



Metodología molecular empleada para la detección de RNA y DNA de VIH-1 en reproducción asistida

 7 min.



En el siguiente trabajo el Dr. Edgardo Sturba, Jefe de la Unidad de Biología Molecular en Microbiología del Laboratorio Stamboulían nos describe los avances en las técnicas de biología molecular empleada para la detección del VIH en muestras de semen utilizadas en procedimientos de reproducción asistida en parejas discordantes (hombre infectado/mujer no infectada). Esta conclusión surge de una revisión de los procedimientos realizados por ocho centros de reproducción de Europa del grupo CREATHe (Centre for Reproductive Assisted Techniques for VIH in Europe).



Dr. Edgardo Sturba
Jefe Unidad Biología Molecular en Microbiología
Stamboulían Laboratorio



En los últimos 20 años, en la infección por VIH se han producido cambios relacionados con aspectos epidemiológicos,

clínicos y de tratamiento, que fueron acompañados por modificaciones en las conductas médicas y en el manejo del laboratorio de virología clínica.

En un comienzo, la infección estaba restringida a hombres que tenían sexo con hombres (HSH) y a drogadictos endovenosos, mientras que la relación hombre/mujer infectados en ese momento era 20/1. En la actualidad, la principal causa de transmisión es la vía heterosexual, y la relación hombre/mujer infectados ha cambiado a 2/1.

A mediados de la década del 90, la incorporación del High Activity Antiretroviral Treatment (HAART) modificó aspectos virológicos, inmunológicos y, como consecuencia, la sobrevivencia de los pacientes, convirtiendo a la infección por VIH en una infección crónica. Dado que la mayoría de los infectados pertenecen al grupo etario entre 15 y 45 años, surge la inquietud y necesidad de las parejas por tener hijos propios. En la bibliografía, la mayoría de los trabajos indican que cerca del 30% de las parejas se plantea esta necesidad (1). En este aspecto, se consideran dos escenarios para parejas discordantes que desean tener hijos propios genéticamente relacionados:

- sexo no protegido al momento de la ovulación,
- reproducción asistida a través de sus diferentes metodologías: Inseminación Artificial (IA), Fecundación In Vitro (FIV), Intra-citoplasmática inyección de espermatozoide (ICIE).

Varios estudios han estimado el riesgo de un único acto sexual sin protección en el orden del 0.1-0.5% (2), (3), (4). Sin embargo, trabajos realizados en parejas con sexo no protegido han tenido seroconversiones del 4.3% (5) y 10.8% (3), aunque debemos considerar que estos estudios fueron realizados antes del HAART o en lugares sin acceso a medicación. En cambio, ningún trabajo con reproducción asistida realizada previo procesamiento del esperma ha tenido parejas infectadas (6), excepto un estudio con una seroconversión producida en una pareja en la que el paciente no estaba bajo tratamiento antirretroviral (7).

Desde 1992, con el trabajo de Semprini A.E et al (8), se demostró que el lavado del esperma con gradiente de densidad seguido de swim up es altamente efectivo para eliminar partículas virales y células no espermáticas. A pesar de que en dicho trabajo no se realizó detección del virus por



LABORATORIOS BACON S.A.I.C.



Diagnóstico

Screening Neonatal

TSH
Fenilalanina
Tripsina
Galactosa
17OHProgesterona
Biotinidasa

Ciencia e Investigación

Biología Molecular
Corticoesterona en ratas
Fast Prep® - 24

Tarjetas Reglamentarias para

Toma de muestra Neonatal
Autorizadas por ANMAT

Kits RIA - IRMA - ELISA

SaFTEST

Kits Control de calidad:
- Biodiesel
- Alimentos

Asesoramiento General Servicio Técnico

Equipamiento e Insumos

Lectores verticales manuales y automáticos
Lavadores manuales y automáticos
Pipetas punto fijo y multicanal
Microtiras y microplacas alta densidad p/Elisa
Microplacas Filtrantes Millipore
Agitador orbital
Sacabocados para Screening Neonatal



Whatman
Schelcher + Schuell



técnicas moleculares -ya que no estaban disponibles en el momento-, no hubo ninguna seroconversión.

La presencia del virus en semen fue demostrada tanto en pacientes tratados como no tratados, y en semen con o sin procesamiento de lavado previo.

En pacientes no tratados no siempre se correlaciona la carga viral en plasma y en semen debido a que la producción de esperma se realiza en un compartimento independiente, y existen 3 patrones de secreción viral: secreción nula, intermitente y continua, pero habitualmente la carga viral en plasma es mayor a la carga viral en semen (9), (10). Pacientes tratados y con carga viral no detectable en plasma pueden tener presencia del virus en semen tanto RNA como DNA proviral en células no espermáticas que se encuentren en el semen aún post procesamiento de lavado.

Estos datos demuestran la necesidad de utilizar técnicas de detección de VIH-1 RNA/DNA en esperma previo al procedimiento de fertilización asistida.

En un comienzo, la mayoría de los grupos realizaba dos determinaciones: la detección de RNA viral en plasma seminal previo al procesamiento, y la detección de RNA/DNA en la fracción espermática obtenida posterior a los lavados y swim up. Actualmente se tiende a realizar la detección de RNA/DNA viral directamente en la fracción final, que es aquella que se va a utilizar para el procedimiento de reproducción asistida. En cualquiera de los casos, todo resultado positivo descartaría la muestra.

El estudio puede ser realizado en el día y se utiliza la fracción de células espermáticas fresca. Sin embargo, la mayoría de las veces esto no es posible, la muestra se fracciona en alícuotas y se congela a -180 °C en nitrógeno líquido. Una de ellas se procesa y las otras quedan en nitrógeno líquido, a la espera del resultado para realizar el procedimiento de fertilización. La supuesta desventaja de este último método es la posibilidad de perder viabilidad de los espermatozoides después de ser descongelada la alícuota a utilizar en el procedimiento, o que la muestra estudiada no sea idéntica a la congelada. Sin embargo, esto no ha sido comprobado en la práctica.

Los métodos utilizados para la detección de VIH-1 en plasma seminal son los mismos que se utilizan en plasma, con adaptaciones para evitar la presencia de inhibidores y la sensibilidad expresada en el límite de detección de cada metodología.

El primer inconveniente llevó a que la

mayoría de los grupos de trabajo realizara como técnica de aislamiento el método de Boom (15), que utiliza partículas de sílice donde se adhiere el Ácido Nucleico (AN), lo que sirve de sostén para los posteriores lavados. Esta técnica demostró, a través de su control interno de inhibición, eliminar casi en su totalidad los posibles inhibidores presentes.

La incorporación de las metodologías ultrasensibles con límites de detección de 20-50 copias/ml permitió minimizar el segundo inconveniente. Las principales modificaciones corresponden a diluir el plasma seminal en plasma humano o soluciones de elución provistas por cada equipo comercial, para obtener el volumen adecuado y disminuir, además, la interferencia por inhibidores. Combina el método de aislamiento de Boom con otras técnicas de amplificación.

En un comienzo se utilizaron técnicas manuales. Posteriormente se adaptaron con los mismos criterios las metodologías automatizadas, tanto de aislamiento como amplificación, hasta la incorporación de las metodologías en tiempo real con resultados similares.

En la actualidad, algunos grupos realizan el aislamiento con metodologías de captura del AN específico de VIH o genérico con sondas adheridas a partículas magnéticas. Estas metodologías permiten posteriormente la realización de los lavados correspondientes, eliminando los inhibidores, como el sistema COBAS/AmpliPrep de Roche. Dichas técnicas se han acoplado a métodos automatizados de amplificación y detección como COBAS AMPLICOR (RT-PCR con detección colorimétrico) o RT-PCR en tiempo real, como el COBAS/TaqMan.

Si bien en teoría el lavado y swim up eliminaría toda célula no espermática, posibles errores al obtener la alícuota en el procesamiento podrían arrastrar células infectadas. Para ello, se debe realizar la detección de VIH-1 ADN proviral en células.

Diferentes trabajos han tratado de demostrar la presencia del VIH-1 en células de las diferentes progenies del espermatozoide, las que fueron refutadas y consideradas artefactos de las técnicas utilizadas, ya que nunca se demostró la presencia de receptores como CD4, CCR5 y CXR4 en estas células. Sin embargo, se ha detectado DNA proviral, tanto en semen sin procesar como después del procesamiento, y se considera que corresponde a células no espermáticas que pueden estar presentes aún después del procesamiento de lavado y swim up (11).

En Stambouliau, a través de un equipo multidisciplinario, llevamos a cabo un protocolo desde 1999 hasta la actualidad. Se estudiaron 221 parejas discordantes (Hombre VIH Reactivo/Mujer VIH No reactiva), y de ellas se han concretado 85 embarazos, 2 en curso, 1 con cuatrillizos y nacieron 86 bebés. En todos los casos no hubo infectados, ni en las parejas, ni en los recién nacidos.

Conclusión

Los métodos de reproducción asistida con procesamiento previo del semen con lavados, gradiente de densidad seguido de swim up y detección de RNA y DNA de VIH-1 por técnicas moleculares comerciales, son una conducta médica segura para parejas discordantes, en particular para hombre infectado/mujer no infectada. Esta conclusión surge de una revisión de los procedimientos realizados por ocho centros en diferentes países de Europa por el grupo CREATHe (Centre for Reproductive Assisted Techniques for VIH in Europe) (14), que calculó como cero la probabilidad de transmisión de VIH-1 a la pareja y al hijo. (13)



Bibliografía

1. Chen JL et al. Fertility desires and intentions of HIV-positive men and women. (Farm Plann Perspect 2001; 33:144).
2. Baeten JM, Overbaugh J. Measuring the infectiousness of persons with HIV-1: opportunities for preventing sexual HIV-1 transmission. (Curr HIV Res 2003; 1:69-86).
3. De Vicenzi I. A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual Partners. (N Engl J Med 1994; 331: 341-346).
4. Gray RH et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1 serodiscordant couples in Rakai, Uganda. (Lancet 2003; 357: 1149-53).
5. Mandelbrot et al. Natural conception in HIV-negative women with HIV-infected Partners. (Lancet 1997; 349: 850-851).
6. C. Gillings-Smith. At. el. HIV and reproductive care-a review of current practice. (BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology).
7. Sauer MV, Choi J. HIV seroconversion in a woman preparing for assisted reproduction: an inherent risk in caring for HIV-serodiscordant couples. (Reprod Biomed Online 2006; 12: 375-377).
8. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive Partners. (The Lancet, Vol 340: 1317-1319).
9. Gupta P et al. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen. The Journal of Infectious Diseases 2000; 182(1):79-87.
10. Bujan L et al. Factors of intermittent HIV-1 excretion in semen and efficiency of sperm processing in obtaining spermatozoa without HIV-1 genomes. 2004 Mar 26; 18(5):757-66.
11. Pasquier C. Validation of an automated real-time PCR protocol for detection and quantitation of HIV and HCV genomes in semen. 2006 Oct; 137(1):156-9.
12. Kim LU Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. (1999 Apr 16; 13(6):645-51).
13. Bujan L, et al. Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREATHe network. AIDS. 2007 Sep 12; 21(14):1909-14.
14. Pasquier C, et al. Multicenter quality control of the detection of HIV-1 genome in semen before medically assisted procreation. Journal of Medical Virology 2006; 78: 877-882
15. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CJ, Wertheim-van Dillen PME y van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28:495-503.