AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE VIH-1 Y TÍTULO DE ANTICUERPOS CONTRA P24 EN SEROPOSITIVOS CON PROGRESIÓN RÁPIDA Y LENTA A SIDA

✉ Enrique Noa, Leonor Lobaina, Marta Dubed, Olga L Vilarrubia, Héctor M Díaz, Orfelina Rodríguez, Ana L Lubián, Maricela Izquierdo y Leonor Navea

Laboratorio de Investigaciones del SIDA. Apartado postal 23031. Marianao 14. Ciudad de La Habana. Cuba. Telf: (53-7) 78 3274; Fax: (53-7) 24 1682.

ABSTRACT

The cytopathogenicity and replicative capacity of the HIV-1 isolates with the serological marker of anti p24 antibodies (Abp24) in serum, the co-infection with other human retroviruses, and the clinical evolution to AIDS were correlated in our study. The virus was isolated in all patients showing rapid progression to AIDS, most of the strains were of a high rapid growth and sincitium inducing, while virus recovery was lower in the long term survivors, and the cytopathogenecity of the isolated strains increased with the appearance of clinical symptoms. A high correlation between the Abp24 serological marker in the serum and the biological properties of the isolated strains was observed.

Key words: HIV, isolation, biological characterization, Abp24 titer, human retroviruses, clinic evolution

Biotecnología Aplicada 1997; 14:233-236

RESUMEN

En este estudio se relaciona la citopatogenicidad y capacidad replicativa de los aislamientos de VIH-1 con el marcador serológico de anticuerpos contra la p24 (Acp24) en suero, la coinfección con otros retrovirus humanos y la evolución clínica al SIDA. El virus se aisló de todos los pacientes con progresión rápida al SIDA, y la mayoría de las cepas se caracterizaron por ser de crecimiento rápido alto e inductoras de sincicios, mientras el recobrado de virus fue menor en los sobrevivientes de largo período y la citopatogenicidad de las cepas aisladas se incrementó con la aparición de manifestaciones clínicas. Se observó correlación entre el marcador serológico de Acp24 en suero y las características biológicas de las cepas aisladas.

Palabras claves: VIH, aislamiento, caracterización biológica, título de Acp24, retrovirus humanos, evolución clínica

Introducción

La historia natural de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se caracteriza por su variabilidad en la duración del período libre de síntomas, el cual está determinado por factores del hospedero y/o viral. Dos determinantes de la interacción virus-hospedero parecen jugar un mayor papel en la patogénesis del VIH: el fenotipo biológico del virus y el nivel de replicación del mismo. También influyen diferencias, determinadas genéticamente en el huésped, y la coinfección con otros virus (1-5).

El análisis de las características biológicas (capacidad replicativa y citopatogenicidad) de cepas de VIH ha mostrado la variabilidad entre aislamientos obtenidos de diferentes individuos y en un mismo paciente en varios momentos de la infección, las cuales están altamente relacionadas con la severidad de la infección en el seropositivo (1, 6, 7).

Los marcadores serológicos (disminución de niveles de anticuerpos contra la proteína 24 (Acp24) y el aumento en la detección del antígeno p24 (Agp24), los niveles de Neopterina y β_2-microglobulina en el suero, la disminución del número de células T CD_4^+, el desplazamiento del perfil de citoquinas de Th_1 a Th_2), y las características biológicas de las cepas, permiten predecir la evolución clínica de un seropositivo al VIH (2, 7-10).

En este estudio se describe el aislamiento y la caracterización biológica de las cepas que infectan a un grupo de seropositivos a anticuerpos contra VIH-1, con rápida y lenta progresión al SIDA.

Materiales y Métodos

Pacientes

Se tomó sangre periférica con anticoagulante de 20 pacientes con anticuerpos (Ac) contra el VIH-1, que se encontraban en diferentes estadios clínicos de la infección.

✉ Autor de correspondencia

1. Rayfield MA. HIV culture. In: AIDS testing. A comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issue. Eds. Shochetman GS and George JR. Springer-Verlag. New York, 2nd Ed. 1994; Cap 7:129-140.

2. Lange J, Wolf F, Goudsmit J. Markers for progression in HIV infection. AIDS 1989;3(Suppl.):158-160.

3. Nielsen C, Pedersen C, Londgren JD, Gerstoft J. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. AIDS 1993;7:1035-1040.

4. Tersmette M, Schuitemaller H. Virulent HIV strain?. AIDS 1993;7:1123-1125.

5. Schwartz D, Sharma V, Busch M, Weinholdk M, Matthews T, Lieberman J *et al.* Absence of recoverable infectious virus and unique immune response in asymptomatic HIV+ long-term survivor. AIDS Res Human Retrov 1994;10:1703-1711.

6. Asjo B; Albert J; Karlsson A, Morfeld-Manson L, Biberfeld G, Lidman K, Fenyo M. Replicative propertiers of Human Immunodeficiency Virus from patients with varying severity of HIV infection. Lancet 1986;II:660-662.

Diez de estos pacientes evolucionaron a SIDA en menos de 3 años, determinado por el tiempo transcurrido desde su posible fecha de contagio hasta que aparecieron los primeros síntomas que los clasificaban en grupo IV, por lo que se consideraron como progresores rápidos (PR) (11).

Diez seropositivos se consideraron como sobrevivientes de largo período (SLP), por tener más de 8 años de infectados, 5 de ellos en el momento de la toma de muestra presentaban manifestaciones clínicas menores de enfermedad que los clasificaban como grupo IV, progresores típicos (PT), mientras los otros 5 permanecían asintomáticos, constituyendo el grupo de posibles no progresores (PNP) (11).

Estudios seroepidemiológicos

El suero de los pacientes, correspondiente al día de la toma de muestra, se estudió para determinar Ac contra VIH-1, VIH-2 y HTLV-I/II, por los sistemas Vironostika HIV mixt (Organon, Holanda), ELAVIA II (Diagnostic Pasteur, Francia) y DAVIH HTLV-I (DAVIHLAB, Cuba), respectivamente, y se confirmaron por las técnicas de *immunobloting* de DAVIH BLOT (DAVIHLAB, Cuba); NEW LAV BLOT II (Diagnostic Pasteur, Francia) y DAVIH BLOT HTLV-I (DAVIHLAB, Cuba). Además se realizó la titulación de Ac contra la proteína p24 en suero, empleando el estuche DAVIH AcP24 (DAVIHLAB, Cuba).

Se recopilaron los datos de cada paciente de la fecha probable de infección, el tiempo que demoró en desarrollar las manifestaciones clínicas de la enfermedad, forma de contagio y número de contactos.

Aislamiento viral

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los pacientes, obtenidas por gradiente de Ficoll-Paque, se estimularon con fitohemaglutinina (DAVILAB FHA, Cuba) y se cocultivaron en relación 1:1 con CMSP de donantes seronegativos sanos previamente estimulados con FHA, en medio RPMI-1640 suplementado con interleucina 2 (IL-2), polibrene y suero fetal bovino (SFB) al 10 %.

El cocultivo se mantuvo por 28 días y se monitoreó una vez por semana la presencia de Agp24 en el sobrenadante libre de células utilizando un ELISA de captura de Agp24 (DAVIH Agp24, Cuba).

Se usó como criterio para considerar un aislamiento positivo que 2 pruebas de Agp24 fueran reactivas, con un incremento de la concentración de Agp24.

Caracterización biológica

Los sobrenadantes de los cocultivos positivos se inocularon en CMSP de donantes sanos y en las líneas celulares linfocíticas (CEM, JURKAT-TAT y MT4) y monocítica (U937).

Los cultivos se probaron una vez por semana en un período de 28 días, adicionándoseles células frescas y medio RPMI-1640 suplementado con 10 % SFB y polibrene. El criterio seguido para considerar que un aislamiento se replicaba en las CMSP y/o en alguna de las líneas celulares, fue el mismo que se utilizó para determinar un aislamiento positivo.

Las cepas aisladas se clasificaron a partir de su tropismo celular preferencial (linfocítico y/o monocítico); la cinética de replicación: rápidas altas (RA) y lentas bajas tipo 1 (LB1), tipo 2 (LB2) o tipo 3 (LB3), y por su citopatogenicidad (capacidad de inducir sincicios (IS) o no inducir sincicios (NIS) en la línea celular MT4) (12).

Resultados

En todos los pacientes incluidos en este estudio, la forma de contagio fue por vía sexual. En los de PR predominó la conducta homobisexual, en comparación con los otros 2 grupos. Además es de destacar el número pequeño de contactos sexuales reportados por los pacientes del grupo de los PNP (Tabla 1).

El virus se logró aislar del 100 % de los pacientes con progresión rápida a SIDA (PR), y en los sobrevivientes de largo período (SLP) de un 50 % (5 de 10), de los cuales 3 aislamientos se logró de progresores típicos (PT) (Tabla 2).

Todos los aislamientos se replicaron en los cultivos de CMSP de donantes sanos; los que fueron capaces de replicarse en alguna línea celular presentaron un tropismo preferencial por las células de estirpe linfocíticas (Tabla 2), sólo 4 aislamientos de pacientes con PR se replicaron también en la línea celular monocítica U937.

La mayoría de los aislamientos de pacientes PR (8 de 10) se caracterizaron por tener alta producción de Agp24 en los diferentes sustratos celulares em-

7. Tersmette M; Lange JMA; de Goede REY, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PThA *et al.* Association between biological properties of Human Immunodeficiency Virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. Lancet 1989;1:983-985.

8. Forster SM, Asborne LM, Cheingsong-Popov R. Declive of anti p24 antibodies precedes antigenaemia as correlate of prognosis in HIV-1 infection. AIDS 1987;1:235-240.

9. Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, Giorgi JV. The prognosis value of cellular and serologic markers in infection with Human Immunodeficiency virus type 1. New Eng J Med 1990;322:166-173.

10. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of HIV type 1 infection. New Eng J Med 1995; 332:201-208.

Tabla 1. Datos epidemiológicos y título de Acp24 en suero de los pacientes.

Grupo de estudio	Pacientes	Rango (meses)	Forma de contagio		Número de contactos (rango)	Título de Acp24 (rango)
			HB	HT		
PR	10	6-29	7	3	4-14	NR-puro
PT	5	100-112	1	4	1-17	puro-1:250
PNP	5	98-130	0	5	1-3	1:50-1:6250

HB: homobisexual, HT: heterosexual, NR: no reactivo, PR: progresores rápidos, PT: progresores tipicos, PNP: posibles no progresores.

Tabla 2. Relación entre el estadio clínico de la infección y la posibilidad de aislar el virus y el tropismo celular de sus cepas.

Grupo de estudio	Aislamiento		Tropismo celular				
	Positivo	Negativo	CMSP	CEM	JURKAT-TAT	MT4	U937
PR	10	0	10	6	8	8	4
PT	3	2	3	2	2	2	0
PNP	2	3	2	0	0	0	0

PR: progresores rápidos, PT: progresores típicos, PNP: posibles no progresores.

pleados, desde los primeros monitoreos, por lo cual se clasificaron como LB3 o RA (Tabla 3, Figura 1).

Las cepas aisladas de los PT presentaron un comportamiento no uniforme, 2 se caracterizaron por una alta producción de Agp24 en las líneas celulares y una solo se replicó en los cultivos primarios con baja concentración de Agp24. Los aislamientos obtenidos de los PNP (Tabla 3, Figura 1) presentaron este último comportamiento.

Al analizar la citopatogenicidad de las cepas aisladas en cuanto a su capacidad de inducir sincicios en la línea celular MT4 (Tabla 3), se observó que las 8 cepas de los pacientes con PR que se replicaron en esta línea celular indujeron sincicios; no así las cepas aisladas de los PT, donde sólo una de las 2 que se replicaron en ella fue inductora de sincicios.

En los pacientes con PR no se detectó título de Ac contra la proteína p24, sólo el ELISA fue capaz de detectarla en la muestra pura de 3 de ellos. En los SLP el rango de título de Acp24 osciló desde puro hasta 1:6250, estando el título en los PT siempre por debajo de 1:250 (Tabla 1).

En ninguno de los seropositivos se detectó Ac anti VIH-2 o anti HTLV-I/II.

Discusión

El recobrado de virus en cada grupo de estudio (100 % en los de PR y 50 % en los SLP) concuerda con lo publicado en la literatura, donde se ha observado una relación directa entre la severidad de la infección en el hospedero y el porcentaje de recobrado viral, que puede ser hasta 100 % en pacientes con manifestaciones clínicas de SIDA (1, 6, 10, 12).

La probabilidad de aislar el virus se ha asociado al deterioro inmunológico que se observa en los pacientes en grupo IV o SIDA y la antigenemia p24 que acompaña al empeoramiento clínico con una disminución de los títulos de Acp24 en suero o plasma. Como se evidenció en nuestro estudio, en la medida en que estaba más avanzada la evolución clínica los títulos de Acp24 se hicieron más bajos y el porcentaje de recobrado de virus aumentó (2, 8, 9, 11, 13).

El tropismo preferencial linfocitotrópico mostrado por nuestras cepas se corresponde con lo planteado por otros autores, quienes refieren que la mayoría de los aislamientos de pacientes con estadio clínico avanzado se multiplican preferencialmente en las líneas celulares linfocíticas. También se ha reportado que la capacidad de replicarse en líneas celulares continuas no es inherente a todos los aislamientos, por lo cual muchos son capaces de replicarse en cultivos primarios, pero no en líneas celulares continuas, incluso cepas aisladas de pacientes en estadio clínico de SIDA (3, 4, 6, 7, 12, 14).

En ninguna de las muestras de suero se detectó Ac contra VIH-2 o HTLV-I/II, por lo cual en este grupo de seropositivos se descartó el posible papel de estos retrovirus humanos en la evolución clínica de los pacientes (4, 15, 16).

Las características observadas en cuanto a la capacidad de replicarse de forma rápida y con altos títulos de Agp24 en los sustratos celulares empleados, así como la capacidad de inducir sincicios en la línea celular MT4, ha reportado que están altamente relacionadas con el estadio clínico de la infección y pueden predecir la posible evolución clínica de un paciente. No obstante, la manifestación de estas características en cultivos *in vitro* puede estar influenciada por los sistemas de cultivo empleados en el aislamiento y expansión de los mismos (3, 5-7, 17).

11. Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. Science 1996;271:324-328.

12. Fenyo EM, Albert J, Asjo B. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. AIDS 1989;3 (Suppl. 1):5-12.

13. Levy JA. HIV pathogenesis and Long Term Survival. AIDS 1993;7:1401-1410.

14. Weiss RA. How does HIV cause AIDS?. Science 1993;260:1273-1279.

15. Montefiori DC, Mitchell WM. Persistent coinfection of T Lymphocytes with HTLV-I/II and HIV and the role of syncytium formation in HIV-induced cytopathic effect. Virology 1987;160:372-378.

16. Soriano V, Gutiérrez M, Gazapo E, Puentes S, Baquero M, González-La Hoz J. HIV-2 infection in high-risk individuals with indeterminate HIV-1 Western blot analysis: a serologic surveillance. Vox Sang 1992;62:244-245.

17. Koot M, Vos AHV, Keet RPM, de Goede REY, Dercksen MW, Terpstra FG *et al.* HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT2 cocultivation assay. AIDS 1992;6:49-54.

18. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho D. Increased viral borden and cytophathicity correlate temporally with CD_4^+ T-Lymphocyte decline and clinical progression in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected individuals. J Virol 1993;67:1772-1777.

19. Richmann DD, Bozzette SA. The impact of the Syncytium-Inducing Phenotype of Human Immunodeficiency Virus on Disease Progression. J Inf Dis 1994; 169:968-974.

Tabla 3. Cinética de replicación y capacidad de inducir sincicios de las cepas aisladas en relación con el estadio clínico de la infección.

Grupo de estudio	Cinética de replicación				Capacidad	
	LB1	LB2	LB3	RA	IS	NIS
PR	2	0	2	6	8	2
PT	1	0	1	1	1	2
PNP	2	0	0	0	0	2

PR: progresores rápidos, PT: progresores típicos, PNP: posibles no progresores, LB1: cepas lentas bajo tipo 1, LB2: cepas lentas bajo tipo 2, LB3: cepas lentas bajo tipo 3, RA: cepas rápidas altas, IS: cepas inductoras de sincicios, NIS: cepas no inductoras de sincicios.

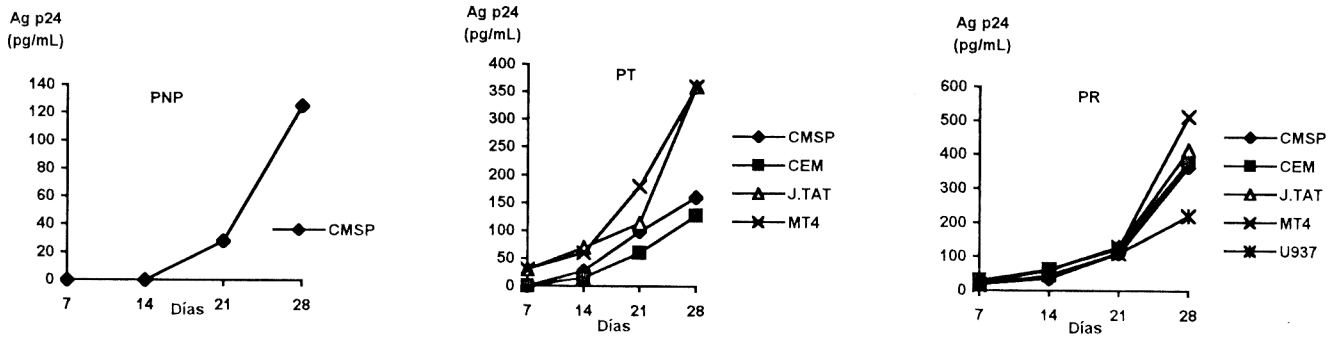

Figura 1. Niveles de Agp24 en sobrenadantes de cultivos primarios y líneas celulares continuas. Los datos son la media de los aislamientos capaces de replicarse en cada una de las células.

La citopatogenicidad de las cepas que infectaban a los pacientes con progresión rápida a SIDA, así como la vía de contagio y número de contactos de cada paciente, pudiera explicar la evolución tórpida de estos pacientes y el fallecimiento de todos ellos entre 3 y 4 años posteriores a su posible fecha de contagio (3, 4, 7, 11, 12, 18, 19).

Las cepas aisladas de los PNP presentaron características biológicas poco citopáticas y la carga viral resultó baja. Esta observación coincide con la de otros investigadores en estudio de estos seropositivos, quienes han llegado a la conclusión de que, generalmente, los bajos títulos de virus con características NIS, unido a altos títulos de anticuerpos anti p24 y a propiedades genéticas e inmunológicas de cada persona, permite que éstos permanezcan por un largo período sin presentar síntomas de la infección (2, 5, 7, 9-11, 13, 20).

20. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF *et al.* Studies in subjects with long-term non progressive human immunodeficiency virus infection. New Eng J Med 1995;332:209-216.

Recibido en septiembre de 1996. Aprobado en abril de 1997.