 5. RESULTADOS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 5.1 VARIABLES ESTADÍSTICAS

Para la realización del análisis estadístico de los datos, las anteriores variables fueron renombradas de la siguiente forma:

- **PRET:** cifras de anticuerpos prevacunales totales. (Grupos 2 y 3)
- **PREC:** cifras de anticuerpos prevacunales frente a los polisacáridos capsulares. (Grupos 2 y 3)
- **PRECP:** porcentaje de adsorción de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared en los sueros prevacunales. (Grupos 2 y 3).
- **PREA:** avidez de los anticuerpos prevacunales. (Grupos 2 y 3).
- **POST:** cifras de anticuerpos postvacunales totales, 2 meses después de la vacunación. (Grupos 2 y 3).
- **POSC:** cifras de anticuerpos postvacunales frente a los polisacáridos capsulares, 2 meses después de la vacunación. (Grupos 2 y 3).
- **POSCP:** porcentaje de adsorción de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared en los sueros postvacunales, 2 meses después de la vacunación (Grupos 2 y 3).
- **POSA:** avidez de los anticuerpos postvacunales, 2 meses después de la vacunación. (Grupos 2 y 3).
- **POS2T:** cifras de anticuerpos postvacunales totales, 2 años después de la vacunación. (Grupo 1).

- **POS2C:** cifras de anticuerpos postvacunales frente a los polisacáridos capsulares, 2 años después de la vacunación (Grupo 1).
- **POS2CP:** porcentaje de adsorción de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared en los sueros postvacunales, 2 años después de la vacunación. (Grupo 1).
- **POS2A:** avidéz de los anticuerpos postvacunales, 2 años después de la vacunación (Grupo 1).
- **CD4:** cifras de linfocitos T CD4+ en el momento de la vacunación. (Grupos 1 y 2).

## 5.2 PRUEBA DE AJUSTE A UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL

En los estudios realizados en Ciencias de la Salud, habitualmente se supone que las variables estudiadas siguen una distribución Normal. Sin embargo, necesitamos un procedimiento que nos permita ratificar o descartar este supuesto. El contraste de Kolmogorov-Smirnov es una prueba de contraste útil y a veces más eficiente que la de la chi-cuadrado ya que se puede aplicar con muestras más pequeñas.

**Tabla 5.1** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

	CD4 (cél/mm <sup>3</sup> )	PRET (µg/mL)	PREC (µg/mL)	PRECP (%)	PREA ([tiocianato])
N	153	66	66	66	66
Parámetros normales <sup>a,b</sup> Media	494,90	111,43	48,82	56,44	,83
Desv. Típica	238,16	99,85	51,72	18,40	,465
Dif. Más extremas Absoluta	,120	,223	,233	,072	,269
Positiva	,120	,223	,233	,057	,269
Negativa	-,049	-,165	-,183	-,072	-,177
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,487	1,815	1,896	,587	2,168
Sig.asintótica (bilateral)	<b>,024</b>	<b>,003</b>	<b>,002</b>	<b>,881</b>	<b>,000</b>

	POST (µg/mL)	POSC (µg/mL)	POSCP (%)	POSA ([tiocianato])	POS2T (µg/mL)
N	66	66	66	66	109
Parámetros normales <sup>a,b</sup> Media	386,22	237,01	38,189	,6705	412,67
Desv. Típica	292,06	210,93	21,35	,3167	559,82
Dif. Más extremas Absoluta	,168	,163	,063	,311	,260
Positiva	,168	,163	,063	,311	,260
Negativa	-,123	-,151	-,048	-,199	-,235
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,368	1,322	,510	2,525	2,716
Sig.asintótica (bilateral)	<b>,047</b>	<b>,051</b>	<b>,957</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>

	POS2C ( $\mu\text{g/mL}$ )	POS2CP (%)	POS2A ([tiocianato])
N	109	109	109
Parámetros normales <sup>a,b</sup> Media	271,01	33,66	,571
Desv. Típica	409,22	22,34	,282
Dif. Más extremas Absoluta	,259	,095	,260
Positiva	,255	,095	,260
Negativa	-,259	-,069	-,174
Z de Kolmogorov-Smirnov	2,705	,989	2,712
Sig.asintótica (bilateral)	<b>,000</b>	<b>,282</b>	<b>,000</b>

- a. La distribución de contraste es la normal  
 b. Se han calculado a partir de los datos.

Como se observa en la tabla, en casi todas las variables (a excepción de PRECP, POSCP y POS2CP, es decir, los porcentajes de adsorción, los cuales están relativizados) el nivel de significación es menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ) lo cual significa que los datos no se ajustan a una distribución normal o paramétrica y por tanto tendremos que realizar **pruebas no paramétricas** para el análisis de los datos.

### 5.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

**Tabla 5.2** Distribución de los grupos por sexo.

	Hombres	Mujeres	Total
Grupo I	74 67,9%	35 32,1%	109 100%
Grupo II	36 81,8%	8 18,2%	44 100%
Grupo III	12 54,5%	10 45,5%	22 100%

#### Prueba de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado de Pearson	5,622	2	<b>,060</b>

La prueba de chi-cuadrado nos da un valor mayor de 0,05 lo que nos indica que la diferencia en la distribución por sexo entre los grupos de estudio **no es significativa**.

**Tabla 5.3** Distribución de los grupos por edad.

	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Amplitud Intercuartil
Grupo I	32	28	37	9
Grupo II	34,5	29,25	39	9,75
Grupo III	29	25	50	25

**Prueba de Kruskal-Wallis**

Grupo	N	Rango Promedio
1 Antiguos	109	85,22
2 Recientes	44	98,84
3 Sanos	22	80,11
Total	175	

**Prueba de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado de Pearson	2,883	2	,237

El valor de la significación es mayor de 0,05 lo que significa que la diferencia de edad entre cada uno de los grupos **no es significativa**.

**Tabla 5.4** Tipo de terapia recibida por los pacientes.

	Terapia HAART SI	Terapia HAART NO
Grupo I	91 83%	18 17%
Grupo II	35 79%	9 21%
Total	126	27

**Prueba de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado de Pearson	-	2	<b>0,56</b>

El test estadístico nos indica que las diferencias en la terapia recibida por los pacientes de los grupos 1 y 2 **no son significativas**.

**Tabla 5.5.** Estadio de enfermedad de los pacientes.

	A1	A2	Total A1+A2
Grupo I	39 35,77%	38 34,86%	77 70,63%
Grupo II	14 31,8	16 36,3	30 68,1%

**Prueba de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado de Pearson	-	2	<b>0,64</b>

El test estadístico realizado confirma que las diferencias en los estadios de enfermedad de los pacientes de ambos grupos **no son significativas**.

Por todo lo anterior, podemos considerar que las características poblacionales de cada uno de los grupos (edad, sexo, tipo de terapia recibida y estadio de enfermedad) son iguales entre sí, y por tanto, los datos obtenidos en estos grupos, aunque formados por individuos distintos en su mayoría, son comparables estadísticamente.

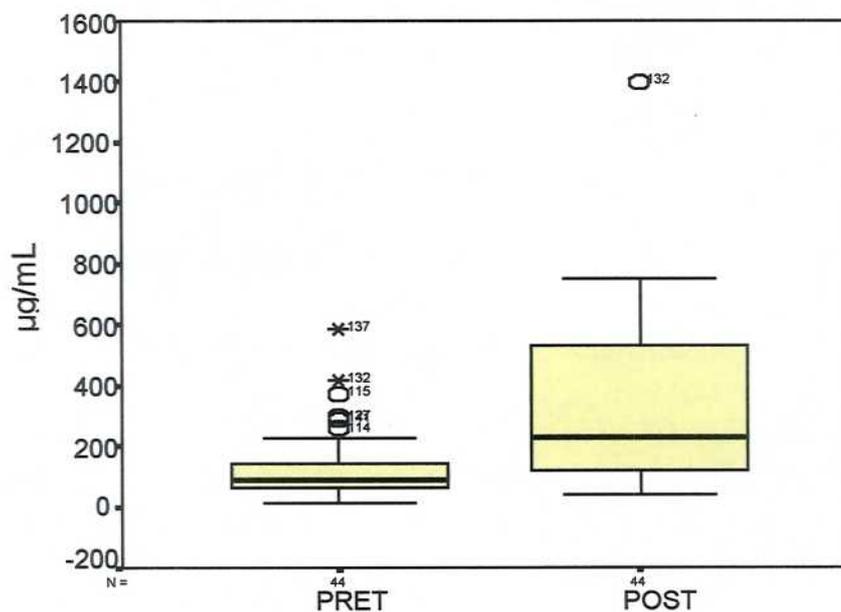
## 5.4 ESTUDIO DE ANTICUERPOS Y AVIDEZ EN LOS INDIVIDUOS DEL GRUPO 2

### 5.4.1 Estudio del incremento de anticuerpos totales a los dos meses

**Tabla 5.6** Análisis comparativo del incremento de anticuerpos totales dos meses después de la vacunación en los pacientes del Grupo 2.

		PRET ( $\mu\text{g/mL}$ )	POST ( $\mu\text{g/mL}$ )
N	Válidos	44	44
	Perdidos	0	0
Mediana		87,500	230,00
Percentiles	25	61,50	118,500
	75	142,625	530,00
Amplitud Intercuartil		81,125	411,50

**Figura 5.1.** Diagrama de cajas del incremento de anticuerpos totales dos meses después de la vacunación en los individuos del Grupo 2.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

	N	Rango promedio	Suma de rangos
POST-PRET Rangos negativos	2 <sup>a</sup>	19,00	38,00
Rangos positivos	41 <sup>b</sup>	22,15	908,0
Empates	1 <sup>c</sup>		
Tota	44		

a. POST &lt; PRET

b. POST &gt;PRET

c. PRET = POST

Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POST -PRET
Z	-5,253 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Basado en los rangos negativos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Utilizamos el test de Wilcoxon para comprobar si las diferencias entre el nivel de anticuerpos totales antes y después de la vacunación son estadísticamente significativas. Utilizamos esta prueba ya que se trata de dos variables dependientes.

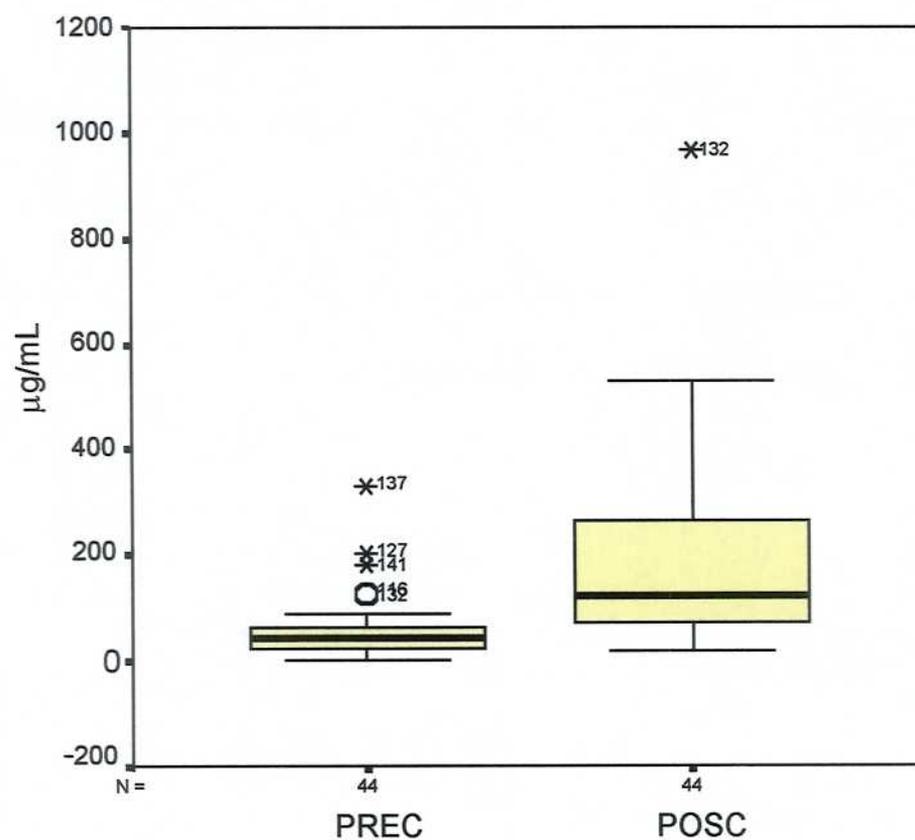
Como se puede observar, la significación es claramente inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) lo cual nos indica que **el incremento de anticuerpos totales después de la vacunación en los pacientes del Grupo 2 es estadísticamente significativo.**

## 5.4.2 Estudio del incremento de anticuerpos capsulares

**Tabla 5.7.** Análisis comparativo del incremento de anticuerpos capsulares ( $\mu\text{g/ml}$ ) en los individuos del Grupo 2 después de la vacunación.

		PREC ( $\mu\text{g/mL}$ )	POSC ( $\mu\text{g/mL}$ )
N	Válidos	44	44
	Perdidos	0	0
Mediana		41,50	121,50
Percentiles	25	24,25	71,50
	75	62,25	270,25
Amplitud Intercuartil		38,00	198,75

**Figura 5.2.** Diagrama de cajas del incremento de anticuerpos capsulares 2 meses después de la vacunación en los individuos del Grupo 2.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

### Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
POSC -PREC	Rangos negativos	4 <sup>a</sup>	14,50	58,00
	Rangos positivos	40 <sup>b</sup>	23,30	932,0
	Empates	0 <sup>c</sup>		
	Tota	44		

a. POSC &lt; PREC

b. POSC &gt; PREC

c. PREC = POSC

### Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POSC-PREC
Z	-5,100 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Basado en los rangos negativos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

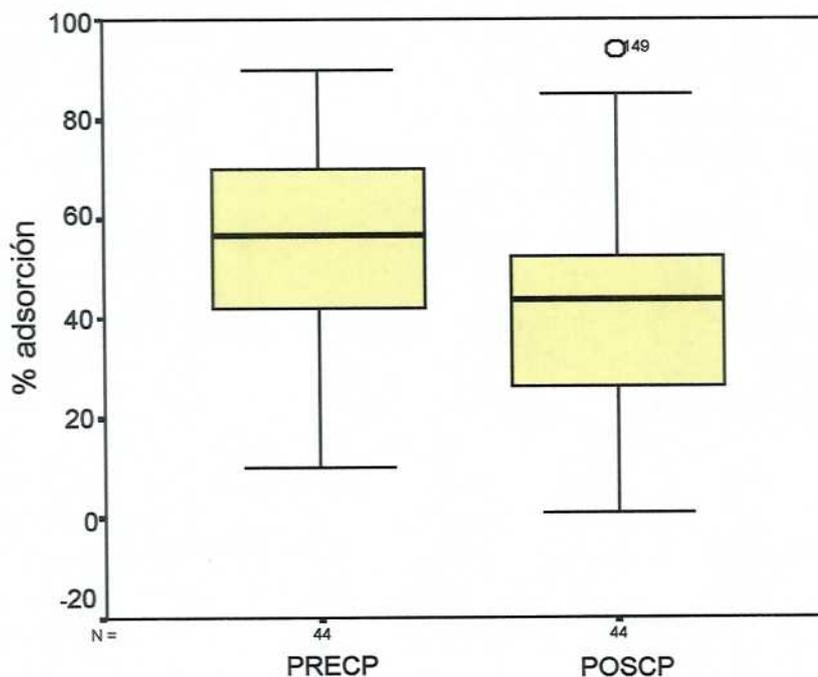
El test de Wilcoxon nos da un nivel de significación “p” claramente inferior a 0,05 ( $p=0,000$ ), lo que nos indica que **el incremento de anticuerpos capsulares producido por la vacunación 23-valente es estadísticamente significativo en el Grupo 2.**

### 5.4.3 Comparación de los porcentajes de adsorción pre y postvacunales (2 meses) del Grupo 2

**Tabla 5.8** Análisis comparativo de los porcentajes de adsorción de anticuerpos antes y dos meses después de la administración de la vacuna.

		PRECP (%)	POSCP (%)
N	Válidos	44	44
	Perdidos	0	0
Mediana		56,50	43,50
Percentiles	25	41,50	26,00
	75	70,00	53,25
Amplitud Intercuartil		28,50	27,25

**Figura 5.3.** Diagrama de cajas del porcentaje de adsorción antes y dos meses después de la vacunación en los individuos del Grupo 2.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
POSCP-PRECP	Rangos negativos	32 <sup>a</sup>	25,44	814,0
	Rangos positivos	11 <sup>b</sup>	12,00	132,0
	Empates	1 <sup>c</sup>		
	Tota	44		

a. POSCP&lt;PRECP

b. POSCP&gt;PRECP

c. PRECP=POSCP

Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POSCP - PRECP
Z	-4,11 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

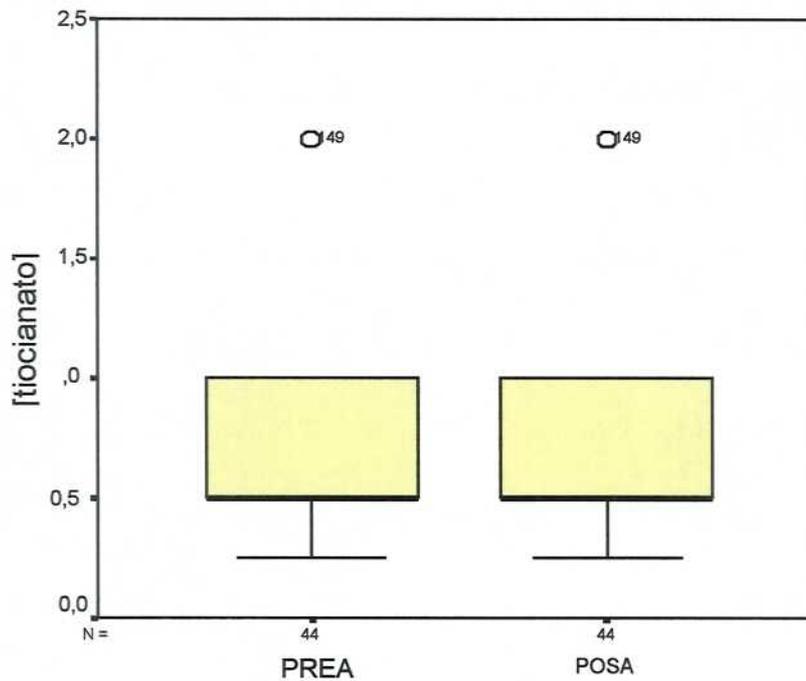
Nuevamente el test de Wilcoxon nos da un nivel de significación “p” inferior a 0,05 ( $p=0,000$ ), lo que nos indica que **el porcentaje de adsorción en los sueros prevacunales es significativamente mayor que en los postvacunales**. Este dato nos indica que la vacunación genera principalmente la producción de anticuerpos frente a los polisacáridos capsulares, ya que el porcentaje de estos anticuerpos con respecto al total es mayor en los sueros postvacunales.

#### 5.4.4. Comparación de la avidéz de los anticuerpos capsulares antes y después (2 meses) de la vacunación en el Grupo 2

**Tabla 5.9** Avidéz ([tiocianato]) de los anticuerpos capsulares en los sueros pre y postvacunales recientes en los individuos del Grupo 2.

		PREA ([tiocianato])	POSA ([tiocianato])
N	Válidos	44	44
	Perdidos	0	0
Mediana		,500	,500
Percentiles	25	,500	,500
	75	1,00	1,00
Amplitud Intercuartil		,500	,500

**Figura 5.4.** Diagrama de cajas de la avidéz de los anticuerpos antes y dos meses después de la vacunación en los individuos del Grupo 2.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

### Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
POSA-PREA	Rangos negativos	10 <sup>a</sup>	7,00	70,00
	Rangos positivos	5 <sup>b</sup>	10,00	50,00
	Empates	29 <sup>c</sup>		
	Tota	44		

a. POSA&lt;PREA

b. POSA&gt;PREA

c. PREA =POSA

### Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POSA -PREA
Z	-,579 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,563

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

En este caso, como ya se preveía en la representación gráfica, la significación asintótica nos da un valor de  $p=0,563$  lo que nos dice que **las diferencias de avidéz en los anticuerpos capsulares en el Grupo 3, antes y después de la vacunación no son significativas.**

A pesar de que el contraste es claramente no significativo, si que se puede observar una ligera tendencia a la disminución en la avidéz de los anticuerpos tras la vacunación, en las tablas de frecuencia y de contingencia que se detallan a continuación.

**Tabla 5.10** Tabla de Frecuencia de la avidéz prevacunal en el Grupo 2.

PREA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
0,25	4	9,1	9,1
0,50	26	59,1	68,2
1,00	13	29,5	97,7
2,00	1	2,3	100,0
Total	44	100,0	-

**Tabla 5.11** Tabla de Frecuencia de la avidéz postvacunal en el Grupo 2.

POSA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
0,25	8	18,2	18,2
0,50	23	52,3	70,5
1,00	12	27,2	97,7
2,00	1	2,3	100
Total	44	100,0	

**Tabla 5.12** Tabla de Contingencia de la avidéz pre y postvacunal.

		POSA				Total
		0,25	0,50	1,00	2,00	
PREA	0,25 Recuento	2	1	1	-	4
	%	50,0%	25,0%	25,0%	-	100%
	0,50 Recuento	5	18	3	-	26
	%	19,2	69,2%	11,5%	-	100%
1,00 Recuento	1	4	8	-	13	
%	7,7%	30,8%	61,5%	-	100%	
2,00 Recuento	-	-	-	1	1	
%	-	-	-	100%	100%	
Total Recuento		8	23	12	1	44
% de POSA		18,2%	52,3%	27,3%	2,3%	100%

En resumen, de 44 sueros postvacunales, la avidéz disminuye en 10 de ellos, se mantiene en 29 y tan solo aumenta en 5.

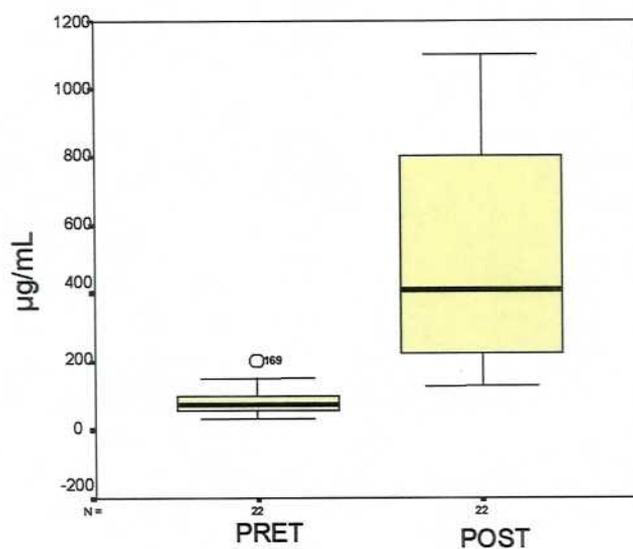
## 5.5 ESTUDIO DE ANTICUERPOS Y AVIDEZ EN EL GRUPO

CONTROL (GRUPO 3)5.5.1 *Estudio del incremento de anticuerpos totales, 2 meses después de la vacunación, en el Grupo 3*

**Tabla 5.13** Análisis comparativo del nivel de anticuerpos totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) antes y dos meses después de la vacunación en el grupo control.

		PRET ( $\mu\text{g/mL}$ )	POST ( $\mu\text{g/mL}$ )
N	Válidos	22	22
	Perdidos	0	0
Mediana		72,50	412,00
Percentiles	25	53,00	223,75
	75	99,50	800,00
Amplitud Intercuartil		46,50	576,25

**Figura 5.5** Diagrama de cajas del incremento de anticuerpos totales 2 meses después de la vacunación en los individuos del Grupo 3.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
POST-PRET	Rangos negativos	0 <sup>a</sup>	,00	,00
	Rangos positivos	22 <sup>b</sup>	11,50	253,0
	Empates	0 <sup>c</sup>		
	Tota	22		

a. POST&lt;PRET

b. POST&gt;PRET

c. PRET=POST

Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POST-PRET
Z	-4,107 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Basado en los rangos negativos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

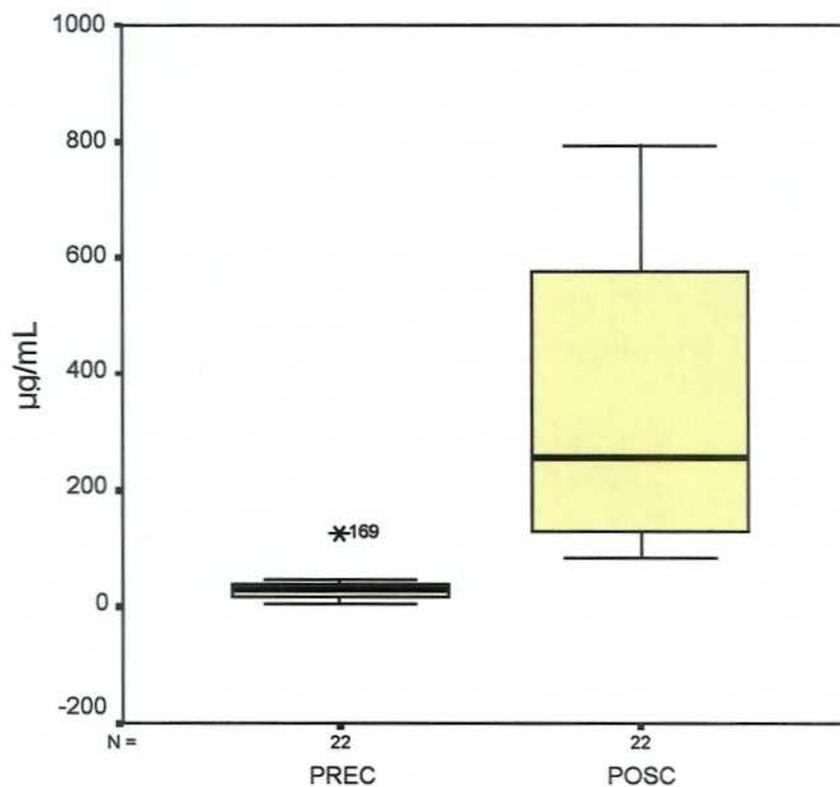
El contraste entre los anticuerpos totales medidos antes de la vacunación y dos meses después es claramente significativo ( $p=0,000$ ), lo que nos indica que **el incremento de anticuerpos totales producido por la vacunación en el Grupo 3 es estadísticamente significativo.**

## 5.5.2 Estudio de los anticuerpos capsulares en el Grupo 3.

**Tabla 5.14** Comparación de los niveles de anticuerpos capsulares ( $\mu\text{g/mL}$ ) antes y después (2 meses) de la administración de la vacuna.

		PREC ( $\mu\text{g/mL}$ )	POSC ( $\mu\text{g/mL}$ )
N	Válidos	22	22
	Perdidos	0	0
Mediana		28,875	256,75
Percentiles	25	18,75	120,25
	75	40,87	582,00
Amplitud Intercuartil		22,125	461,75

**Figura 5.6.** Diagrama de cajas del incremento de anticuerpos capsulares dos meses después de la vacunación.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

### Rangos

	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSC -PREC			
Rangos negativos	0 <sup>a</sup>	,00	,00
Rangos positivos	22 <sup>b</sup>	11,50	253,0
Empates	0 <sup>c</sup>		
Tota	22		

a. POSC<PREC

b. POSC>PREC

c. PREC=POSC

### Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POSC-PREC
Z	-4,107 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Basado en los rangos negativos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

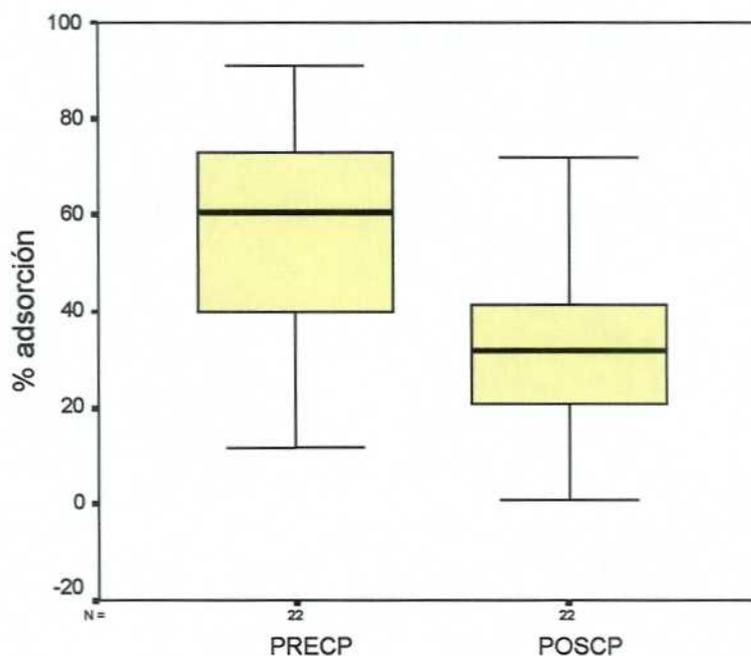
El estadístico de contraste nos da un valor claramente inferior a 0,05 lo que nos indica que **el incremento de anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares, dos meses después de la vacunación, es significativo.**

### 5.5.3 Comparación de los porcentajes de adsorción pre y postvacunales (2 meses) del Grupo 3

**Tabla 5.15.** Comparación de los porcentajes de adsorción de los anticuerpos frente a la pared, antes de la vacunación y dos meses después.

		PRECP (%)	POSCP (%)
N	Válidos	22	22
	Perdidos	0	0
Mediana		60,500	32,00
Percentiles	25	39,125	18,625
	75	73,25	41,625
Amplitud Intercuartil		34,125	23,00

**Figura 5.7.** Diagrama de cajas del porcentaje de adsorción de anticuerpos, antes y dos meses después de la vacunación en el Grupo 3.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSCP-PRECP Rangos negativos	19 <sup>a</sup>	12,79	243,0
Rangos positivos	3 <sup>b</sup>	3,33	10,00
Empates	0 <sup>c</sup>		
Tota	22		

a. POSCP&lt;PRECP

b. POSCP&gt;PRECP

c. PRECP=POSCP

Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POSCP-PRECP
Z	-3,78 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

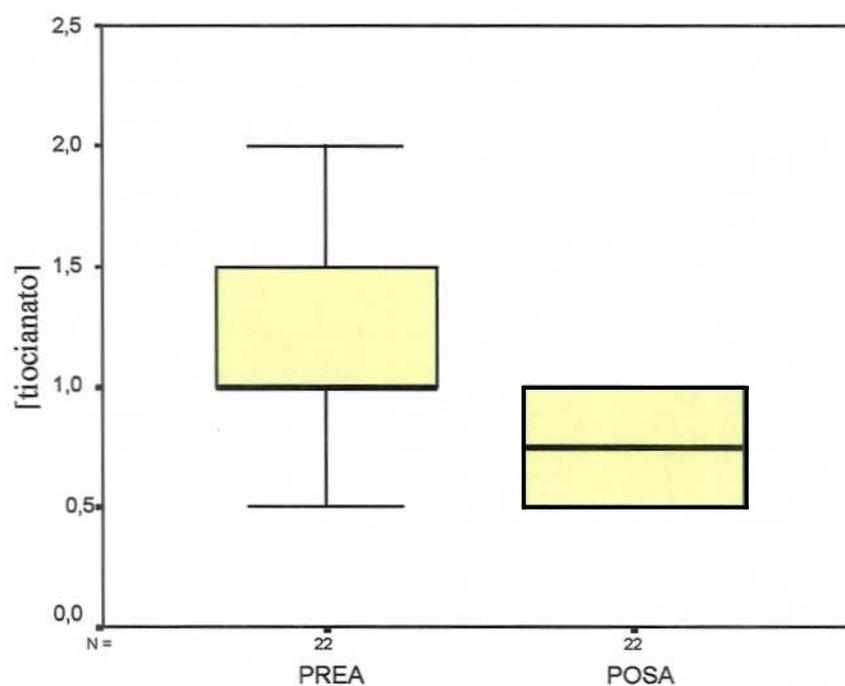
De nuevo la significación asintótica es inferior a 0,005 ( $p=0,000$ ), lo que nos indica que **la proporción de anticuerpos frente al polisacárido común de la pared es significativamente mayor en los sueros prevacunales**, o lo que es lo mismo, que la vacuna polisacárida 23-valente induce, principalmente, la formación de anticuerpos frente a los polisacáridos capsulares en el Grupo control.

#### 5.5.4. Comparación de la avidéz de los anticuerpos capsulares antes y después (2 meses) de la vacunación en el Grupo 3

**Tabla 5.16.** Comparación de la avidéz de los anticuerpos capsulares ([tiocianato]), antes de la vacunación y dos meses después.

		PREA ([tiocianato])	POSA ([tiocianato])
N	Válidos	22	22
	Perdidos	0	0
Mediana		1,00	,75
Percentiles	25	1,00	,50
	75	1,625	1,00
Amplitud Intercuartil		,625	,50

**Figura 5.8** Diagrama de cajas de la avidéz de los anticuerpos, antes de la vacunación y dos meses después, en el Grupo 3.



## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Rangos

		N	Rango promedio	Suma de rangos
POSA-PREA	Rangos negativos	14 <sup>a</sup>	7,50	105,0
	Rangos positivos	0 <sup>b</sup>	,00	,00
	Empates	8 <sup>c</sup>		
	Tota	22		

a. POSA&lt;PREA

b. POSA&gt;PREA

c. PREA=POSA

Estadísticos de contraste<sup>b</sup>

	POSA-PREA
Z	-3,360 <sup>a</sup>
Sig. asintót. (bilateral)	,001

a. Basado en los rangos positivos.

b. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

La prueba de Wilcoxon para estas variables del Grupo control nos da un valor de  $p=0,001$ , **lo que nos indica que la avidéz de los anticuerpos en el Grupo control antes de la vacunación es significativamente mayor que dos meses después de la misma**, como se podía prever observando la Figura 5.8. Este dato contrasta con el obtenido para el Grupo 2, en el cual no se observaban diferencias significativas en la avidéz de los anticuerpos antes y a los dos meses de la vacunación.

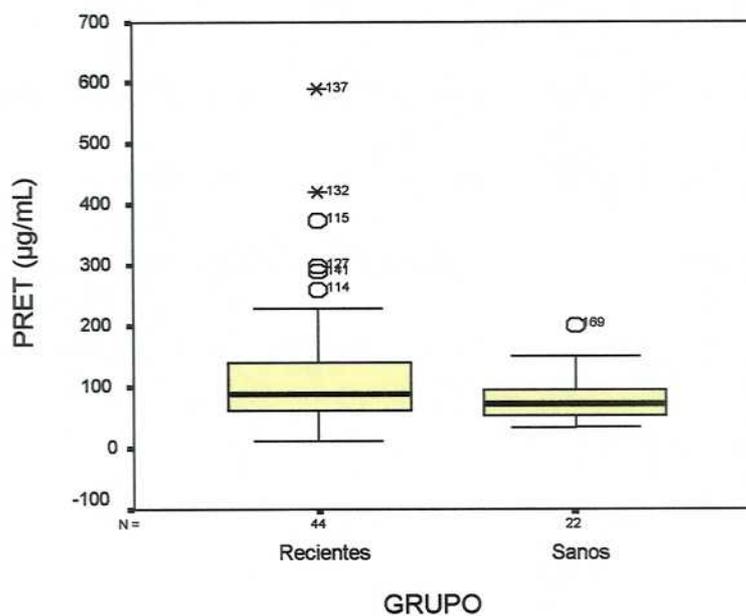
## 5.6 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS A CORTO PLAZO EN LOS GRUPOS 2 Y 3

### 5.6.1 *Comparación de los niveles de anticuerpos prevacunales totales en ambos grupos.*

**Tabla 5.17** Valores de PRET ( $\mu\text{g/mL}$ ) en los dos Grupos

PRET ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		87,50	72,50
Percentiles	25	61,50	53,00
	75	142,625	99,50
Amplitud Intercuartil		81,125	46,50

**Figura 5.9.** Diagrama de cajas de los valores de PRET en ambos Grupos.



### Prueba de Mann-Whitney

En este caso usamos la prueba de Mann-Whitney para realizar el contraste ya que se trata de dos variables independientes.

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
PRET	2 Recientes	44	36,32	1598,0
	3 Sanos	22	27,86	613,0
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	PRET
U de Mann-Whitney	360,00
W de Wilcoxon	613,00
Z	-1,68
Sig. asintót. (bilateral)	,092

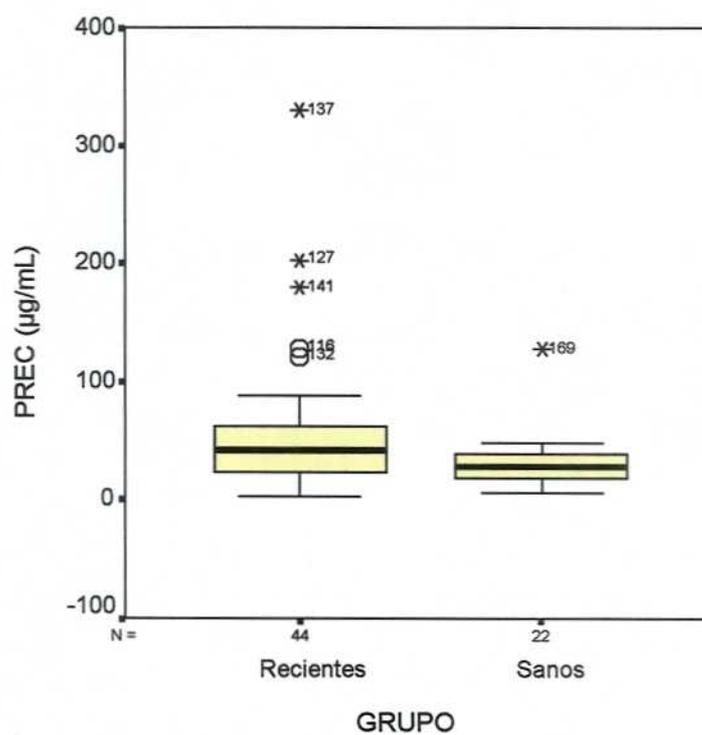
El test de Mann-Whitney nos da un valor de  $p=0,092$ , mayor de 0,05, lo que nos indica que **no existen diferencias estadísticamente significativas en el nivel de anticuerpos prevacunales totales entre el Grupo 2 (VIH recientes) y el Grupo 3 (Sanos)**. A pesar de ello, en la figura 5.9 se puede observar que las cifras de anticuerpos antineumococo totales en los pacientes VIH positivos están más elevadas que en los sujetos sanos control, aunque no llegue a ser estadísticamente significativo.

### 5.6.2 Comparación de los niveles de anticuerpos prevacunales capsulares en ambos grupos.

**Tabla 5.18** Comparación de los valores de PREC ( $\mu\text{g/mL}$ ).

PREC ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		41,50	28,875
Percentiles	25	24,25	18,75
	75	62,25	40,875
Amplitud Intercuartil		38,00	22,125

**Figura 5.10.** Diagrama de cajas de los valores de PREC.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
PREC	2 Recientes	44	36,83	1620,5
	3 Sanos	22	26,84	590,5
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	PREC
U de Mann-Whitney	337,50
W de Wilcoxon	590,50
Z	-1,99
Sig. asintót. (bilateral)	,046

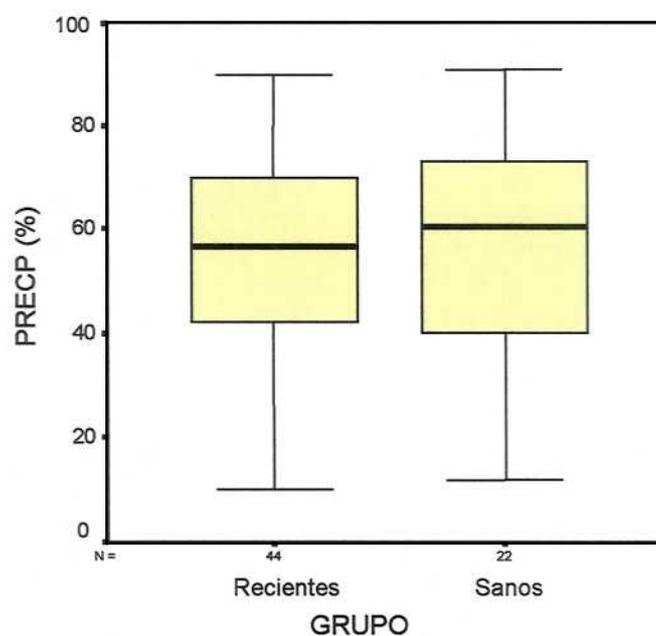
En este caso, la significación asintótica es menor de 0,05 ( $p=0,046$ ), lo que nos indica que **los individuos del Grupo 2 tienen unas cifras de anticuerpos prevacunales frente a los polisacáridos capsulares significativamente mayores que los sujetos sanos control**. Este dato confirma la tendencia que se observaba en las cifras de anticuerpos prevacunales totales, aunque en aquel caso no eran estadísticamente significativas.

### 5.6.3 Comparación de los porcentajes de adsorción prevacunales.

**Tabla 5.19** Porcentajes de adsorción de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared en los Grupos 2 y 3.

PRECP (%)		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		56,50	60,50
Percentiles	25	41,50	39,125
	75	70,00	73,250
Amplitud Intercuartil		28,50	34,125

**Figura 5.11.** Diagrama de cajas de los valores de PRECP en los Grupos 2 y 3.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
PRECP	2 Recientes	44	32,75	1441,0
	3 Sanos	22	35,00	770,0
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	PRECP
U de Mann-Whitney	451,00
W de Wilcoxon	1441,00
Z	-,449
Sig. asintót. (bilateral)	,653

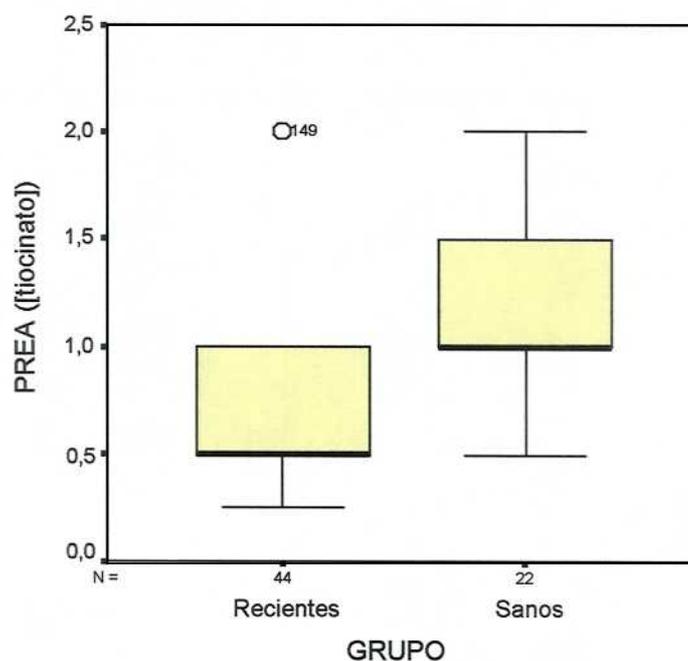
No existen diferencias significativas entre los porcentajes de adsorción en ambos grupos. Es decir, tanto los individuos VIH positivos del Grupo 2, como los sanos control del Grupo 3, tienen el mismo porcentaje de anticuerpos capsulares con respecto al total de anticuerpos antineumococo prevacunales.

### 5.6.4 Comparación de la avidéz prevacunál en ambos grupos.

**Tabla 5.20** Avidéz de los anticuerpos capsulares prevacunales ([tiocianato]) en ambos grupos.

PREA ([tiocianato])		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		,50	1,00
Percentiles	25	,50	1,00
	75	1,00	1,625
Amplitud Intercuartil		,50	,625

**Figura 5.12.** Diagrama de cajas del nivel de avidéz de los anticuerpos capsulares prevacunales en los Grupos 2 y 3.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
PREA	2 Recientes	44	27,08	1191,5
	3 Sanos	22	46,34	1019,5
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	PREA
U de Mann-Whitney	201,50
W de Wilcoxon	1191,50
Z	-4,16
Sig. asintót. (bilateral)	,000

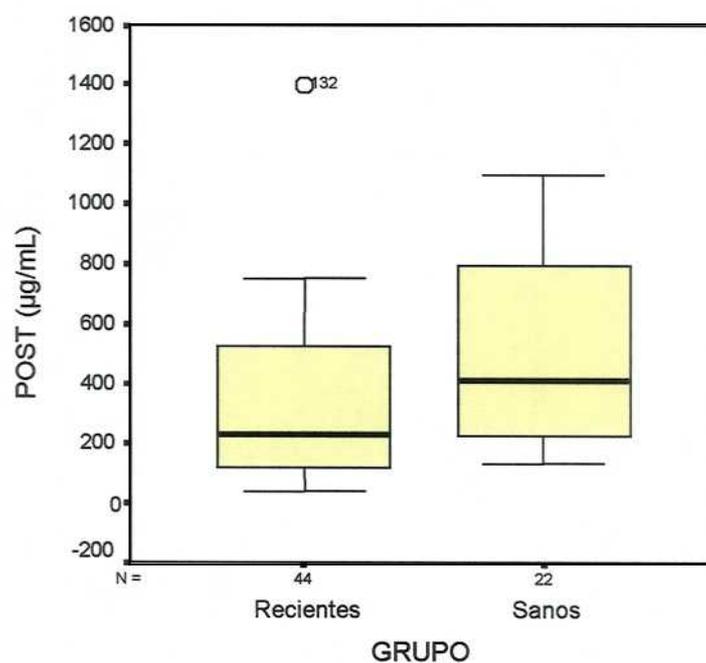
La significación es claramente inferior a 0,05 ( $p=0,000$ ), lo cual nos indica que **la avidéz prevacunal en los sujetos sanos control del Grupo 3 es significativamente mayor que en los pacientes VIH positivos del Grupo 2.**

**5.6.5 Comparación de los niveles de anticuerpos postvacunales totales, a los dos meses de la vacunación, en ambos grupos.**

**Tabla 5.21** Anticuerpos postvacunales totales ( $\mu\text{g/ml}$ ) en los Grupos 2 y 3.

POST ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		230,00	412,00
Percentiles	25	118,50	223,75
	75	530,00	800,00
Amplitud Intercuartil		411,50	576,25

**Figura 5.13.** Diagrama de cajas de los valores de anticuerpos postvacunales totales en estos grupos.



### Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POST	2 Recientes	44	29,26	1287,5
	3 Sanos	22	41,98	923,5
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	POST
U de Mann-Whitney	297,50
W de Wilcoxon	1287,50
Z	-2,53
Sig. asintót. (bilateral)	,011

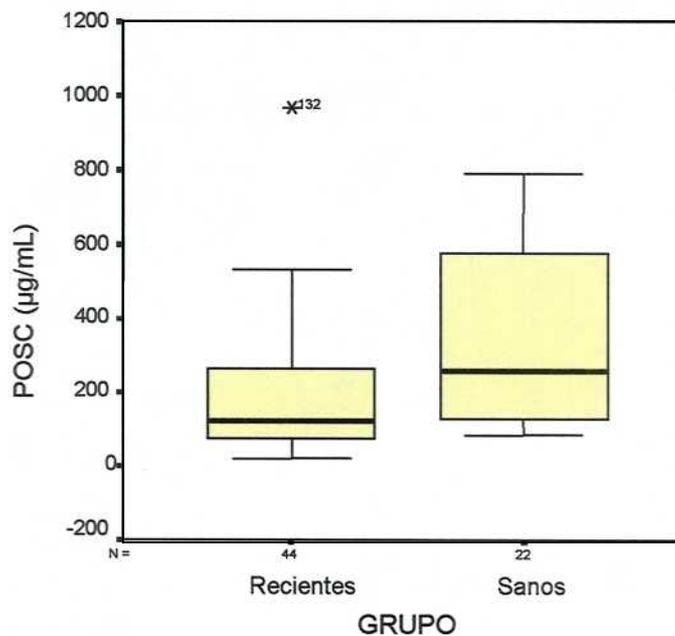
Como se puede observar en los estadísticos de contraste, **el número de anticuerpos totales, 2 meses después de la vacunación, es significativamente mayor ( $p=0,011$ ) en los sujetos sanos del Grupo 3.**

### 5.6.6 Comparación de los niveles postvacunales capsulares, a los dos meses de la vacunación, en ambos grupos.

**Tabla 5.22** Anticuerpos postvacunales capsulares ( $\mu\text{g/ml}$ ) en ambos grupos.

POSC ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		121,50	256,75
Percentiles	25	71,50	120,25
	75	270,25	582,00
Amplitud Intercuartil		198,75	461,75

**Figura 5.14.** Diagrama de cajas de los valores de anticuerpos postvacunales capsulares en estos grupos.



### Prueba de Mann-Whitney

		Rangos		
	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSC	2 Recientes	44	28,48	1253,0
	3 Sanos	22	43,55	958,0
	Total	66		

### Estadísticos de contraste

	POSC
U de Mann-Whitney	263,00
W de Wilcoxon	1253,00
Z	-3,00
Sig. asintót. (bilateral)	,003

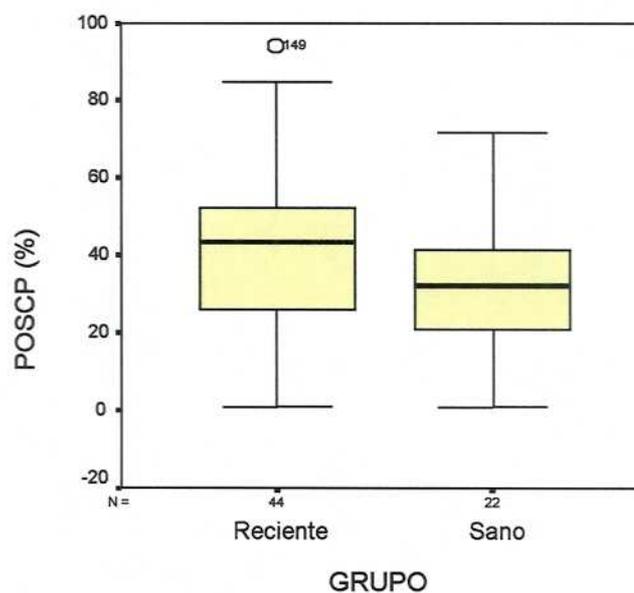
Al igual que en el caso de los anticuerpos totales, el valor del estadístico ( $p=0,003$ ) nos indica que **las cifras de anticuerpos frente a la cápsula son significativamente mayores en los individuos sanos del Grupo 3.**

### 5.6.7 Comparación del porcentaje de adsorción, a los dos meses de la vacunación, en ambos grupos.

**Tabla 5.23** Porcentajes de adsorción de los anticuerpos frente al polisacárido de la pared, dos meses después de la vacunación.

POSCP (%)		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		43,50	32,00
Percentiles	25	26,00	18,625
	75	53,25	41,625
Amplitud Intercuartil		27,25	23,00

**Figura 5.15.** Diagrama de cajas de los porcentajes de adsorción postvacunales en los grupos 2 y 3.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSCP	2 Recientes	44	36,51	1606,5
	3 Sanos	22	27,48	604,5
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	POSC
U de Mann-Whitney	351,50
W de Wilcoxon	604,50
Z	-1,80
Sig. asintót. (bilateral)	,071

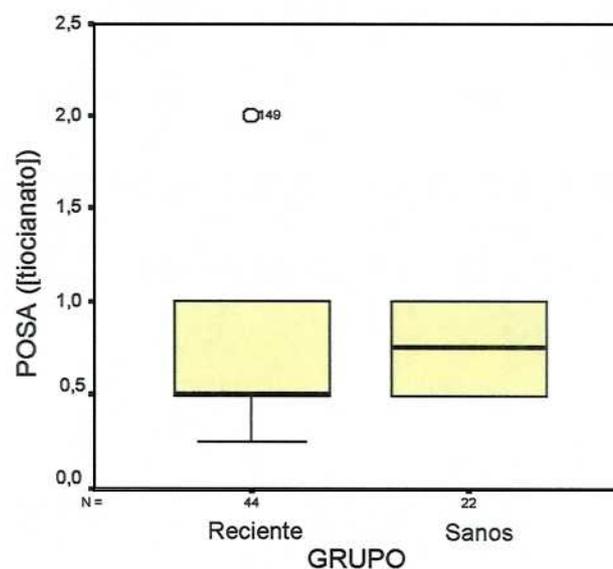
La significación asintótica nos da un valor de  $p=0,071$ , lo que nos indica que **las diferencias en los porcentajes de adsorción postvacunal no son significativas**. Según este dato, no podemos afirmar que los porcentajes de anticuerpos frente a la cápsula y frente a la pared, tras la vacunación, sean distintos. Sin embargo, a pesar de que no sea estadísticamente significativo, si se puede observar una tendencia hacia unos mayores porcentajes de adsorción en los individuos del grupo 2.

### 5.6.8 Comparación de la avidéz postvacunal , dos meses después de la vacunación, en los grupos 2 y 3.

**Tabla 5.24** Avidéz de los sueros postvacunales recientes ([tiocianato]) en ambos grupos.

POSA ([tiocianato])		Grupo 2 (Recientes)	Grupo 3 (sanos)
N	Válidos	44	22
	Perdidos	0	0
Mediana		,50	,75
Percentiles	25	,50	,50
	75	1,00	1,00
Amplitud Intercuartil		,50	,50

**Figura 5.16.** Diagrama de cajas de la avidéz postvacunal en los grupos 2 y 3.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSA	2 Recientes	44	30,39	1337,0
	3 Sanos	22	39,73	874,0
	Total	66		

Estadísticos de contraste

	POSA
U de Mann-Whitney	347,00
W de Wilcoxon	1337,00
Z	-2,02
Sig. asintót. (bilateral)	,043

El estadístico de contraste es significativo (aunque en el límite), lo cual significa que **la avidéz de los anticuerpos postvacunales es significativamente mayor en los individuos sanos del grupo 3.**

## 5.7 ESTUDIO DEL INCREMENTO DE ANTICUERPOS “DOBLE O MAS” Y “TRIPLE O MAS” PARA LOS GRUPOS 2 Y 3.

En general, se considera que la respuesta a la vacuna es eficaz cuando se aumenta dos o más veces el número de anticuerpos existentes antes de la vacunación. De esta forma, utilizaremos el estudio de incremento de anticuerpos “doble o más” y “triple o más” para evaluar la eficacia de la vacunación tanto en el Grupo 2 (VIH recién vacunados) como en el Grupo 3 (sanos).

### 5.7.1 Incremento de anticuerpos al doble o más.

**Tabla 5.25** Incremento de anticuerpos totales al doble o más.

Tabla de contingencia

			INCREMENTO DOBLE/+ AC TOTALES		Total
			1,00 Si	2,00 No	
GRUPO 2 Recientes	Recuento		30	14	44
	% de GRUPO		68,2%	31,8	100%
3 Sanos	Recuento		21	1	22
	% de GRUPO		95,5%	4,5%	100%
Tota	Recuento		51	15	66
	% de GRUPO		77,3%	22,7	100%

### Prueba de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado de Pearson	6,212	1	,013

Como se puede observar en la tabla 5.25, el 95,5% de los sujetos sanos del grupo 3 aumentan el título de anticuerpos totales dos o más veces después de la vacunación. Sin embargo, en el caso de los pacientes VIH positivos del grupo 2 este porcentaje se reduce al 68,2%. Es decir, si definimos la eficacia vacunal como el aumento al doble o más en el número de anticuerpos previos, observamos una eficacia vacunal del 95,5% en los sujetos sanos por un 68,2% en los sujetos VIH positivos. Además, el contraste realizado por la chi-cuadrado (usamos la chi-cuadrado de Pearson ya que se trata de dos variables cualitativas) nos da una significación asintótica de 0,013, lo cual nos indica que las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas.

De forma análoga realizamos este estudio en el caso de los anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares.

**Tabla 5.26** Incremento de anticuerpos capsulares al doble o más.

Tabla de contingencia

			INCREMENTO DOBLE/+ AC CAPSULARES		Total
			1,00 Si	2,00 No	
GRUPO	2 Recientes	Recuento	30	14	44
		% de GRUPO	68,2%	31,8%	100%
	3 Sanos	Recuento	22		22
		% de GRUPO	100%		100%
Total		Recuento	52	14	66
		% de GRUPO	78,8%	21,2%	100%

### Prueba de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado de Pearson	8,885	1	,003

En el caso de los anticuerpos capsulares, la eficacia vacunal del grupo control sería de un 100%, mientras que en el grupo 2 se mantendría el mismo valor de 68,2%. Por este motivo, el contraste realizado por la prueba de chi-cuadrado sale más significativo aún ( $p=0,003$ ).

#### 5.7.2 Incremento de anticuerpos al triple o más.

**Tabla 5.27** Incremento de anticuerpos totales al triple o más.

Tabla de contingencia

			INCREMENTO TRIPLE/+ AC TOTALES		Total
			1,00 Si	2,00 No	
GRUPO 2 Recientes	Recuento	18	26	44	
	% de GRUPO	40,9%	59,1	100%	
3 Sanos	Recuento	18	4	22	
	% de GRUPO	81,8%	18,2	100%	
Tota	Recuento	36	30	66	
	% de GRUPO	54,5%	45,5	100%	

### Prueba de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado Pearson	9,900	1	,002

Si consideramos la eficacia vacunal como el incremento en tres o más veces el número de anticuerpos totales previos a la vacunación,

nuestros datos nos ofrecen una eficacia vacunal del 81,8% en los sujetos sanos del grupo 3, por un 40,9% de eficacia en los sujetos VIH positivos del grupo 2. Como se puede observar, a medida que aumenta el número de veces que se han de incrementar las cifras de anticuerpos para considerar que la respuesta a la vacuna es eficaz, mayor es la diferencia existente entre ambos grupos. De esta forma, la significación resultante de la prueba de chi-cuadrado es mayor, con un valor de  $p=0,002$ .

En el caso de los anticuerpos específicos frente a la cápsula, los resultados se detallan a continuación.

**Tabla 5.28** Incremento de anticuerpos capsulares al triple o más.

Tabla de contingencia

			INCREMENTO TRIPLE/+ AC CAPSULARES		Total
			1,00 Si	2,00 No	
GRUPO	2 Recientes	Recuento	24	20	44
		% de GRUPO	54,5%	45,5%	100%
	3 Sanos	Recuento	19	3	22
		% de GRUPO	86,4%	13,6%	100%
Total		Recuento	43	23	66
		% de GRUPO	65,2%	34,8%	100%

### Prueba de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig asintót (bilateral)
Chi-Cuadrado Pearson	6,540	1	,011

En el caso de los anticuerpos específicos, las cifras aumentan en ambos grupos. En los sujetos sanos podemos observar un 86,4% de eficacia

---

vacunal por un 54,5% de eficacia en los sujetos VIH positivos. A su vez, la chi-cuadrado nos da un valor de  $p=0,011$ , lo que nos indica que la diferencia de eficacia entre ambos grupos sigue siendo significativa.

### 5.8 COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS POSTVACUNALES A CORTO Y MEDIO PLAZO.

Con el fin de evaluar la eficacia de la vacunación a medio plazo (2 años) en los pacientes con infección por VIH, contrastamos los niveles de anticuerpos (tanto totales como capsulares) a los dos meses de la vacunación, con los niveles de anticuerpos que mantiene la población de VIH positivos después de dos años.

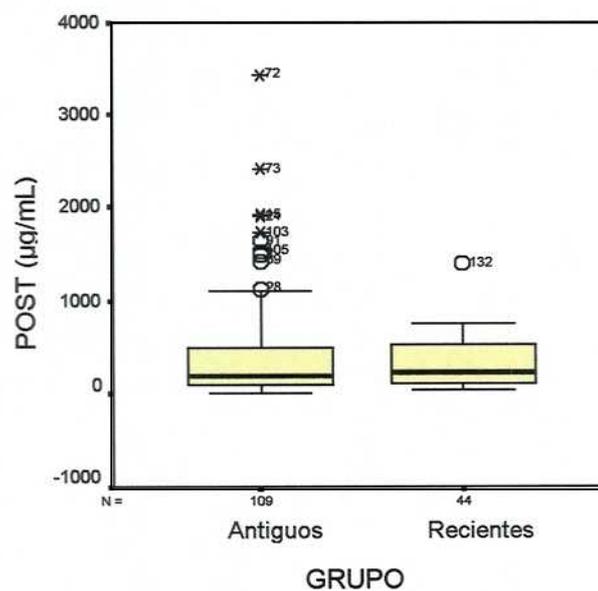
Por este motivo realizamos la comparación entre las cifras de anticuerpos postvacunales del grupo 2 (VIH positivos vacunados recientemente) con las cifras del grupo 1 (VIH positivos vacunados hace dos años).

### 5.8.1 Comparación de los anticuerpos postvacunales totales de los grupos 1 y 2.

**Tabla 5.29** Anticuerpos totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) a los dos meses y a los dos años de la vacunación.

POST ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grupo 1 (Antiguos)	Grupo 2 (Recientes)
N	Válidos	109	44
	Perdidos	0	0
Mediana		190,00	230,00
Percentiles	25	90,50	118,50
	75	520,50	530,00
Amplitud Intercuartil		430,00	411,50

**Figura 5.17.** Diagrama de cajas de los niveles de anticuerpos postvacunales totales, a corto y medio plazo.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POST	1 Antiguos	109	75,09	8184,5
	2 Recientes	44	81,74	3596,5
	Total	153		

Estadísticos de contraste

	POST
U de Mann-Whitney	2189,50
W de Wilcoxon	8184,50
Z	-,840
Sig. asintót. (bilateral)	,401

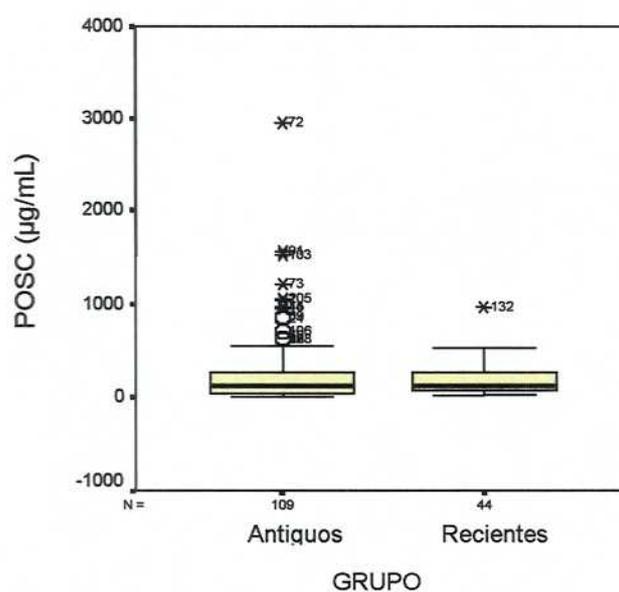
La prueba de Mann-Whitney nos da un valor de significación de 0,401 (muy por encima de 0,05) lo que significa que **las diferencias en los niveles de anticuerpos totales a corto y medio plazo no son significativas.**

### 5.8.2 Comparación de los anticuerpos postvacunales capsulares de los grupos 1 y 2.

**Tabla 5.30** Anticuerpos capsulares ( $\mu\text{g/mL}$ ) a los dos meses y a los dos años de la vacunación.

POSC ( $\mu\text{g/mL}$ )		Grupo 1 (Antiguos)	Grupo 2 (Recientes)
N	Válidos	109	44
	Perdidos	0	0
Mediana		120,00	121,50
Percentiles	25	48,75	71,50
	75	282,00	270,25
Amplitud Intercuartil		233,25	198,75

**Figura 5.18.** Diagrama de cajas de los niveles de anticuerpos capsulares postvacunales, a corto y medio plazo.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSC	1 Antiguos	109	76,63	8352,5
	2 Recientes	44	77,92	3428,5
	Total	153		

Estadísticos de contraste

	POSC
U de Mann-Whitney	2357,50
W de Wilcoxon	8352,50
Z	-,163
Sig. asintót. (bilateral)	,870

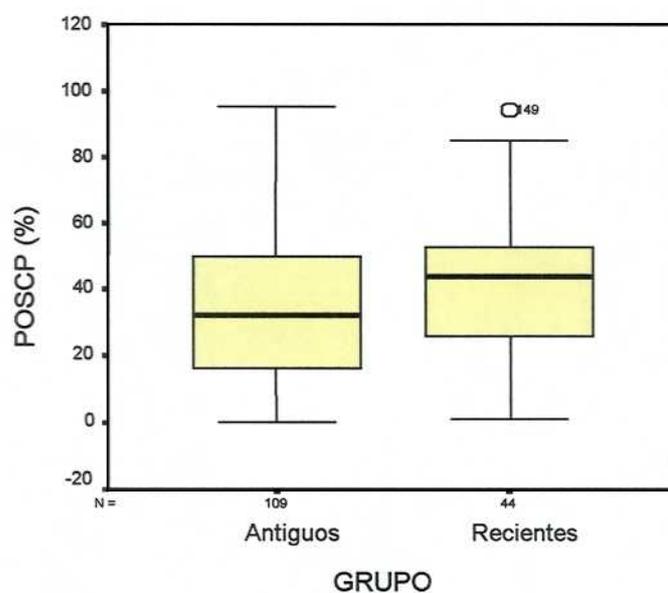
El valor de la significación asintótica indica que **las diferencias entre los niveles de anticuerpos capsulares postvacunales a corto y medio plazo no son significativas.**

### 5.8.3 Comparación de los porcentajes de adsorción en los grupos 1 y 2.

**Tabla 5.31** Adsorción (%) de los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared en los grupos 1 y 2.

POSCP (%)		Grupo 1 (Antiguos)	Grupo 2 (Recientes)
N	Válidos	109	44
	Perdidos	0	0
Mediana		32,00	43,50
Percentiles	25	16,00	26,00
	75	50,00	53,25
Amplitud Intercuartil		34,00	27,25

**Figura 5.19.** Diagrama de cajas de los porcentajes de adsorción a corto y medio plazo.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSCP	1 Antiguos	109	72,40	7892,0
	2 Recientes	44	88,39	3889,0
	Total	153		

Estadísticos de contraste

	POSC
U de Mann-Whitney	1897,00
W de Wilcoxon	7892,00
Z	-2,02
Sig. asintót. (bilateral)	,043

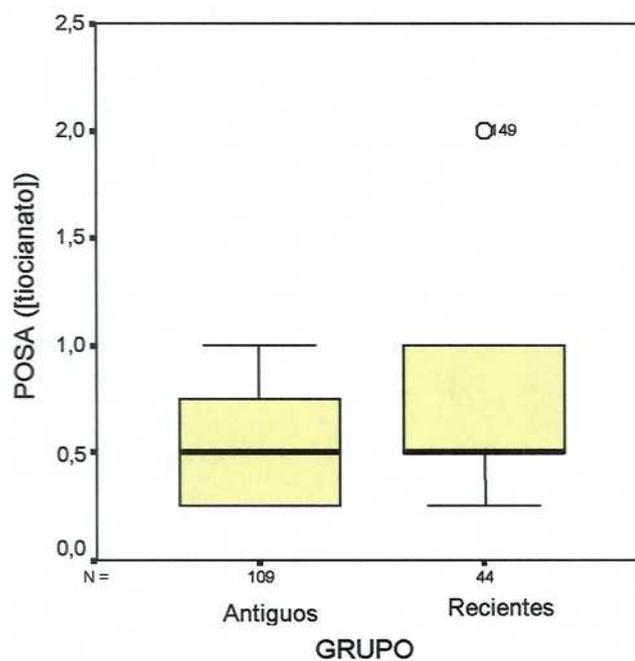
El valor de  $p=0,043$  indica que **la diferencia en los porcentajes de adsorción es estadísticamente significativa**. Según esto, se puede afirmar que a corto plazo hay una mayor proporción de anticuerpos frente al polisacárido de la pared (irrelevantes).

#### 5.8.4 Comparación de la avidéz de los anticuerpos capsulares en los grupos 1 y 2.

**Tabla 5.32** Avidéz de los anticuerpos a corto y medio plazo.

POSA ([tiocianato])		Grupo 1 (Antiguos)	Grupo 2 (Recientes)
N	Válidos	109	44
	Perdidos	0	0
Mediana		,50	,50
Percentiles	25	,25	,50
	75	,75	1,00
Amplitud Intercuartil		,50	,50

**Figura 5.20.** Diagrama de cajas de los resultados de avidéz a corto y medio plazo.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	GRUPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
POSA	1 Antiguos	109	75,05	8180,5
	2 Recientes	44	81,83	3600,5
	Total	153		

Estadísticos de contraste

	POSA
U de Mann-Whitney	2185,50
W de Wilcoxon	8180,50
Z	-,903
Sig. asintót. (bilateral)	,367

El estadístico de contraste nos da un valor de  $p=0,367$ , lo que significa que **las diferencias en la avidéz postvacunal a corto y medio plazo no son significativas.**

## 5.9 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LA RESPUESTA CON LAS CIFRAS DE LINFOCITOS CD4+

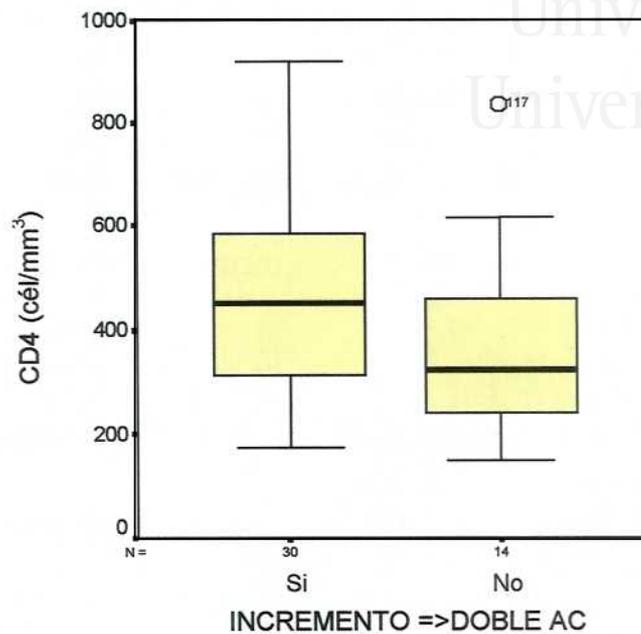
Con los siguientes resultados intentamos comprobar si la eficacia de la vacuna está condicionada de alguna manera por las cifras de linfocitos CD4 presentes en cada individuo en el momento de la vacunación.

### 5.9.1 *Relación de las cifras de linfocitos CD4 con el aumento de anticuerpos totales al “doble o más” en el grupo 2.*

**Tabla 5.33** Comparación de las cifras de CD4 (cél/mm<sup>3</sup>) entre los sueros del grupo 2 que aumentaron sus cifras de anticuerpos totales al “doble o más” y los que no lo hicieron

CD4 (cél/mm <sup>3</sup> )		Incremento SÍ	Incremento NO
N	Válidos	30	14
	Perdidos	0	0
Mediana		450,00	323,00
Percentiles	25	310,50	229,00
	75	595,25	496,00
Amplitud Intercuartil		284,75	267,00

**Figura 5.21.** Diagrama de cajas de la relación entre las cifras de CD4 y el incremento de anticuerpos totales al “doble o más”



### Prueba de Mann-Whitney

#### Rangos

	INCREMENTO AC TOTALES DOBLE/+	N	Rango promedio	Suma de rangos
CD4	1,00 Si	30	24,70	741,0
	2,00 No	14	17,79	249,0
	Total	44		

#### Estadísticos de contraste

	CD4
U de Mann-Whitney	144,00
W de Wilcoxon	249,00
Z	-1,664
Sig. asintót. (bilateral)	,096

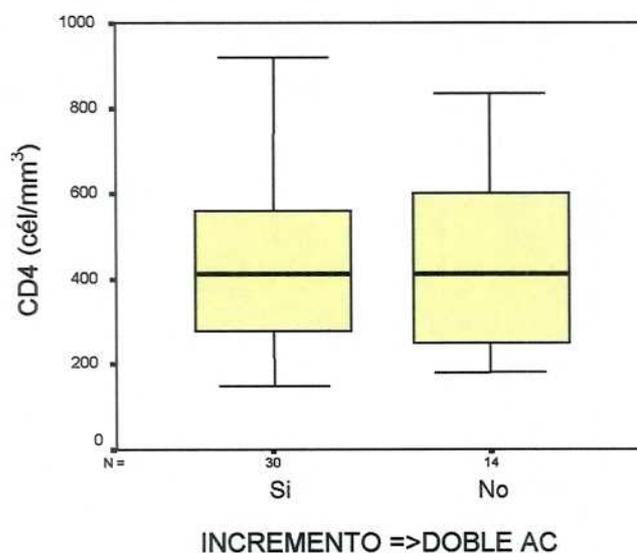
El estadístico de contraste nos da un valor de  $p=0,096$ , lo que indica que las diferencias en las cifras de CD4 en los dos subgrupos creados (los que aumentan al doble y los que no) **no son significativas**.

### 5.9.2 Relación de las cifras de linfocitos CD4 con el aumento de anticuerpos capsulares al “doble o más” en el grupo 2.

**Tabla 5.34** Cifras de CD4 (cél/mm<sup>3</sup>) en los sueros que aumentaron los anticuerpos capsulares al “doble o más” y los que no lo hicieron.

CD4 (cél/mm <sup>3</sup> )		Incremento SÍ	Incremento NO
N	Válidos	30	14
	Perdidos	0	0
Mediana		413,00	412,50
Percentiles	25	275,00	247,50
	75	566,25	607,25
Amplitud Intercuartil		291,25	359,75

**Figura 5.22.** Diagrama de las cifras de CD4 para estos subgrupos.



## Prueba de Mann-Whitney

Rangos

	INCREMENTO AC CAPS. DOBLE/+	N	Rango promedio	Suma de rangos
CD4	1,00 Si	30	22,52	675,5
	2,00 No	14	22,46	314,5
	Total	44		

Estadísticos de contraste

	CD4
U de Mann-Whitney	209,50
W de Wilcoxon	314,50
Z	-,013
Sig. asintót. (bilateral)	,990

El valor de  $p=0,990$  indica que las diferencias en las cifras de linfocitos CD4+ en los sueros que aumentan al doble los anticuerpos capsulares y los que no, no son significativas.

## 5.9.3 Correlación de las cifras de CD4 con el resto de variables.

Tabla 5.35 Coeficiente de correlación de Spearman

Correlaciones

			CD4	POST	POSC	POSCP	POSA
Rho de Spearman	CD4	Coeficiente de correlación	1,000	,184	,137	,198*	-,010
		Sig. (bilateral)	,	,056	,154	,039	,920
		N	109	109	109	109	109
	POST	Coeficiente de correlación	,184	1,000	,916**	,142	,258**
		Sig. (bilateral)	,056	,	,000	,142	,007
		N	109	109	109	109	109
	POSC	Coeficiente de correlación	,137	,916**	1,000	-,187	,227*
		Sig. (bilateral)	,154	,000	,	,052	,017
		N	109	109	109	109	109
	POSCP	Coeficiente de correlación	,198*	,142	-,187	1,000	,096
		Sig. (bilateral)	,039	,142	,052	,	,319
		N	109	109	109	109	109
	POSA	Coeficiente de correlación	-,010	,258**	,227*	,096	1,000
		Sig. (bilateral)	,920	,007	,017	,319	,
		N	109	109	109	109	109

\*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

\*\*. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

El coeficiente de correlación varía de 0 (ninguna correlación) a 1 (correlación perfecta). Como se puede ver en la tabla, el coeficiente de correlación de las cifras de CD4 no es bueno con ninguna de las demás variables.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 6. DISCUSIÓN



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

La elevada tasa de enfermedad neumocócica en los pacientes infectados por el VIH, y la probada seguridad, efectividad y bajo coste de la vacuna polisacárida 23-valente en la prevención de la enfermedad neumocócica invasiva entre los adultos inmunocompetentes<sup>74-76</sup>, han sido suficiente justificación para recomendar el uso rutinario de esta vacuna entre los pacientes VIH-positivos. Sin embargo, el énfasis con el que se realiza esta recomendación es bajo. En Estados Unidos, el Comité Consultor para las Prácticas de Inmunización otorga un nivel de evidencia C alegando que “La efectividad de la vacunación no está probada, pero el alto riesgo de enfermedad junto con los beneficios potenciales y la seguridad de la vacuna justifican la vacunación”.<sup>74</sup>

En este trabajo hemos cuantificado el efecto de esta vacuna en los individuos afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Existen muchos estudios que prueban la eficacia de esta vacuna en adultos sanos, sin embargo, datos que demuestren esta eficacia entre las personas infectadas por el VIH son escasos y conflictivos. Gebo et al<sup>77</sup> sugieren una eficacia del 78% de prevención de la enfermedad neumocócica entre pacientes infectados por VIH con unos niveles de CD4 superiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, pero no encuentran efectividad entre personas con un menor número de linfocitos CD4. En el mismo sentido, Breinman et al<sup>74</sup> en el 2000, y Dworkin et al<sup>78</sup> en el 2001 sugieren un efecto protector de la

vacuna y apoyan la continuación de su uso. En el lado opuesto, estudios recientes realizados por French et al en Uganda<sup>79</sup> y por Linderburg et al en Amsterdam<sup>80</sup> no encuentran eficacia en la prevención de enfermedades neumocócicas invasivas entre los vacunados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, y de forma general, se podría concluir que el incremento de anticuerpos después de la vacunación en los pacientes VIH-positivos es claramente detectable, aunque significativamente inferior al resultado obtenido tras la misma vacunación en el grupo sano control. Sin embargo, resulta muy importante discernir entre los anticuerpos dirigidos frente a los polisacáridos capsulares específicos presentes en la vacuna, y los anticuerpos frente al polisacárido común de la pared (CWPS) que también forman parte de la composición de la vacuna. Los primeros son los que van a participar en la respuesta frente al neumococo, facilitando la fagocitosis mediada por opsonización<sup>52</sup>, mientras que los segundos no participan en dicha respuesta ya que están dirigidos frente a una estructura invariante y presente en todos los neumococos, pero que se encuentra por debajo de la cápsula bacteriana y, por tanto, no accesible para los anticuerpos<sup>52,81</sup>.

Muchos polisacáridos capsulares, usados para la medición de anticuerpos, se encuentran contaminados por el CWPS presente en todos

los serotipos. Por esta razón, se puede producir una sobreestimación de los resultados obtenidos, a menos que se realice una adsorción o neutralización de los anticuerpos frente al CWPS.

De acuerdo con nuestros resultados, el porcentaje de adsorción (es decir, el número de anticuerpos frente al CWPS retirados con respecto a los totales) es mayor en los sueros prevacunales que en los postvacunales, tanto para los pacientes VIH-positivos como para los sanos del grupo control. Este dato nos indica que la vacuna induce principalmente la producción de anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares, y coincide con los resultados obtenidos por Vidarsson et al<sup>52</sup> en 1994, los cuales también observaban una mayor interferencia de los anticuerpos frente al CWPS en los sueros prevacunales.

En nuestro trabajo, hemos realizado las mediciones del nivel de anticuerpos y de la avidéz con y sin neutralización de los anticuerpos frente al CWPS, y en adelante nombraremos “anticuerpos capsulares” a los anticuerpos medidos tras la adsorción y “anticuerpos totales” a los anticuerpos medidos sin adsorción.

Comparando las cifras de anticuerpos prevacunales totales obtenidas en el grupo 2 (VIH recientes) y en el grupo 3 (sanos) podemos observar

que los anticuerpos previos a la vacunación están más elevados en los pacientes VIH-positivos que en los sanos (Fig. 5.9) aunque el contraste estadístico no es significativo ( $p=0,092$ ). Sin embargo, si realizamos la misma comparación retirando los anticuerpos no protectores, es decir, comparando únicamente los anticuerpos capsulares (Fig. 5.10), nos encontramos con que el contraste sí es significativo en este caso ( $p=0,046$ ), confirmando la tendencia anterior.

La explicación a estos datos puede deberse a que estos pacientes, por las características socioeconómicas que rodean a gran parte de ellos, están más en contacto con el neumococo de forma natural que los individuos incluidos en el grupo control, ya que cumplen muchos de los factores de riesgo asociados a la enfermedad neumocócica como la estancia en penitenciarias, el alcoholismo, la desnutrición, los ingresos hospitalarios y la exposición al frío entre otros. Todo esto viene a redundar en la idea de que la infección por VIH, en sí misma, es un factor de riesgo de enfermedad neumocócica como ya han señalado numerosos autores previamente<sup>64,74,78,80</sup>.

La comparación entre los niveles de anticuerpos prevacunales y postvacunales totales recientes (dos meses después de la vacunación) en los pacientes VIH-positivos (Fig. 5.1) indica claramente que el incremento de

anticuerpos totales tras la vacunación en este grupo es significativo, con un nivel de significación estadística muy elevado ( $p < 0,001$ ). Más acentuada aún es la diferencia si nos fijamos en los anticuerpos capsulares (Fig. 5.2) también con un nivel de significación  $p < 0,001$ . Por todo ello, se puede afirmar que el incremento de anticuerpos capsulares producido por la vacuna polisacárida 23-valente en los individuos afectados por el VIH, considerados como grupo, alcanza niveles significativamente superiores con respecto al estado prevacunal.

Sin embargo, si comparamos las cifras de anticuerpos postvacunales recientes entre el grupo VIH-positivo y el grupo sano control, observamos que tanto en el caso de los anticuerpos totales (Fig. 5.13) como en el de los anticuerpos capsulares (Fig. 5.14), los niveles en los sujetos sanos son significativamente mayores que en los pacientes VIH-positivos, con una significación estadística de 0,011 y 0,003 respectivamente. Lo cual nos indica que la respuesta a la vacunación, en lo que a número de anticuerpos se refiere, es mejor en los sujetos sanos que en los VIH-positivos, y evidencia hasta qué punto puede estar afectado el brazo humoral del sistema inmune de estos pacientes, al tratarse de una respuesta de tipo T-independiente.

Diversos autores han afirmado que la respuesta a la vacuna es eficaz cuando se aumentan dos o más veces el número de anticuerpos basales<sup>82-84</sup>. El estudio del incremento de anticuerpos totales al doble o más se refleja en la tabla 5.25. Según estos resultados, de 44 pacientes VIH-positivos, tan solo 30 aumentan sus cifras de anticuerpos dos o más veces tras la vacunación (68,2%). En cambio, de los 22 sujetos sanos, un total de 21 doblaron como mínimo su nivel de anticuerpos (95,5%). Es decir, si definimos la eficacia vacunal como el incremento al doble o más en el número de anticuerpos previos, observamos una eficacia vacunal del 95,5% en los sujetos sanos y del 68,2% en los VIH. Además, el contraste realizado nos da una significación  $p=0,013$ , lo cual nos indica que las diferencias entre ambos grupos son significativas. Esta diferencia se acentúa un poco más si realizamos el mismo contraste con relación a los anticuerpos capsulares (Tabla 5.26). En este caso se mantiene la eficacia en el grupo VIH-positivo (68,2%), pero aumenta la del grupo control ya que todos los sujetos sanos (100%) superan en dos o más veces el número de anticuerpos capsulares previos. ( $p=0,003$ )

Si aumentamos el nivel de exigencia y consideramos la eficacia vacunal como el incremento de anticuerpos al “triple o más” en lugar del doble o más, obtenemos una eficacia del 40,9% en el grupo VIH-positivo y del 81,8% en los sujetos sanos, ambos datos referidos a los anticuerpos

totales (tabla 5.27) ( $p=0,002$ ). Mientras que si nos referimos a los anticuerpos capsulares (tabla 5.28), la eficacia vacunal medida es del 54,5% para VIH y del 86,4% para los sanos ( $p=0,011$ ). Según estos datos anteriores, se puede concluir que la eficacia vacunal es significativamente mayor en los adultos sanos del grupo control que en los pacientes VIH-positivos, con unas tasas de seroconversión del 86,4% y del 54,5% respectivamente, y que los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana no solo tienen afectada la inmunidad celular específica, sino también la respuesta humoral, independientemente de que los linfocitos B no estén infectados.

El segundo de los objetivos que nos propusimos a la hora de realizar este trabajo, era evaluar el efecto protector que confiere la vacuna neumocócica a los pacientes VIH-positivos a medio plazo, determinando el nivel de anticuerpos que mantenían estos pacientes pasados dos años desde la administración de la vacuna. Para ello comparamos las cifras de anticuerpos obtenidas dos meses después de la vacunación en los pacientes VIH-positivos del grupo 2, con las medidas a los dos años en los pacientes VIH-positivos del grupo 1. En este punto nos encontramos con una de las limitaciones del estudio, ya que las medidas de anticuerpos a los dos meses y a los dos años no se correspondían en su mayoría a los mismos individuos, lo que hubiera sido la situación idónea. Sin embargo, como ha

quedado demostrado en la descripción de los grupos de estudio, las medidas obtenidas son perfectamente comparables ya que las características de edad, sexo, terapia recibida y estadio de enfermedad en estos dos grupos son iguales.

En la tabla 5.29 se muestran los valores de anticuerpos totales medidos en ambos grupos. Como se puede observar, las medianas (Me) obtenidas son parecidas (Me Grupo1=190, Me Grupo2=230) con una significación  $p=0,4$  ( $p>0,05$ ) lo que nos indica que no existe diferencia significativa en los niveles de anticuerpos totales medidos a los dos meses y a los dos años de la vacunación.

Más llamativa aún es la comparación de los anticuerpos capsulares entre estos dos grupos, en los cuales, estos valores se igualan espectacularmente (tabla 5.30). Como se puede observar, las medianas obtenidas son prácticamente idénticas (Me Grupo1=120; Me Grupo2=121,5), indicando claramente que el nivel de anticuerpos específicos frente a los polisacáridos capsulares, obtenidos a corto plazo después de la vacunación (Grupo 2), se mantiene prácticamente inalterado dos años después (Grupo 1). Es decir, las diferencias en el nivel de anticuerpos totales observadas entre estos dos grupos (aunque no eran significativas estadísticamente) se debían exclusivamente a los anticuerpos

frente al CWPS (anticuerpos irrelevantes respecto a su papel protector frente al neumococo), los cuales, como queda demostrado por este dato, se han perdido prácticamente en su totalidad a los dos años de la vacunación.

Adicionalmente, el porcentaje de adsorción de los anticuerpos frente al CWPS es mayor en los sueros recientes ( $p < 0,05$ ), lo cual viene a decir lo que ya hemos expresado anteriormente: que la cantidad de anticuerpo inespecífico es mayor inmediatamente después de la administración de la vacuna, y que esos anticuerpos son los primeros que se pierden.

Por otro lado, los valores extremos que se observan dentro del Grupo 1 (Fig. 5.18) se pueden deber a infecciones neumocócicas sufridas por estos pacientes en el transcurso de estos dos años.

Así pues, según los resultados que hemos obtenido, parece claro que los anticuerpos capsulares o específicos se mantienen prácticamente en su totalidad a medio plazo, mientras que aquellos anticuerpos dirigidos frente al CWPS, y por tanto irrelevantes, son los primeros que se pierden. Este resultado es uno de los más importantes que hemos obtenido al llevar a cabo este trabajo, ya que no hemos encontrado en la bibliografía ningún dato relacionado. De esta forma, se puede afirmar que la vacuna induce

una respuesta específica frente a los polisacáridos presentes en ella, y que además, esta especificidad se mantiene a medio plazo.

Otro de los objetivos de este trabajo se basaba en la medición de la avidéz de los anticuerpos. Para evaluar la protección frente a las enfermedades neumocócicas, además de la cantidad de los anticuerpos es muy importante medir la calidad de los mismos. La avidéz se puede definir como la “afinidad funcional” de los anticuerpos<sup>65,85</sup> y está determinada por dos parámetros. El primero es la afinidad intrínseca o verdadera, es decir, la fuerza de atracción entre el antígeno y el sitio de unión al anticuerpo. El segundo es el número de sitios de unión a antígeno que contiene el anticuerpo (2 sitios de unión para la IgG, 10 para la IgM, y 2-4 o más para la IgA). La avidéz de los anticuerpos ha sido relacionada con la actividad in vitro frente a numerosos patógenos, incluyendo el *Haemophilus influenzae* tipo b<sup>86,87</sup> y *Neisseria meningitidis*<sup>88</sup>, y con la habilidad del suero para mediar la fagocitosis de *Streptococcus pneumoniae*<sup>55,68,82,85</sup>.

Si nos fijamos en los resultados obtenidos al medir este parámetro en el Grupo 2 (Tabla 5.9) observamos que la avidéz de los anticuerpos postvacunales en los pacientes VIH-positivos es muy similar a la de los anticuerpos prevacunales, lo que nos indicaría que la vacuna no ha tenido ningún efecto sobre la avidéz de los anticuerpos. Sin embargo, si se puede

observar una tendencia hacia la disminución de la avidéz (Tabla 5.12) después de la vacunación en este grupo, ya que de 44 sueros, la avidéz postvacunal disminuye (con respecto a la prevacunal) en 10 de ellos, se mantiene en 29 y tan solo aumenta en 5.

Esta tendencia se confirma por los resultados obtenidos en el grupo sano control. En este grupo sí se observa un descenso significativo de la avidéz en los sueros postvacunales ( $p=0,001$ ), indicando que los anticuerpos generados por la vacuna son de peor calidad que los generados de forma natural. Probablemente este efecto se debe a que los polisacáridos presentes en la vacuna son antígenos T-independientes, es decir, no se pueden asociar a las moléculas del MHC de clase II de las células presentadoras de antígeno (APC) y por tanto no se produce la activación de los linfocitos T-helper. Esta respuesta independiente de las APC no genera memoria inmunológica ni maduración de la afinidad de los anticuerpos<sup>70</sup> y es por esto que los anticuerpos generados por la vacuna neumocócica polisacárida no son de elevada afinidad.

En cambio, los anticuerpos antineumococo que se generan de forma natural lo hacen a través de las células dendríticas foliculares, que controlan la maduración de las células B en los centros germinales. Durante esta maduración, las células B con elevada afinidad por el antígeno

adherido a la superficie de las células dendríticas sobreviven, mientras que las que muestran baja afinidad son destruidas por apoptosis o fagocitosis.<sup>70,89</sup> Por otro lado, las células secretoras de anticuerpo aparecen de forma rápida en médula ósea después del encuentro con el antígeno. Sin embargo, estas células secretan anticuerpos de baja afinidad y mueren rápidamente, en un plazo de unas dos semanas<sup>90</sup>, y las células maduras de elevada afinidad procedentes de los centros germinales las reemplazan en la médula. Esta es la base para el desarrollo de la avidez de los anticuerpos, y conduce a la formación de un reservorio de linfocitos B de memoria de alta avidez.

Como ya hemos comentado, la respuesta inmune generada por la vacuna no puede inducir esta maduración de la afinidad ya que, ni los linfocitos T, ni las células dendríticas, participan en la respuesta a polisacáridos exclusivamente. Además esta idea coincide plenamente con nuestros resultados en los sujetos del grupo control. Probablemente, el desarrollo que se está realizando actualmente de la vacuna neumocócica conjugada ayude a solventar este problema al inducir una respuesta inmune más parecida a la que se produce de forma natural, al inducir una respuesta de tipo T-dependiente.

El hecho de que esta disminución en la avidéz postvacunal no se manifieste claramente en los pacientes VIH-positivos, como ocurre en los sanos, puede deberse a que la avidéz de los anticuerpos prevacunales en este grupo ya está bastante disminuida debido a la grave alteración inmunológica a la que están sometidos. De hecho, si comparamos la avidéz de los anticuerpos prevacunales entre los dos grupos (Fig. 5.12) se observa claramente que la avidéz prevacunal en los sujetos sanos es significativamente mayor que en los pacientes VIH-positivos ( $p < 0,001$ ).

Por otro lado, al contrastar la avidéz de los anticuerpos postvacunales en los pacientes VIH-positivos, a los dos meses y a los dos años de la vacunación (Fig. 5.20; Tabla 5.32), podemos observar como la avidéz a los dos años es muy similar a la obtenida recién administrada la vacuna ( $p = 0,36$ ), es decir, la avidéz, al igual que ocurría con los anticuerpos capsulares, se mantiene al cabo de dos años.

Por último, a la hora de realizar este trabajo nos planteamos, como objetivo secundario, estudiar la correlación existente entre las cifras de linfocitos T CD4 positivos en el momento de la vacunación en los pacientes VIH-positivos y los niveles de anticuerpos generados. En este sentido, varios autores han relacionado las cifras de CD4 con la

inmunogenicidad de la vacuna en los adultos infectados por VIH<sup>70</sup>, indicando la mayoría de ellos que la vacunación resulta eficaz con cifras superiores a 200 células/mm<sup>3</sup> y no encontrando el mismo efecto con cifras de linfocitos CD4 inferiores.<sup>77,78,91</sup>

Sin embargo, nuestros resultados no son concordantes con los obtenidos por estos autores ya que nosotros no encontramos diferencias en las cifras de células CD4 entre aquellos pacientes que responden adecuadamente a la vacuna (Me=413) y los que no lo hacen (Me=412,5) (p=0,99) (Fig. 5.22;Tabla 5.34). En cierta medida esto se puede deber a que, de los 44 pacientes incluidos en el estudio, tan solo 4 (9%) tenían unas cifras de linfocitos CD4 positivos inferiores a 200 cél/mm<sup>3</sup>, y de éstos, tan solo 1 (25%) no mostró un incrementó de anticuerpos considerado como eficaz. Estos resultados coinciden con los del estudio realizado por Breiman et al<sup>74</sup> para evaluar la eficacia de esta vacuna en los pacientes VIH-positivos, los cuales tampoco encuentran diferencias en la eficacia vacunal entre pacientes con bajas, y relativamente altas cifras de células CD4.

En nuestra opinión, estos resultados obtenidos se pueden explicar si consideramos que la respuesta a la vacuna polisacárida es, como ya hemos comentado anteriormente, de tipo T-independiente y por tanto, esta

respuesta no está directamente condicionada por los linfocitos T. No sucede lo mismo si hablamos de la protección frente a la enfermedad neumocócica, en la cual, los linfocitos T sí juegan un papel predominante y por tanto aquellos pacientes con cifras de CD4 más bajas tendrán un mayor riesgo de enfermedad neumocócica.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 7. CONCLUSIONES



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

1. La vacunación con polisacáridos capsulares neumocócicos alcanza niveles protectores de anticuerpos en un 68,2% de los pacientes infectados por el VIH, aunque estos niveles resultan significativamente inferiores a los medidos en el grupo control. Este dato parece indicar que sería necesario adelantar la revacunación en estos pacientes para mantener el efecto protector de la vacuna.
2. Debido a que un porcentaje relativamente alto de pacientes VIH positivos no responden eficazmente a la vacunación (31,8%), sería recomendable determinar el título de anticuerpos pre y postvacunales en todos los sujetos afectados por esta enfermedad, para proceder a la revacunación de aquellos que no hayan alcanzado una respuesta adecuada.
3. Por otro lado, la revacunación rutinaria de aquellos pacientes que respondieron favorablemente a la vacunación no es necesaria dos años después, ya que los niveles de anticuerpos capsulares se mantienen prácticamente inalterados tras ese tiempo. Para determinar el momento idóneo de revacunación sería necesario alargar el presente estudio en el tiempo.

4. La respuesta cualitativa es similar en los pacientes VIH positivos y en los sujetos sanos control, ya que los anticuerpos generados son, principalmente, de tipo específico frente a los polisacáridos capsulares en ambos grupos.
  
5. A pesar de lo anterior, la vacuna genera una respuesta cualitativamente inferior a la que se obtiene de forma natural como lo demuestra el hecho de que la avidéz de los anticuerpos postvacunales es inferior a la detectada en los anticuerpos prevacunales.
  
6. No existe ninguna correlación entre las cifras de linfocitos T CD4 positivos y la respuesta vacunal en ninguno de los grupos de estudio, lo cual coincide con el hecho de que la vacuna genera una respuesta de tipo T-independiente.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 8. BIBLIOGRAFÍA



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

1. Temin HM, Mizutani S. "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus" *Nature* 1970; 226:1211-1213
2. Baltimore D. "Viral RNA dependent DNA polymerase". *Nature* 1970; 226:1211-1213.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)". *Science*. 1983; 220:868-70.
4. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. "Human T-lymphotropic retrovirus, HTLV III, isolated from AIDS patients and donors at risk for AIDS". *Science*. 1984;224:500-3.
5. Kanki Pj, Barin F, M'Boup M, et al. "New Human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic retrovirus type III (STLV III)" *Science*. 1986;232:238-40.
6. Mandell, Douglas y Bennet. "Enfermedades infecciosas. Principios y práctica" 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Julio 1998
7. Haase A.T. "Pathogenesis of lentivirus infections" *Nature*. 1986;332:130-6.
8. Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, et al. "Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus" *Science*. 1985;227:173-7.

9. Sonigo P, Alizon M, Staskus K, et al. "Nucleotide Sequence of the visna lentivirus: Relationship to the AIDS virus" *Cell* 1985;42:369-82.
10. Hirsch VM, Dapolito GA, Goldstein S, et al. "A distinct African Lentivirus from Sykes monkeys" *J. Virol.* 1993;67:1517-28
11. Arthur L, Bess JW Jr, Sowder RC, et al. "Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines" *Science.* 1992;258:1935-8
12. Trono D. "Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia virus" *J Virol.* 1991;66:4893-900
13. Lori F, Veronese FDM, Devico AL, et al. "Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions" *J Virol.* 1992;66:5067-74
14. Ratner L, Haseltine WA, Patarra R, et al. "Complete nucleotide sequence of the AIDS virus". *Nature.* 1985;313:277-84.
15. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, et al. "Nucleotide sequence of the AIDS virus" *Cell.* 1985;40:9-17.
16. Muesing M, Smith D, Cabradilla C, et al. "Nucleic acid structure and expression of the human AIDS retrovirus" *Nature.* 1985;313:450-8.
17. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, et al. "3'-Azido-2'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibit the

- infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus in vitro” Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:7096-100.
18. Yarchoan R, Mitsuya H, Thomas RV, et al. “In vivo activity against HIV and favorable toxicity profile of 2',3'-dideoxyinosine” Science, 1989;245:412-5.
19. Tristram G. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I. Terr, John B. Imbodem “Medical Immunology” 2001. 10ª edición. Ed. McGraw-Hill.
20. Carolyn M. Steffens, Thomas J. Hope. “Recent advances in the understanding of HIV accesory protein function” AIDS 2001, 15 (suppl 5):S21-S26.
21. Kestler HW 3<sup>rd</sup>, Ringler DJ, Morri K, et al. “Importance of the Nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS” Cell 1991, 65: 651-662.
22. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin MA.”The HIV A (sor) gene product is essential for virus infectivity” Nature 1987, 328:728-730.
23. Dornadula G, Yang S, Pomerantz RJ, Zhang H “Partial rescue of the Vif-negative phnotype of mutant human immunodeficiency virus type 1 strain from nonpermissive cells by intravirion reverse transcription” J Virol 2000, 74:2594-2602.

24. Kunal Saha, Jianchao Zhang, Anil Gupta, Rajnish Dave, Meron Yimen, Bouchra Zerhouni. "Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor" *Nature Medicine* 2001, 7:65-72
25. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase" *Science* 1988;242:1168-71.
26. Ho D, Neumann A, Perelson A et al. "Rapid Turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection" *Nature* 1995; 373:123-6.
27. Frits van Griesven, Giovanni Rezza "Epidemiology and social issues" *AIDS* 2001, 15 (suppl 5):S47-S48.
28. World Health Organization "AIDS global data" *Week Epidemiol Rep* 1998 73:926-9.
29. Chin J, Mann J. "The global patterns and prevalence of AIDS and HIV infection" *AIDS* 1998 (suppl. 1):247-52
30. Weissman D, Fauci AS. "Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection" *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:358-67.
31. Johnson R, Siciliano R, McElrath M. " Cellular immune responses to HIV-1" *AIDS* 1998; 12:113.
32. Britton CB, Miller JR. "Neurological complications in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)" *Neurol Clin* 1984; 2:315-339.

33. Heidelberger M, Avery OT. "The soluble specific substance of pneumococcus" J Exp Med. 1923;38:73-79.
34. Felton LD. "Studies on the immunizing substances in pneumococci. II. Separation of the organism into acid soluble and acid insoluble fractions" J Immunol. 1934;27:379-93.
35. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III" J Exp Med 1944;79:137-57.
36. Lancefield RC. "A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci" J Exp Med. 1933;57:571-95.
37. Kontiainen S, Sivonen A. "Optochin resistance in *S. pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid" Eur J clin Microbiol. 1987;6:422-4.
38. Muñoz R, Fenoll A, Vicioso D, et al. "Optochin-resistant variants of *S.pneumoniae*" Diag Microbiol Infect Dis. 1990;13:63-6.
39. Gross J, Fulco O. "Pneumococcal pneumonia and septicemia resulting from a nontypable strain of pneumococcus" J Am Geriatr Soc. 1985;33:153.

40. Pease AA, Douglas CWI, Spencer RC. "Identifying noncapsulate strains of *S. pneumoniae* isolated from eyes" *J Clin Pathol* 1986;39:871-5.
41. van Dam JEG, Fler A, Snippe H. "Immunogenicity and Immunochemistry of *S. pneumoniae* capsular polysaccharides" *Antonie Van Leeuwenhoek* 1990;58:1-47.
42. Mulholland K. "Strategies for the control of pneumococcal diseases" *Vaccine* 1999;17 Suppl 1: s79-84.
43. Heffron R. "Pneumonia: with special reference to pneumococcus lobar pneumonia" Cambridge, MA: Harvard University Press; 1979.
44. Gary BM, Converse GM, Dillon HC Jr. "Epidemiologic studies of *S. pneumoniae* in infants: Acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life" *J Infect Dis.* 1980;142:923-33.
45. Gary BM, Dillon HC Jr. "Epidemiologic studies of *S. pneumoniae* in infants: Antibodies to types 3, 6, 14 and 23 in the first two years of life" *J Infect Dis.* 1988;158:948-55.
46. Musher DM, Johnson B Jr, Watson DA "Quantitative relationship between anticapsular antibody measured by ELISA or RIA and protection of mice against challenge with *S. pneumoniae* serotype 4" *Infect Immun.* 1990;58:3871-6.

47. Watson DA, Musher DM. "Interruption of capsule production in *S. pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916" *Infect Immun.* 1990;58:3135-8.
48. Boulnois GJ. "Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*" *J Gen Microbiol.* 1992;138:249-59
49. Schwartz LE, Brown RB. "Purulent otitis media in adults" *Arch Intern Med.* 1992;152:2301-4
50. Luby JP. "Infections of the central nervous system" *Am J Med Sci.* 1992;304:379-91.
51. Rodriguez MC, Musher DM, Hamill RJ, et al. "Unusual manifestations of pneumococcal infections in HIV-infected individuals: The past revisited" *Clin Infect Dis.* 1992;14:192-9.
52. Gestur Vidarsson, Ingileif Jonsdottir, Steinn Jonsson, Helgi Valdimarsson. "Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *S. pneumoniae*" *Journal Infect Dis* 1994;170:592-9.
53. Anu Soininen, Maijastiina Karpala, Sirkka-Liisa Wahlman. et al. "Specificities and opsonophagocytic activities to pneumococcal capsular polysaccharides in sera of unimmunized young children" *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:1032-38.

- 
54. Yother J, Forman C, Gray BM, et al. "Protection of mice from infection with *Streptococcus pneumoniae* by anti-phosphocholine antibody". *Infect Immun*. 1982;36:184-8.
  55. Wallick S, Claflin JL, Briles DE. "Resistance to *Streptococcus pneumoniae* is induced by a phosphocholine-protein conjugate" *J Immunol*. 1983;130:2871-5.
  56. McDaniel LS, Benjamin WH Jr, Forman C, et al. "Blood clearance by antiphosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia" *J Immunol*. 1984;133:3308-12
  57. Szu SC, Schneerson R, Robbins FB. "Rabbit antibodies to the cell wall polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* fail to protect mice from lethal challenge with encapsulated pneumococci" *Infect Immun*. 1986;54:448-55.
  58. Musher DM, Watson DA, Baughn RE. "Does naturally acquired IgG antibody to cell wall polysaccharide protect human subjects against pneumococcal infection?" *J Infect Dis*. 1990;161:736-40.
  59. Koskela M. "Serum antibodies to pneumococcal C polysaccharide in children: Response to acute pneumococcal otitis media or to vaccination" *Pediatr Infect Dis J*. 1987;6:519-26.
  60. Musher DM, Luchi M, Watson DA, et al. "Pneumococcal polysaccharide vaccine in young adults and older bronchitics:

- Determination of IgG responses by ELISA and the effect of adsorption of serum with nontype-specific cell wall polysaccharide”  
 J Infect Dis. 1990;161:728-35.
61. Sorensen VBS, Henrichsen J. “C-polysaccharide in a pneumococcal vaccine” Acta Path Microbiol Immunol Scand. 1984;92:351-6.
62. Janoff EN, Breiman RF, Daley CL, et al. “Pneumococcal disease during HIV infection: Epidemiologic, clinical and immunologic perspectives” Ann Intern Med. 1992;117:314-24.
63. Janoff EN, O’Brien J, Thompson P, et al. “*Streptococcus pneumoniae* colonization, bacteremia and immune response among persons with human immunodeficiency virus infection” J Infect Dis. 1993;167:49-56.
64. Redd SC, Rutherford GW III, Sande MA, et al. “The role of human immunodeficiency virus infection in pneumococcal bacteremia in San Francisco residents” J Infect Dis. 1990;162:1012-7.
65. Romero-Steiner S, Musher D, Cetron M et al. “Reduction in functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* in vaccinated elderly individuals highly correlates with decreased IgG antibody avidity” Clin Infect Dis 1999;29:281-8.
66. Sun Y, Hwang Yi, Nahm M. “Avidity, potency, and crossreactivity of monoclonal antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide serotype 6B” Infect Immun 2001;69:336-44.

67. Advisory Committee on Immunization Practices, Centers for Disease Control and Prevention. "Pneumococcal polysaccharide vaccine" MMWR. 1984;38:64-74.
68. Centers for Disease Control and Prevention. "Guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus: US Public Health Service (USPHS) and Infectious Diseases Society of America (IDSA)" MMWR 1999;48 (RR-10):1-59;61-6.
69. Stein K. "Thymus-independent and thymus dependent responses to polysaccharide antigens" J Infect Dis 1992;165:S49-52.
70. Wuorimaa T, Kayhty H. "Current state of pneumococcal vaccines" Scand J Immunol. 2002;56:111-119.
71. Shapiro E, Berg A, Austrian R. "The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine" N Engl J Med 1991;325:1453-60.
72. Farr B, Jhonston B, Cobb DK, et al "Preventing pneumococcal bacteremia in patients at risk. Results of matched case-control study" Arch Intern Med 1995;155:2336-40.
73. Fiore A, Levine O, Elliot J. "Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine for preschool-age children with chronic disease" Emerg Infect Dis 1999;5:828-31.

74. R.F. Breiman, David W. Keller, Maureen A. Phelan, et al. "Evaluation of effectiveness of the 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine for HIV-infected patients" *Arch Intern Med.* 2000;160:2633-38.
75. Keller DW, Breiman RF. "Preventing bacterial respiratory tract infections among persons infected with human immunodeficiency virus" *Clin Infect Dis.* 1995;21 (suppl 1):S77-S83.
76. Centers for Disease Control and Prevention. "Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)" *Morb Mortal Wkly Rep.* 1997;46:1-24.
77. Gebo KA., Moore RD, Keruly JC, et al "Risk factors for pneumococcal disease in human immunodeficiency virus-infected patients" *J Infect Dis.* 1996;173:857-62.
78. Mark S. Dworkin, John W. Ward, Debra L. Hanson, et al "Pneumococcal disease among human immunodeficiency virus-infected persons: Incidence, risk factors and impact of vaccination" *Clin Infect Dis* 2001;32:794-800.
79. French N, Nakiyingi J, Carpenter LM, et al. "23-Valent pneumococcal polysaccharide vaccine in HIV-1 infected Ugandan adults: double-blind, randomised and placebo controlled trial" *Lancet* 2000;355:2106-11.

80. Linderburg C, Langendam MW, Benthem B, et al "No evidence that vaccination with a polysaccharide pneumococcal vaccine protects drug users against all-cause pneumonia" *Research letters AIDS* 2001;15:1315-17.
81. Sjögren A, Lindholm B, Holme T. "Availability of reaction with antibodies of the pneumococcal C-polisaccharide of the surface of capsulated pneumococci" *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1987;95:371-8.
82. Payeras A, Martinez P, Milá J, et al. "Risk factors in HIV-1-infected patients developing repetitive bacterial infections: toxicological, clinical, specific antibody class responses, opsonophagocytosis and FcγRIIa polymorphism characteristics" *Clin Exp Immunol* 2002;130:271-78.
83. Gibb D, Spoulou V, Giacomelli A, et al. "Immunogenicity of bacterial polysaccharides in children with HIV infection" *Progress in immune deficiency V*. Ed Springer-Verlag Ibérica 1995.
84. Misbah S.A, Mitchell T, Griffiths H, et al. "Anti-polysaccharide antibody responses in children with otitis media" *Progress in immune deficiency V*. Ed Springer-Verlag Ibérica 1995.
85. Konradsen H.B. "Quantity and Avidity of pneumococcal antibodies before and up to five years after pneumococcal vaccination of elderly persons" *Clin Infect Dis* 1995;21:616-20.

86. Hetherington SV, Lepow ML. "Correlation between antibody affinity and serum bacterial activity in infants" J Infect Dis 1992;165:753-6.
87. Schlesinger Y, Granoff DM. "Avidity and bacterial activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines" JAMA 1992;267:1489-94.
88. Granoff DM, Maslanka SE, Carlone GM, et al "A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses" Clin Diagn Lab Immunol 1998;5:479-85.
89. Choe J, Li L, Zhang X, et al. "Distinct role of follicular dendritic cells and T cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line L3055" J Immunol 2000;164:56-63.
90. Smith K, Hewitson T, Nossal G, et al. "The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci" Eur J Immunol 1996;26:444-8.
91. Jones JL, Hanson DL, Dworkin MS, et al. "Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992-1997" Morb Mortal Wkly Rep 1999;48(SS2):1-22.