

32. Salud Humana

Diagnóstico y caracterización del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2 circulante en Uruguay

Montaldo, Natalia; Somma, Silvana;

natimontaldo@gmail.com; ssommas@gmail.com

Orientadora: Dra. Ruchansky, Dora; druchansky@msp.gub.uy

Laboratorio Nacional de Referencia de VIH/SIDA – DLSP- MSP

Facultad de Ciencias, Udelar

Resumen

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae* existiendo dos tipos: VIH-1 y VIH-2 filogenéticamente relacionados. Estos difieren en el diagnóstico y estrategias de tratamiento, siendo de importancia clínica y epidemiológica conocer el tipo de VIH en la persona infectada.

En Uruguay, se diagnosticaron en el Ministerio de Salud Pública, 27 casos de VIH-2 en el período 1997-2005.

Objetivo: Actualizar la información de infección por VIH-2 en personas con serología confirmatoria VIH1/2 positiva, así como el relevamiento de genotipos circulantes entre los años 2012-2017 en Uruguay.

Metodología: Se partió de muestras clínicas (suero y/o sangre total con EDTA) que en los test serológicos confirmatorios por Western Blot VIH-1/2 obtuvieron un resultado reactivo para VIH-2 en el período 2012-2017. Se confirmó la presencia de estos anticuerpos por Western Blot (WB) específico para VIH-2. Para el diagnóstico molecular se partió de la extracción de ADN celular, que fue amplificado por PCR anidada de un fragmento del gen *pol* de VIH-2 (258 nt), así también como una PCR anidada de VIH-1 de un fragmento del gen *gag* (424 nt). Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones, realizando el estudio filogenético con secuencias de referencia para VIH.

Resultados: Veintidós muestras presentaron serología positiva por WB VIH-2, con un patrón de bandas correspondiente a la presencia de anticuerpos contra proteínas de la envoltura, cápside y de la polimerasa. Siete muestras tuvieron las condiciones adecuadas para ser

amplificadas desde ADNproviral. Los resultados obtenidos del análisis filogenético, informan la pertenencia al subtipo A de dicho virus.

Palabras clave: VIH-2, diagnóstico, genotipo, Uruguay.

Introducción y Antecedentes

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) produce una infección crónica en la persona infectada, que sin mediar ningún tratamiento, afecta severamente el sistema inmune, generando el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en los avances de la enfermedad (Simon et al., 2006).

El virus de la inmunodeficiencia humana pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* existiendo dos tipos: VIH-1 y VIH-2 filogenéticamente relacionados (ICTV, 2018). Es un virus con envoltura lipídica en la que se encuentran espículas de glicoproteínas en su superficie y transmembrana. Presenta cápside icosaédrica conteniendo en su interior 2 monohebras de ARN idénticas de sentido positivo, un ARN de transferencia (generalmente Lisina) y 3 enzimas que intervienen en el ciclo replicativo: Retrotranscriptasa (RT), Integrasa (IN) y Proteasa (PR). El ARN viral se replica a través de un intermediario de ADN, denominado ADNproviral, en las células que infecta (Alcami y Coiras, 2001).

El VIH-1 fue caracterizado en 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et., al 1983), diseminándose por todo el mundo, responsable de la pandemia originada en la década de los ochenta (Sharp y Hahn 2010). El VIH-2 fue descubierto en 1985 (Clavel et al., 1986), siendo endémico en África occidental, actualmente se está extendiendo lentamente al resto del mundo (Visseaux et al., 2016).

Según datos del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/sida (ONUSIDA) a finales de 2017 había aproximadamente 36,9 millones de personas infectadas por el VIH en el mundo, y en ese año se produjeron 1,8 millones de nuevas infecciones (ONUSIDA 2018). Se estima que en la actualidad hay aproximadamente 12.684 personas viviendo con VIH en Uruguay (Ministerio de Salud Pública, 2018).

La circulación del VIH-2 se reportó inicialmente en muchos países del continente africano como Gambia, Guinea-Bissau, Ghana, Cabo Verde, Costa de Marfil, Senegal, Sierra Leona y Nigeria (Maueia et al. 2011). También se

ha extendido a otros continentes como Europa principalmente en Portugal, Francia y España, en Asia, India y en el continente americano, Estados Unidos y Brasil (Campbell-yesufu et al., 2011; Visseaux et al., 2016). La causa del mismo puede ser el aumento en la migración de la población, guerras regionales y viajes internacionales (Maueia et al., 2011).

Actualmente el VIH-2 filogenéticamente se clasifica en nueve grupos denominados de la A a la I, siendo el grupo A el prevalente epidemiológicamente (Visseaux et al., 2016).

Los modos de transmisión para el VIH-2 son los mismos que para el VIH-1: transmisión sexual, sanguínea y transmisión vertical (transmisión madre a hijo) (Simon et al., 2006). Sin embargo, el VIH-2 tiene menor capacidad de transmisión y un período de incubación más prolongado hasta el desarrollo del SIDA, considerando su ciclo natural sin intervención farmacológica (MacNeil et al., 2007; Alford et al., 2016). En la actualidad se han demostrado que las cargas virales de VIH-2 son más bajas que las que presenta la infección por VIH-1 en similares etapas (Matheron et al., 2003; Visseaux et al., 2016).

Las infecciones por VIH-1 y VIH-2 difieren en el diagnóstico y requieren diferentes estrategias de tratamiento (Diaz et al., 2005), por lo que es de suma importancia clínica saber qué tipo de infección tiene el individuo. Así también para comprender mejor la transmisión, epidemiología y patogénesis del virus en zonas geográficas donde circulan ambos tipos.

En la década de los 90 la Administración de Alimentos y Medicamentos (en inglés: Food and Drug Administration FDA) validó el primer ensayo para el diagnóstico serológico del VIH-2 y el primer sistema combinado de VIH-1/2 permitiendo la detección simultánea de anticuerpos para ambos virus (Constantine et al., 2006). Se han reportado co-infecciones de VIH-1/2 así como infecciones individuales por VIH-2 (Nsagha et al., 2012).

En Uruguay, fueron reportados por el Laboratorio Nacional de Referencia VIH-SIDA del Ministerio de Salud Pública, 27 casos de VIH-2 en el período 1997-2005. Dichas infecciones fueron diagnosticadas y confirmadas por serología, así también como caracterizados molecularmente estos virus circulantes (Ruchansky, 2009; Ruchansky et al., 2011).

Dada la importancia a nivel clínico y epidemiológico, se plantea en este

trabajo, actualizar los datos de circulación de VIH-2 en Uruguay.

Objetivo

Actualizar la información del diagnóstico y genotipificación de VIH-2 circulante en Uruguay durante los años 2012-2017 a través del uso de diferentes técnicas y abordajes experimentales.

Materiales y métodos

Población en estudio

Muestras clínicas ingresadas al Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP) de suero y/o sangre total anticoagulada con EDTA, cuyos test confirmatorios Western Blot VIH-1/2 (HIV BLOT 2.2 MP Diagnostic) hayan resultado reactivo para VIH-2, entre los años 2012 a 2017.

Metodología

Se realizó la revisión de los patrones de WB VIH-1/2, seleccionando las muestras clínicas, que cumplieran con los criterios de inclusión de la población en estudio, las que fueron conservadas a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

El análisis serológico de las muestras por WB VIH-2 se realizó con el kit comercial NEW LAV-BLOT II (Bio-Rad). Criterio de positividad: Anticuerpos en bandas de env+pol+gag.

La extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre total con anticoagulante EDTA y de plasma, fue realizado con el kit comercial por columna de sílica (QIAamp® DNA Mini Kit y QIAamp® Viral RNA Mini Kit).

La amplificación de ácidos nucleicos se realizó por PCR anidada de VIH-1, partiendo de extractos de ADN, amplificando el fragmento correspondiente al gen *p17* (posición 787-1184 en HXB2 (Korber et al., 2014)), con control interno de un fragmento del gen *CCR5* celular (Ruchansky, 2009).

Para la RT-PCR y/o PCR Anidada VIH-2 se trabajó con los extractos de ADN y/o ARN, según correspondiera, amplificando un fragmento del gen *pol* (Posición 2082 – 2380 en HIV-2_{ROD}) (Pieniazek et al., 1998).

Los fragmentos amplificados fueron analizados en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TBE 0.5X (Tris Borato EDTA) utilizando GelRed™ (Olerup SSP AB, Sweden), siendo visualizados en un transiluminador bajo luz Ultra Violeta (UV).

Para realizar la secuenciación nucleotídica, previamente se purificó el ADN a partir del gel de agarosa mediante un Kit comercial (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), siguiendo las indicaciones del fabricante.

El material de ADN amplificado y purificado fue secuenciado automáticamente en ambos sentidos en un secuenciador Applied Biosystems 3730XL (empresa Humanizing Genomics Macrogen)

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Lasergene SeqMan (DNASTAR®), posteriormente fueron alineadas mediante el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) (con posterior corrección manual), que también fue utilizado para realizar los árboles filogenéticos, los cuales se hicieron sobre la región del genoma secuenciado obtenido, incluyendo las secuencias de referencias extraídas de la base de datos públicos GenBank (Benson, et al., 2005). Los resultados obtenidos fueron así mismo trabajados con el programa HIV Databases (HIV Databases, 2018).

Resultados y discusión

Resultados Serológicos

Veintidós muestras presentaron serología positiva por WB VIH-2, diferenciándose 8 patrones de bandas correspondiente a la presencia de anticuerpos contra proteínas de la envoltura, cápside y de la polimerasa (Figura 1).

Ocho muestras fueron agrupadas en el patrón 1, presentando anticuerpos contra todas las proteínas de la tira. Dos muestras fueron agrupadas en el patrón 2, presentando todos los anticuerpos contra las proteínas de la tira excepto gp36. Cinco muestras fueron agrupadas en el patrón 3, presentando todos los anticuerpos contra las proteínas de la tira excepto gp36 y gp140. Dos muestras fueron agrupadas en el patrón 4, presentando los anticuerpos contra las proteínas de la tira p26, p34, p68 y gp105. Una muestra fue agrupada en el patrón 5, presentando los anticuerpos contra las proteínas de la tira p26, p34, gp105 y gp140. Una muestra fue agrupada en el patrón 6, presentando todos los anticuerpos contra las proteínas de la tira excepto p16 y gp140. Dos muestras fueron agrupadas en el patrón 7, presentando los anticuerpos contra las proteínas de la tira p26, p34 y gp105. Una muestra fue agrupada en el patrón 8, presentando los anticuerpos contra las proteínas de la tira p26, p34, gp36 y p68.

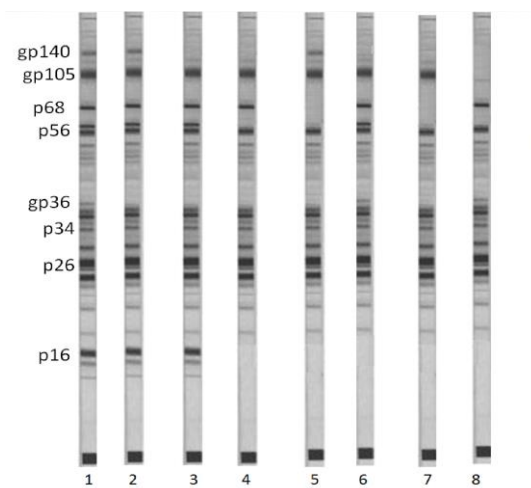


Figura 1. Patrones de bandas WB VIH-2 de anticuerpos presentes en las muestras analizadas. **Patrón 1:** gp140, gp105, p68, p56, gp36, p34, p26, p16, **Patrón 2:** no está presente gp36, **Patrón 3:** no está presente gp36 y gp140, **Patrón 4:** gp105, p68, p34, p26. **Patrón 5:** gp140, gp105, p34, p26. **Patrón 6:** gp105, p68, p56, gp36, p34, p26. **Patrón 7:** gp105, p34, p26. **Patrón 8:** p68, gp36, p34, p26

Resultados moleculares

Siete muestras tuvieron las condiciones adecuadas para ser amplificadas desde ADNprovincial, todas presentaron una confirmación molecular por VIH-2 mediante una PCR anidada amplificando un fragmento del gen *pol* (Posición 2082 – 2380 en HIV-2_{ROD}) y además una muestra presentó confirmación molecular por PCR anidada VIH-1 amplificando el fragmento correspondiente al gen *p17* (posición 787-1184 en HXB2) (Tabla 1).

Análisis filogenéticos

Las secuencias utilizadas en el análisis filogenético incluyeron 4 secuencias pertenecientes al fragmento amplificado de la región del gen *pol* y secuencias de referencia presentes en la base de datos GenBank. Dichas secuencias fueron alineadas y corregidas manualmente para posteriormente realizar el árbol filogenético (Figura 2).

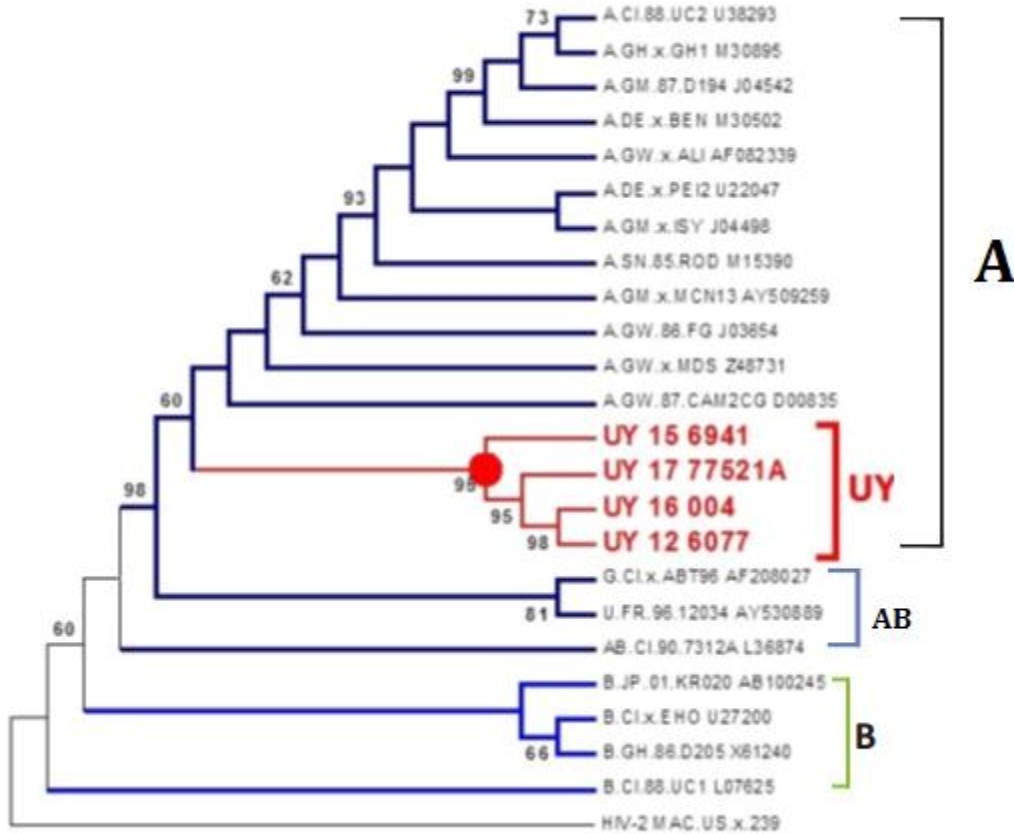


Figura 2. Árbol filogenético obtenido por método neighbor-joining de las secuencias en la región del gen *pol* de VIH-2. Las muestras analizadas en este trabajo están representadas en color rojo. Se indican valores de bootstrap ≥ 60 .

Tabla 1. Muestras analizadas en este estudio, de acuerdo a las siguiente variables: Patrón WB VIH-2 definidos en figura 1, ID (año de toma de muestra /nº muestra), PCR VIH-2, PCR VIH-1, Genotipo VIH-2 y Genotipo VIH-1. s/d: Sin dato.

PATRON WB VIH-2	ID	PCR VIH-2	PCR VIH-1	GENOTIPO VIH-2	GENOTIPO VIH-1
1	17/77521A	POSITIVO	NEGATIVO	A	s/d
	16/004				
	15/6941				
	12/6077				
	17/1127	s/d	s/d	s/d	s/d
	17/888				
	14/1149				
	14/187				
2	17/1253	POSITIVO	NEGATIVO	s/d	s/d
	15/211	s/d	s/d		
3	13/1645				
	13/136				
	13/79				
	12/1712				
	12/1645	POSITIVO	POSITIVO	s/d	B
4	13/455	POSITIVO	NEGATIVO	s/d	s/d
	13/414	s/d	s/d		
5	12/1547	s/d	s/d	s/d	s/d
6	12/1606	s/d	s/d	s/d	s/d
7	12/1636	s/d	s/d	s/d	s/d
	16/920				
8	13/252	s/d	s/d	s/d	s/d

Discusión

La Técnica de WB VIH-1/2, ha sido el punto de inicio de la detección de pacientes con anticuerpos VIH-2 en nuestra población, determinando el algoritmo propuesto en el trabajo para su confirmación.

De las metodologías directas utilizadas, la amplificación de ADN proviral por PCR-Nested fue la más eficiente, no obteniéndose buenos resultados de la amplificación de ARN viral por RT-PCR. Pensamos que esto pudo deberse a que las muestras no habían sido preservadas en condiciones óptimas para el mantenimiento del ARN.

Se observa la presencia de una co-infección VIH1- VIH2, que respalda los reportes a nivel internacional de la presencia de estos dos tipos virales co-circulando en un mismo individuo.

De todas las muestras amplificadas pudieron ser secuenciadas solamente 4, de las 3 restantes no se obtuvo concentración mínima para realizar el ensayo.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 1) se sigue observando la circulación de VIH-2 en Uruguay, siendo

su prevalencia baja pero regular a lo largo de los años.

Conclusiones

La circulación de VIH-2 sigue manteniéndose en Uruguay (Ruchansky et al., 2011) con casos serológicamente positivos, que al ser caracterizados molecularmente confirman la circulación VIH-2 del grupo A.

Se destaca en este trabajo la necesidad de seguir monitorizando la circulación de VIH-2 serológica y molecularmente aportando a los perfiles de circulación de este virus inicialmente confinado a África occidental.

Bibliografía

Alcamí J, Coiras M. (2001). Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(3), 216-226.

Alford JE, Marongiu M, Watkins GL, Anderson EC. (2016). Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Gag Is Trafficked in an AP-

3 and AP-5 Dependent Manner. Liang C, ed. PLoS ONE, 11(7), 1-16.

Barre-Sinoussi F, Chermann J.C, Rey F, Nugeyre M.T, Chamaret S, Gruest, J, et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at Risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science, 220, 868-871.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2005). GenBank. Nucleic Acids Research, 33(Database Issue), D34–D38.

Boletín epidemiológico VIH/SIDA. (2018) Ministerio de Salud Pública. Recuperado de http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Boletin%20Epidemiol%C3%B3gico%20julio%202018.pdf

Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. (2011). Update on Human Immunodeficiency Virus (HIV-2) Infection. Clinical Infectious Diseases, 52(6), 780-787.

Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. (1986). Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. Science, 233(4761), 343-346.

Constantine N. (2006). HIV Antibody Assays . HIV In Site Knowledge Base Chapter. Reagents of the University of California. Recuperado de <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-02-01#S6X>

Diaz D, Ortiz E , Martin D, Nibot C, Rizo A , Silva E. (2012). HIV-2 Antibody Detection after Indeterminate or Negative HIV-1 Western Blot in Cuba, 2005. Medicc Review, 14(1), 25-29.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman, VS, et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, 220(4599), 865-867.

HIV Databases. Recuperado de <http://www.hiv.lanl.gov/>.

ICTV. Recuperado de
<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

Korber BT, Foley BT, Kuiken CL, Pillai SK, Sodroski JG. (2014). Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG.HIV sequence database. Recuperado de
<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/HXB2.html>

MacNeil A, Sankalé JL, Meloni S, Abdoulaye DS, Mboup S, Kanki P. (2007). Long-term intra patient viral evolution during HIV-2 infection Journal of Infectious Diseases, 195(5), 726-733.

Matheron S, Pueyo S, Damond F, Simon F, Leprêtre A, Campa P, et al. (2003). Factors associated with clinical progression in HIV-2 infected-patients: the French ANRS cohort. AIDS, 17(18), 2593-2601.

Maueia, C., Costa, D., Meggi, B., Ismael, N., Walle, C., Curvo, R., Ferreira, O. C. (2011). Frequency of human immunodeficiency virus type-2 in hiv infected patients in Maputo

City, Mozambique. Virology Journal, 8, 408.

Nsagha D, Njunda A, Kamga H, Assob J, Bongkem E. (2012) HIV-1/HIV-2 co-infection among voluntary counselling and testing subjects at a regional hospital in Cameroon. African Health Sciences., 12(3), 276-281.

ONUSIDA. Recuperado de
<http://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>

Pieniazek D, Baggs J, Hu DJ, Matar GM, Abdelnoor AM, Mokhbat J, et al. (1998). Introduction of HIV-2 and multiple HIV-1 subtypes to Lebanon. Emerging Infectious Diseases, 4 (4), 649-656.

Ruchansky, Dora. (2009). Variabilidad Genética del Virus de Inmunodeficiencia Humana en Uruguay. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias- Universidad de la República, Uruguay.

Ruchansky D.; Somma S.; Brasso S.; Chiparelli H.; Henry S.; Russi JC.

(2011). Evidencias Serológicas y Moleculares de Infección por el Virus de inmunodeficiencia Humana Tipo 2 en Uruguay, X Congreso Argentino de Virología, Revista Argentina de Microbiología, 43, P99. Publicación de la Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires.

Sharp PM, Hahn BH. (2010). The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1552), 2487-2494.

Simon V, Ho DD, Karim QA. (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. Lancet, 368(9534), 489-504.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12), 2725-2729.

Visseaux B, Damond F, Matheron S, Descamps D, Charpentier C. (2016). HIV-2 molecular epidemiology. Infection, Genetics and Evolution; 46, 233-240.