

INFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA: DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DOBLE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO.

G.A. Oliva¹, M.V. Vila Roza^{1,2}, C.M. Galosi^{1,3}, T. Teodoroff⁴, M.C. Castellano⁵,
M.R. Pecoraro^{1,6}, D.O. Arias⁷, E.T. Gonzalez¹, M.E. Etcheverrigaray¹

¹Cátedra de Virología, ²Becaria de Perfeccionamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires, ³ Investigador Adjuntos CIC, ⁴ Becaria de Entrenamiento de CIC, ⁵. Cátedra de Clínica de Pequeños Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, ⁶Investigador Adjunto CONICET. ⁷Servicio de Cardiología.

Resumen: Se desarrolló una técnica de doble reacción en cadena de la polimerasa ("Nested PCR") para la detección directa del virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF). Se evaluaron dos métodos de extracción de DNA proviral y cuatro pares de cebadores. Se estandarizó el método de amplificación y la especificidad fue determinada por digestión de los productos de PCR con enzimas de restricción. La determinación de anticuerpos se realizó con un equipo comercial. Se trabajó con 30 muestras de sangre heparinizada provenientes de gatos con y sin signos clínicos compatibles con la infección con VIF. En 17 de las muestras examinadas se detectaron anticuerpos específicos contra VIF y DNA proviral. La técnica de PCR desarrollada resultó sensible y específica y podría ser utilizada cuando se presentaran resultados serológicos dudosos o para la detección del provirus en gatos con infecciones recientes.

Palabras claves: diagnóstico, virus de la inmunodeficiencia felina, PCR.

FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS: DEVELOPMENT AND APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD FOR DIAGNOSIS

Abstract: A Nested PCR technique for direct identification of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) was developed. Two methods for proviral DNA extraction and two pairs of primers were evaluated. The method for amplification was standardized and its specificity was determined by the restriction endonucleases digestion of PCR products. Antibodies specific to FIV were determined using a commercial kit. Thirty heparinized blood samples obtained from cats with and without clinical signs consistent with FIV infection were analyzed. In 17 of the samples antibodies specific to FIV and proviral DNA were detected. The PCR technique proved sensitive and specific. It could be useful in the presence of doubtful serologic results and to detect provirus in cats with recent infections.

Key words: Diagnosis, Feline Immunodeficiency, PCR

Fecha de recepción: 15/05/00

Fecha de aprobación: 10/11/00

Dirección para correspondencia: G.A.Oliva CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

Tel: +54 (0221) 4257980

E-mail: gaoliva@fcv.medvet.unlp.edu.ar

Introducción:

El virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) es un miembro de la familia *Retroviridae*. Tanto por su organización genética, como por sus características bioquímicas y antigénicas, el mismo ha sido incorporado dentro de la subfamilia *Lentivirinae* (1).

El VIF es responsable de una enfermedad debilitante crónica y fatal de los gatos domésticos, asociada a una disfunción del sistema inmune (1).

La infección provocada por el VIF tiene una distribución mundial (2). El diagnóstico puede realizarse a través del aislamiento del virus a partir de linfocitos de sangre periférica, de la amplificación de las secuencias de ácido nucleico viral mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o bien por medio de la detección de anticuerpos específicos, para lo cual existen diversas técnicas: ELISA, inmunofluorescencia indirecta, inmunoblotting y radioinmunoprecipitación (3, 4).

En la República Argentina, la presencia de la infección con VIF ha sido demostrada a través de la detección de anticuerpos específicos y del aislamiento viral (4, 5, 6).

La reacción de PCR ha sido utilizada para estudiar distintas cepas de VIF multiplicadas en cultivos celulares (7, 8), para determinar la cantidad de DNA proviral en células infectadas (9, 10, 11, 12), para analizar la dinámica de la infección e identificar el RNA viral y el provirus en estados tempranos, para estudios epidemiológicos y de subtipos genéticos (13, 14) y para investigar la patogenia de la infección en gatos domésticos (9, 15). Mateucci y col. (16) emplearon la técnica para detectar virus en saliva y plasma en gatos seropositivos y Rimstad y col. (17), al igual que Hohdatsu y col. (7) describieron una "Nested PCR" para detectar DNA proviral en linfocitos de sangre periférica. Posteriormente, la técnica fue utilizada por otros autores con fines variados tales como para cuantificar la presencia de provirus en tejidos de gatos infectados experimentalmente (18).

El objetivo de este trabajo fue optimizar la técnica de PCR para detectar DNA proviral de linfocitos de sangre periférica, con la finalidad de emplearla como técnica rápida y de detección directa del virus en el diagnóstico de rutina.

Material y métodos:

Virus: se utilizó DNA control de la cepa LP3 aislada en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad

Nacional de La Plata (5).

Muestras: se trabajó con 30 muestras de sangre heparinizada provenientes de gatos con y sin signos clínicos compatibles con la infección con VIF (4). Las muestras se separaron en 3 partes:

1) 2,5 ml para la extracción de linfocitos mediante la técnica de Ficoll-Hypaque y posterior extracción de DNA con un equipo comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega).

2) 300 μ l para la extracción de DNA con el equipo comercial.

3) 500 μ l de plasma para determinación de anticuerpos específicos.

La concentración de DNA de las muestras fue determinada por corrida en geles de agarosa al 1% utilizando un patrón de fago λ de concentración conocida.

Técnica de PCR:

Cebadores: se emplearon cuatro pares de cebadores correspondientes a la región P24 del gen *gag*. Todos fueron sintetizados basados en la secuencia de nucleótidos de la cepa de referencia Petaluma (1).

Los cebadores P1 + P4 y TG 1+ TG2 fueron utilizados como pares externos y P2 + P3 y TG3 + TG4 como pares internos. La secuencia de los mismos se indica en la Tabla I.

Condiciones de la reacción: la amplificación fue realizada empleando un termociclador Perkin-Elmer y *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer, USA). Se comenzó con un período de desnaturalización de 5 min a 94° C y se optimizaron las condiciones de la reacción para cada par de cebadores, variando las temperaturas de "annealing" y polimerización. Se analizaron dos tipos de "buffers" comerciales: "Supermix" y "Buffer PCR 10x" (Promega-Madison, USA), variando la concentración final de sus constituyentes. En tubos de 0.5 ml se adicionaron 4 μ l de la mezcla de dinucleótidos 10 mM, 2 unidades/ μ l de *Taq* polimerasa, 20 pM de cada cebador y 10 μ l de muestra. Se variaron las concentraciones de Cl_2Mg entre 1,5 mM y 3,5 mM y de gelatina entre 0,015 y 0,025 %. El volumen final de la reacción fue de 50 μ l. Para la segunda amplificación se usaron 5 μ l del producto de la primera, no se usó gelatina y la concentración de Cl_2Mg se varió dentro de los mismos parámetros. El volumen final también fue de 50 μ l.

Análisis de los productos de PCR: 10 μ l del producto amplificado fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE (50 mM

Tabla I. Secuencia y localización de los cebadores correspondientes a la región P24 del gen gag.
Table I: Primers location and sequence of FIV genome gene gag P24 region.

Cebador	Secuencia(5'-3')	Gen y localización (bp)
P1	ATATGACGGTGTCTACTGCTGCTG	<i>gag</i> (916-939)
P2	AAGGCAAGAGAAGGACTAGGAG	<i>gag</i> (1108-1129)
P3	TAGGGTAATGGTCTGGGAGCAT	<i>gag</i> (1310-1289)
P4	CTCTACACTGCATCCTAGCTGGTG	<i>gag</i> (1398-1375)
TG1	CTAGGAGGTGAGGAGGTCCAACCTGTG	<i>gag</i> (1126-1151)
TG2	CTGGTGATCCTACTTCTTGGCAGGC	<i>gag</i> (1687-1663)
TG3	ACAGATGACAGCTGAGTATGATCGTAC	<i>gag</i> (1257-1287)
TG4	CCTCTAAAGTACTTTCTGTTTAAAG	<i>gag</i> (1651-1627)

de Tris pH 8,0 50 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA) durante 1 hora a 50 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. La observación de una banda con el peso molecular esperado fue considerada un resultado positivo.

La especificidad del segmento amplificado con los cebadores P fue analizado por corte con enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I.

Determinación de anticuerpos específicos: Se utilizó la prueba de inmunocromatografía en sandwich para detectar anticuerpos contra la gp40 del VIF (Speed Duo FeLV-FIV, Bio Vet, Francia).

Resultados:

Se optimizó una técnica de doble PCR ("Nested PCR") para la detección directa del virus empleando el DNA de la cepa argentina LP3.

En tres muestras no se obtuvo concentración suficiente de DNA partiendo de 300 µl Se establecieron las concentraciones óptimas de DNA en un rango de 65 µg/ml a 125 ng/µl.

Después de un período de desnaturalización de 5 min a 94° C se estandarizó, para ambos pares de cebadores, el siguiente programa de ciclado: la primera amplificación de 25 ciclos de 45 seg a 94°C, de 1 min a 55° C y de 2 min a 72° C; la segunda amplificación de 30 ciclos de 1 min a 94°C, de 1 min a 55°C y de 1 min a 72°C. Con el "Buffer Supermix" no se logró amplificación. Sin embargo, con el "Buffer PCR 10x" y con concentraciones de 3,5 mM de Cl₂Mg y 0,01% de gelatina para la primera amplificación y de 1,5 mM Cl₂Mg para la segunda, con 4 µl de la mezcla 10 mM de dinucleótidos y cebadores al medio de la concentración especificada, se obtuvo como resultado con los cebadores "T" una banda de 310 pb

y con los cebadores "P" una de 203 pb.

Para el estudio de las muestras de sangre felina se utilizaron los cebadores "P" (Foto N° 1). En el análisis del producto amplificado con enzimas de restricción se obtuvieron segmentos de 137 pb y 68 pb con *Hind*III, mientras que con *Pst*I las bandas fueron de 117 pb y 88 pb.

En 17 de las muestras estudiadas se demos-

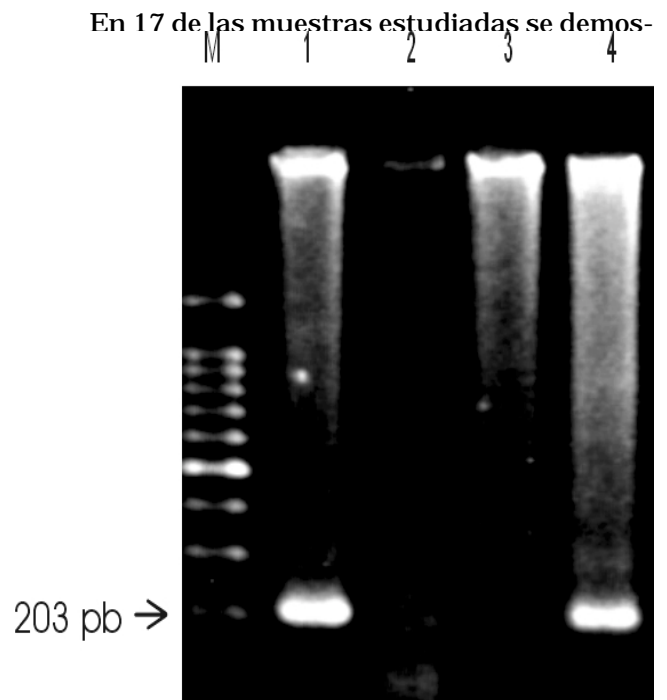


Foto 1: resultados obtenidos en la PCR con los cebadores "P". Línea 1: DNA control positivo. Línea 2: agua destilada control negativo. Línea 3: sangre de gato negativa. Línea 4: sangre de gato positiva. M: marcador de peso molecular (100- 1500 pares de bases). El número de la izquierda indica los pares de bases del fragmento amplificado

Photo 1:PCR results with P primers. Line 1: DNA positive control, Line 2: negative control (distilled water), Line 3: negative blood cat, Line 4: positive blood cat. MÑ molecular weight marker (1500-100 pb). 203 pb amplified fragment.

tró la presencia de anticuerpos específicos contra VIF mediante la prueba de inmunocromatografía en sandwich. En las mismas se detectó, también, la presencia de DNA proviral a través de la técnica de PCR.

Discusión:

La selección para el diagnóstico de una técnica de PCR en dos etapas ("Nested PCR"), en la cual se emplea un par de cebadores que amplía un segmento altamente conservado del gen *gag* y luego otros cebadores que amplían una fracción interna de este segmento, significa un aumento de sensibilidad y especificidad respecto a una reacción de PCR en un solo paso (7, 8, 17). Por tal razón, se eligió una prueba de este tipo para diagnóstico a partir de sangre periférica donde la cantidad de provirus insertado en linfocitos es variable (12,19). El método de extracción de DNA con el equipo comercial sin la separación previa de los linfocitos con Ficoll-Hypaque resulta práctico y rápido. Se parte de una muestra de 300 µl de sangre y en una hora se puede obtener la muestra de ácido nucleico. En tres casos no se obtuvo concentración de DNA suficiente y, como no se disponía del recuento de células blancas de los animales en estudio, no se pudo establecer si esos casos de baja concentración estaban relacionados con un número muy bajo de linfocitos (20). Por otra parte, como era deseable asegurar una cantidad suficiente de provirus insertado en linfocitos, se decidió combinar los dos métodos: separación de linfocitos con Ficoll-Hypaque seguido de la extracción del DNA con el equipo comercial. En estados tempranos de la enfermedad, libres de signos, la aparición o desaparición de los provirus hasta límites no detectables está causada por el balance entre incremento de células infectadas y destrucción de las mismas (8, 12).

De acuerdo con Rimstad y Ueland (17), las concentraciones de Cl_2Mg y de los dinucleótidos son definitorias para el éxito de la reacción. Es por eso que, cuando se trabajó con el buffer denominado "Supermix" que posee ambos compuestos en concentraciones estándar, no se obtuvieron resultados positivos. Sin embargo, empleando el "Buffer PCR 10X", variando las concentraciones de Cl_2Mg , agregando gelatina a la primera amplificación y los dinucleótidos y cebadores en las concentraciones ya especificadas se mejoraron los resultados de la reacción. La especificidad de la reacción fue demostrada con las enzimas de restricción.

El presente trabajo permitió obtener un protocolo de "Nested PCR" empleando DNA de una

cepa autóctona. Si bien la técnica desarrollada fue sensible y específica no se encontraron sustanciales ventajas en su aplicación respecto a la determinación de anticuerpos específicos. Dado que existió correspondencia entre los resultados de ambas técnicas, la PCR podría ser una herramienta útil para la confirmación de reacciones serológicas dudosas, para distinguir inmunidad adquirida por vacunas de inmunidad por infección natural (19) o para la detección de animales portadores del VIF y que se encuentran en el período de ventana inmunológico.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional de La Plata y la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

Bibliografía:

1. Pedersen NC, Ho EW, Brown M L, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 1987; 235:790 -793.
2. Courchamp F, Pontier D. Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *C.R. Acade. Sci. Paris. Sciences de la vie/Life sciences* 1994; 317: 1123-1134.
3. Berthon AF, Lacheretz A, Malh P, Vialard J. Diagnostic expérimental du syndrome immunodéficientaire félin par ELISA et Western blot: Confrontation des résultats aux données cliniques et épidémiologiques. *Revue Méd.Vet.* 1995; 146 (12): 855-862.
4. Castellano MC, Oliva GA, Risso M, Vila Roza MV, Galosi CM, Pecoraro MR, Etcheverrigaray ME. Estudio seroepidemiológico de la infección con el virus de la inmunodeficiencia felina en gatos domésticos de la ciudad de La Plata, Argentina y alrededores. *Revista de Medicina Veterinaria* 1999; 80 (1): 1-4.
5. Pecoraro MR, Tomonaga K, Miyazawa T, Kawaguchi Y, Sugita S, Tohya Y, Kai C, Etcheverrigaray ME, Mikami T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol.* 1996; 77: 2031-2035.
6. Tohya Y, Castellano MC, Norimine J, Etcheverrigaray ME. Anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia felina: Primera comprobación en Argentina. *Rev Med Vet.* 1994; 75 (4): 242-246.
7. Hohdatsu T, Yamada M, Okada M, Fukasawa M, Watanabe K, Ogasawara T, Takagi M, Aizawa C, Hayami M, Koyama H. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol* 1992; 30 (2-3): 113-23.
8. Momoi Y, Matsumoto Y, Watari T, Goitsuka R, Miyazawa T, Mikami T, Tsujimoto H, Hasegawa A. Detection of feline immunodeficiency virus proviral DNA in feline peripheral blood mononuclear cells by the nested two- step polymerase chain reaction. *Zentralbl Bakteriol* 1993; 279 (2):274-82.

9. Ohkura T, Shin YS, Wakamiya N, Iwa N, Kurimura T. Detection of proviruses and viral RNA in the early stages of feline immunodeficiency virus infection in cats: a possible model of the early stage of HIV infection. *Exp Anim* 1997; 46 (1): 31-9.
10. Klein D, Janda P, Steinborn R, Muller M, Salmons B, Gunzburg W H. Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis* 1999; 20 (2): 291-299.
11. Leutenegger CM, Klein D, Hofmann-Lehmann R, Mislin C, Hummel U, Boni J, Boretti F, Guenzgurg WH, Lutz H. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantizations by polymerase chain reaction using the Taq Man fluorogenic real-time detection system. *J Virol Methods* 1999; 78 (12): 105 -16.
12. Lawson M, Meers J, Blechynden L, Robinson W, Greene W, Carnegie P. The detection and quantification of feline immunodeficiency provirus in peripheral blood mononuclear cells using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1993; 38: 11-21.
13. Maki N, Miyazawa T, Fukasawa M, Hasegawa A, Hayami M, Miki K, Mikami T. Molecular characterization and heterogeneity of feline immunodeficiency virus isolates. *Arch Virol* 1992; 123: 29-45.
14. Rigby MA, Holmes EC, Pistello M, Mackay A, Brown A, Neil JC. Evolution of structural proteins of feline immunodeficiency virus: molecular epidemiology and evidence of selection for change. *J Gen Virol* 1993; 74 (3): 425-436.
15. Machi S, Maggi F, Di Iorio C, Poli A, Bendinelli M, Pistello M. Detection of feline immunodeficiency proviral sequences in lymphoid tissues and the central nervous system by in situ gene amplification. *J Virol Methods* 1998; 73 (1): 109 -19.
16. Mateucci D, Baldinotti F, Mazzetti P, Pistello M, Bandecchi P, Chilarducci R, Poli A, Tozzini F, Bendinelli M. Detection of Feline Immunodeficiency Virus in Saliva and Plasma by Cultivation of Feline Immunodeficiency Virus in Saliva and Plasma by Cultivation and Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (3): 494-501
17. Rimstad E, Ueland K. Detection of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. *J Virol. Methods* 1992; 36: 239-248.
18. Pistello M, Menzo S, Giorgi M, Da Prato L, Cammarota G, Clementi M, Bendinelli M. Competitive polymerase chain reaction for quantization feline immunodeficiency virus load in infected cat tissues. *Mol Cell Probes* 1994; 8 (3): 229-34.
19. Inoshima Y, Tomonaga K, Ikeda Y, Miyazawa T, Mikami T. Quantification of feline immunodeficiency virus (FIV) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of cats infected with Japanese strains of FIV. *J Vet Med Sci.* 1995; 57 (3): 487-92.
20. Meers J, Robinson W.F, del Fierro G.M, Scoones M.A, Lawson MA. Feline immunodeficiency virus: quantification in peripheral blood mononuclear cells and isolation from plasma of infected cats. *Arch Virol* 1992; 127:233-243.