

DETECCIÓN VIH POR RT-PCR

Ref. PCRHIV (4 prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

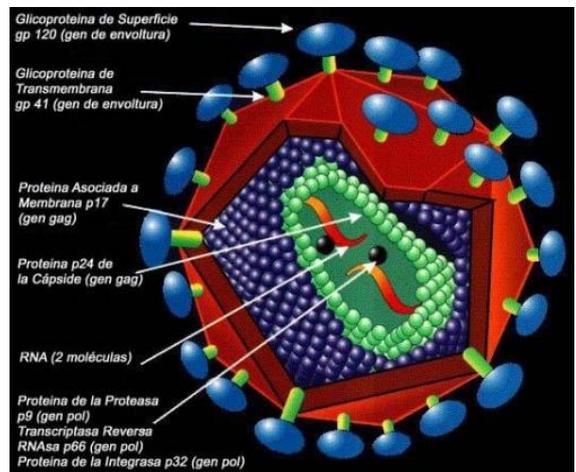
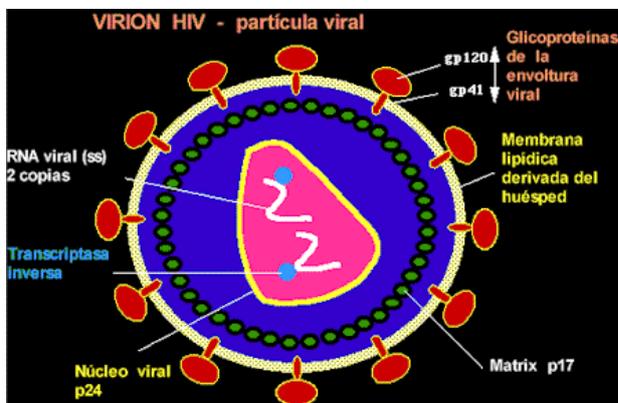
El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta para la detección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana por PCR

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre el HIV y la enfermedad que produce, el SIDA.

2. INTRODUCCION

2.1 VIH

El **virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)** es un lentivirus (de la familia Retroviridae), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).



Está formado por una partícula esférica de 80-100 nm con una estructura en dos capas:

- La envoltura es una bicapa lipídica derivada de la célula huésped donde se insertan las Glucoproteínas con 72 proyecciones externas. Contiene las proteínas vírales Gp120, Gp 41 y Gp17.
- La nucleocápside central o core en cuyo interior se encuentra el material genético y las enzimas necesarias para la replicación viral.

El genoma es un ARN de cadena única constituido por 2 hebras idénticas de polaridad positiva. Existen genes encargados de codificar los componentes de la partícula vírica (genes estructurales) y de regular la expresión de los mismos (genes reguladores). De los genes estructurales el gen GAG codifica las proteínas del core, el gen POL codifica fundamentalmente la Transcriptasa Inversa y la Proteasa y el gen ENV las proteínas de la envoltura vírica.

2.2 La enfermedad: SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida)

Es una enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La afección destruye el sistema inmunitario en forma gradual, lo cual hace que para el cuerpo sea más difícil combatir infecciones.

El SIDA es la sexta causa importante de muerte en personas entre 25 y 44 años de edad en los Estados Unidos, pero en 1995 ocupaba el número uno. Millones de personas alrededor del mundo viven con VIH/SIDA, incluso muchos niños menores de 15 años.

Las bacterias comunes, los hongos, los parásitos y los virus que generalmente no provocan enfermedades serias en personas con sistema inmunitario sano pueden provocar enfermedades mortales en las personas con SIDA.

Se ha encontrado el VIH en saliva, lágrimas, tejido del sistema nervioso, líquido cefalorraquídeo, sangre, semen (incluido el líquido preseminal, que es el líquido que sale antes de la eyaculación), flujo vaginal y leche materna. Sin embargo, se ha demostrado que sólo la sangre, el semen, los flujos vaginales y la leche materna transmiten la infección a otras personas.

Síntomas del SIDA

El SIDA comienza con una infección por VIH. Es posible que las personas infectadas con el VIH no presenten síntomas durante 10 años o más, pero pueden transmitir la infección a otros durante este período asintomático. Si la infección no se detecta y no se inicia el tratamiento, el sistema inmunitario se debilita gradualmente y se desarrolla el SIDA.

La infección aguda por VIH progresa con el tiempo (generalmente de unas pocas semanas a meses) a una infección por VIH asintomática (sin síntomas) y luego a infección sintomática temprana por VIH. Posteriormente, progresa a SIDA (infección por VIH avanzada con conteo de células T CD4 por debajo de 200 células/mm³).

Casi todas las personas infectadas con el VIH, de no recibir tratamiento, contraerán SIDA. Hay un pequeño grupo de pacientes en los que el SIDA se desarrolla muy lentamente o que nunca aparece. A estos individuos se los llama pacientes sin progresión de la enfermedad y muchos parecen tener una diferencia genética que impide que el virus cause daño a su sistema inmunitario.

Los síntomas del SIDA son principalmente el resultado de infecciones que normalmente no se desarrollan en personas con un sistema inmunitario sano. Éstas se llaman infecciones oportunistas. En las personas con SIDA, el VIH ha dañado el sistema inmunitario, por lo que son muy susceptibles a dichas infecciones oportunistas.

Los síntomas comunes son:

- Escalofríos
- Fiebre
- Salpullido
- Sudores (particularmente en la noche)
- Ganglios linfáticos inflamados
- Debilidad
- Pérdida de peso

Nota: al principio, es posible que la infección con el VIH no produzca ningún síntoma. Sin embargo, algunas personas sí experimentan síntomas pseudogripales con fiebre, erupción cutánea, dolor de garganta e inflamación de los ganglios linfáticos, generalmente entre 2 y 4 semanas después de contraer el virus. Esto se denomina síndrome retroviral agudo. Algunas personas con infección por VIH permanecen por años sin síntomas entre el momento en que se exponen al virus y cuando desarrollan el SIDA.

Vías de transmisión del SIDA

El virus se puede diseminar (transmitir):

- A través del contacto sexual: incluido el sexo oral, vaginal y anal.
- A través de la sangre: vía transfusiones de sangre (ahora muy infrecuente) o por compartir agujas
- De la madre al hijo: una mujer embarazada puede transmitirle el virus a su feto a través de la circulación sanguínea compartida, o una madre lactante puede pasárselo a su bebé por medio de la leche materna.

Otros métodos de propagación del virus son infrecuentes y abarcan lesión accidental con una aguja, inseminación artificial con semen donado infectado y trasplantes de órganos infectados.

La infección por VIH no se propaga por:

- Contacto casual como un abrazo
- Mosquitos
- Participación en deportes
- Tocar cosas que han sido tocadas con anterioridad por una persona infectada con el virus
- El SIDA no se transmite a una persona que DONA sangre u órganos. Las personas que donan órganos nunca entran en contacto directo con quienes los reciben. De la misma manera, alguien que dona sangre nunca tiene contacto con el que la recibe. En todos estos procedimientos se utilizan agujas e instrumentos estériles.

Sin embargo, el VIH se puede transmitir a la persona que RECIBE sangre u órganos de un donante infectado. Para reducir este riesgo, los bancos de sangre y los programas de donación de órganos hacen exámenes minuciosos a los donantes, la sangre y los tejidos.

Entre las personas con mayor riesgo de contraer el VIH están:

- Drogadictos que comparten agujas para inyectarse drogas.
- Bebés nacidos de madres con VIH que no recibieron tratamiento contra el VIH durante el embarazo.
- Personas involucradas en relaciones sexuales sin protección, especialmente con individuos que tengan otros comportamientos de alto riesgo, que sean VIH positivos o que tengan SIDA.
- Personas que recibieron transfusiones de sangre o hemoderivados entre 1977 y 1985 (antes de que las pruebas de detección para el virus se volvieran una práctica habitual). Los compañeros sexuales de personas que participan en actividades de alto riesgo (como el uso de drogas inyectables o el sexo anal).

Diagnóstico del SIDA

En la mayoría de los casos se usan técnicas inmunoenzimáticas (EIA, ELISA) en **una muestra de sangre**. En caso de que el resultado sea positivo, con la misma muestra de sangre extraída se realiza una técnica más específica para confirmar el resultado, siendo el Western Blot el método más empleado.

Además se realizan los contajes de linfocitos para saber la afectación del sistema inmune, y desde 1.995 se puso a punto una técnica, **la demostración de genoma vírico mediante técnicas de biología molecular (PCR)**, que permitía medir la cantidad de virus VIH en la sangre, lo que a su vez es un reflejo de la cantidad de virus que existen en todo el organismo.

Tratamiento del SIDA

En este momento, no existe cura para el SIDA. Sin embargo, se encuentran disponibles varios tratamientos que pueden ayudar a mantener los síntomas a raya y mejorar la calidad y duración de la vida de aquellas personas que ya han desarrollado síntomas.

Al aplicar la técnica PCR para VIH muestras de sangre congeladas desde 10 o más años antes se vio que de las personas que tenían muy pocos virus (carga viral baja) apenas un 10% habían desarrollado SIDA, mientras que las personas que tenían gran cantidad de virus (carga viral alta) en sangre habían desarrollado SIDA y muerto en su mayoría.

Hasta 1.995 se disponía de una serie de fármacos denominados Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Viral (RETROVIR, VIDEX, HIVID) que, por separado o en combinación, tenían un efecto poco potente y, además, transitorio sobre el virus VIH, logrando retrasar la aparición de SIDA en una persona infectada como máximo 2 años; si se usaban en fase de SIDA retrasaban la muerte en 1 ó 2 años.

Esto se debe a que el virus es capaz de hacerse resistente a estos fármacos porque esta cambiando (mutando) cada vez que se reproduce (replica); como es lógico, aquellas personas que tienen gran cantidad de virus tienen mayor tasa de replicación (y de resistencia) y el pronóstico es peor que en el caso de que tengan pocos virus. Se vio también que con los anteriores fármacos se lograba como media dividir por 10 ó por 50 la cantidad de virus de la sangre, lo que, en una persona que tuviese, por ejemplo, 300.000 virus por mililitro, es una reducción insignificante e insuficiente para evitar la progresión a SIDA.

En 1995-1996 aparecieron, ya comercializados, una serie de fármacos denominados Inhibidores de la Proteasa Viral (NORVIR, INVIRASE, CRIXIVAN) que, en combinación con los anteriores, logran dividir la carga viral por 1.000 ó más; en algunos pacientes consiguen hacer desaparecer de la sangre a estos virus y, manteniendo el tratamiento varios años, pueden quizá eliminar por completo el virus del organismo.

La experiencia con dos años de uso es muy buena, con reducciones de mortalidad de más del 50%, recuperación de los linfocitos T4 perdidos y mejoría marcada de los síntomas de la enfermedad.

Estos tratamientos son relativamente bien tolerados y se administran por boca (no necesitan inyectarse). Aunque estos tratamientos son muy caros (un Inhibidor de la Proteasa más dos Inhibidores de la Transcriptasa suponen al año más de 6000 euros), en España están cubiertos por la Seguridad Social y, sobre todo, las vidas salvadas y el ahorro que producen en gastos de hospitalización compensan ampliamente su valor económico.

Prevención del SIDA

Por vía sexual

- Teniendo abstinencia sexual (no teniendo relaciones sexuales).
- Mediante la práctica del sexo seguro, es decir, sin penetración (besos, caricias, abrazos, autoerotismo o masturbación).
- Utilizando condón en cada relación sexual.

Por vía sanguínea

- Utilizando sangre y derivados que hayan sido previamente analizados y estén libres del virus.
- Recomendando a los Usuarios de Drogas Inyectables utilizar una aguja y jeringa nueva en cada aplicación lavarlas y/o hervirlas.
- Utilizando guantes de látex o poliuretano siempre que se maneje sangre o secreciones Corporales.

Por vía perinatal

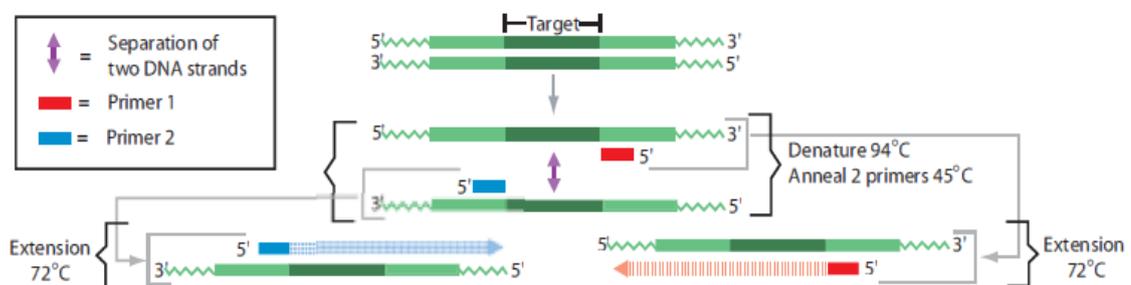
- Ofreciendo la prueba de detección para el VIH al 100% de mujeres embarazadas, de manera gratuita, voluntaria y confidencial en los servicios de salud de todo el país.

2.3 La RT-PCR

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) es una variante de PCR, una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación". En el RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscripta en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en un PCR tradicional. **PCR en Transcripción Reversa** no debe ser confundido con el PCR en tiempo real, PCR cuantitativa o Q-PCR, el cual a veces de manera errónea se abrevia como RT-PCR.

La amplificación exponencial mediante PCR en Transcripción Reversa supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Los principales usos de la RT-PCR están relacionados con el campo del Diagnóstico Molecular y con la investigación científica. Puede utilizarse como método de detección molecular de genes, para estudiar el genoma de virus de ARN como los retrovirus (tales como el VIH) o el virus de la gripe (virus de la influenza).

Una de las características más importantes es que en el proceso de RT-PCR, el ADNc generado ya no lleva los intrones que sí tendría el ADN original. De este modo, al expresar el ADNc producto de la RT-PCR, se generará un ARNm formado exclusivamente por exones. Esto ha permitido darle a esta técnica uno de sus usos más importantes: insertar genes eucariotas en organismos procariontas.



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

En esta práctica se realizará una PCR simulada ya que el instrumento para llevar a cabo la PCR tiene un coste muy elevado, para ello se utilizarán colorantes NO TOXICOS que migrarán en el gel de agarosa como si se tratasen de los fragmentos de ADN amplificados.

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Pedro Polimerasa ha tenido varias relaciones heterosexuales sin ningún tipo de protección y con personas desconocidas, es por ello que decidió realizarse la prueba del SIDA. Se le realizó una extracción de sangre y dio positivo para el ELISA.

El siguiente paso que van a realizar en el Hospital Nuestra Señora de E. coli donde llevan su caso es una PCR para confirmar si se trata definitivamente de un resultado positivo.

Utilizan un kit comercial de la casa NORGEN BIOTEK, este kit permite realizar la extracción del ARN a partir del suero y a su vez realizar la RT-PCR para la detección del VIH.

Este kit permite amplificar un **fragmento de 297 pb del VHB**, además la reacción de la PCR genera un fragmento de 499 pb, esta amplificación es muy importante que esté presente en todas las muestras ya que se utiliza como control de amplificación, es decir, es un control de que la reacción de la PCR funciona.

4. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10 X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	4

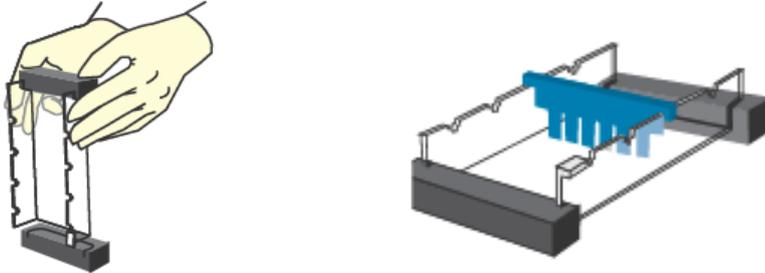
Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

5. PRACTICA

5.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos.



B) Preparación del gel de agarosa

1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel:

2.b) **Para geles de 7 x 7 cm:** Añadir **32 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.30 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

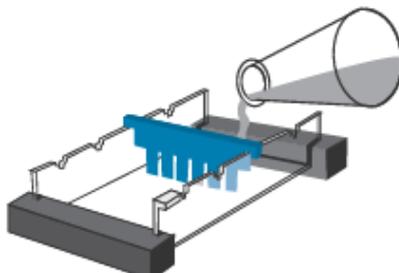
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X.

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse un placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a punto de ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.

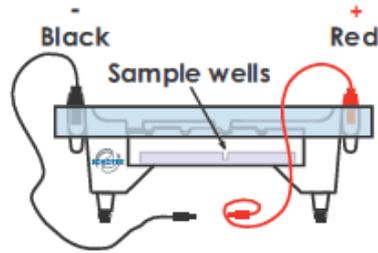


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera. (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

C) Preparación del gel para la electroforesis

1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.

2.c) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).



3.c) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis**. **El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva electroforesis.**

4.c) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.

5.c) Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.

6.c) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

5.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

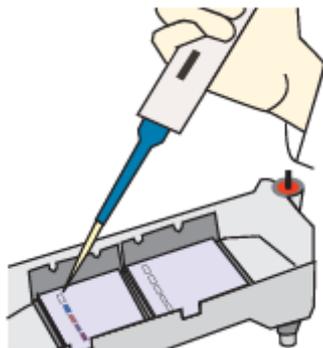
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) Muestras de electroforesis: *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.*

1.a) Se suministran 4 muestras diferentes presentadas en 4 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	Verde	MARCADOR
2	Rojo	CONTROL POSITIVO
3	Lila	PACIENTE 1 (PEDRO POLIMERASA)
4	Azul	PACIENTE 2

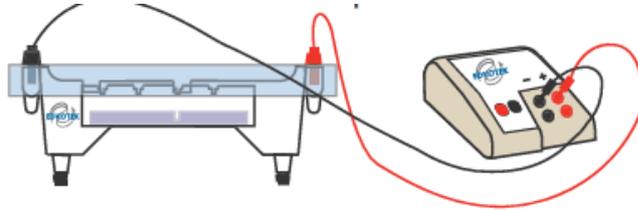
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



B) Llevar a cabo la electroforesis

1.b) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

2.b) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



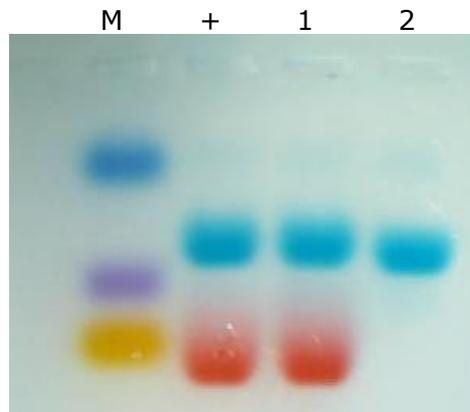
3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)**. **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

5.b) Después de que la electroforesis ha terminado, **apagar la fuente de corriente**, desconectar los cables y sacar la cubierta.

6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse).

6. RESULTADOS



M: El marcador de peso molecular tiene 3 fragmentos (750pb que se corresponde con la banda azul claro, 450 pb que se corresponde con la banda azul intensa, 300 pb que se corresponde con la banda amarilla).

+: Contro positivo, sirve para controlar que la reacción de PCR funciona.

Paciente1: Bandas 297 y 499 pb.

Paciente2: Banda de 499 pb.

7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Cuál es la diferencia entre la reacción de PCR y la RT-PCR?** La principal diferencia es que mediante la RT-PCR se pueden amplificar ARN mediante un paso previo utilizando un enzima llamado Transcriptasa inversa que pasa el ARN a ADNc.
2. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
3. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers"?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde).
4. **¿El VIH, es un virus de ADN o ARN?** ARN.
5. **¿Para qué sirve el control+ de la PCR?** En todas las PCR es necesario incluir un control +, a esa reacción se añaden fragmentos de ADN del VIH y nos informa de cómo debe salir un resultado positivo.
6. **¿Qué nos indica la presencia de una banda de 499pb en todas las reacciones?** Nos indica que en todos los casos la reacción de la PCR ha funcionando, esto es muy importante en aquellos caso que no se observa la banda de 297 pb, de esta forma se descartan falsos negativos, la banda del VIH no se ha amplificado pero si la de control de la PCR.
7. **¿Pedro Polimerasa es portador del VIH?** Sí, es seropositivo.
8. **¿Cómo podía haber evitado contagiarse con el VIH?** Mediante la realización de prácticas sexuales seguras utilizando preservativos.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros biotod@arrakis.es