

Niveles de carga viral plasmática en pacientes cubanos infectados por el VIH

✉ Felipe M Rolo Gómez, Héctor M Díaz Torres, Madeline Blanco de Armas, Alely Gessa Abreu, Ana L Lubián Caballero, Maricela Izquierdo Márquez

Laboratorio de Investigaciones del SIDA. Carretera de Tapaste y Autopista Ocho Vías. San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 57 41 52; E-mail: cicdc@infomed.sld.cu

RESUMEN

Las pruebas para medir los niveles de carga viral en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o enfermos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), constituyen un marcador virológico de mucha utilidad que, junto a otras pruebas como la detección de Ag p24 y el conteo de células CD4/CD8, permiten establecer un pronóstico sobre la evolución del proceso infección-enfermedad prácticamente en cualquier etapa. Esto favorece una atención individualizada del paciente en relación con la terapéutica antirretroviral. En este trabajo se analizan, por primera vez, los valores de carga viral medidos por la concentración del ARN del VIH en el plasma, determinada mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) en un grupo de 50 pacientes cubanos en diferentes estadios de infección por VIH/SIDA. Los resultados se comparan con otros marcadores serológicos y con los hallazgos clínicos. En todos los pacientes analizados fue posible cuantificar la carga viral. Se encontraron valores entre 1×10^3 y 3×10^5 copias de ARN/mL de plasma, y hubo buena correlación entre los niveles elevados de carga viral y el resto de los marcadores analizados.

Palabras claves: ARN, carga viral, infección por VIH/SIDA, marcadores, TR-RCP

Biotechnología Aplicada 2000;17:99-101

ABSTRACT

Plasma Viral Load Levels in Cuban HIV-infected Patients. The evaluation of the viral load in HIV/AIDS patients along with other serological and cellular markers, allows to predict disease progression to clinical acquired immunodeficiency syndrome. It may provide a more accurate individualized regimen of antiretroviral therapies for patients. We have analyzed for the first time a direct method for the assessment of the viral load by measuring HIV-RNA in plasma by RT-PCR, in a group of 50 seropositive Cuban patients in different stages of HIV infection. In all of them we could detect values between 1×10^3 to 3×10^5 of RNA copies/mL of plasma. There was a good correlation with other surrogate markers.

Keywords: HIV/AIDS infection, HIV-RNA, markers, RT-PCR, viral load

Introducción

Hace apenas cinco años que las investigaciones sobre la patogénesis de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), evidenciaron que no era absoluta la supuesta "latencia" en el período asintomático. A partir de ese momento, se establecieron nuevos criterios acerca de la cinética de replicación del virus, al comprobar la ocurrencia de un rápido recambio viral en el plasma asociado a la muerte celular por eliminación de los linfocitos CD4+. Este hecho quedó demostrado en personas con progresión moderada o rápida al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [1, 2].

La necesidad de evaluar la progresión clínica y la respuesta *in vivo* a la terapia antirretroviral —la cual ha experimentado un gran adelanto en los últimos dos años—, han estimulado el empleo de diferentes marcadores sustitutivos para el monitoreo de los pacientes; por ejemplo, los marcadores virológicos, entre los que se encuentran la medición de la carga viral en el plasma y la detección del antígeno p24 (Ag p24). Existen marcadores no virológicos como el conteo de células CD4+ que se emplea frecuentemente, y otros menos extendidos a la práctica clínica como la neopterinina y la β_2 -microglobulina. Estos dos últimos marcadores son menos utilizados por sus limitaciones

de baja sensibilidad y baja especificidad [3-5]. Los métodos directos para evaluar la carga viral tienen una mayor exactitud, debido a que permiten determinar el título de virus en el plasma y en las células mononucleares de la sangre periférica. Esto se puede lograr mediante técnicas de cultivo o a través de la medición de la concentración del ARN viral en el plasma, para lo cual se ha empleado la técnica de síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) [6, 7].

Otros métodos desarrollados para evaluar la carga viral son el sistema de amplificación de la señal con el empleo de un iniciador ramificado (del inglés, *branched DNA [bDNA]*, Chiron Corporation, EE.UU.), y el sistema de amplificación isotérmica (NASBA) desarrollado por Organon Teknika, aunque aún no han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos [8, 9]. Por esta razón, se escogió un sistema comercial basado en TR-RCP (Amplicor HIV-1 Monitor, Roche, PAIS), al cual se le hicieron algunas modificaciones para realizar por primera vez en un grupo de 50 pacientes cubanos en diferentes estadios de la infección por VIH-1, un ensayo de cuantificación del ARN viral. Los resultados se compa-

1. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117-22.

2. Perelson AS, Neuman AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell-life span, and viral generation time. *Science* 1996;271:1582-6.

3. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-70.

4. Boni J, Opravil M, Tomazik Z, Rothen M, Bisset L, Grob PJ, et al. Simple monitoring of antiretroviral therapy with a signal amplification boosted HIV-1 p24 antigen assay with heat denatured plasma. *AIDS* 1997;11(6):F47-F52.

5. MacDougall DS. Redefining the role of HIV viral load monitoring. *J Int Assoc Physicians-AIDS. Care* 1998;4(2):16-21.

6. Dallman MJ, Porter ACG. Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, editors. *PCR 1 a practical approach*. 1st ed. Oxford: IRL Press;1991. p.215-9.

raron con la aparición o no de manifestaciones clínicas, y con otros marcadores.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio transversal en el que se incluyeron 50 pacientes infectados por el VIH-1: 18 clasificados como que padecen SIDA, 9 con infecciones oportunistas menores (no SIDA) y 23 asintomáticos. En todos los casos y de previo acuerdo con el paciente, se tomó una muestra de 10 mL de sangre periférica en tubos con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 0,2 M a pH 7,2 como anticoagulante. La sangre fue trasladada de inmediato al laboratorio y se centrifugó a 1 500 *xg* durante 10 min para obtener el plasma y congelarlo a -20 °C antes de transcurridas 4 h. Otros marcadores empleados fueron la titulación de los anticuerpos contra la proteína de 24 kD del núcleo viral (Ac p24) y la determinación de la concentración de Ag p24. Para estos análisis, se emplearon los estuches de ELISA Davih Ac p24 y Davih Ag p24, respectivamente (Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba), según las instrucciones del fabricante. Los resultados de la titulación de anticuerpos se expresaron como "no reactivos" o "reactivos", para el plasma puro o en las diluciones 1:50, 1:250, 1:1 250 y 1:6 250. Se consideraron títulos elevados los valores de dilución 1:1 250, y títulos bajos los valores 1:250. Los valores de concentración de Ag p24 se expresaron en picogramos por mililitro de plasma (pg/mL).

La medición del ARN viral plasmático se realizó con los reactivos suministrados en el estuche Amplicor HIV-1 Monitor (Roche, PAIS), para la extracción del ARN viral, la síntesis del ADNc por transcripción reversa (TR) y la amplificación mediante RCP de la región de interés en el gen del antígeno de grupo (*gag*) del VIH-1. Para los diferentes ciclos de temperatura, se utilizó un equipo automático modelo PTC-100 (MJ Research, Estados Unidos) que se basa en el mismo principio del efecto Peltier del equipo de la firma comercial Perkin Elmer. Se creó un programa similar al propuesto por el fabricante con sólo algunos ajustes de temperatura, debido a la sustitución de viales de 0,2 mL por los de 0,5 mL empleados en la reacción de amplificación. Las diluciones para la titulación de la muestra se realizaron con pipetas multicanales nuevas y bien calibradas (Finnpipette, LabSystems, Finlandia), y se utilizaron las puntas con filtro resistentes a aerosoles y libres de nucleasas (Barrier Tips, Promega, Estados Unidos). Los lavados posteriores a la etapa de hibridación, se realizaron en un lavador Multiwash Plus (Tri-Continent, EE.UU.). El cálculo de los valores de carga viral se realizó según las instrucciones del prospecto y los resultados se expresaron como copias ARN/mL o log copias ARN/mL. Además de los controles y el patrón de cuantificación suministrados en el estuche de reactivos, se emplearon muestras clínicas conocidas con títulos virales bajos o elevados cuantificados por técnicas de microcultivo.

Para el análisis de la información, se empleó el programa EPI-INFO, mediante el cual se agruparon los datos y se compararon proporciones y grupos según diferentes variables. Se empleó el estadígrafo no paramétrico chi cuadrado. La comparación de las medias se hizo mediante un ANOVA y, para el estudio de corre-

lación entre los valores de carga viral y la antigenemia, se analizaron los datos en un diagrama de dispersión y se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados y Discusión

Fue posible cuantificar la carga viral en todos los pacientes analizados. El método de TR-RCP utilizado como principio en este ensayo cuantitativo, permitió amplificar la región del ARN viral correspondiente al gen *gag* en todas las cepas estudiadas. Los valores de carga viral encontrados para los controles negativo, positivo débil y positivo fuerte del estuche de reactivos, fueron los esperados dentro del rango señalado en el prospecto para cada lote de fabricación, y que aparecen en la tarjeta que acompaña a cada estuche. Este hecho sugiere que los cambios en el equipamiento no afectaron la realización del ensayo. Se ha señalado como una posible limitación de este ensayo que algunas cepas pertenecientes a subtipos virales menos frecuentes que el B, pudieran no ser identificadas debido a que los oligonucleótidos empleados como cebadores se seleccionaron sobre la base de secuencias de cepas del subtipo B [10]. En este trabajo, se analizaron pacientes que se infectaron en Cuba, donde predominan las cepas del subtipo B hasta el momento [11, 12]. Este hecho podría explicar la sensibilidad de 100% que alcanzó la prueba, la cual permitió determinar los niveles de carga viral en todos los casos analizados. Por lo tanto, este ensayo es útil en nuestro medio, donde, en la actualidad, no existe una metodología alternativa para evaluar la carga viral en los pacientes, y el seguimiento se realiza solamente a través del conteo de células CD4+ y de la determinación de Ag p24 y la titulación de Ac p24 con todas sus limitaciones [13, 14].

Los valores de carga viral por encima de 100 000 copias de ARN/mL, se encontraron con mayor frecuencia en pacientes de SIDA (Tabla 1; 5/18, 28%) y sólo en 9% (2/23) de los individuos asintomáticos estudiados. La frecuencia de aparición de niveles bajos de carga viral (< 5 000 copias de ARN/mL), fue mayor en pacientes asintomáticos (11/23, 48%) y menor en enfermos de SIDA o con infecciones oportunistas menores (7/27, 26%). Pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo que posiblemente se debió al tamaño de la muestra y a que el grupo de seropositivos asintomáticos se seleccionó de acuerdo con las necesidades de la asistencia médica (muestra no probabilística). Estos pacientes resultaron ser individuos de diagnóstico reciente en fechas cercanas a la seroconversión o con más de diez años desde la fecha probable de contagio. En ambas situaciones, la carga viral puede estar elevada en ausencia

7. Holodniy M, Katzenstein DA, Sengupta S. Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991;163:826-8.

8. Dewar RL, Highbarger HC, Sarmiento MD, Todd JA, Vasudevachari MB, Davey RT, et al. Application of branched DNA (bDNA) signal amplification to monitor HIV burden in human plasma. *J Infect Dis* 1994;170:1172-9.

9. Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukink R, Dircks M, Adriaanse H, et al. NASBA™ isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Meth* 1991;35:273-86.

10. Alaeus A, Lidman K, Sonnerberg A, Albert J. Subtype specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA. *AIDS* 1997;11(7):859-65.

11. Rolo FM, Miranda L, Wainberg MA, Gu Z, Lobaina L, Noa E, et al. Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995;9:123-5.

12. Martínez N. Genotipificación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante el ensayo de movilidad de heteroduplex (HMA). [disertación] La Habana (Cuba): Universidad de La Habana; 1998.

13. Dewar RL, Sarmiento MD, Lawton ES, Clark HM, Kennedy PE, Shah A, et al. Isolation of HIV-1 from plasma of infected individuals: an analysis of experimental conditions affecting successful virus propagation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5:822-8.

14. Díaz HM, Silva E, Rodríguez O, Bárcenas M, Lubián AL, Joanes J. Uso del ELISA DAVIH Ac p24 en el seguimiento clínico de personas infectadas por el VIH-1. *LABORAT-acta* 1996;8(1):15-8.

Tabla 1. Niveles de carga viral (copias ARN/mL) en diferentes estadios clínicos.

Clasificación clínica CDC/OMS 1987	No. de pacientes (% del total)	No. de pacientes (% del total)		
		< 5 x 10 ³	5 x 10 ³ - 10 ⁵	> 10 ⁵
SIDA n = 18		6 (33)	7 (39)	5 (28)
Grupo IV (no SIDA) n = 9		1 (1)	7 (8)	1 (1)
Grupo II asintomáticos n = 23		11 (48)	10 (43)	2 (9)

Fuente: LISIDA, La Habana, Cuba.

de manifestaciones clínicas. Esto también puede estar relacionado con el perfil serológico observado en este grupo de pacientes, con 91% (21/23) de títulos bajos de anticuerpos anti-p24 (1/250), una prevalencia de antigenemia de 48% y una concentración media de 33 pg/mL (Tabla 2). En estudios que incluyen un número mayor de individuos seleccionados aleatoriamente, se han observado diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia elevada de títulos altos de anticuerpos anti-p24 en pacientes asintomáticos y la frecuencia baja de títulos altos en pacientes de SIDA [14].

En el grupo de pacientes con más de 10 000 copias de ARN/mL, se encontró una frecuencia de antigenemia (20/27, 74%) mayor que entre los pacientes con carga viral menor de 10 000 copias de ARN/mL (6/23, 26%) ($p < 0,0007$). Mellors y colaboradores reportaron resultados similares, aunque este marcador resultó ser menos sensible que la determinación de la carga viral en el plasma [15].

En la Figura, se puede observar que la concentración media plasmática de Ag p24 es mayor en los grupos de individuos con niveles más elevados de carga viral, con una significación estadística $p < 0,01$. Al estudiar la posible correlación entre la concentración plasmática de Ag p24 y los niveles de carga viral, se determinó un coeficiente de correlación $r = 0,41$ con un intervalo de confianza de 95% amplio ($0,15 < r < 0,62$). Esto significa que de alguna manera existe una relación lineal positiva entre las variables, pero la amplitud del intervalo de confianza obliga a interpretar los resultados con precaución, con la posible influencia del sesgo de selección y el tamaño de la muestra. Se consideró necesario profundizar en el estudio de la relación entre la antigenemia y la carga viral en un número mayor de pacientes seleccionados al azar.

Recibido en junio de 1999. Aprobado en noviembre de 1999.

Tabla 2. Perfil serológico de los pacientes estudiados (n = 50).

Clasificación clínica CDC/OMS 1987	Antigenemia p24		Títulos Ac anti p24	
	Prevalencia*	Concentración media	Altos (= 1/1 250)*	Bajos (= 1/250)*
Enfermos n = 27	15 (55)	63,6 pg/mL	4 (15)	23 (89)
Asintomáticos n = 23	11 (48)	33 pg/mL	2 (9)	21 (91)

*Número de pacientes (% del total). Fuente: LISIDA, La Habana, Cuba.

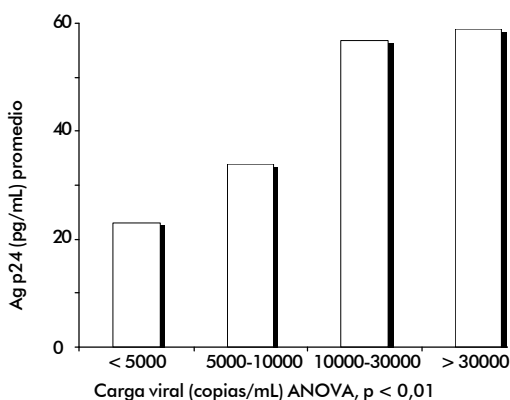


Figura. Concentración media plasmática de Ag p24 a diferentes niveles de carga viral.

De forma general, se puede afirmar que fue útil medir los niveles de carga viral mediante el uso del estuche Amplicor HIV-1 Monitor, lo que mostró una buena correlación con las determinaciones serológicas realizadas a los pacientes estudiados. Los resultados obtenidos avalan el empleo de esta técnica en nuestro medio sin necesidad de hacer inversiones en un equipamiento costoso, debido a que se logró un nivel de sensibilidad adecuado con las modificaciones realizadas y se pudo detectar la carga viral de cada uno de los pacientes.



ISBN 959-235-019-1

Más información en:

Elfos Scientiae

Apartado 6072,

La Habana 6, Cuba.

Tel.: (53-7) 33 1917

Fax: (53-7) 33 1917

E-mail: elfos@cigb.edu.cu

Cultivos transgénicos: hechos y desafíos

Albert Sasson

próximamente

Los productos agrícolas constituyen la base de la alimentación del hombre y los animales que éste emplea en beneficio propio. El surgimiento de la ingeniería genética introdujo la posibilidad de manipular cualidades de las plantas de una manera más asequible para todos los países y con un potencial realmente insospechable. La obtención de plantas transgénicas con nuevas propiedades, aunque es factible económicamente, presenta diversos riesgos y tiene implicaciones éticas y de regulación que deben ser analizadas con cautela.

Albert Sasson aborda ampliamente, con información actualizada, las especies de plantas que han sido modificadas genéticamente y las tendencias en este campo, su contribución al mercado internacional y los aspectos de percepción pública de los productos agrícolas transgénicos, en un libro de lenguaje claro y sencillo que trata un tema de amplio debate internacional en la actualidad. Sin dudas, esta monografía será de gran utilidad a todos los profesionales que trabajan en el sector agropecuario y a aquellos que laboran en las entidades reguladoras que velan por la conservación de la diversidad biológica existente.

URL: <http://www.elfoscientiae.com.cu>