

Artículo original

Optimización de la técnica de PCR reversa para la detección del VIH en plasma de pacientes infectados

Gladys Inocencia Ameli Marcozzi^{a,*}, Cristina del Rosario Gutiérrez García^a, Pierina D'Angelo^b, Héctor Rangel^b

^aLab. de Programas Especiales, Hepatitis y SIDA. Gerencia Sectorial de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas. ^bLaboratorio de Virología Molecular. Centro de Microbiología y Biología Celular, IVIC, Altos de Pipe, Venezuela.

Recibido 8 de noviembre de 2012; aceptado 8 de octubre de 2013

Resumen: Aunque la técnica convencional para el diagnóstico del VIH es la PCR a partir de ADN proviral, la técnica RT-PCR cualitativa podría constituir una herramienta de apoyo en el diagnóstico del VIH en pacientes infectados, ya que una de sus principales ventajas es el uso de muestras de plasma, en lugar de sangre total, lo cual facilitaría su transporte entre las distintas regiones del país. En este estudio se planteó como objetivo evaluar las condiciones óptimas, en cuanto al uso de cebadores y enzima transcriptasa reversa, para síntesis de ADN complementario (RT-PCR) de la región de envoltura del VIH, a partir de muestras de plasma de pacientes VIH positivos. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la utilización de cebadores azarosos, en una mezcla de reacción con la enzima RT "SuperScript"™ TM (200 U/mL), permite maximizar la eficiencia de amplificación del gen de la envoltura de VIH-1, en comparación con cebadores específicos. Esto permite ofrecer una alternativa metodológica a partir de muestras de plasma, para la detección del VIH en aquellas personas que por diversas razones no pueden trasladarse a la institución de referencia.

Palabras clave: transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa, VIH, cebador azaroso, plasma de pacientes.

Optimization of the reverse PCR technique for HIV detection in plasma of infected patients

Abstract: Even though PCR is the conventional technique for HIV diagnosis in proviral DNA, the qualitative RT-PCR technique could constitute a support tool for HIV diagnosis in infected patients since one of its main advantages is the use of plasma samples instead of whole blood, which facilitates its transportation from the various regions of the country. The main objective of this study was the evaluation of the optimal conditions regarding use of primers and reverse transcriptase enzyme, for the synthesis of complementary DNA (RT-PCR) of the HIV sheath in plasma samples of HIV positive patients. The results obtained in this study suggest that the use of random primers, in a reactive mixture with the RT "SuperScript"™ enzyme TM (200 U/mL), allows maximizing the amplifying efficiency of the HIV-1 sheath gene, as compared with specific primers. This offers a methodological alternative using plasma samples for HIV detection in those persons who due to various reasons cannot travel to the reference institution.

Keywords: reverse transcription, polymerase chain reaction, HIV, random primer, patient plasma.

* Correspondencia:
E-mail: gladysameli@hotmail.com

Introducción

Las partículas virales infecciosas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) encapsidan dos cadenas simples de ARN como información genética y en su ciclo de vida ocurre una conversión a ADN denominado provirus, el cual se integra dentro de la célula huésped [1,2].

Las técnicas de biología molecular ofrecen la ventaja de

permitir la amplificación de pocas moléculas de material genético para así obtener niveles detectables de un blanco particular, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) [2], la cual fue descubierta por Kary Mullis en 1983.

En la infección por VIH la técnica de PCR, ha demostrado diversas utilidades tanto en clínica como en investigación [3], tales como:

- Detección directa del virus integrado (ADN proviral), a partir del ADN de células mononucleares de sangre periférica de personas infectadas.
- Detección del virus durante el período de ventana (antes de la generación de anticuerpos específicos para el VIH).
- Resolver el estatus de infección de individuos con prueba de Western Blot indeterminado.
- Prueba de seguimiento y diagnóstico en hijos de madres seropositivas al VIH.
- Diferenciación de la infección entre VIH-1 y VIH-2.
- Definir patrones de transmisión y evolución del virus a nivel poblacional.

Las aplicaciones de la PCR pueden involucrar nuevos procedimientos, así como modificaciones de métodos existentes, como lo es la síntesis de ADN complementario para la realización de la transcripción reversa acoplada a la PCR (RT-PCR). La técnica RT-PCR se utiliza debido a que el ARN no sirve de molde para la reacción de PCR, pues la enzima utilizada durante la reacción es una polimerasa dependiente de ADN (ADN polimerasa), por lo que la PCR debe ser precedida por una reacción de transcripción reversa que convierte el ARN en una copia de ADN complementario o ADNc [4].

El primer paso para la obtención de ADNc consiste en la extracción del ARN total. El ARN es sometido entonces a una reacción de transcripción reversa, que es catalizada por una enzima llamada transcriptasa reversa. Las transcriptasas reversas (RT) son polimerasas de ADN dependientes de ARN [4]. Fundamentalmente se conocen dos tipos de RT disponibles en el comercio: la RT del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y la RT del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV) [5,6].

Aunque en nuestro país la técnica convencional para el diagnóstico del VIH es la PCR a partir de ADN proviral [7,8], la técnica RT-PCR cualitativa podría constituir una herramienta de apoyo en el diagnóstico del VIH en pacientes infectados, ya que una de sus principales ventajas es el uso de muestras de plasma, en lugar de sangre total, lo cual facilitaría el transporte de las muestras entre distintas regiones del país. Según nuestra experiencia en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR), los pacientes que requieren estudios de PCR del VIH, son principalmente niños menores de 18 meses y personas adultas con resultados de pruebas serológicas indeterminadas (pacientes en la fase aguda de la infección, con agammaglobulinemias o pacientes en periodo de ventana después de una exposición viral). En algunos pacientes adultos que requieren la prueba diagnóstica para el VIH y provienen de distintas regiones geográficas del país y no disponen de recursos suficientes para trasladarse al instituto y/o se encuentran hospitalizados, la prueba RT-PCR en plasma podría constituir un método alternativo para la detección del VIH.

Los anticuerpos contra el VIH son detectables en aproximadamente el 95% de los pacientes dentro de los tres meses después de la infección. Aunque una prueba serológica negativa para VIH usualmente indica que la persona no está

infectada, no excluye una infección reciente. Las pruebas virológicas serían útiles en este caso para identificar una infección aguda en personas que son negativas para las pruebas de detección de anticuerpos contra el VIH y tienen un antecedente de riesgo [9].

En la actualidad existen diversas técnicas para la cuantificación de la carga viral del VIH-1, basadas en la amplificación de la señal (ADN-ramificado o "branched-DNA, en inglés) o en la amplificación de la secuencia (RT-PCR en tiempo real, NASBA y LCx) [10], sin embargo estas pruebas no han sido desarrolladas con una especificidad suficiente y pueden causar falsos positivos [11]. En estas situaciones es preferible utilizar otras pruebas genéticas de tipo cualitativo con sensibilidad y especificidad ampliamente demostrada, como el ADN proviral. Sin embargo, existen situaciones especiales en que la determinación de la carga viral se puede usar como diagnóstico de la infección por VIH, como es el caso de niños recién nacidos de madres seropositivas, o en la primoinfección, cuando el diagnóstico serológico está comprometido, debido al periodo de ventana inmunológica durante la fase aguda de la infección. Se considerarán válidos sólo aquellos resultados en lo que el nivel de viremia sea elevado, sino, es preferible descartar la infección mediante el uso de otras pruebas [10].

En el presente estudio se planteó como objetivo evaluar las condiciones óptimas, en cuanto al uso de cebadores y enzima transcriptasa reversa, para la síntesis de ADN complementario (RT-PCR) de la región de envoltura del VIH, a partir de muestras de plasma de pacientes VIH positivos.

Materiales y métodos

Población estudiada: Para la optimización de la RT-PCR se seleccionaron un total de 44 plasmas provenientes de pacientes con serología positiva contra el VIH en edades comprendidas entre 18 y 50 años, referidos al INHRR, cuyos valores de carga viral en plasma resultaron detectables (mayor a 1.000 copias/mL) por la técnica de b-DNA, para el momento del estudio. Adicionalmente, se emplearon 11 muestras de pacientes con serología negativa para VIH como controles negativos. De las muestras con cargas virales detectables, se emplearon 20 muestras con valores bajos de carga viral (1.000 a 10.000 copias/mL, 3-4 log₁₀), 10 muestras con valores intermedios (10.001-35.000 copias/mL, 4-4,5 log₁₀) y 14 muestras con valores elevados de carga viral (>35.000 copias/mL, 4,5 log₁₀) [12].

Este estudio se realizó en el marco de un proyecto titulado "Caracterización molecular del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y su relación con otros virus de hepatitis" y fue revisado por la Comisión de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas en informe del 23 de mayo de 2004 y evaluado por la Comisión Científica del INHRR en reunión del 25 de junio de 2004.

Extracción del ARN del VIH y amplificación por RT-PCR: De la población evaluada se obtuvieron un total de 44 muestras

de sangre venosa usando EDTA al 10% en un volumen de 5 mL como anticoagulante. Las muestras fueron procesadas en un periodo no mayor de 2 horas después de su extracción para la obtención de plasma por centrifugación entre 800 y 1.600 g durante 20 minutos a temperatura ambiente, el cual fue transferido a tubos de polipropileno estériles. Luego el plasma sanguíneo fue sometido a un proceso de extracción de ARN viral mediante micro-columnas de sílica-gel (QIAGEN QIAmp Viral RNA Mini Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. El material genómico extraído fue sometido a una transcripción reversa (RT) y posteriormente se procedió a detectar la presencia o no de ADN viral mediante la técnica de PCR a través de un ensayo a dos rondas (PCR-nested) en el que se utilizaron cebadores altamente conservados de la región génica *env* del VIH-1 que codifica un fragmento de 336 pares de bases (pb) [8]. En la etapa de transcripción reversa (RT) se evaluaron cuatro condiciones diferentes en cuanto al tipo y concentración de la enzima transcriptasa reversa (RT) y de los cebadores utilizados: 1) cebador azaroso o "random primer", en inglés (150 ng) y enzima RT "SuperScript"™ (200 U/uL); 2) cebador específico E105: 3'GCTTTTCCTACTTCCTGCCACS'(región *env*) (10 pmol/uL y enzima RT del virus del mieloblastoma murino (M-MLVRT) (200 U/uL); 3) cebador específico E105 (2 pmol/uL) y enzima M-MLVRT (200 U/uL); 4) cebador específico E105 (2 pmol/uL) y enzima RT "SuperScript"™ (200 U/uL). Una vez obtenido el ADNc se procedió a realizar la amplificación por PCR con los siguientes cebadores externos: en la primera ronda, E80: 5'CCAATTCATACATTATTGTTG3' y E105: 3'GCTTTTCCTACTTCCTGCCAC 5' y en la segunda ronda los cebadores internos: E110: 5'CTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAA 3' y E125: 3'CAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGGG 5'. En ambas rondas, la amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C de desnaturalización, 30 segundos a 55 °C de alineamiento y 60 segundos a 72 °C de extensión. La amplificación se completó con una extensión final de 72 °C, durante 7 minutos. La visualización del producto amplificado, se obtuvo luego de realizar una electroforesis en gel de agarosa al 2% por tinción con bromuro de etidio [8].

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se calcularon los parámetros de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de cada una de las condiciones, utilizando un programa estadístico disponible en: <http://www.alemana.cl/Mbe/bioestadística.html>.

Resultados

Se evaluaron diferentes condiciones en el uso de cebadores y enzima transcriptasa reversa para la síntesis óptima de ADN complementario (RT-PCR) de la región de envoltura del VIH, a partir de muestras de plasma de pacientes VIH

positivos. Los resultados obtenidos en cada condición en cuanto a sensibilidad, especificidad y valor predictivo, se expresan en la tabla 1. La sensibilidad de la condición 1 fue mayor en comparación con el resto de las condiciones (93,5%), mientras que la sensibilidad de las condiciones 2 y 3 fue muy semejante (82,4% y 83,3%, respectivamente), la condición 4 reflejó tener la menor sensibilidad (69,2%). Igualmente se estimó la especificidad del ensayo (RT-PCR) con las diferentes condiciones, en donde el valor de la condición 1 (91,7%) fue muy próximo a la condición 2 (92,3%). Las condiciones 3 y 4 fueron las menos específicas (80,0% y 82,3%, respectivamente).

Tabla 1. Comparación de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de cuatro condiciones para la realización de la técnica RT-PCR en muestras de plasma provenientes de pacientes VIH positivos.

Condiciones evaluadas	Cebador azaroso y SScript	Cebador E105(2pmol/ul) y M-MLVRT	Cebador E105(10 pmol/ul) y M-MLVRT	Cebador E105(2pmol/ul) y SScript
Sensibilidad	93,5%	82,4%	83,3%	69,2%
Especificidad	91,7%	92,3%	80,0%	82,3%
VPP	97,7%	93,3%	83,3%	90,0%
VPN	78,6%	78,6%	80,0%	75,0%

Abreviaturas: SScript: Enzima Transcriptasa Reversa SuperScript; M-MLVRT: Enzima Transcriptasa Reversa del Virus del Mieloblastoma Murino; Cebador E105: Cebador región de envoltura del VIH; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo.

Con respecto al valor predictivo positivo (VPP), se obtuvo un 97,7% al realizar la transcripción reversa con cebador azaroso y la enzima Super script, siendo éste el mayor porcentaje obtenido con relación al resto de las otras condiciones. El valor predictivo negativo (VPN) de las condiciones 1 y 2 fue idéntico (78,6%), mientras que la condición 3 presentó el mayor VPN (80,0%) y la condición 4 presentó el menor VPN (75,0%).

Discusión

En el presente estudio se pudo demostrar que la condición óptima para la realización de la técnica RT-PCR para la detección de la región de envoltura (*env*) del VIH a partir de muestras de plasma, fue la condición 1, es decir, la utilización de la enzima RT "SuperScript"™ (200 U/uL), junto con el uso de cebadores azarosos (150 ng). Es muy probable obtener un resultado verdadero positivo empleando esta condición debido a su mayor sensibilidad en comparación con las otras condiciones. Igualmente, la condición 1 presentó una alta especificidad, al igual que la condición 2, lo que sugiere mayor capacidad para detectar un resultado verdadero negativo. Además, la condición 1 presentó el mayor VPP, por lo que un resultado positivo de la RT-PCR estaría asociado con una alta probabilidad de infección por el VIH. Las condiciones 2 y 4 presentaron un VPP muy próximo, mientras que la condición 3 presentó el menor valor. Aunque la condición 3 presentó el mayor

VPN, indicando que un resultado negativo tendría una alta probabilidad de que el paciente no esté infectado, la condición 1 presentó un valor muy próximo al de la condición 3 y una mayor especificidad.

La extensa variabilidad genética observada en el VIH-1 puede tener relevancia biológica para su patogenicidad, transmisibilidad, desarrollo de pruebas diagnósticas, tratamiento antirretroviral, diseño de vacunas eficaces, y finalmente, la selección de cepas del virus resistente a drogas antirretrovirales [13].

En la actualidad, la presencia de variantes genéticas y subtipos virales puede causar problemas en el diagnóstico por PCR y en la cuantificación de las partículas de VIH-1 en la persona infectada. Estas técnicas están basadas en el uso de sondas o "primers" que han sido diseñados tomando como referencia secuencias del subtipo B del VIH-1. La variabilidad de las secuencias de los aislados de VIH-1 puede ocasionar una unión inestable entre los cebadores y la secuencia blanco correspondiente, lo cual podría originar resultados falsos negativos, o un resultado de carga viral erróneo [14]. En este sentido, el empleo de cebadores azarosos o "random primers" podría ser de gran utilidad, ya que genera un cDNA que puede ser utilizado para la amplificación de cualquier región genómica del VIH. Su uso durante la RT-PCR, tiene la ventaja de permitir la hibridación o unión complementaria del cebador de manera simultánea en distintas regiones en el templado de ARN, lo que a su vez permite la amplificación de múltiples fragmentos diferentes del genoma viral en forma aleatoria, a diferencia del cebador específico que es complementario a una única secuencia blanco [15,16].

La selección del mejor compartimiento sanguíneo para la detección por amplificación genómica del VIH ha sido materia de debate. En algunos estudios, incluyendo un estudio realizado en Venezuela recientemente, se ha encontrado buena correlación entre los resultados obtenidos de la amplificación genómica del VIH, usando dos compartimientos diferentes (células mononucleares de sangre periférica y plasma), no encontrándose diferencia significativa entre los resultados obtenidos, utilizando cebadores de dos regiones genéticas distintas (*env* y *gag*) [17-19].

El método RT-PCR a partir de muestras de plasma podría emplearse como método alternativo para el diagnóstico de la infección por VIH en pacientes que por distintos motivos no podrían acudir al centro de referencia para la realización de la prueba convencional en sangre total (PCR proviral). Sin embargo, un resultado positivo empleando el método RT-PCR no es concluyente, ya que se debe confirmar con una segunda prueba virológica como la determinación de carga viral del VIH en el plasma del paciente.

El uso de cebadores azarosos en la metodología RT-PCR tendría la ventaja de permitir la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral, que a su vez podría ser utilizado para la amplificación de cualquier región genómica del VIH. En nuestro estudio se obtuvo una alta sensibilidad y especificidad en la detección del

VIH por PCR de la región de envoltura, cuando se empleó ADNc obtenido mediante cebadores azarosos. Aunque los cebadores para la amplificación de la región de envoltura están dirigidos a las regiones más conservadas del genoma que codifica para la envoltura viral, se sugiere la realización del estudio usando cebadores específicos para la amplificación de la región *gag* del VIH, ya que constituye una región de muy baja variabilidad genética del VIH.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la utilización de cebadores azarosos, en una mezcla de reacción con la enzima RT "SuperScript"™ (200 U/mL), permite maximizar la eficiencia de la amplificación del gen de la envoltura de VIH-1, en comparación con cebadores específicos, lo que permite optimizar y ofrecer una metodología alternativa mediante pruebas de biología molecular a partir de muestras de plasma en aquellas personas que por diversas razones no pueden trasladarse a la institución de referencia y que se emplearía como herramienta de apoyo para el diagnóstico de la infección por VIH.

Agradecimientos

A la Lic. Dulce Morón y al Prof. Leovigildo García por su valioso aporte.

A FONACIT.

Referencias

1. Kwok S, Sninsky J. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: Persing DH, Smith FC, Tenover TJ, White TJ, editors. Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications. Washington DC: ASM Press; 1993. p. 645-70.
2. Saiki R. The Design and Optimization of the PCR. In: Erlich H, editor. PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. New York: W.H. Freeman and Company. 1992. pp.7-17.
3. Pacheco M, Monzón A. Diagnóstico, pronóstico e interpretación de los resultados de laboratorio en la infección por VIH. Act Cient Soc Venez Bioanal Esp. 2001; 7:24-36.
4. Loureiro C, Devesa M, Pujol F. Reacción en cadena de la polimerasa y aplicaciones en el diagnóstico clínico. Act Cient Soc Venez Bioanal Esp. 2001; 7:17-35.
5. Gerard G, Fox D, Nathan M, D'Alessio J. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. Mol Biotechnol. 1997; 8:61-77.
6. Fuchs B, Zhang K, Rock M, Balander M, Sarkar G. High temperature cDNA synthesis by AMV reverse transcriptase improves the specificity of PCR. Mol Biotechnol. 1999; 12:237-40.
7. Programa Nacional de SIDA/ITS. Guía para el manejo del tratamiento antirretroviral de las personas que viven con el VIH/SIDA en Venezuela. 3ª ed. 2008-2009. Disponible en: www.svinfectologia.com/sida/Guia%20TARV-08.pdf.

Acceso 14 de abril 2010.

8. D'Angelo P, Ameli G, Gutiérrez C. Detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante la PCR, en neonatos de madres seropositivas. Rev Soc Ven Microbiol. 2007; 27:79-84.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases. Treatment Guidelines, 2010. MMWR 2010; 59:1-116.
10. García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011. Disponible en Doi:10.1016/j.eimc.2010.12.006. Acceso 15 de mayo 2013.
11. De Mendoza C, Holguín A, Soriano V. False positives for HIV using commercial viral load quantification assays. AIDS. 1998; 12:2076-7.
12. Mellors J, Muñoz A, Giorgi J, Margolick J, Tassoni C, Gupta P *et al.* Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. Ann Intern Med. 1997;126:946-54.
13. Gutiérrez C. Biología molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Act Cient Soc Venez Bioanal Esp. 2001; 7:9-17.
14. Holgín A, Soriano V. Epidemiología molecular del VIH. En Soriano V, González-Lahoz J, editores. Manual del SIDA. 5ta. ed. Madrid: Permanier; 2003.p.137-149.
15. Feinberg A, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem. 1983; 132:6-13.
16. Davidson College, Department of Biology, 2002. Disponible en: www.bio.davidson.edu/.../randompriming.html. Acceso 13 de marzo 2010.
17. Rangel H, Garzaro D, Fabro R, Fernández D, Gutiérrez C, Martínez N *et al.* Comparative analysis of polymorphisms in the HIV type 1 *pol* gene in the proviral DNA and viral RNA in the peripheral compartment. AIDS Res and Hum Retroviruses. 2009; 25:837-41
18. Chew C, Potter S, Wang Y, Shaw C, Dwyer D, Saksena N. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. J Clin Virol. 2005; 33:206-16.
19. Gutiérrez C, D'Angelo P, Ameli G, Ariza H. Evaluación de dos compartimientos sanguíneos en la determinación genómica del VIH por PCR en Pacientes Venezolanos. En: Libro de Resúmenes: XX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Montevideo. 2010.