

## COMUNICACIONES BREVES

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DEL SIDA (LISIDA)

### Empleo del AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5 en el diagnóstico de la infección perinatal por el VIH-1 en Cuba

Liuber Y. Machado Zaldivar,<sup>1</sup> Madeline Blanco de Armas,<sup>2</sup> Ana Luisa Lubián Caballero<sup>3</sup> y Héctor M. Díaz Torres<sup>4</sup>

#### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** la amplificación del ADN proviral del VIH-1, constituye un método preferencial para el diagnóstico perinatal, empleado en Cuba desde 1992. El estuche AMPLICOR HIV-1 DNA es un ensayo cualitativo *in vitro* para la detección del ADN proviral de VIH-1 en sangre total. **OBJETIVO:** en el presente trabajo se reportan los resultados del empleo de este estuche por primera vez en Cuba para el diagnóstico perinatal de VIH-1. **MÉTODOS:** entre 2005 y 2007 se trabajaron mediante el estuche AMPLICOR HIV-1 DNA 346 muestras de sangre total de niños nacidos de madres seropositivas al VIH-1. **RESULTADOS:** del total de muestras trabajadas, 6 resultaron positivas y 340 fueron negativas. **CONCLUSIONES:** el estuche fue reproducible en las condiciones cubanas y los resultados obtenidos permitieron realizar el diagnóstico y seguimiento de niños nacidos de madres seropositivas.

**Palabras clave:** VIH-1, diagnóstico molecular, prevención de la transmisión vertical de madre a hijo, reacción en cadena de la polimerasa.

La transmisión vertical de madre a hijo constituye una de las vías de infección del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), por lo que un diagnóstico temprano de la entidad posibilitará un accionar médico temprano. Los métodos serológicos empleados para el diagnóstico de la infección no resultan útiles, puesto que los anticuerpos maternos específicos al VIH-1 permanecen en los niños hasta los 18 meses de edad.<sup>1</sup> La amplificación del ADN proviral mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) constituye un método preferencial para el diagnóstico perinatal de la infección por VIH-1 a partir de los

15 d de nacido, porque desde ese instante la detección del ADN integrado presenta 50 % de sensibilidad, que llega a 100 % a los 2 meses de edad, por lo que se recomienda mantener un seguimiento al menos hasta los 18 meses de edad.<sup>2,3</sup> En Cuba comenzó el empleo de la RCP con estos propósitos desde 1992, se utilizó una RCP doméstica que amplificaba el gen *gag* y el sistema de detección era a través de marcaje radiactivo.<sup>4</sup> Posteriormente, en 1996 se comenzaron a amplificar 3 regiones consensos importantes del virus (*gag*, *env* y *pol*) mediante una RCP anidada doméstica, pero la alta manipulación, el consumo de tiempo, así como la

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica. Aspirante a Investigador. Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigador Auxiliar. LISIDA. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Epidemiología. Investigadora Auxiliar. LISIDA. La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Especialista de I Grado en Medicina Interna. Máster en Infectología. Investigador Auxiliar. LISIDA. La Habana, Cuba.

aparición de reacciones inespecíficas, impuso el empleo de estuches comerciales. En este trabajo se reportan los resultados del diagnóstico perinatal de la infección por VIH-1 en Cuba, mediante el empleo del estuche AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5 (*Roche Molecular Diagnostics*).

Entre 2005 y 2007 se trabajaron, mediante el estuche AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5 (*Roche Molecular Diagnostics*), 346 muestras de sangre total de niños nacidos de madres seropositivas comprendidos entre los 3 y 18 meses de edad. Las muestras se colectaron por punción venosa en tubos estériles con EDTA. A partir de 500  $\mu$ L de sangre total se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) según las instrucciones de uso del fabricante.

El ADN proviral se obtuvo a partir de la adición de 200  $\mu$ L del tampón de extracción suministrado por el estuche a las CMSP y posterior incubación por 30 min consecutivos a 60 y 100 °C, respectivamente. Después se adicionaron 50  $\mu$ L de ADN extraído a 50  $\mu$ L de la mezcla de reacción suministrada por el estuche, la cual contiene dATP, dCTP, dGTP, dUTP, AmpErase, AmpliTaq, sales y los cebadores biotinilados SK145 y SKCC1B, específicos para la región *gag* del VIH-1 y un control interno que determina la presencia de inhibidores de la RCP, respectivamente. Para la amplificación del material genético se empleó el termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc), el cual no está referido por el fabricante en las instrucciones de uso, con las condiciones de ciclado siguientes: 2 min 50 °C, 5 ciclos de 10 s a 95 °C, 10 s 52 °C y 10 s a 72 °C, seguido de 35 ciclos de 10 s a 90 °C, 10 s a 55 °C y 10 s a 72 °C, y una extensión final de 15 min a 72 °C. La detección del material amplificado se realizó por el sistema avidina-biotina, mediante el empleo de sondas de hibridación específicas al VIH-1 y al control interno. La lectura de los resultados se realizó a una densidad óptica (DO) de 450 nm y los valores de DO se interpretaron según la instructiva de uso del estuche.

En el transcurso del estudio se obtuvieron 340 (98,27 %) muestras negativas y 6 (1,73 %) muestras positivas al ADN proviral del VIH-1, respectivamente. Los resultados positivos y negativos corresponden a niños a los cuales se les realizó un seguimiento clínico y serológico, según lo establece

el algoritmo para el diagnóstico de la infección perinatal por VIH-1 en Cuba.

*Zjenah* y otros demostraron que el estuche presenta 100 % de sensibilidad y especificidad para la detección de ADN proviral de VIH-1.<sup>5</sup> Su fácil manipulación y la reducción de falsos positivos por la presencia de la N-uracil glicosidasa (AMPERASE®), que cataliza la destrucción del material amplificado de procedimientos anteriores, permite la obtención de resultados certeros y confiables. Además, la incorporación de un control interno en cada muestra, posibilita evaluar el desempeño del usuario y la calidad de los procedimientos de extracción y amplificación del material genético (Manual del usuario del estuche AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5) (*Roche Molecular Diagnostic*, 2005). Estudios realizados en Zimbabwe mostraron la capacidad del estuche para detectar diversos subtipos del grupo M del VIH-1,<sup>5</sup> lo que hace más atractivo su empleo para el diagnóstico de la transmisión vertical de madre a hijo y ensayos clínicos a diferentes terapias, teniendo en cuenta la amplia variedad de subtipos que circulan en Cuba.<sup>6,7</sup> Las muestras a realizarle el diagnóstico perinatal se almacenaron y procesaron según las especificaciones del fabricante, el cual plantea la posibilidad de almacenar la muestra de sangre total a 4 °C hasta 4 d; aunque *Jenning* y otros (2005)<sup>8</sup> demostraron que la sangre puede procesarse hasta 10 d después de colectada, manteniéndola en condiciones ambientales (2 a 25 °C), detectándose la presencia de ADN proviral en las muestras. Una de las bondades del estuche es la posibilidad de procesar poco volumen de sangre total (500  $\mu$ L), se obtienen rendimientos aceptables de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) para la obtención del ADN viral integrado. No obstante, hay reportes en la literatura donde se comparan los resultados obtenidos de la extracción del ADN proviral mediante este estuche, a partir de 100  $\mu$ L contra 500  $\mu$ L, obteniendo 100 % de concordancia entre las muestras negativas y positivas.<sup>9</sup> Para el procedimiento de extracción del ADN proviral, anteriormente se empleaban 10 mL de sangre total en EDTA y la obtención del ADN mediante el método fenol/cloroformo y precipitación etanólica demoraba 48 h, aproximadamente. En cambio, el estuche AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5 permite realizar el procedimiento

completo: procesamiento inicial de la muestra, extracción, amplificación y detección, en 8 h o 2 d de trabajo. El termociclador PTC-100 empleado para la incubación de las muestras en la extracción y la amplificación del material genético, resultó útil en el procedimiento, si bien el fabricante recomienda el empleo de un termociclador Gene Amp PCR System 9700 con placa de oro de 96 pozos de la casa comercial Applied Biosystems, además de otros equipamientos que son necesarios para la extracción y detección del ADN proviral. Aunque hay métodos que permiten al usuario realizar la extracción automática del material genético y su posterior empleo con el estuche,<sup>10</sup> el procedimiento de trabajo es sencillo y consume poco tiempo.

Los resultados del empleo del estuche AMPLICOR HIV-1 DNA test v 1.5 permitieron realizar el seguimiento y diagnóstico de la infección por VIH-1 de niños nacidos de madres seropositivas al VIH-1 en Cuba.

#### Use of Amplicor HIV-1 DNA test v.1.5 in diagnosis of perinatal infection from HIV-1 in Cuba

##### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** HIV-1 proviral DNA amplification is the preferential method for HIV diagnosis infection in infants and it has been used in Cuba since 1992. AMPLICOR HIV-1 DNA kit is an *in vitro* qualitative assay for the detection of HIV-1 proviral DNA in the whole blood. **OBJECTIVE:** this paper showed the results of the use of this kit for the first time in Cuba for the perinatal diagnosis of HIV-1 infection. **METHODS:** three hundred forty six whole blood samples from children of HIV seropositive women were analyzed by the AMPLICOR HIV-1 DNA kit in the period 2005-2007. **RESULTS:** among the tested samples, six were positive, and 340 negative. **CONCLUSIONS:** the assay was reproducible under the Cuban conditions and the achieved results made the diagnosis and follow up of children of HIV-1 seropositive mothers possible.

**Keys words:** HIV-1, molecular diagnosis, mother-to-child transmission prevention, polymerase chain reaction.

##### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rakusan TA, Parrot R H, Sever JL. Limitations in the laboratory diagnosis of vertically acquired HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991;4:116-21.
2. Borkowsky W, Krasinski K, Pollack H, Hoover W, Kaul A, Moore T. Early diagnosis of human immunodeficiency virus infection in children <6 months of age: comparison of polymerase chain reaction, culture, and plasma antigen capture techniques. *J Infect. Dis.* 1992;166:616-9.
3. Cervia J, Kaplan B, Schuval S, Weiss S. Virologic testing in management of perinatal HIV exposure. *AIDS Read.* 2003;13(1):39-46.
4. Berkner KL, Folk WR. Polynucleotide T4 kinase exchange reaction *Eco RI* cleavage and methylation of DNAs containing modified pyrimidines in the recognition sequence. *J Biol Chem.* 1977;252:3176.
5. Zjenah L, Humphrey J, Nathoo K, Malaba L, Zuandasana P, Mahomua A, et al. Evaluation of prototype Roche DNA Amplification Kit incorporating the new SSK145 and SKCC1B primers in detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA in Zimbabwe. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3569-71.
6. Rolo FM, Miranda L, Wainberg M, Gu Z, Lobaina L, Noa E. Envelope V3 region sequence of Cuban HIV-1 isolates. *J Acq Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirology.* 1995;9:122-5.
7. Blanco M, Rolo F, Martínez N, Gessa A, Díaz H, Lubián A. Aplicación del ensayo de movilidad del heteroduplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba. *Biología Aplicada.* 2001;18:149-153.
8. Jennings Ch, Danalovic A, Scianna S, Brabbilla D, Bremer J. Stability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA in Whole-Blood Samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4249-50.
9. Piwovar-Manning E, Lugalia L, Kafufu B, Brooks Jackson J. Comparison of Results Obtained with Amplicor HIV-1 DNA PCR Test version 1.5 using 100 versus 500 Microliters of Whole Blood. *J Clin Microbiol.* 2008;44(3):1104-5.
10. Germer J, Gerads T, Mandrekar JN, Mitchell SP and Yao JDC. Detection of HIV-1 proviral DNA with the AMPLICOR® HIV-1 DNA Test, version 1.5, following sample processing by the MagNA Pure LC instrument. *J Clin Virol.* 2006;37(3):195-8.

Recibido: 21 de septiembre de 2009. Aprobado: 8 de febrero de 2010.

Lic. *Liuber Y. Machado Zaldivar*. Laboratorio de Investigaciones del sida. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. San José de las Lajas. La Habana, Cuba. CP: 32 007. Fax: 574009. Correo electrónico: lisida@infomed.sld.cu; liuberyans@infomed.sld.cu