

DETECCION DIRECTA DE LA INFECCION POR VIH 1 Y VIH 2 EN INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS MEDIANTE LA AMPLIFICACION DEL ADN

Marcelo Nazábal, Ricardo Silva, Jorge Machado

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, C. Habana, Cuba.

Recibido en diciembre de 1992. Aprobado en junio de 1993

Key words: PCR, HIV-1, HIV-2, peripheral mononuclear blood cells

RESUMEN

En el trabajo se detectaron las secuencias provirales del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) del tipo 1 y 2 en el ADN proveniente de células mononucleares extraídas de sangre periférica aisladas de individuos seropositivos al VIH 1. Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, donde se usaron como cebadores secuencias conservadas de la región del gag que se encuentran en ambos tipos de virus. La señal se detectó por "Southern Blot" y las sondas fueron oligonucleótidos con secuencias específicas para cada tipo viral. Se evaluaron doce individuos, de los cuales once fueron positivos al VIH 1 y uno al VIH 2, no se encontraron falsos positivos ni falsos negativos.

SUMMARY

We report here the identification of HIV 1 and HIV 2 proviral sequences in DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells of persons seropositive to HIV 1. By means of polymerase chain reaction, using conserved and specific pair of primers from the gag region in both viruses and Southern blot hybridization procedures for the identification of HIV type present, twelve samples were evaluated. Eleven of them were positive to HIV 1 and the other was positive to HIV 2.

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH 1) y el tipo 2 (VIH 2) son los responsables del desarrollo del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y otras infecciones oportunistas asociadas a la enfermedad (Chiu *et al*, 1985).

La forma más común de diagnosticar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana es por vía serológica, lo que no significa que realmente el individuo esté infectado, aspecto que puede ser demostrado sólo por el aislamiento del virus y no obstante existen casos de individuos ya enfermos a los que no se les ha podido aislar el virus (Ou *et al*, 1988).

El número de linfocitos de sangre periférica infectados por el virus es uno por cada diez mil (Harper *et al*, 1984). Con la aparición de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987), donde el ADN o ARN a detectar

puede ser amplificado millones de veces (Schochetman *et al*, 1988), se logra una sensibilidad suficiente para determinar la presencia del ADN provírico en los linfocitos de los individuos infectados, de hecho, esta técnica ha sido utilizada con ese objetivo previamente (Hart *et al*, 1988; Kwok *et al*, 1987; Ou *et al*, 1988 y Rayfield *et al*, 1988).

Se analizaron doce individuos seropositivos seleccionados al azar, de los cuales ocho eran del sexo masculino y cuatro del sexo femenino, y cuatro muestras de individuos seronegativos.

El objetivo de este trabajo es demostrar la presencia del genoma de los virus VIH1 y VIH2 en los linfocitos de sangre periférica aislados de individuos seropositivos al VIH1 mediante el PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de las células mononucleares periféricas

A partir de tres mililitros de sangre periférica heparinizada, se purificaron los linfocitos por gradiente de ficol. Y se resuspendieron en 1ml de tampón Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8.

Extracción del ADN

Se purificó a partir de 100 µl de células por extracción con fenol (Maniatis *et al*, 1989).

Amplificación del ADN

En la reacción se añadió 1 µg de ADN cromosómico de las muestras, en un volumen de 100 µl con 40 pmoles de cada oligonucleótido cebador, SK 100 y SK 104 (Rayfield *et al*, 1988) (ver tabla 1), 200 pmoles de cada dNTP (dCTP, dATP, dGTP y dTTP) y tampón Tris-HCl 10 mM, pH=8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, gelatina al 0.02 % concentración final, y 5 U de Tth ADN polimerasa (Carballeira *et al*, 1990) (Heberlab, Cuba) y se le colocó una fina capa de parafina líquida. Se realizaron treinta ciclos en un programador automático de temperaturas (HYBAID, Inglaterra). La programación fue la siguiente: Un ciclo 94°C 3 min, 55°C 10 seg y 72°C 30 seg, veintiocho ciclos cambiando el tiempo a 15 seg. para 94°C y un último ciclo donde el tiempo de extensión a 72°C fue de cinco minutos.

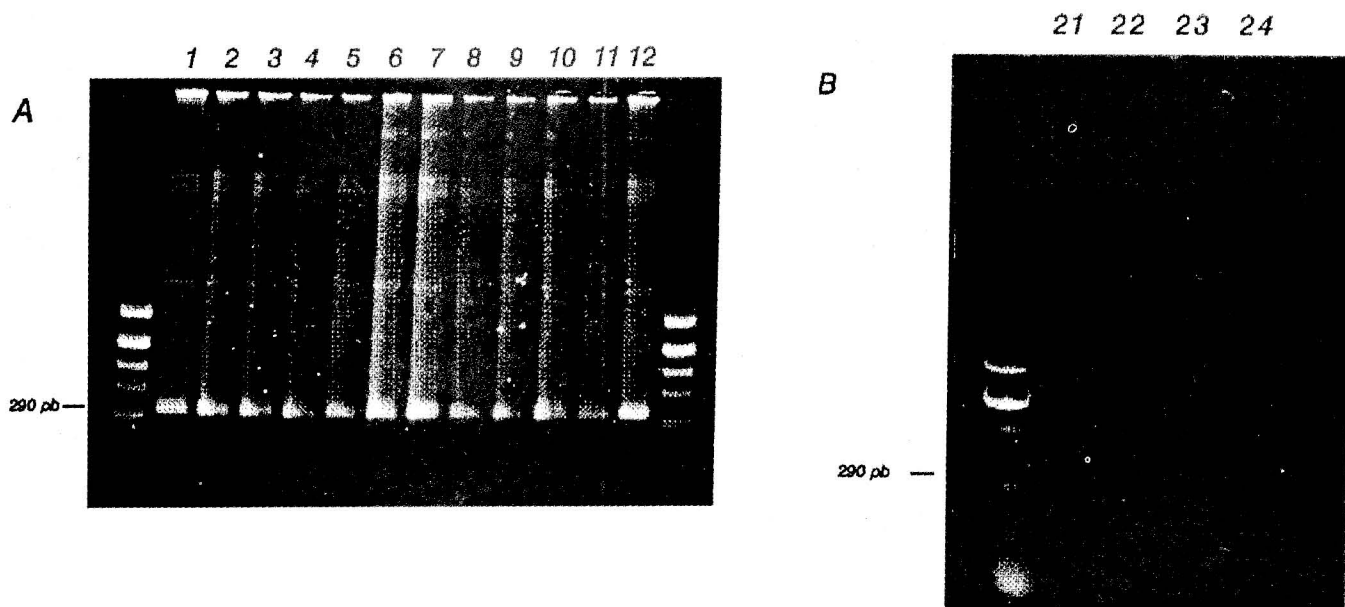


Fig. 1.- Electroforésis en gels de agarosa de los productos del PCR.

A.- Muestras de los individuos seropositivos. De izquierda a derecha: Patrón de peso molecular pBR322 digerido con AluI, muestras de la 1 a la 12 y pBR322 digerido con AluI.

B.- Muestras de individuos seronegativos. De izquierda a derecha: Patrón de peso molecular pBR322 digerido con AluI, muestras de la 21 a la 24.

Marcación de los Oligonucleótidos

Se mezclaron 100 ng de los oligonucleótidos SK 19 y SK 19' o los SK 109 y SK 109' (Rayfield *et al.*, 1988) (tabla 1), en un volumen de 10 µl, se calentaron a 94°C durante 3 min., se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego se añadió a la mezcla de reacción, que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7 . MgCl₂ 50 mM,

0.01 % de seroalbumina bovina libre nucleasas (Hebertec, Cuba), 20 µCi de alfa- d ATP³² (Amersham, Inglaterra) y 1 U de ADN polimerasa fragmento Klenow (Hebertec, Cuba) en un volumen final de 25 µl. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min. y luego se purificó la sonda por Sephadex G- 25 fine (Pharmacia, Suecia) según (Maniatis *et al.*, 1989). La actividad específica obtenida fue de 4x10⁸ cpm/mcg de sonda.

Tabla 1

Secuencias de los oligonucleotidos utilizados como "primers" y como sondas . Su localizacion en el genoma del VIH 1 y VIH 2.

Oligo	Secuencia	Localización		
			VIH 1	VIH 2
" primers"				
SK100	ATCAAGCAGCCATGCAAAT	gag	1377-1395	1132-1150
SK104	CCTTTGGTCCCTGTCTTATGTC	gag	1646-1667	1401-1422
sondas				
SK 19	ATCCTGGGATIAAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC	gag	1505-1635	
SK 19'	TAGGGCTATACATT			
SK 109	AGATAGTATTGCAGAAGTGTGTGAGGATGTACAACCGACC	gag		1351-1391
SK 109'	GGTCGGTTGTACATC			

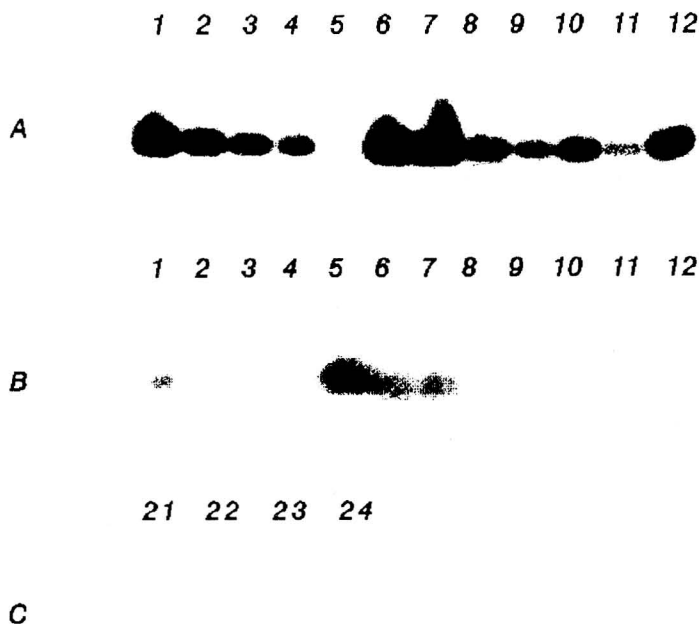


Fig. 2.- Análisis de las doce muestras de individuos seropositivos y las cuatro negativas luego de amplificadas por PCR. Southern blot de los productos del PCR usando los cebadores SK 100 y SK 104.

A.- Autorradiografía de las muestras de seropositivos, utilizando como sonda el SK19, específico para VIH 1

B.- Autorradiografía de las muestras de seropositivos, utilizando como sonda el SK 109, específico para VIH 1

C.- Autorradiografía de los controles negativos, utilizando como sondas una mezcla de los oligonucleótidos SK 19 y SK 109, específicos para VIH 1 y VIH 2 respectivamente

"Southern blot"

Se tomaron 10 µl de la reacción de PCR y se aplicaron en un gel de agarosa al 1 % (FMC, EEUU), el gel luego fue transferido a un filtro de Nylon Hybond-N (Amersham, Inglaterra) según la recomendación de los fabricantes. El filtro se prehibridó a 42°C durante 1 hora en bolsas de nylon que contenían una solución de 4X SSC, 5X Denhardt's, 0.5 % SDS y 20 % Formamida, luego se añadió la sonda (tabla 1) desnaturalizada, 5 min a 94°C, a razón de 2x10⁶ cpm/ml, se dejó hibridar a 42°C durante 2 horas. Los lavados se realizaron con 2X SSC, 0.2 % SDS a temperatura ambiente por 20 min., dos veces. El filtro se expuso a películas fotográficas para rayos X durante 2 horas a -70°C.

Ensayos inmunoenzimáticos

Estos se realizaron según las instrucciones de los fabricantes, para el VIH 1 se usó el juego de reactivos RECVIH variante KC-01 (HeberBiotec, Cuba) y para el VIH 2 el juego de reactivos ELAVIA (Instituto Pasteur, Francia)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación de genes es una herramienta poderosa para la detección de secuencias de ADN que se encuentran en pequeñas cantidades, por lo que su uso en el diagnóstico de infecciones virales es cada vez mayor (Schochetman *et al*, 1988).

Luego de realizar el PCR a las muestras, una fracción del producto de la reacción se analizó por

electroforesis en gels de agarosa. En todas las aplicaciones correspondientes a los individuos seropositivos se observaron bandas de talla 290 pb

Tabla 2
Correlación de los resultados obtenidos con el PCR y con los ELISA para la detección del VIH 1 y el VIH 2

Muestras	ELISA		PCR	
	VIH1	VIH2	VIH1	VIH2
1	+	+	+	-
2	+	+/-	+	-
3	+	-	+	-
4	+	+	+	-
5	+	+	-	+
6	+	-	+	-
7	+	-	+	-
8	+	+	+	-
9	+	+	+	-
10	+	-	+	-
11	+	+	+	-
12	+	+	+	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-

(figura 1A), que era la esperada según el diseño de los cebadores (tabla 1). En el caso de las muestras de individuos seronegativos no se observó ninguna banda, figura 1B. La aparición de una banda con la talla esperada en la electroforesis en agarosa de los productos de la reacción del PCR, no es una demostración de que el resultado es positivo (Schochetman *et al*, 1988), en nuestro caso para confirmar los resultados escogimos el "Southern Blot" dada su sensibilidad y especificidad. En la figura 2 se muestran los resultados de este. Por tanto el ADN provírico del VIH 1 está presente en las muestras de la 1 a la 4 y de la 6 a la 12. Además en el caso de la muestra 5, la secuencia proviral amplificada pertenecía al VIH 2 y no al VIH 1.

La técnica más utilizada para el diagnóstico de la infección por VIH es el EIA, por lo que la usamos para comparar los resultados con el PCR. Los resultados se muestran en la tabla 2. Es conocido que existe reacción cruzada entre los anticuerpos contra las principales proteínas de ambos virus (Foucault *et al*, 1987; Rey *et al*, 1987; Weiss *et al*, 1988), especialmente cuando se usan lisados virales fijados a la placa. El juego de reactivos utilizados para detectar el VIH 1 utiliza las proteínas p24 y p41 del VIH 1, lo que justifica que la muestra 5 siendo positiva para VIH 2, resultara positiva para el VIH 1. En el juego de reactivos utilizado para el VIH 2 se utiliza el lisado vírico, por lo que se entiende la coincidencia con el VIH 1 respecto a la positividad de las muestras. No en todos los casos evaluados para VIH 2 ocurrió lo mismo, ya que esta reactividad cruzada depende también de la respuesta inmunológica del individuo a las proteínas virales.

Al comparar los resultados obtenidos por PCR y por EIA (tabla 2) y considerando la mayor especificidad del PCR, donde no influyen los problemas anteriormente mencionados y en el que además se utiliza la hibridación con sondas específicas, podemos concluir que la muestra 5 es positiva solo al VIH 2 y el resto son falsos positivos.

El PCR ha demostrado ser una técnica sensible y específica, por lo que puede ser utilizada en el diagnóstico de la infección por VIH 1 y VIH 2 permitiendo demostrar la presencia real del virus y no la exposición a este como ocurre con el EIA.

REFERENCIAS

- Carballeira, N.;M, Nazábal;J, Brito y O. Garcia (1990). Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB 8, useful in polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 9: 276- 281.
- Chiu, I.;A, Yaniv;J.A. Dahlberg;A. Dazit;S.F. Skuntz;S.R. Tronick and S.A. Aaronson. (1985) Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature*. 317: 366- 368.
- Foucault, C.;O. Lopéz;G. Jourdan;J.J. Fournell;P. Perret y J.C. Gluckman. (1987) Double HIV 1 and HIV 2 seropositivity among blood donors. *Lancet*. 1: 165-166.
- Harper, M. H.;L.M. Marselle;R. C. Gallo y F. Wong-Staal. (1984) Detection of lymphocytes expressing human T-Lymphotropic virus type III in lymphoid nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 772-776.
- Hart, C.;T. Spira;J. Moore; J.J. Sninsky;G. Schochetman;A. Liftson; J. Galphin y C-Y. Ou. (1988) Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. *The Lancet*. 596-599.
- Kwok, S.;D.H. Mack; K.B. Mullis;B. Poiesz;G. Ehrlich;D. Blair; A. Friedman-Kien y J. J. Sninsky. (1987) Identification of Human immunodeficiency virus sequences by using *in vitro* enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J. Virology*. 61: 1690-1694.
- Kwok, S. and J.J. Sninsky. (1989) Application of PCR to the detection of human infectious diseases. En: *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*. Ed. Ehrlich, H. Stockton Press. 239.
- Maniatis, T.;E.F. Fritsch and J. Sambrook. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mullis, K.B. and F.A. Faloona. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. En: *Methods in enzymology*. Ed. Ray Wu. Academic Press. Inc. 155:335
- Ou, C-Y;S. Kwok;S.W. Mitchell;D.H. Mack;J.J. Sninsky;J.W. Krebs; P. Feorino;D. Warfield and G. Schochetman. (1988) DNA amplification for direct detection of HIV 1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*. 239: 295-297.
- Rayfield, M.; K. De Cock; W. Heyward;L. Goldstein; J. Krebs; S. Kwok; S. Lee;J. Mc Cormick;J. Moreau;K. Odejouri;G. Schochetman;J. J. Sninsky and C-Y, Ou. (1988) Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: Demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J. Infectious Dis.* 158: 1170-1176.
- Rey, M.A.;P.M. Girard;M. Harzic;J.J. Madjar;F. Brun-Vezinet and A.G. Saimot. (1987) HIV 1 and HIV 2 double infection in french homosexual male with AIDS related complex. *The Lancet*. 1: 388- 389.
- Schochetman, G.;C-Y, Ou y J.W. Jones. (1988) Polymerase chain reaction. *J. Infectious Dis.* 158: 1154-1157.
- Weiss, R.A.;P.R. Clapham; J.N. Weber;D. Whitby;R.S. Tedder;T. O'Connor;S. Chomaret and L. Montagnier. (1988) HIV 2 sera cross-neutralize HIV. *AIDS*. 2: 95-100.