

# DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH MEDIANTE LA RCP EN MUESTRAS DE SANGRE SECA EN PAPEL DE FILTRO

✉ Felipe Rolo Gómez, Jorge Mato Luis, Madeline Blanco de Armas, Héctor Díaz Torres y Ana Luisa Lubián Caballero

Laboratorio de Investigaciones del SIDA, Apartado 23031, La Habana 14, Cuba.

## ABSTRACT

Blood sampling on filter paper has many advantages to detect antibodies to HIV. To evaluate this method for the detection of proviral DNA by the polymerase chain reaction (PCR) technique we have studied 50 dried blood samples from HIV-1 seropositive individuals including children born from HIV infected women, and 60 samples from normal blood donors. The 92 % of seropositives were positive with the PCR technique, no positives were found among seronegative people. The PCR technique was useful to elucidate the perinatal infection. The applied procedure allowed us to detect proviral DNA from dried blood spots on filter paper.

**Key words:** polymerase chain reaction (PCR), HIV-1, dried blood spots

*Biotecnología Aplicada 1996;13:105-108*

## RESUMEN

La sangre seca en papel de filtro constituye una muestra adecuada para la detección de anticuerpos contra el VIH. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar su utilidad en la detección del ADN proviral. Se estudiaron 50 muestras de sangre seca de seropositivos al VIH-1, entre las cuales se incluyeron niños nacidos de madres seropositivas; conjuntamente se estudiaron 60 muestras procedentes de donantes de sangre voluntarios. El 92 % de los seropositivos analizados resultaron positivos por la técnica de RCP, no se encontró positividad entre los seronegativos, el seguimiento clínico y serológico de los niños confirmó la utilidad de esta técnica para evaluar la infección perinatal en los casos estudiados. El procedimiento empleado resultó útil en la detección del ADN proviral a partir de la sangre seca en papel de filtro.

**Palabras claves:** reacción en cadena de la polimerasa, VIH-1, sangre seca en papel de filtro

## Introducción

La técnica de coleccionar sangre en papel de filtro facilita la realización de programas seroepidemiológicos porque simplifica el traslado de las muestras desde lugares distantes hasta un laboratorio central sin necesidad de refrigeración ni cuidados especiales, implica un menor riesgo biológico, además de facilitar su almacenamiento y conservación sin que se afecte la estabilidad. Debido a estas características, este tipo de muestra se utiliza en programas de detección precoz de diferentes enfermedades de origen genético y metabólico en niños recién nacidos, ya que no se requiere punción venosa y la cantidad de sangre necesaria es pequeña (1, 2). En el diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha utilizado con bastante éxito la sangre colectada en papel de filtro para la detección de anticuerpos específicos antivirales (3-5), lo cual permite establecer la seroprevalencia de anticuerpos en la población estudiada, sin embargo, no permite diferenciar en el caso de los niños, si los anticuerpos detectados son de origen materno o propios, por lo que se necesitan otras técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) que establece el criterio de infección mediante la demostración del ADN proviral. La RCP tiene también utilidad en aquellos casos en que el patrón serológico resulta indeterminado, como por ejemplo

en la seroconversión temprana. En trabajos recientes se reporta la detección del ADN proviral a partir de sangre seca en papel de filtro, en muestras preparadas con una línea celular infectada diluida en sangre total seronegativa y en muestras clínicas procedentes de niños nacidos de madres seropositivas o a partir de discos de papel de filtro embebidos en sangre tomada con anticoagulante (6-8). En el presente trabajo nos propusimos estimar la efectividad del procedimiento para la extracción del ADN a partir de sangre seca en papel de filtro, adaptado para las condiciones de realización de la RCP en nuestro laboratorio, utilizando por primera vez muestras clínicas de adultos seropositivos asintomáticos tomadas directamente por punción digital.

## Materiales y Métodos

### Pacientes

Se seleccionaron 41 individuos seropositivos asintomáticos que se encontraban bajo seguimiento clínico y serológico, los cuales dieron su aprobación para el estudio, y 9 niños entre 6 meses y 2 años de edad nacidos de madres seropositivas para los que se pidió el consentimiento de los padres y que fueron objeto de seguimiento por 2 años. Paralelamente se estudiaron 60 donantes de sangre voluntarios, sero-

1. National Committee of Clinical Lab. Standards C. Colección de sangre en papel de filtro para programas de screening neonatal. NCCLS 1990;8:7-10.

2. Bickel HC, Bachman C and Beckers E. Neonatal mass screening for metabolic disorders. Eur J Pediatr 1981; 137:133-139.

3. Lillo F, Varnier O and Mantia E. Detection of HIV-1 antibodies in blood specimens spotted on filter paper. Bulletin of the World Health Organization 1992;70:323-325.

4. Beebe J and Griggs LC. Evaluation of Enzyme Linked Immunoassay Systems for detection of Human Immunodeficiency virus type 1 antibodies from filter paper disk, impregnated with whole blood. J Clin Microbiol 1990;28:808-812.

5. Everengard B and Linder E. Filter paper sampling of blood infected with HIV: Effect of heat on antibody activity and viral infectivity. Brit Med J 1988; 297:6657.

6. Cassol SN and Salas LT. Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the polymerase chain reaction and dried blood spots specimens. J Acq Immunodef Synd 1992;5:113.

negativos al VIH. El estudio serológico de las muestras se realizó mediante un ELISA (Vironostika anti HTLV-III) y la confirmación mediante Western blot con el estuche Davih-Blot.

#### Obtención de la muestra

La muestra de sangre para papel de filtro se obtuvo por punción con lanceta estéril, previa desinfección, del pulpejo del dedo pulgar en los adultos y del área del calcáneo en los niños. Luego de coleccionar la sangre en los discos de 1 cm de diámetro del papel de filtro No. 903 (Schleicher and Schuell), éstos se dejaron secar a temperatura ambiente y se conservaron en una desecadora hasta su procesamiento. La obtención de sangre venosa y el aislamiento de células mononucleares para el procedimiento original de RCP se realizó según Ou, *et al.*, (9).

#### Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó mediante una modificación de la técnica empleada por Cassol, *et al.* (8), según se describe a continuación. La elución de la sangre total por incubación de los discos de papel de filtro (2 por cada muestra) se realizó en 1 mL de solución amortiguadora para la digestión enzimática, que contenía tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 2 % y 0,3 µg/mL de proteínaasa K, con incubación a 37 °C durante toda la noche. La sangre eluida y digerida se pasó a un tubo limpio donde se añadieron 5 µg de ARN de transferencia de *E. coli* como portador y se hizo extracción con igual volumen de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1); la fase acuosa se trató de igual forma por segunda vez y por último se trató sólo con cloroformo. Estos pasos de extracción fueron dados sin empleo de vortex. El sobrenadante se pasó a otro tubo donde se precipitó el ADN durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación lenta en 2 volúmenes de etanol al 100 % más 1/3 de volumen de acetato de amonio 2,5 M y 10 µL de sílica Base Binder (Applied Biosystems). Para recuperar el ADN precipitado en la resina se centrifugó 5 min a 100'000 rpm, el sedimento se resuspendió en 30 µL de agua destilada y se incubó 30 min a 42 °C, se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se aplicó sobre un ultrafiltro MC (Millipore), este paso se repitió y ambos sobrenadantes (60 µl) se unieron y conservaron a -20 °C hasta su análisis. La extracción del ADN a partir de las células mononucleares se realizó sin modificaciones de la técnica original (10). La calidad y recobrado del ADN en ambos casos se comprobó en gel de agarosa al 0,8 % (Sea Plaque) teñido con bromuro de etidio.

#### Amplificación del ADN

La RCP se realizó a partir de alícuotas (25 µL) del sobrenadante hervido a 100 °C durante 10 min enfriado en hielo a 4 °C, recalentado a 80 °C y unido

con la mezcla de reacción precalentada, para un volumen final de 100 µL que contenía Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, Tween 20 0,25 %, Nonidet P-40 0,25 %, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM cada uno, 200 pmol de cada oligonucleótido y 2,5 U de Taq Polimerasa (Perkin Elmer Cetus). Se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos: el SK145/SK150 que reconoce la secuencia de consenso en el gen *gag* del VIH-1 y 2 (10) y el SK38/SK39 que reconoce solamente secuencias del gen *gag* del VIH-1, ver Tabla 1 (9, 11). En cada amplificación se incluyó un control positivo, que contenía entre 6 y 10 copias de un ADN proviral para evaluar la sensibilidad y reproducibilidad de la prueba, así como un control de reactivos (mezcla de reacción sin ADN) y un control negativo de ADN de linfocitos no infectados. La reacción de amplificación se realizó en un equipo automático regulable para ciclos de temperatura (Hybaid), siguiendo un programa con tres temperaturas en que ocurre la desnaturalización, el alineamiento de los oligonucleótidos y su extensión, el cual se aplicó de la siguiente forma:

Para los oligonucleótidos SK 38/39, 1 ciclo a 95 °C, 56 °C y 72 °C, 1 min en cada paso, respectivamente, 30 ciclos a 95 °C -1 min, 56 °C -30 s y 72 °C -1 min y 1 ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C. Un programa similar en que sólo se varió la temperatura de alineamiento en 2 grados más, es decir, 58 °C, se utilizó para los oligonucleótidos SK145/150. En las mismas condiciones se realizó la RCP a partir de 1 µg de ADN extraído del lisado de las células mononucleares según el procedimiento utilizado tradicionalmente en nuestro laboratorio a partir de sangre obtenida con anticoagulante. Todas las muestras fueron amplificadas con los 2 juegos de oligonucleótidos y para ser considerada como positiva una muestra, debió cumplir el requisito de ser positiva con ambos juegos (9).

Los productos de amplificación se observaron en gel de agarosa (Sea Plaque) al 0,8 % y 1/3 de cada reacción se sometió a hibridación en solución con sondas marcadas (SK102/SK19) que identifican respectivamente sendas secuencias internas en las regiones marcadas por los 2 juegos de oligonucleótidos descritos anteriormente. Las condiciones de hibridación fueron las mismas que se emplean en la técnica tradicional (9). Para evitar contaminaciones se tomaron en cuenta las recomendaciones de Kwok (12). Los productos de la hibridación se separaron en gel de poliacrilamida al 10 % y se detectaron mediante autorradiografía con pantalla intensificadora durante toda la noche a -70 °C.

## Resultados y Discusión

#### Calidad y recobrado del ADN

El recobrado de ADN logrado por nosotros a partir de la sangre seca en papel de filtro, utilizando la si-

7. Yourho J. Direct polymerase chain reaction for detection of human immunodeficiency virus in blood spots residues in filter paper after elution of antibodies: An adjunct to serological surveys for estimating vertical transmission rates among human immunodeficiency virus antibody positive newborns. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1364-1367.

8. Cassol S, Salas T and Arella M. Use of dried blood spots specimens in the detection of human immunodeficiency virus type 1 by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:671.

9. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW and Mack DH. DNA amplification for direct detection of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988;238:295-297.

10. Ehrlich EK and Kwok S. Detection of human immunodeficiency virus. PCR protocols: A guide to methods and applications. Part Four. *Diagnostics and Forensics* 1990;337-347.

11. Krone WJA, Sninsky JJ and Goudsmit J. Detection and characterization of HIV-1 by polymerase chain reaction. *J Acq Immunodef Synd* 1990; 3:517-524.

12. Kwok S, Higuchi KR. Avoiding false positive with PCR. *Nature (London)* 1989;339:237-238.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados como cebadores y sondas en la RCP.

Oligonucleótidos (orientación)	Secuencia	Posición
SK 38 (+)	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	1 541-1 578
SK 39 (-)	TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATGC	1 665-1 638
SK 19 (+)	ATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC	1 595-1 635
SK 145 (+)	AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	1 366-1 395(1) 1 121-1 150(2)
SK 150 (-)	TGCTATGTCACTCCCCTGGTTCTCTC	1 507-1 480(1) 1 259-1 232(2)
SK 102 (+)	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGAT	1 403-1 435(1) 1 158-1 190(2)

lica (Base Binder) durante la precipitación y haciendo la extracción orgánica sin el empleo de vortex, fue de 0,8 µg, estando al mismo nivel que el reportado por Cassol *et al.*, (8); esto fue posible aun cuando sólo empleamos 2 filtros de 1 cm de diámetro por cada paciente, por lo que consideramos que las modificaciones realizadas en este trabajo garantizan mayor eficiencia en el recobrado de ADN, así como su adecuada integridad, lo cual permitió su ulterior amplificación. Yourno (7) en 1993 reportó el empleo de los filtros de sangre seca para la extracción de ADN, luego de haber sido utilizados para la detección de anticuerpos, aunque los valores alcanzados fueron inferiores a los reportados por Cassol *et al.*, (8). Estos autores emplearon como medida de control de calidad, para el ADN genómico obtenido del papel de filtro, una técnica de amplificación y detección por hibridación con sondas marcadas, previo a su amplificación específica para el VIH. En nuestro caso esto no fue necesario y solamente utilizamos la tinción con bromuro de etidio (Figura 1, resultado tipo) para comprobar que el ADN recobrado era adecuado y en cantidad suficiente para su empleo en la RCP.

El hecho de que el ADN genómico obtenido del papel de filtro sea amplificado previamente para secuencias específicas del genoma humano, habla a favor de su calidad y de la ausencia de posibles inhibidores en la muestra; no obstante, la representatividad de dicha muestra para la detección del VIH sigue siendo dependiente de la cantidad de partículas virales (blanco) que pudieran estar presentes en la sangre periférica del paciente; debido a esto la optimización de la RCP y la reproducibilidad de sus resultados con los controles adecuados, deben garantizar la no ocurrencia de falsos negativos, ya que otras medidas como las mencionadas anteriormente, pudieran emplearse en aquellos casos con resultados discrepantes o indeterminados en la RCP, pero no deben incluirse de rutina en el laboratorio, pues encarecen aún más esta técnica que ya de hecho no resulta accesible a todos.

#### *Sangre seca vs. sangre fresca*

En relación con la RCP, los resultados alcanzados con las muestras colectadas en papel de filtro, demostraron que el nivel de sensibilidad y especificidad fue equivalente al logrado con la muestra tradicional, ya que en ambos casos, del total de 50 seropositivos analizados, 46 fueron positivos con ambos juegos de oligonucleótidos y solamente 4 muestras resultaron negativas al no observarse el producto de amplificación esperado con ninguno de los dos juegos de oligonucleótidos empleados y su correspondiente sonda, dichas muestras negativas corresponden a 4 de los niños estudiados. En la Figura 2 se observan los resultados de la RCP a partir de papel de filtro, con el juego de oligonucleótidos SK 38/39 a manera de ejemplo.

Las 60 muestras de donantes seronegativos fueron negativas. Estos resultados demuestran que el procedimiento empleado para la extracción del ADN a partir de la sangre seca fue eficiente y pudiera ser aplicado para estudios en muestras clínicas tanto en niños como en adultos. En el caso de los adultos, este es el primer trabajo que agrupa muestras clínicas, tomadas directamente por punción digital en diferentes hospitales, para luego ser trasladadas al Laboratorio de Referencia donde fueron procesadas. En trabajos anteriores estas condiciones habían sido simuladas (8) y se reportaban resultados superiores con la RCP en papel de filtro, con respecto a la muestra tradicional, por lo que se planteaba la necesidad de ampliar estos estudios, con fines de demostrar el valor diagnóstico y pronóstico de la técnica con respecto a otras pruebas como las serológicas. En nuestro estudio podemos afirmar que hubo una buena correlación entre los resultados con ambas RCP, el cual fue del 100 %.

#### *RCP en papel de filtro y correlación clínico-serológica*

Al comparar los resultados de la RCP en papel de filtro con la serología, observamos que hubo discrepancia en los 4 casos mencionados anteriormente

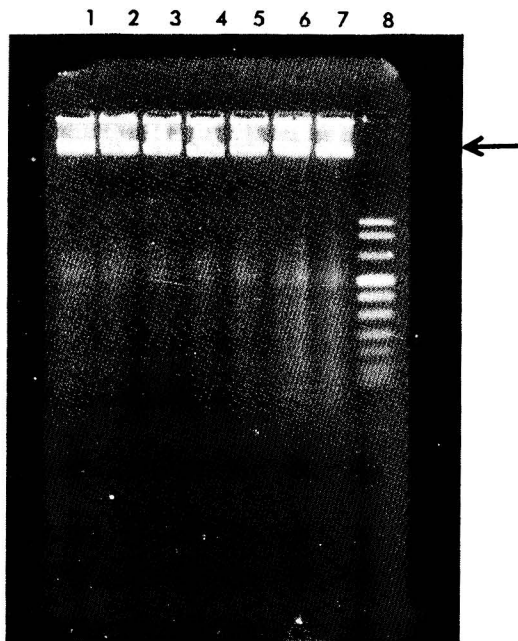
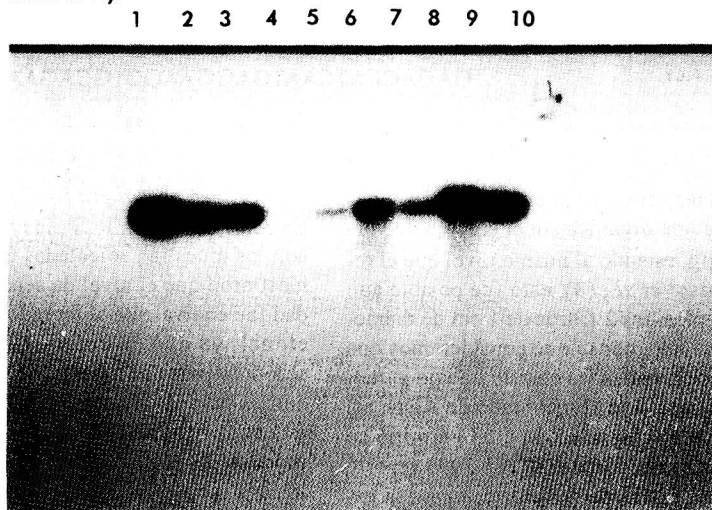


Figura 1. Gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio. La flecha indica el ADN recohrado de las muestras en papel de filtro. A la derecha se observa el PPM cuya banda superior es de 1 114 pares de bases y tiene una concentración de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Figura 2. Autorradiografía de los productos de la RCP realizada con los oligonucleótidos SK 38/39. Las líneas de la 1 a la 3 son diluciones del control positivo (ADN) de una línea celular infectada por el VIH-1, la línea 4 corresponde al control de reactivo (mezcla de reacción sin ADN), las líneas 5-9 corresponden a la banda de amplificación de muestras de ADN de sangre seca en papel de filtro, de los 5 niños que resultaron positivos, con talla de 115 pb, línea 10 control negativo (ADN de linfocitos no infectados).



correspondientes a 4 de los niños estudiados, esto pudiera atribuirse a que realmente no estaban infectados sino que se trataba de una transferencia pasiva de anticuerpos anti-VIH maternos lo que se comprobó posteriormente con el seguimiento serológico y clínico de dichos niños, en los cuales el patrón de reactividad en el Western blot se fue modificando hasta una total serorreversión y su estado de salud actual es satisfactorio, por lo que se consideraron como seronegativos al concluir este estudio. De los 5 niños que resultaron positivos por ambas RCP, 2 continúan en fase de seguimiento pues siguen siendo positivos de acuerdo al patrón de reactividad de Western blot, los 3 restantes evolucionaron como verdaderos infectados y 1 de ellos falleció.

Estos resultados coinciden con los de otros autores que han encontrado una estrecha correlación entre la presencia del ADN proviral en sangre periférica y la de los anticuerpos específicos antivirales en el suero o plasma de las personas analizadas (13-16); de igual forma se reporta el empleo del papel de filtro con resultados satisfactorios en el esclarecimiento de la infección en los niños nacidos de madres seropositivas (6). Como resultado del incremento que existe en la transmisión heterosexual del

VIH, actualmente la población femenina y los niños nacidos de mujeres infectadas constituyen uno de los grupos más importantes entre los pacientes con SIDA, la OMS estima que para el año 2000 alrededor de 20 millones de mujeres estarán infectadas por VIH y 10 millones de niños adquirirán esta infección por vía perinatal (3); la mayoría de estas infecciones ocurrirán en países del Tercer Mundo, por lo cual resulta de interés el empleo de técnicas que faciliten la toma de muestra y el traslado de las mismas hacia los laboratorios con fines de investigar y apreciar el impacto que se va produciendo en las diferentes regiones y poder trazar estrategias para aliviar las necesidades de salud. La RCP a partir de sangre seca en papel de filtro pudiera jugar un papel importante en el estudio de esta problemática a nivel mundial.

El procedimiento empleado por nosotros resultó eficiente para la detección del ADN proviral, tanto en los adultos seropositivos asintomáticos como en los niños nacidos de madres seropositivas, por lo que pudiera ser utilizado en estudios posteriores sobre transmisión vertical. Se requieren otras investigaciones para evaluar su posible uso en los estudios sobre caracterización genética del VIH.

13. Karen KY, James B and Winters RE. Detection of HIV DNA in peripheral blood by the polymerase chain reaction: A study of clinical applicability and performance. *AIDS* 1990;4:389-391.

14. Sninsky JJ and Kwok S. Detection of human immunodeficiency viruses by the polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:259-262.

15. Krivine A, Yakudima A, Le May M and Peña Cruz V. A comparative study of virus isolation polymerase chain reaction and antigen detection in children of mothers infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1990;116:372-376.

16. Williams P, Simmonds P, Lee Yap, and Balfe P. Polymerase chain reaction in the diagnosis of vertically transmitted HIV infection. *AIDS* 1990;4:393-398.