

Clasificación clínica y comportamiento de las poblaciones linfocitarias en VIH positivos

Corral R.H.¹, Crespo M.P.², Alzate A.³

Resumen

Con el fin de determinar el comportamiento de las diferentes poblaciones linfocitarias, a través de los diferentes estadios clínicos de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) establecidos por el CDC, se realizaron tipificaciones de linfocitos T, B, T CD4 y T CD8 en 155 individuos VIH positivos del ISS en Cali, utilizando la técnica de inmunocitoquímica de los complejos fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) en extendidos de sangre periférica.

En los pacientes del estadio II, los linfocitos T, B y CD4 se encontraron dentro de los valores normales para la población general, mientras que los CD8 estaban aumentados. En el estadio III, el comportamiento de las poblaciones de linfocitos fue similar salvo un ligero aumento de los linfocitos B. Estos estadios sólo se diferenciaron clínicamente por la presencia de adenopatías.

En el estadio IV se observó una marcada depleción de todas las poblaciones linfocitarias estudiadas.

En virtud al aumento temprano de CD8 en los estadios II y III, la relación CD4/CD8 presenta alteraciones y es menor de 1,0 aunque el recuento de CD4 en estos estadios sea normal. Sin embargo, cuando ocurre la depleción general en el estadio IV, su utilidad es limitada y el recuento absoluto de CD4 es el indicador más útil en la progresión de la enfermedad.

En virtud a que el recuento de linfocitos CD4 y CD8 constituye un pilar y en él se orientan la mayoría de las conductas profilácticas y de tratamiento que se adoptan en los VIH positivos, se hace necesario conducir los esfuerzos para hacer más asequible esta metodología a los pacientes, así como plantear la implementación de otras pruebas evaluadoras de la inmunidad, útiles como indicadores de la progresión de la enfermedad.

Summary

T, B, T CD4 and T CD8 lymphocyte typifying, using the immunochemical technique of complex alkaline phosphatase-alkaline antiphosphatase (APAAP) in thin smears, was carried out on 155 HIV positive individuals from the Social Security Institute in Cali (Colombia) to determine the behaviour of different lymphocyte populations throughout the different clinical stages of infection by the human immunodeficiency virus (HIV) as established by the CDC.

¹ Médico internista, Profesor asistente, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle; Coordinador del Servicio Integrado de Enfermedades Infecciosas, Instituto de los Seguros Sociales; Cali, Colombia.

² Bacterióloga, Magister en microbiología; microbióloga de la Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia.

³ Médico, Magister en salud pública, Profesor titular, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

In stage II, T, B, and CD4 patient's lymphocytes were found within the norms for the general population, while those of CD8 were increased. In stage III, the behaviour of the lymphocyte populations was similar except for a slight increase in B lymphocytes. These stages only differed clinically because of the presence of adenopathies.

In stage IV, a marked depletion of all the lymphocyte populations studied was observed. Due to the early increase of CD8 in stages II and III, the relationship CD4/CD8 presents alterations and is less than 1.0, even though the CD4 count is normal. However, when general depletion occurs in stage IV, its usefulness is limited and it is the CD4 count alone which is the most useful indicator of the illness's progression.

Considering that the majority of prophylactic behaviour and treatment which is adopted for HIV positive patients is based on CD4 and the CD8 lymphocyte counts, it is of vital importance to make this methodology more accessible to patients as well as to implement other immunity evaluating tests, to be indicators of the illness's progression.

La infección por el VIH causa una pérdida cuantitativa y cualitativa de la inmunidad mediada por células. Aunque hasta el momento se sabe que el VIH puede infectar un amplio rango de células en el organismo, la inmunodeficiencia que produce se atribuye principalmente a la infección y destrucción de los linfocitos T CD4 o ayudadores, por parte del virus.

Esta pérdida se manifiesta de una manera discreta y progresiva desde el inicio de la infección y avanza hasta que los síntomas se hacen evidentes y empieza a presentarse un amplio espectro de infecciones oportunistas. En un esfuerzo por identificar y organizar los síntomas y complicaciones de la infección por VIH, se han establecido varias clasificaciones de la enfermedad, siendo la más utilizada la clasificación clínica del CDC (1), basada en el desarrollo de la infección por VIH y el deterioro progresivo del individuo que ésta produce. En esta clasificación se reconocen cuatro estadios clínicos, el I o de infección aguda, el II o de portador asintomático, el III o síndrome de linfadenopatía generalizada persistente (SLGP) y el IV o SIDA donde se presenta el síndrome florido y todas sus complicaciones; este estadio, a su vez, se ha subdividido en cinco grupos de acuerdo con el tipo de complicación o infección oportunista que se presente.

Sin embargo, aunque este sistema de clasificación permite ubicar al individuo en su estadio dependiendo de su sintomatología y cuadro clíni-

co, no indica al médico específicamente cuál es el estado de deterioro inmune del paciente, ni permite establecer una mayor predicción con respecto a la progresión de la enfermedad. Es por ello que en la actualidad existen varios marcadores de laboratorio útiles en el seguimiento del individuo VIH positivo. El recuento de linfocitos, particularmente de células T CD4, es un indicador directo del estado inmune celular del individuo ya que permite determinar el efecto de la infección por VIH, siendo importante en la instauración de terapias profilácticas y antirretrovirales. (2,3)

Aunque ambos criterios, tanto el clínico como el de laboratorio son importantes, los costos de la tipificación de linfocitos hace que en nuestro medio prevalezca la clasificación clínica y sólo se recurra al recuento de CD4 cuando es indispensable y no de forma periódica, como se indica en la literatura para un adecuado seguimiento (1).

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se propone determinar cuál es el comportamiento de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en un grupo de VIH positivos de nuestra ciudad y, además, evidenciar si existe correlación entre la clasificación clínica y el recuento de linfocitos T CD4 y otras poblaciones linfocitarias.

Materiales y métodos

Población de estudio

Constituido por un grupo de 155 individuos VIH positivos atendidos en el ISS en Cali, agrupados

por estadios clínicos según lo establecido por el CDC (1). 67 pacientes pertenecían al estadio II o de portador asintomático, 27 al estadio III o SLGP y 61 pertenecían al estadio IV o SIDA.

A cada VIH positivo comprobado, se le realizó un examen físico completo y pruebas de laboratorio: hemograma, anticuerpos para toxoplasma, citomegalovirus y herpes y, además, látex para criptococo; esto con el fin de poder hacer una mayor aproximación clínica del estadio de la infección por VIH.

Tipificación de linfocitos

En el momento del examen físico se le tomó a cada paciente por venopunción 5 ml de sangre con EDTA, para realizar la técnica de inmunocitoquímica de los complejos inmunes fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) en extendidos de sangre periférica; según la metodología de Erber (3,4) con algunas modificaciones. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón para la identificación de linfocitos T totales (CD3), linfocitos B (CD19), T CD4 para los T ayudadores y T CD8 para los T supresores.

El APAAP se fundamenta en la reacción de los anticuerpos monoclonales con los antígenos específicos de membrana de los linfocitos. Inicialmente se hicieron 4 extendidos de sangre completa y se dejaron secar durante 1 a 18 horas a temperatura ambiente; una vez secos, fueron almacenados en papel aluminio a -20°C hasta su procesamiento. En el momento de realizar la técnica, los extendidos se descongelaron y sobre ellos se trazaron varios círculos con lápiz de diamante, cada uno correspondiente al respectivo monoclonal a probar. Posteriormente, se fijaron con una solución amortiguadora de formol acetona durante un minuto; luego, se lavaron con agua destilada y por último en Tris-HCl 0, 1M pH 7,6 durante 5 minutos, dos veces.

Después de lavados, se secaron cuidadosamente los bordes de los círculos y se colocaron los anticuerpos monoclonales correspondientes durante una hora en cámara húmeda. Para los linfocitos T totales se utilizó Dako-CD3 T3 4B5, para los linfocitos B Dako-CD19, para los T CD4 Dako-CD4 MT310 y para los T CD8 Dako-CD8 DK25. Estos anticuerpos se utilizaron en una

dilución 1:10 excepto el T CD3 que se utilizó en una dilución 1:100. Luego de dos lavados con el Tris HCl, se colocó la inmunoglobulina de conejo anti-ratón (Dako A/S) diluida 1:25, durante 45 minutos en cámara húmeda.

Posteriormente, se lavaron los extendidos y se adicionó el complejo de inmunoglobulina de ratón anti-fosfatasa alcalina más fosfatasa alcalina (APAAP Dako A/S) diluida 1:50 durante 45 minutos en cámara húmeda; para una mayor eficiencia de la reacción, estos dos últimos pasos se realizaron nuevamente. Después se agregó un sustrato de la enzima y un revelador de la reacción, que consistió en una solución de 100 mg Naphthol as bifosfato, 200 µl de dimetilformamida, 10 ml de buffer salino pH 9,2 y 5 - 10 mg de *Fast red*; luego, se hizo un nuevo lavado con Tris HCl y agua destilada y se hizo una contratinción con hematoxilina de Harris por un minuto; se lavó con agua corriente y se montaron las placas con glicerol glicerina. Los linfocitos identificados con el monoclonal correspondiente presentaron una corona roja en su membrana. Los extendidos se observaron en el microscopio de luz y se realizó un conteo por duplicado de los linfocitos teñidos en un total de 100 vistos.

El cálculo del número de cada subpoblación se hizo así: $\text{No. de CD4} = \text{total de leucocitos} \times \% \text{ de linfocitos} / 100 \times \% \text{ de linfocitos marcados} / 100$.

Para hacer este cálculo fue necesario realizar un leucograma de cada paciente.

Análisis estadístico

Se realizaron promedios geométricos y desviación estándar. Para comparar proporciones, se emplearon tablas de contingencia que fueron evaluadas por el P de Fisher o el Chi cuadrado, según el caso. La razón de desigualdades (OR) ampliamente utilizada en estudios de casos y controles, fue necesaria para estimar las asociaciones entre variables.

Resultados

El grupo de 155 pacientes VIH positivos del programa de infectología del ISS estuvo conformado por 149 hombres (96,1%) y 6 mujeres (3,9%), con un promedio de edad de 32,9 años.

La media geométrica (MG) del recuento total de leucocitos en los VIH positivos fue de 6.761 (IC 95% 6.310 - 7.244); el 25% tenían leucopenia (recuentos menores de 5.100 leucocitos/ μ l), siendo ésta más marcada en los pacientes que pertenecían al estadio clínico IV (SIDA), donde el 40% eran leucopénicos y fue más moderada en los estadios II y III (13,4% y 19,2% de leucopénicos, respectivamente).

Del total de pacientes VIH positivos, sólo 25 (16,7%) presentaron linfopenia (recuento de linfocitos menor de 1250/ μ l), 21 (13,5%) pertenecían al estadio IV y 4 (2,58%) a los estadios II y III, existiendo una asociación significativa entre estar en el estadio IV y tener linfopenia (OR = 11,81 IC 95% = 3,60 - 49,5 $p < 0,001$).

Cuando se realizó la clasificación del grupo VIH positivo de acuerdo con los estadios clínicos se observaron cambios importantes en cuanto al comportamiento de las poblaciones linfocitarias.

En los pacientes del estadio II, el recuento de linfocitos CD4 se encontraba dentro de los valores normales ($>400/\mu$ l) (1,3-5), con una MG de 603/ μ l, mientras que los linfocitos CD8 estaban elevados, con una MG de 1.096/ μ l (valor normal: $<800/\mu$ l), lo que produce una relación CD4/CD8 menor de 1,0 en la mayoría de los pacientes a pesar de encontrarse en el estadio II o de portador asintomático (figura 1).

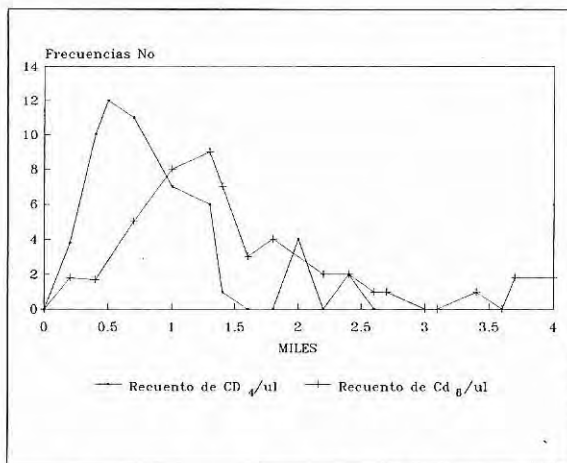


Figura 1. Población de linfocitos CD4 y CD8 en VIH positivos del estado II.

En cuanto a las otras poblaciones linfocitarias, la MG de linfocitos T fue de 1.820/ μ l aún dentro de los rangos normales (800 - 2.200/ μ l)⁽⁶⁾ y en los linfocitos B la MG fue de 347/ μ l también dentro de los rangos normales (60 - 440/ μ l)⁽⁶⁾.

En los VIH positivos del estadio III, la MG de linfocitos CD4 fue 851/ μ l, con una MG de linfocitos CD8 de 955/ μ l y la relación CD4/CD8 alterada ($<1,0$). Los linfocitos T con una MG de 1.820/ μ l y una MG de linfocitos B de 468/ μ l los cuales se encontraban ligeramente aumentados.

En los pacientes ubicados en el estadio IV, la MG de linfocitos CD4 descendió considerablemente a 182/ μ l, los linfocitos CD8, aunque altos en comparación a los CD4, se vieron disminuidos al compararse con los registrados en los estadios II y III de la infección; la media geométrica fue de 589/ μ l (figura 2). Como consecuencia, la relación CD4/CD8 se observó aún más baja.

En cuanto a los linfocitos T totales, la MG fue de 813/ μ l y la MG de los linfocitos B de 120/ μ l; ambas poblaciones se encontraron disminuidas.

De acuerdo con lo observado en el estadio IV y teniendo en cuenta que según el CDC se ha definido como caso de SIDA todo paciente VIH positivo con un recuento menor o igual a 200/ μ l, se evidenció que la definición por el laboratorio y la definición por la evaluación clínica son diferentes (X^2 MacNemar = 13,7 $p < 0,01$). El valor predictivo positivo de la clasificación clínica del estadio IV o SIDA es de 46,8%, lo que indica que sólo la mitad de los casos que clínicamente se consideran SIDA son los que poseen un recuento de CD4 $<200/\mu$ l y necesitan irremediablemente el tratamiento antirretroviral. Mientras que si se parte de un recuento de CD4 $<200/\mu$ l casi la totalidad de los pacientes tendrá SIDA. Por lo tanto, el valor predictivo negativo es bueno (95%) ya que sólo se encontraron cuatro pacientes que siendo clasificados en el estadio II asintomáticos, tenían un recuento de CD4 menor o igual a 200/ μ l (figura 3). Es decir, existe una tendencia significativa entre tener un recuento de CD4 menor o igual a 200/ μ l y ser clasificado clínicamente como estadio IV (OR 16,5 IC95% = 4,84 - 70,33 $p < 0,001$).

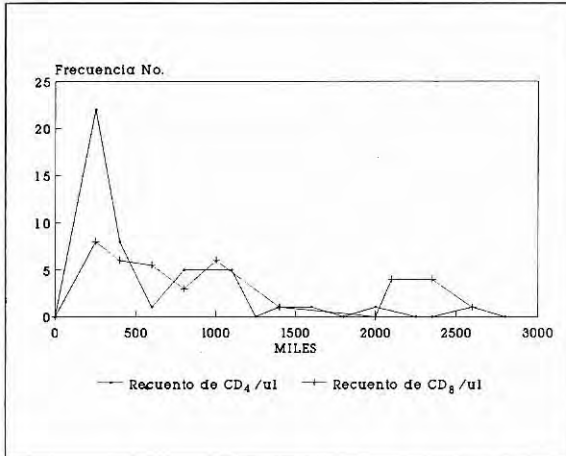


Figura 2. Población de linfocitos CD4 y CD8 en VIH positivos cel estado IV.

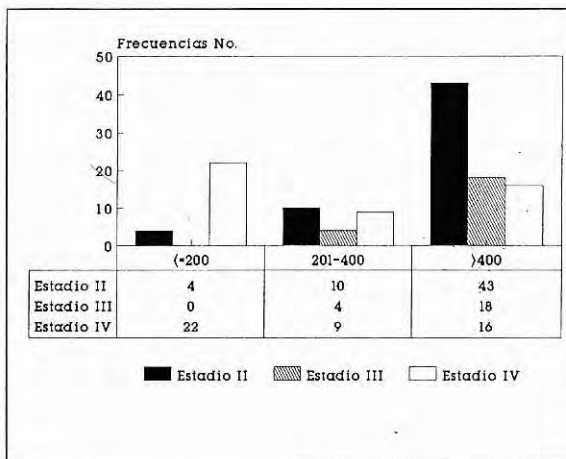


Figura 3. Recuento de linfocitos CD4 en VIH positivos según su estado clínico.

Con respecto a la relación CD4/CD8 <1,0, ésta no es una buena predictora del estadio IV (OR = 1,6 p>0,05), ya que aunque en este estadio es muy baja (66% <0,5) ya existen alteraciones importantes a este respecto en los estadios II y III (83% <1,0 vs. 88% en estadio IV). Dado el nivel de depleción de todas las poblaciones linfocitarias en el paciente de estadio IV, la disminución simultánea de linfocitos CD4 y CD8 puede producir una relación CD4/CD8 cercana a 1,0, lo cual daría una falsa imagen del estado inmunológico del paciente.

Discusión

En la evaluación de las subpoblaciones linfocitarias se utilizó la técnica de inmunocitoquímica APAAP la cual representó una buena alternativa, con algunas ventajas con respecto a la técnica tradicional de inmunofluorescencia directa que es la más utilizada en nuestro país; entre ellas, la no utilización de equipo sofisticado como el microscopio de fluorescencia. Además, puede realizarse con volúmenes de sangre pequeños a diferencia de la inmunofluorescencia, donde se necesita una concentración de 0,5 a 1×10^6 mononucleares. Evita procesos adicionales de separación y centrifugación de linfocitos, tales como el gradiente de Fycoll Hypaque, que pueden alterar el recuento; se ha visto que el proceso de centrifugación puede disminuir el recuento de linfocitos B y causar un aumento de linfocitos T en la suspensión final.

También, los gradientes de separación pueden aumentar falsamente el recuento de linfocitos CD4 en virtud a una disminución de los linfocitos CD8. Además, la diferenciación de las poblaciones linfocitarias puede hacerse sencillamente como si se tratara de un extendido de hematología con un mejor criterio morfológico, ya que en la inmunofluorescencia no es posible observar con claridad la morfología celular y por ello algunos monocitos que son CD4 positivos pueden ser incluidos en el recuento como linfocitos (7). Algo muy importante es que cuando se utiliza el APAAP, es posible guardar las muestras como extendidos de sangre durante un año antes y después del procedimiento.

De otro lado, el estudio de las subpoblaciones linfocitarias permitió confirmar que en el estadio IV o SIDA es donde se hacen evidentes la mayoría de las alteraciones linfocitarias. Existe una mayor tendencia a la linfopenia y una disminución general de linfocitos T, B y linfocitos T CD4 y CD8. En los estadios clínicos II y III de la infección por VIH, el comportamiento de las poblaciones de linfocitos estudiadas fue similar, sólo se presentaron diferencias muy sutiles en cuanto a los recuentos, mientras que en el estadio IV existe ya una marcada diferencia (figura 4-7). En el estadio III se observó un ligero aumento de linfocitos CD4, el cual fue significativo (t=

1,975 77 gl $p > 0,05$); igualmente se observó un aumento en el recuento de linfocitos B, el cual no fue significativo cuando se comparó con el recuento de linfocitos B en el estadio II ($t = 1,678$ 70gl $p > 0,05$).

A pesar de que se considera que los linfocitos CD4 disminuyen progresivamente desde el inicio de la infección, éstos presentan fluctuaciones (8). La variabilidad de un individuo puede ser del 35 - 75% y la fluctuación de los conteos entre cada laboratorio está entre los 100 - 200/ μ l (8). Las fluctuaciones biológicas en los recuentos que se presentan en los individuos de los estadios II y III no permiten diferenciar estos dos estadios. El estadio II se puede diferenciar del estadio III clínicamente por la presencia de adenopatías generalizadas persistentes que indican una acción de respuesta del organismo contra la infección viral; esto se manifiesta con un ligero incremento en el recuento de linfocitos B. En estos estadios se presenta un aumento en el recuento de linfocitos D8; el aumento de los linfocitos T supresores constituye una de las alteraciones iniciales en la inmunidad del individuo VIH positivo. Esto conduce a una relación CD4/CD8 alterada o menor, que se hace evidente desde el estadio de portador asintomático, por lo que en los estadios II y III la relación CD4/CD8 es un indicador útil para determinar la presencia de alteración inmune. Sin embargo, su utilidad es limitada puesto que en el estadio IV ocurre una

depleción total de los linfocitos y, en este caso, el recuento absoluto de linfocitos CD4 sería el mejor indicador del estado inmune del paciente.

Aunque en este estudio se observó una buena correlación entre la clasificación clínica y los recuentos de linfocitos CD4 en los estadios II y III, ésta se pierde en el estadio IV, existiendo un 53,2% de pacientes que al ser clasificados clínicamente como SIDA tienen recuentos de CD4 mayores de 200/ μ l. Esto pone en evidencia que existen enfermedades oportunistas marcadoras de defectos inmunes graves y que definen clínicamente a un paciente como caso de SIDA cuando el recuento de linfocitos CD4 no ha descendido de 200 / μ l. Además, se trata de infecciones que son altamente prevalentes en nuestro medio como es el caso de la toxoplasmosis del sistema nervioso central.

No obstante la buena correlación observada entre la clasificación clínica y el recuento de CD4 en los estadios II y III y que el recuento de CD4 es uno de los indicadores más útiles como predictor del estado y deterioro inmune del paciente orientando sobre el empleo de conductas profilácticas, existen individuos que a pesar de tener recuentos de CD4 mayores de 400/ μ l dentro del rango normal, presentan síntomas y signos de infección por VIH avanzada, presumiblemente porque la funcionalidad de las células está comprometida o porque la inmunidad de tipo humoral muestra signos de deterioro.

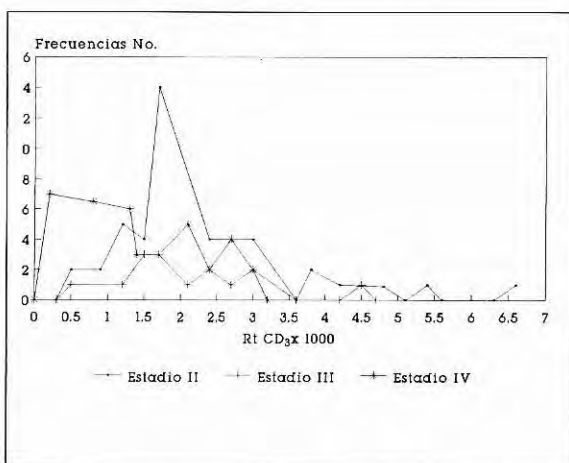


Figura 4. Poblaciones de linfocitos T totales CD3 en VIH positivos de los estadios II, III y IV.

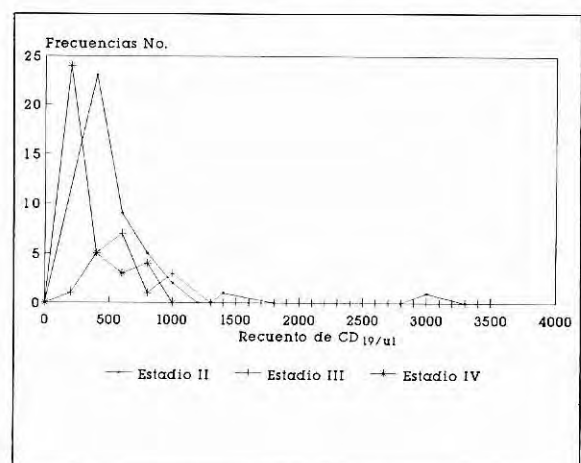


Figura 5. Poblaciones de linfocitos B (CD19) en VIH positivos de los estadios II, III y IV.

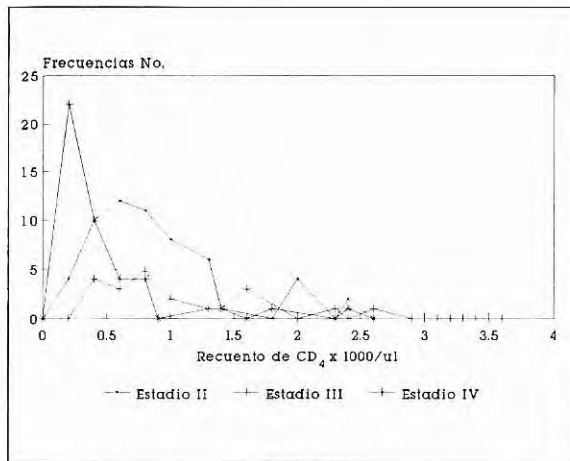


Figura 6. Poblaciones de linfocitos CD4 en VIH positivos de los estadios II, III y IV.

Por el contrario, también existen pacientes asintomáticos, como se observó en este trabajo, con recuentos de CD4 menores de 200/ μ l en los cuales el recuento es de valor predictivo ya que, probablemente, estos pacientes desarrollen el SIDA en dos años si no son tratados.

Aunque la clasificación clínica y la evaluación por laboratorio basada en los recuentos de linfocitos han demostrado ser diferentes pero complementarias, en este momento el CDC ha reconocido nuevas definiciones para un caso de SIDA y dentro de éstas se considera tanto a los casos clínicos de SIDA como a los casos inmunológicos por SIDA por el laboratorio (9).

La utilización del recuento de CD4 en el monitoreo ha demostrado ser cada vez más necesaria, puesto que se ha visto que pacientes VIH positivos asintomáticos con recuentos menores de 400/ μ l tienen un riesgo relativo de 2,8 veces más de desarrollar SIDA si no son tratados. Medir los niveles CD4 es útil como guía clínica y en el manejo terapéutico de los pacientes VIH positivos. Sin embargo, existen otras pruebas de laboratorio que pueden ser indicadores humorales de inmunidad, útiles para determinar la progresión de la enfermedad y que complementan la información suministrada por los recuentos de CD4. tales como la beta 2 microglobulina, Ag p24, la neopterina y los niveles de IgA (10).

Por lo menos, debe instaurarse dentro del tamizaje inicial en todo paciente VIH positivo, un recuento

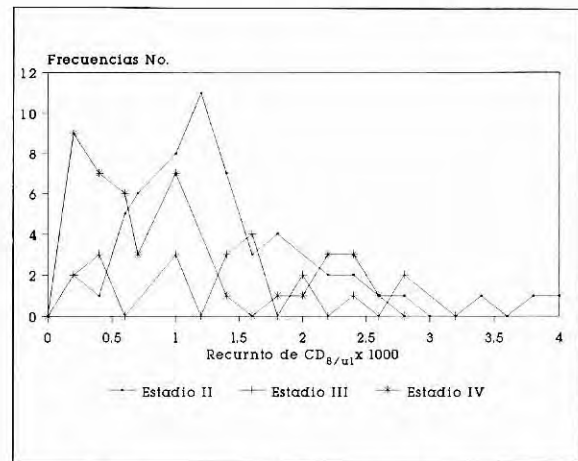


Figura 7. Poblaciones de linfocitos CD8 en VIH positivos de los estadios II, III y IV.

de CD4 y CD8 de rutina; para solucionar el efecto de las fluctuaciones en los recuentos puede optarse por realizar dos recuentos durante el mismo día. Sin embargo, dado los costos del recuento de CD4 y CD8, su utilidad en nuestro medio es limitada, sólo se realiza en contados laboratorios clínicos y no es asequible a todos los pacientes. Aquí, el problema del individuo VIH positivo no sólo es la innumerable cantidad de complicaciones generadas por su estado de inmunosupresión sino el alto costo de las pruebas necesarias para su adecuada evaluación, seguimiento y tratamiento temprano.

No obstante, es urgente conducir nuevos esfuerzos hacia la implementación de las técnicas diagnósticas y de monitoreo, como en el caso de los recuentos de CD4 (para lo cual puede emplearse la técnica APAAP como alternativa), enfocados a un mejor manejo del VIH positivo. La técnica APAAP es útil en cuanto representó una técnica confiable, específica, menos costosa y relativamente sencilla, comparada con la técnica convencional de inmunofluorescencia directa frecuentemente utilizada en nuestro país.

Asimismo, es importante anotar que el conocimiento en nuestro medio del comportamiento de los marcadores humorales o serológicos de inmunidad, podría ser útil en caso de no poder acudir al recuento de CD4 o en el caso en que se pretenda efectuar un análisis más completo del estado inmune del paciente.

Agradecimientos

Expresamos nuestra gratitud a la enfermera jefe Nory Sánchez, a Laura Alvarez, bacterióloga del ISS por su colaboración y, muy especialmente, al doctor Hernán Ramírez de la Universidad del Valle por brindarnos sus conocimientos.

Bibliografía

1. **Valenti WM.** HIV/AIDS. Effective case management in managed health care. 1992.
2. **Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, et al.** CD4 count as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1989; 11:223.
3. **Friedland GH.** Early treatment for HIV: the time has come. *N Engl J Med* 1990; 323:1000.
4. **Erber WM, Mason DY, Pinching AJ.** Immunocytochemical detection of T and B cell populations routine blood smears. *Lancet* 1984; 12:1042.
5. **Horsburgh CR.** Immunologic evaluation of persons infected with human immunodeficiency virus. *Lab Clin Med* 1989; 10:61.
6. **Goff LK, Habeshaw JA, Rose ML, et al.** Normal values for the different classes of venous blood mononuclear cells defined by monoclonal antibodies. *J Clin Pathol* 1985; 38:54.
7. **Wong GW, Hui MBBS PR, Path MRC, et al.** Enumerating T cell subsets on blood smears: an evaluation of an indirect immunalkaline phosphatase method. *Am J Clin Pathol* 1986; 86:756.
8. **Chang SW, Katz MH, Hernández SR.** The new AIDS case definition. *JAMA* 1992; 267:973.
9. **CDC.** Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance. Case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* 1993; 6:729.
10. **Lifson AR, Hessol NA, Buchbinder SP.** Serum b-2 microglobulin and prediction of progression to AIDS in HIV infection. *Lancet* 1992; 339:1436.