



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGIA MOLECULAR
MAESTRÍA DE BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

“TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL”
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**“Aplicación de un método *“in house”* de PCR anidada
para detección de VIH proviral”**

AUTOR: Dayana Maricela Guano Gallardo

TUTOR: Dr. Phd. Efrén Germán Santos Ordoñez

GUAYAQUIL – ECUADOR

DICIEMBRE 2016

| REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA | | |
|--|--|---------------------------------|
| FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL | | |
| TÍTULO "Aplicación de un método <i>"in house"</i> de PCR anidada para detección de VIH proviral" | | |
| AUTOR: Dayana Guano Gallardo | REVISORES: Ing. Sisia Chávez Chica, M g. | |
| INSTITUCIÓN: Universidad de Guayaquil | FACULTAD: UPID | |
| CARRERA: BIOTECNOLOGIA MOLECULAR | | |
| FECHA DE PUBLICACIÓN: 2016 | N° DE PÁGS.: 48 | |
| ÁREA TEMÁTICA: SALUD | | |
| PALABRAS CLAVES: DNA proviral VIH, recién nacidos expuestos, PCR anidada, diagnóstico virológico de VIH. | | |
| RESUMEN: El VIH, agente etiológico del SIDA, ha causado la mayor pandemia mundial afectando todo tipo de población, siendo los hijos de madres seropositivas, un sector muy vulnerable por efectos sanitarios y sociales. La ineffectividad de un diagnóstico con técnicas tradicionales por la persistencia sérica de anticuerpos maternos requiere una prueba precoz que determine su infección, evitando tratamiento profiláctico innecesario y la revisión del esquema de inmunización. El presente estudio descriptivo, retrospectivo de corte longitudinal, aplicó un método de detección de ADN proviral por PCR anidada <i>"in house"</i> para el diagnóstico de VIH en recién nacidos hijos de madres seropositivas; validando la técnica implementada al encontrar una sensibilidad y especificidad superior al 95%, frente muestras confirmadas con Western blot. Los <i>primers</i> utilizados para la primera PCR fueron JA4 y JA7, y para la segunda PCR JA5 y JA6. De las 36 muestras, cinco fueron positivas al encontrar en la primera corrida una banda con un peso de 296pb y en la segunda una banda de 131pb. La muestra 6, resultó ser falsa positiva y presentó una banda atenuada que se la tomó como positiva; se encontró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,9%. El diagnóstico de VIH precoz para neonatos expuestos y para casos especiales está limitada en el país y la técnica implementada brinda una alternativa fiable, accesible y oportuna para ser considerada en el algoritmo diagnóstico del Manual de Atención a PVVS del Ministerio de Salud Pública. | | |
| N° DE REGISTRO (en base de datos): | N° DE CLASIFICACIÓN: | |
| DIRECCIÓN URL (tesis en la web): | | |
| ADJUNTO PDF | <input checked="" type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| CONTACTO CON AUTOR: | Teléfono: 0984677149 | E-mail: dayag_08@hotmail.com |
| CONTACTO DE LA INSTITUCIÓN | Nombre: UNIDAD DE POSTGRDO | |
| | Teléfono: 2325538/ 39 EXT. 114 O 104 | |

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del estudiante DAYANA MARICELA GUANO GALLARDO del Programa de Maestría/Especialidad BIOTECNOLOGIA MOLECULAR, nombrado por el Decano de la Facultad de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo CERTIFICO: que el estudio de caso del examen complejo titulado **Aplicación de un método "in house" de PCR anidada para detección de VIH proviral.**, en opción al grado académico de Magíster en BIOTECNOLOGIA MOLECULAR, cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que establece el Reglamento aprobado para tal efecto.

Atentamente

DR. EFREN GERMAN SANTOS ORDOÑEZ

TUTOR

Guayaquil, diciembre de 2016

DEDICATORIA

A mis papás Teresa y Alejandro (†), y a mi hija
Melissa.

A G R A D E C I M I E N T O

A mi Familia porque fueron la razón esencial para lograr tan anhelado sueño.

A las Autoridades de la Universidad de Guayaquil por sus enseñanzas y conocimientos impartidos.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación especial, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL”

FIRMA

DAYANA MARICELA GUANO GALLARDO

ABREVIATURAS

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

DNA: Ácido desoxiribonucleico

TAR: Terapia antirretroviral

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Humana

IgG: Inmunoglobulina G

Ac: Anticuerpos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RNA: Ácido ribonucleico

RNA^t: Ácido ribonucleico de transferencia

CMH: Complejo Mayor de Histo compatibilidad

CD: Clúster de diferenciación

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PVVS: Personas viviendo con VIH/SIDA.

Tabla de contenido

| | |
|--|------|
| Portada | i |
| Repositorio | ii |
| Certificación del Tutor | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimiento | v |
| Declaración expresa | vi |
| Abreviaturas | vii |
| Contenido | viii |
| Índice de Tablas | ix |
| Resumen | x |
| Introducción | 12 |
| Delimitación del problema: | 13 |
| Formulación del problema: | 14 |
| Justificación: | 15 |
| Objeto de estudio: | 16 |
| Campo de acción o de investigación: | 16 |
| Objetivo general: | 16 |
| Objetivos específicos: | 16 |
| La novedad científica: | 17 |
| Capítulo 1 | 18 |
| El VIH: Su historia y desarrollo en el ser humano | 18 |
| Fisiopatología del virus, historia natural y diagnóstico | 21 |
| Referentes empíricos | 24 |
| Capítulo 2 | 29 |
| MARCO METODOLÓGICO | 29 |
| 2.1 Metodología: | 29 |
| 2.2 Métodos: | 29 |
| 2.3 Premisas o Hipótesis | 32 |
| 2.4 Universo y muestra | 32 |
| 2.5 CDIU – Operacionalización de variables | 33 |
| TABLA 1 | 33 |
| 2.6 Gestión de datos | 34 |
| 2.7 Criterios éticos de la investigación | 35 |

| | |
|---|----|
| Capítulo 3..... | 36 |
| RESULTADOS | 36 |
| 3.1 Antecedentes de la unidad de análisis o población | 36 |
| 3.2 Implementación de la prueba de PCR anidada para detección de VIH – 1 DNA proviral en menores del año y medio de edad, hijos de madres seropositivas y validación de la técnica | 37 |
| Capítulo 4..... | 41 |
| DISCUSIÓN | 41 |
| 4.1 Contrastación empírica:..... | 41 |
| 4.2 Limitaciones:..... | 42 |
| 4.3 Líneas de investigación:..... | 42 |
| 4.4 Aspectos relevantes | 42 |
| Capítulo 5..... | 44 |
| PROPUESTA | 44 |
| Conclusiones y recomendaciones | 46 |
| Bibliografía | 47 |
| Anexos..... | 49 |

Título: Aplicación de un método “in house” de PCR anidada para detección de VIH proviral.

Resumen

El VIH, agente etiológico del SIDA, ha causado la mayor pandemia mundial afectando todo tipo de población, siendo los hijos de madres seropositivas, un sector muy vulnerable por efectos sanitarios y sociales. La ineffectividad de un diagnóstico con técnicas tradicionales por la persistencia sérica de anticuerpos maternos requiere una prueba precoz que determine su infección, evitando tratamiento profiláctico innecesario y la revisión del esquema de inmunización. El presente estudio descriptivo, retrospectivo de corte longitudinal, aplicó un método de detección de ADN proviral por PCR anidada “in house” para el diagnóstico de VIH en recién nacidos hijos de madres seropositivas; validando la técnica implementada al encontrar una sensibilidad y especificidad superior al 95%, frente muestras confirmadas con Western blot. Los *primers* utilizados para la primera PCR fueron JA4 y JA7, y para la segunda PCR JA5 y JA6. De las 36 muestras, cinco fueron positivas al encontrar en la primera corrida una banda con un peso de 296pb y en la segunda una banda de 131pb. La muestra 6, resultó ser falsa positiva y presentó una banda atenuada que se la tomó como positiva; se encontró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,9%. El diagnóstico de VIH precoz para neonatos expuestos y para casos especiales está limitada en el país y la técnica implementada brinda una alternativa fiable, accesible y oportuna para ser considerada en el algoritmo diagnóstico del Manual de Atención a PVVS del Ministerio de Salud Pública.

Palabras clave: DNA proviral VIH, recién nacidos expuestos, PCR anidada, diagnóstico virológico de VIH.

Summary

HIV, etiologic agent of AIDS, has caused the largest global pandemic affecting all kinds of people, being the children of HIV-positive mothers, a very vulnerable by health and social effects sector. Ineffectiveness of a diagnosis with traditional techniques by serum persistence of maternal antibodies requires an early test to determine their infection, avoiding unnecessary prophylactic treatment and revision of the immunization schedule. This retrospective, descriptive study standardized method of proviral DNA detection by nested PCR "in house" for diagnosing HIV in newborns of HIV positive mothers; validating the technique implemented by finding a sensitivity and specificity greater than 95% compared with Western blot confirmed samples. The primers used for the first PCR were JA 4 and JA 7, and for the second PCR JA 5 and JA 6. Of the 36 samples, five were positive in the first run to find a band with a weight of 296pb and the second a band of 131pb. Sample 1, turned out to be false positive and showed an attenuated band took it as positive; a sensitivity of 100% and a specificity of 96.9% was found. Early diagnosis of HIV exposed infants and for special cases is not available in the country and the implemented technique provides a reliable, accessible and timely alternative to be considered in the diagnostic algorithm Care Manual PLWA the Ministry of Public Health.

Keywords: DNA proviral HIV-exposed newborns, nested PCR virological diagnosis of HIV.

Introducción

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), se ha convertido en la pandemia del siglo XXI; a 30 años de su inicio, se logró redefinirla como una enfermedad crónica, gracias a las respuestas sanitarias oportunas y el desarrollo tecnológico; este último ha aportado significativamente en el diagnóstico oportuno del VIH, pilar fundamental en llegar a su control.

A pesar de que las vías de transmisión del virus son limitadas, si se compara con las vías que los típicos agentes etiológicos de las peores pandemias mundiales utiliza (vías aéreas, por aspiración de gotitas de saliva infectada, principalmente), su diseminación en treinta años ha sido alarmante; aproximadamente se estima que existen 50 millones de personas con el virus de VIH, muchos de los cuales desconocen su estado, la mayoría están en etapa de portadores y en menor cantidad están en fase de SIDA.

Para que se desarrolle la infección hay algunas situaciones que deben cumplirse, como la cantidad de virus que hay en el individuo infectado (carga viral), calidad del mismo, o sea, si se encuentra activo e infectante (el VIH mantiene mejor estas características en secreciones que contengan células de defensa), y que, en caso de haber contacto, este debe ser directo a una vía sanguínea o linfática; se considera que algunas personas no se han infectado con VIH a pesar de haber estado en contacto directo con el virus por no haber cumplido los antecedentes mencionados.

Su diagnóstico fue inicialmente complicado, pero en los últimos tiempos, la lucha contra esta enfermedad, ha desarrollado varias estrategias de mitigación, en el campo diagnóstico se han tecnificado varios procedimientos y su accesibilidad ha tratado de llegar a todas las poblaciones de la tierra.

Además del diagnóstico, también se desarrollaron otras estrategias como acceso a tratamientos oportunos, campañas de información y prevención, acceso a atención médica gratuita a la persona que vive con VIH, entre otras.

Un sector muy vulnerable por las consecuencias sociales, emocionales y que repercute directamente sobre su salud, es los recién nacidos hijos de mujeres con VIH; es menester que su diagnóstico de infección se realice lo más precozmente posible, ya que su identificación temprana colabora en la inmediata aplicación de la terapéutica apropiada, sobretodo, se evitaría el tratamiento profiláctico antirretroviral. Asimismo, las estrategias de inmunización están supeditadas a dicho diagnóstico.

Debido a que por transferencia transplacentaria los anticuerpos maternos del tipo IgG pueden estar presentes en el niño hasta el año y medio de vida, el diagnóstico antes de esa edad debe realizarse exclusivamente a través de ensayos virológicos.

Delimitación del problema:

El diagnóstico precoz del neonato expuesto, es decir, hijo de madre con VIH (aunque en otros casos puede también identificarse en este grupo a neonatos que recibieron leche infectada), es de suma importancia pero de igual complejidad, las técnicas tradicionales inmunológicas o moleculares como ELISA o Carga viral por PCR, respectivamente, no tienen un alcance a este nivel.

Una de las principales razones para que no se pueda realizar un diagnóstico oportuno en esta población es la transferencia de anticuerpos maternos vía placentaria al feto, en el momento del embarazo, sin que ello signifique que haya habido la infección con el VIH, así también, otra situación es la historia natural que presenta el comportamiento viral, quien puede pasar sin replicarse durante meses o años, y dado que las pruebas disponibles detectan

anticuerpos (que el neonato poseerá en su organismo por transferencia materna), o que detectan la partícula viral cuando está activa (RNA), hace que estas pruebas no tengan factibilidad de uso sino hasta el año y medio de edad que es en el momento en que el individuo estará con su pleno desarrollo inmunitario y con la posibilidad de que si el virus entró, pueda replicarse.

Con lo expuesto, los recién nacidos sin un conocimiento de su estado serológico, se convierte en un individuo que se lo tratará a ciegas, se lo expondrá a procedimientos como intervenciones profilácticas antirretrovirales y de infecciones oportunistas, revisión y cambios en el esquema de vacunas del programa nacional del recién nacido. Además, los prejuicios, la discriminación y estigmatización social, así como la afectación psicológica a nivel familiar, la desigualdad en el acceso y la utilización de servicios de salud, prestaciones de servicios sociales e incluso a la vivienda, son otros efectos que se exacerban por el desconocimiento del estado serológico del niño.

Formulación del problema:

¿El diagnóstico en el recién nacido hijo de madre con VIH puede realizarse aplicando una prueba molecular que se basa en la detección de regiones no variables del DNA proviral por una PCR anillada, lo que permitiría una detección oportuna del virus de VIH y por ende, un diagnóstico certero y precoz?

Aplicando una técnica "in house" de PCR anidada para detectar el VIH en su estado proviral, esta técnica cualitativa amplifica por PCR secuencias de una región altamente conservada del gen *gag* del VIH-1 utilizando inicialmente un grupo de *primers*, para luego, a partir del producto de PCR se vuelve a utilizar para amplificar usando otro grupo de *primers* que se anillan más adentro en la secuencia previamente amplificada, lo que se conoce como

PCR anidada; lo que permitirá identificar secuencias del Virus del VIH oportunamente en una muestra del recién nacido expuesto.

Justificación:

A nivel mundial se ha frenado la propagación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la progresión del SIDA, con lo que se ha conseguido reducir la epidemia. Las estrategias aplicadas han funcionado, por lo que ahora la respuesta va al siguiente objetivo: poner fin a la epidemia de sida para el 2030 (UNAIDS, 2015).

Para responder a la epidemia, ONUSIDA ha desarrollado un enfoque que pretende alcanzar de una manera rápida un conjunto de objetivos con plazos definidos hasta el año 2020. Uno de los objetivos incluidos en las estrategias adoptadas es que por lo menos el 90% de todas las personas que viven con el VIH conozcan su estado serológico respecto al VIH, ya que se considera que de los 36,9 millones de personas que viven con el VIH en todo el mundo, 17,1 millones no saben que tienen el virus, por lo que los servicios de pruebas del VIH deben llegar a ellos, entre ellos 1,8 millones de niños (UNAIDS, 2015).

En los neonatos expuestos, se basa en determinar el ADN proviral, lo que ofrece un pronto diagnóstico. En el Ecuador, la disponibilidad de esta prueba está limitada, sea por capacidad tecnológica, capacidad del personal técnico o costos elevados de la misma; la aplicación de una prueba molecular usando Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollando una técnica casera (“*in house*”), se vuelve en una alternativa accesible, con el fin de ofrecer un diagnóstico a los recién nacidos hijos de madres con VIH.

Asimismo, esta prueba brinda confiabilidad, al ser implementada bajo un riguroso procedimiento, de esta forma brindar una herramienta eficaz para el diagnóstico temprano de VIH en recién nacidos hijos de madres con seropositivas.

O b j e t o d e e s t u d i o :

La presente investigación tiene como objeto estudiar el VIH en su fase proviral, en recién nacidos hijos de madres infectadas.

C a m p o d e a c c i ó n o d e i n v e s t i g a c i ó n :

La técnica a implementarse en el presente estudio es una prueba cualitativa que amplifica por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) secuencias de una región altamente conservada del gen gag del VIH-1 utilizando inicialmente un grupo de primers, para luego, a partir del producto de PCR se vuelve a utilizar para amplificar usando otro grupo de primers que se anillan más adentro en la secuencia previamente amplificada, lo que se conoce como PCR anidada.

O b j e t i v o g e n e r a l :

Implementar un método de detección de DNA proviral en recién nacidos expuestos, hijos de madres con VIH, aplicando una técnica de PCR anidada “*in house*”, en el laboratorio de virología del Instituto Nacional de Investigación - Quito, de enero a junio de año 2013.

O b j e t i v o s e s p e c í f i c o s :

Desarrollar una técnica de PCR anidada para que detecte DNA proviral de VIH para el diagnóstico de VIH en recién nacidos hijos de madres seropositivas, en el laboratorio de virología del Instituto Nacional de Investigación - Quito.

Analizar muestras por medio de PCR anidada para detectar secuencias de ADN proviral para VIH.

Validar la técnica implementada.

La novedad científica:

El uso de un método molecular para el diagnóstico de una patología siempre presenta ventajas como su rapidez, confiabilidad y precisión; asimismo, presenta desventajas como el complejo equipamiento, elevados costos y personal altamente capacitado lo que limita a ser un método de elección; sin embargo, una infección que requiere este tipo de diagnóstico es la detección de VIH en recién nacidos expuestos, la aplicación de una técnica “*in house*” por PCR anidada, facilita su accesibilidad, sobre todo en las instituciones públicas, pues en el Ecuador, el diagnóstico en recién nacido expuestos de VIH se extiende hasta el año y medio.

Capítulo 1

El VIH: Su historia y desarrollo en el ser humano

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) ataca a las células de defensa del ser humano, la infección aguda avanza de semanas a meses en algunos casos hasta ser asintomática, una etapa crónica de una duración de 10 años o más, sin que ello signifique que no puede transmitirse el virus. La historia natural de la enfermedad, es decir, si recibir tratamiento alguno, progresa hasta romper el equilibrio de defensa del huésped y replicación viral, desatando el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ya que su sistema inmunitario se ha afectado al punto de contraer todo tipo de infecciones causadas por bacterias, hongos, virus, parásitos, incluso también hay proliferación de ciertas células malignas (cáncer), cuya consecuencia final es la muerte del individuo (NIH, 2016), ya que tiene una tasa de mortalidad cercana al 100% (WHO, 2003).

Su forma de transmisión, la accesibilidad al diagnóstico, el tratamiento profiláctico y el desconocimiento y desinterés acerca de esta enfermedad, la han convertido en la epidemia mundial más costosa a nivel económico y social; la tasa de morbilidad y mortalidad tan elevada, los medicamentos, el diagnóstico, las campañas de prevención, han superado cualquier gasto que, si no hubieran dado éxito las estrategias aplicadas para controlarla, hubiera sido imposible de mantener (UNICEF, 2016).

Luego de treinta años de su descubrimiento, se ha controlado este problema de salud mundial, implementando dos estrategias: primero, instituyendo medidas de salud pública para la prevención y control de la expansión del VIH; y segundo, motivando a la investigación científica que permita avanzar en la comprensión del comportamiento del virus y, en base a ello, desarrollar diagnósticos oportunos, tratamientos eficaces y, posiblemente alguna vacuna capaz de prevenir la infección (Chauca, 2004).

El SIDA como tal, fue descrito por primera vez en 1981, cuando algunos jóvenes sanos que vivían en zonas urbanas de Estados Unidos presentaban infecciones oportunistas que eran desconocidas en ese grupo etario. Similares infecciones fueron notificadas en África, el Caribe y Europa (W H O , 2003); dados estos casos, se recopila información de muertes sospechosas desde 1959, cuando se encuentra anticuerpos positivos para VIH en un suero de un fallecido bajo circunstancias parecidas en Zaire (África central) y en 1969 de un joven en Estados Unidos (O P S , 1996).

El SIDA fue tornándose una enfermedad epidémica rápidamente. La mayoría de jóvenes que presentaban los síntomas murieron, había varias hipótesis discrepantes, pero se sospechaba que la causa era un virus transmitido por la sangre (W H O , 2003).

En 1983 el Profesor Luc Montagnier y otros investigadores confirmaron esa sospecha cuando descubrieron un nuevo agente patógeno: un retrovirus con tropismo por las células CD4, que son las células que dan inmunidad celular y protegen al ser humano de una gran diversidad de patógenos víricos, micobacterianos y fúngicos (W H O , 2003).

El profesor Jacques Pepin de la Université de Sherbrooke, hace una recopilación en su libro, en base a una investigación bibliográfica y sustentada científicamente con pruebas moleculares, acerca del origen del VIH, Pepin recalca que el virus fue una aparente mutación del VIS (Virus de la Inmunodeficiencia Simiana), que infecta a poblaciones de chimpancés en África central hace aproximadamente 100 años (Delgado, 2011), mismo que comparte características genéticas y formas de transmisión con el VIH, el salto genético pudo deberse a la faenación y posible zoofilia de estos animales, práctica común en la población de Leopoldville (África), donde se detectan los primeros casos de SIDA en humanos (Araújo, 2014).

Las personas infectadas por el virus, cuando la enfermedad avanza, en su historia natural, pierde su equilibrio de defensa y contrae enfermedades que, son las causantes a la larga de la mortalidad del individuo (Chauca, 2004).

El VIH pertenece a la familia de los *lentivirus* y se clasifica en dos tipos: VIH-1 y VIH-2, ellos comparten un 40-50% de características genéticas y una organización genómica igual. El VIH-1 es el causante de la pandemia mundial de SIDA pues su funcionalidad vírica es más patogénica y transmisible. La infección solo por VIH-2 está confinada principalmente en regiones de África occidental, los casos detectados en otros países presentan confesión con VIH-1 (Delgado, 2011).

Se ha descrito que el VIH-1 y el VIH-2 se originan de diferentes saltos inter-especie de virus que infectan en la naturaleza a poblaciones de simios en África. El VIH-2 está filogenéticamente muy cercano al SIV_{sm}, virus de la inmunodeficiencia del *Sooty mangabey*, una especie de mono muy habitual en África occidental. El origen del VIH-1 no está muy claro, pero teorías respaldadas por información genética, le dan origen proveniente del agente que infecta en la naturaleza a la variedad de chimpancé *Pan troglodytes troglodytes* que habita en zonas poco accesibles del sur de Camerún (SIV_{cpzPtt}) (Delgado, 2011; Araújo, 2014).

Las cepas del VIH-1 se han clasificado en tres grandes grupos según su homología genética y se piensa que representan diferentes episodios de salto inter-especies. Estos son el grupo M (*main* o principal), el grupo O (*outlier*), y el grupo N (no M, no O). El grupo M se ha dividido en 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K) y en cepas recombinantes entre ellos, denominados CRF (formas recombinantes circulantes). Los CRF se forman por recombinación de fragmentos genómicos de distintos subtipos. Actualmente se han descrito más de 30 CRF y su número se incrementa constantemente (Delgado, 2011).

Fisiopatología del virus, historia natural y diagnóstico

El virión del VIH-1 tiene una estructura icosaédrica con un diámetro entre 80 y 120 nm, con 72 glicoproteínas con dos copias idénticas de RNA de una sola cadena, el cual está empaquetado en una cubierta proteica o cápside, que forma parte de un conglomerado proteico en el centro de la partícula viral y está conformado por tres proteínas estructurales mayores y tres enzimáticas que son: la transcriptasa inversa, una endonucleasa de ADN (integrasa) y una proteasa (Cordeiro & Taroco, 2006); hay al menos seis genes no estructurales que regulan la replicación viral y la interacción del genoma viral con el genoma celular: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*. Los productos de estos genes actúan coordinadamente como reguladores positivos y/o negativos de la transcripción (Ramírez, 2004).

En la cápside está el gen estructural *pol*, que participan en los pasos tempranos del ciclo vital del virus y la conformación final de las partículas virales antes de salir de la célula huésped; la cápside está rodeada de una cubierta lipídica que es derivada de la membrana celular de la célula huésped infectada y posee las glicoproteínas de membrana gp120 y gp41, que derivan del tercer gene estructural o *env*, al ser abundantemente glicosiladas la convierten en un elemento crucial para el reconocimiento de los receptores de las células diana (Ramírez, 2004).

El VIH-1 infecta es capaz de infectar diferentes células del cuerpo humano siendo los principales blancos el linfocito T CD4+ y los macrófagos, y otras como células de sostén (glía) del sistema nervioso central y neuronas, células enterocromafines del intestino y células dendríticas incluyendo las células de Langerhans así como precursores de médula ósea (Ramírez, 2004).

El proceso en general, de replicación del virus se resume así: entrada a la célula, transcripción inversa, integración del ADNc (ADN copia) viral en el genoma hospedador, transcripción del ADN vírico originando la formación de ARNm víricos y el ARN de la progenie, encapsidación en el citoplasma y por último, la gemación de viriones con envoltura, con la consiguiente liberación de la célula (Cordeiro & Taroco, 2006).

El VIH se ancla a la célula huésped por la interacción con 2 tipos de receptores, la molécula de CD4, y el otro, un conjunto de correceptores del VIH (Alcamí, 2008), y quimiocinas como CCR5 y CXCR4 (Ramírez, 2004).

Al ingresar el virión empieza la acción de la transcriptasa reversa, que es una ADN polimerasa y pasa el ARN viral a una copia de ADN lineal y monocatenario, todo ello en el citosol de la célula huésped, la actividad enzimática se cumple en tres pasos: 1) síntesis de ADN usando como molde el ARN viral, 2) síntesis de ADN usando como molde ADN, y 3) actividad de ribonucleasa H (degrada la cadena de ARN de un híbrido ARN:ADN) usando como cebador ARNt de origen celular; de esta forma se transcribe a ADN un centenar de nucleótidos cercanos al extremo 5' del ARN viral, deteniéndose allí el proceso de transcripción (Cordeiro & Taroco, 2006).

La enzima integrasa inserta el ADN proviral en el ADN genómico huésped, con ayuda del coactivador celular LEDGF/p75 (lens epithelium derived growth factor), que le permite al provirus integrarse en regiones de genes celulares altamente expresados (Arcia Anaya, Montoya Guanin, & Rugeles López, 2014), cuando ya están sintetizadas las proteínas virales, son procesadas por traducción previo al ensamblaje constituyendo las partículas virales maduras, aquí participan algunas proteínas virales como Vif, Vpu y la proteasa viral (Emerman & Malim, 1998; Mangeat, y otros, 2003)

Por la característica mutagénica que posee APOBEC3G, la tasa de error de la transcriptasa reversa que sintetiza así moléculas de ADNc defectivas es elevada y frecuente, esto hace que no se puedan integrar y replicarse de forma efectiva, sin embargo esta misma particularidad de mutación es la que aprovecha el virus para la no identificación inmunitaria (Alcamí, 2008).

Hay un efecto citopático como consecuencia de la infección por VIH de los linfocitos CD4+, al perder el equilibrio entre la respuesta inmune y la replicación viral, se produce una inmunodeficiencia adquirida (McCutchan, Carr, & Robb, 2002); las células dendríticas muestran en su membrana lectinas DC-SIGN y L-SIGN, las que adhieren de una forma inespecífica el virus del VIH, esta unión a las lectinas produce una facilidad y acrecenta enormemente la infección de los linfocitos circundantes, este proceso se denomina facilitación en *trans*, y hace de la interacción entre células dendríticas y linfocitos, denominada sinapsis inmunitaria, una zona preferente de propagación del VIH a linfocitos CD4 o células con receptores similares (Alcamí, 2008).

Las vías de transmisión del virus son muy limitadas y hasta condicionadas, sin embargo su propagación en 30 años no ha dejado de sorprender a la comunidad científica en general, debido a la cantidad de factores que contribuyen al aumento de seropositivos, (Mesa-Mazo, Vergaño-Salazar, Sánchez-Botero, & Muñoz-Loaiza, 2010), los Retrovirus transmitidos por la sangre como el VIH aprovechan los contactos sexuales, las transfusiones sanguíneas con hemocomponentes no seguros, las drogas inyectables (intravenosas en su gran mayoría), los descuidos en las llamadas precauciones universales dentro del entorno salubrista principalmente; y la vía vertical, de la madre al niño durante el embarazo, el parto y la lactancia (WHO, 2003).

Se ha visto que algunos individuos progresan muy rápido a la fase de SIDA, sin embargo, otros presentan una estable respuesta inmunológica, se cree que esto se debe a los *cluster of differentiation* (CD) o grupo de diferenciación, que son moléculas antigénicas, expresadas en la superficie celular, con funciones diversas a nivel biológico; así, los linfocitos T humanos se pueden dividir en células que cumplen funciones de colaboración a otras células inmunitarias y células que median actividad citotóxica y expresan preferencialmente el antígeno CD4 y las citotóxicas, el CD8, las moléculas CD4 y CD8 poseen la función biológica de interacción con la estructura molecular del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y clase I, respectivamente. Este proceso es vital durante la presentación antigénica y la posterior activación del sistema inmune (Noda Albelo, Vidal Tallet, Pérez Lastre, & Cañete Villafranca, 2013).

Referentes empíricos

Un resultado positivo de infección por VIH, se lo da a partir del uso de dos técnicas con distinto principio de reacción antigénica con su posterior conformación por Western Blot en la mayor parte de casos. Las pruebas serológicas de cuarta generación (añaden antígeno-p24) reducen el período ventana a 13-15 días. La viremia plasmática (carga viral) se utiliza para el seguimiento de los pacientes infectados por VIH, para definir inicio de tratamiento y para comprobar el fallo virológico al esquema antirretroviral. Las pruebas de resistencia determinan el cambio de tratamiento, y detectan la transmisión de cepas resistentes en diagnósticos recientes (García, Álvarez, Bernal, Chueca, & Guillot, 2011).

Es de suma importancia que el diagnóstico de infección en niños recién nacidos hijos de mujeres con VIH se lo haga lo más precozmente posible, ya que su identificación temprana ayuda en la pronta iniciación con la terapéutica apropiada. Igual, las estrategias de vacunación están sujetas a dicho diagnóstico (Fonseca & Prieto, 2005).

En el Ecuador, no se disponen de datos fidedignos de prevalencia materna y neonatos expuestos para VIH, hay estudios en países de similares condiciones geográficas, poblacionales y socioeconómicas como Colombia donde esta se sitúa en el 1,44% (1,37-1,52), asimismo, la transmisión vertical (TV) del VIH, sin terapia y profilaxis materna está en un 14-25% de los casos; esta transmisión se puede producir intraútero (25-40% de los casos) o intraparto (60-75% de los casos). La lactancia materna aumenta el riesgo en un 16% en casos de infección establecida y en un 29% en casos de primoinfección. (UNICEF, 2013).

La mayoría de los casos en niños se debe a infección vertical; con una estimación de 630 (570-740) mil niños menores de 15 años infectados anualmente. En el 2003 había 2,1 millones de niños menores de 15 años viviendo con VIH; en este mismo año murieron 490 (440-580) mil niños, 90% en África.

La transmisión del VIH al niño sucede por tres mecanismos diferentes:

1. Transmisión intra-parto. Representa entre 40 y 80% de los casos y es causada por el contacto fetal con la sangre y el líquido amniótico.
2. Transmisión in útero. Ocasionalmente se ha identificado VIH en el tejido fetal a la octava semana de gestación. Es responsable del 10% al 25% de los casos.
3. Transmisión a través de la leche materna. La lactancia materna es el mecanismo de transmisión en 14% a 30% de los casos.

En el recién nacido es inútil la determinación de anticuerpos contra VIH, mediante Elisa o Western Blot debido al paso de anticuerpos maternos al feto que determina que el resultado sea positivo. Se deben realizar pruebas virales directas como PCR-ARN, PCR-ADN y cultivo viral (Fonseca & Prieto, 2005).

El diagnóstico de la infección VIH en neonatos expuestos debe realizarse lo más precoz posible, preferiblemente en las primeras 48 horas de vida ya que son muy importantes las implicaciones que el tratamiento con antirretrovirales tiene en el pronóstico de los niños infectados por VIH, las pruebas serológicas, sin embargo, no son válidas para los niños menores del año y medio, en quienes los anticuerpos anti-VIH pueden ser de transferencia materna durante la gestación por lo en este grupo etario la de elección es PCR DNA, estimándose que, en la mayoría de los niños, la infección VIH puede ser definitivamente diagnosticada al mes de vida, y en prácticamente todos los pacientes a los 6 meses de edad (León-Leal, González-Faraco, Pacheco, & Leal, 2014).

El ADN provirales el genoma viral integrado en el genoma de la célula huésped a la que el virus infecta. En la actualidad, esta prueba está siendo reemplazada por la determinación de carga viral (ARN-VIH), por varios factores, principalmente por la dificultad de disponer de ensayos comerciales para determinar ADN proviral, con suficientes controles de calidad y certificación por agencias reguladoras, además de que para su realización se debe utilizar sangre total. No obstante, sigue siendo la determinación de referencia en el momento de utilizar los métodos moleculares diagnósticos de infección VIH. Es así, esta prueba es clave en aquellas situaciones diagnósticas en las que la serología no es concluyente como en el caso particular de valorar la transmisión madre-hijo (García, Álvarez, Bernal, Chueca, & Guillot, 2011).

Las investigaciones de estimación de la transmisión utilizando como ensayo virológico la detección de DNA proviral por PCR han mostrado que aproximadamente un tercio de los niños infectados pueden ser diagnosticados dentro de las 48 horas de nacidos, con lo que se demostraría que estos niños se infectaron tempranamente en útero; los restantes, identificados posteriormente, indicaría que la transmisión de la infección fue tardía, muy presumiblemente

en el periparto. Esta sería una razón por la cual la sensibilidad de este ensayo en los primeros días de vida no alcanzaría los niveles de detección óptimos. La sensibilidad de un solo ensayo de DNA PCR realizado a menos de 48 horas de vida es menor al 40% , pero aumenta rápidamente durante la segunda semana (93%) y alcanza el 96% a los 28 días de vida, y con una especificidad del 99% (UNICEFF, 2013).

Este marcador es sumamente importante, en particular en niños con resultados previos negativos, ya que el valor predictivo del negativo es del 100% a los 6 meses de vida. En su mayoría, estos ensayos son desarrollados en el laboratorio y en general deberían incluir la detección de más de un gen de VIH, además de la detección de un gen celular. Por otra parte, los ensayos desarrollados en el laboratorio para DNA proviral deberían además ser evaluados en su sensibilidad para la detección de subtipos no-B y sus formas recombinantes, como los que circulan en nuestro país, ya que esta podría estar disminuida tratándose de una técnica de amplificación genómica. Finalmente, respecto de este marcador, es importante recordar que la detección de DNA proviral en tiempo real presenta una sensibilidad superior a la de los métodos convencionales de DNA PCR (Oladokun , y otros, 2015).

Estudios realizados por Cañizal y col, reportan que, si hubo infección en los niños, el RNA extracelular alcanza altos niveles rápidamente, por lo que las pruebas de RNA pueden ser útiles, pero persistiendo el problema que esto solo tiene un alto valor predictivo positivo, por lo que la detección de RNA plasmático cualitativo es un marcador altamente sensible para el diagnóstico temprano en casos de una infección intraútero. Los ensayos cualitativos deben ser validados, frente al diagnóstico definitivo de infección, antes de ser utilizados con tal fin.

(Cañizal, Fernández, Zapiola, & Bouzas, 2010)

Un niño se considera infectado cuando tiene dos pruebas virológicas positivas en dos muestras de sangre distintas, independientemente de su edad. La infección por VIH podría ser

presumiblemente excluida en los bebés no amamantados con dos o más pruebas virológicas negativas, considerando una de ellas a los 14 días de edad y otra con más de 1 mes de vida; o bien, resultados virológicos negativos obtenidos en niños mayores de 2 meses de edad (UNICEF, 2013; Márquez, 2012).

Capítulo 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Metodología:

Para la presente investigación se aplicó un estudio cualitativo descriptivo no experimental de corte longitudinal, en el que se realizó la implementación de una técnica molecular de PCR anidada “*in house*” para el diagnóstico de VIH en recién nacidos hijos de madres seropositivas. El estudio se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigación en Salud de Quito, en el laboratorio de virología, de enero a junio de año 2013, validando su desempeño mediante determinación de sensibilidad y especificidad con el análisis de sueros positivos y negativos confirmados por western blot.

2.2 Métodos:

Se implementó una prueba diagnóstica molecular por PCR anidada para detección de DNA proviral, para ello se procedió a recolectar 5 cm^3 de sangre total con anticoagulante (EDTA) de recién nacidos hijos de madres diagnosticadas con VIH, previo su consentimiento informado y firmado (Anexo 1), quienes acudieron a los ocho días del parto al laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Investigación.

Inmediatamente de la extracción, se procedió a separar los linfocitos para ser almacenados en congelación (-20°C) hasta recolectar las muestras suficientes para su procesamiento molecular. La separación linfocitaria aplica el fundamento de densidad, utilizando un reactivo separador de linfocitos (Ficoll) y con ayuda de centrifugación lenta ocurre la separación de fases en la muestra, con una pipeta Pasteur desechable se procedió a separar el anillo de la interfase, así se recuperaron los linfocitos para su almacenamiento.

La técnica para detección de infección por VIH en los recién nacidos expuestos identifica una región no variable del genoma del VIH en su fase proviral, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, técnica que le mereció a su inventor Karl Mullis, el premio Nobel de Química en 1983; para el presente estudio se utilizó una variante de PCR: la PCR anidada (Nested), que es un método muy utilizado para detectar la presencia de secuencias de DNA proviral del VIH - 1 en células mononucleares de sangre periférica (PMBC); el ADN es extraído con el kit comercial QIAamp mini kit blood de Qiagen, esta técnica es relativamente simple, sencilla y específica, esta técnica se realiza en dos pasos:

La primera corrida consiste en la amplificación de un segmento de una región *gag* conservada del genoma del VIH - 1 usando un par de iniciadores externos, que para este ensayo se basó en los iniciadores descritos por Albert y Fenyó, 1990, con ciertas modificaciones, descritas en el protocolo de referencia de Márquez, 2012; los *primers* JA4 con la secuencia 5'GAA GGC TTT CAG CCC AGA AG3', y JA7 con la secuencia 5'TCT CCT ACT GGG GGT GG3'.

La segunda corrida amplifica sobre el producto de la primera corrida, con iniciadores internos cuya secuencia es complementaria a fragmentos internos de la primera fracción amplificada, también se basa en los iniciadores descritos por Albert y Fenyó, 1990, con las modificaciones descritas en el protocolo de Márquez, 2012; estos *primers* son JA5 5'ACC ATC AAT GAG GAA GCT GC3'; y, JA6 con la secuencia 5'TAT TTG TTC CTG AAG GGT AC3'.

La ventaja que presenta esta técnica es el incremento de la sensibilidad a causa de su doble amplificación de secuencias específicas virales, además de aumentar

también la especificidad porque se amplificarán secuencias solo si hubieron amplificaciones en la primera corrida.

Se utilizó un control de beta globina humana para validar las corridas de amplificación y electroforéticas utilizando como *primers* CO3 5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC3'; y CO4 5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC3'.

La identificación del ADN extraído y amplificado, se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 2% con un voltaje de 110v por 60 minutos, se usó como colorante de contraste SYBR safe.

Para la interpretación de resultados y validación del procedimiento se considera que una muestra es positiva para VIH-1 cuando en la primera corrida se identifica una banda en con un peso de 296pb y que haya una amplificación en la segunda corrida con la presencia de una banda con un peso de 131pb; el procedimiento se valida si el control de beta globina humana está presente con una banda de un peso de 110pb y el control interno de reactivo no muestre bandas; en caso de no cumplir con ninguno de los criterios anteriores debe repetirse el procedimiento para la muestra problema.

El procedimiento completo de las técnicas que se implementaron en el presente estudio, tanto para la extracción de ADN como para la identificación de las bandas presentes por electroforesis en gel de agarosa está descrito a detalle en el Anexo 3.

Los datos, de uso exclusivo del investigador, fueron recogidos en una base electrónica diseñada para el efecto (Anexo 2), y sus datos analizados en el paquete ofimático de Excel 2010.

Los equipos, materiales, consumibles y reactivos necesarios estuvieron disponibles en el mencionado laboratorio donde la investigación se realizó y los resultados de la misma son de uso exclusivo del Instituto Nacional de Investigación en Salud.

2.3 Premisas o Hipótesis

La implementación de la técnica diagnóstica de detección de DNA proviral para infección por VIH aplicando una técnica molecular de PCR anidada en el presente estudio, presenta una sensibilidad y especificidad superior al 98%, lo que la convierte en una herramienta diagnóstica de elección para recién nacidos hijos de madres con VIH.

2.4 Universo y muestra

Según el protocolo diagnóstico pediátrico para VIH, establecido por el Ministerio de Salud Pública, indica que todos los recién nacidos expuestos (menos de un mes de vida) hijos de madres con VIH, deben acudir al laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Investigación en Salud de Quito y Vigilancia Epidemiológica para un diagnóstico, que para ese momento es carga viral (copias de RNA viral plasmático).

Con el antecedente expuesto, se selecciona a todos aquellos niños que fueron llevados al laboratorio para dicho diagnóstico, durante el año 2011. Se recuperaron los linfocitos y fueron conservados hasta su procesamiento en congelación (-80°C).

Hasta el año 2013, varios pacientes regresaron por su examen confirmatorio por Western blot, pues cumplieron con la edad requerida para aplicar un diagnóstico por esta técnica.

Se excluyeron todas aquellas muestras de pacientes que no tuvieron un examen confirmatorio serológico al año y medio de edad.

En total se recuperaron 36 muestras de recién nacidos que cumplieron los criterios de inclusión; 4 fueron positivas al año y medio de edad por pruebas serológicas con confirmación por Western blot y 32 fueron negativas bajo el mismo algoritmo.

Las muestras fueron codificadas por un tercero, al azar con números ordinales del 1 al 36.

2.5 C D I U – O peracionalización de variables

T A B L A 1

| VARIABLE | DIMENSIÓN | INSTRUMENTO | UNIDAD |
|--|---|---|--|
| Diagnóstico de VIH | Determinación serológica por la identificación de anticueros IgG anti VIH-1 en las muestras de recién nacidos hijos de madres seropositivas. | Western blot | Positivo Negativo |
| Recién nacido expuesto | Recién nacido menor de 30 días, hijo de madre diagnosticada con examen confirmatorio como Western blot para infección por VIH | Neonato expuesto menor de 30 días de nacido | Sí No |
| Edad | Tiempo transcurrido de un individuo desde su nacimiento hasta la fecha actual. | Días | Numérico |
| PCR anidada para DNA proviral de VIH-1 | Prueba molecular de amplificación en dos pasos: uno que identifica regiones estables de VIH-1 y el segundo paso que amplifica secciones internas del producto inicialmente amplificado. | Amplificación de una secuencia del genoma del VIH en su fase de DNA proviral identificada por electroforesis en gel de agarosa al 2%. | Positiva Presencia de una banda de 296pb para la primera PCR y de 131pb para la segunda PCR. Negativa Ausencia de bandas con tamaños esperados. |

| | | | |
|---------------|--|--|---|
| Sensibilidad | Capacidad de detectar posibles casos de una patología investigada. | Fórmula: Verdaderos positivos / Verdaderos positivos + falsos negativos | % |
| Especificidad | Capacidad de identificar casos que no tengan la patología estudiada. | Fórmula: Verdaderos negativos / Verdaderos negativos + falsos positivos | % |

2.6 Gestión de datos

Para el análisis de datos, se recolectó la información necesaria en una base electrónica en el paquete informático de Office – Excel 2010, la base diseñada para su efecto se procesó y depuró para realizar los cálculos correspondientes a Sensibilidad y Especificidad, para determinar de esta forma la validación de la prueba.

Las variables cualitativas fueron expresadas en porcentajes y tasas en los casos correspondientes.

Las Fórmulas aplicadas para determinar Sensibilidad y Especificidad fueron:

$$\text{Sensibilidad:} \\ = \frac{VP}{VP + FN} :$$

$$\text{Especificidad:} \\ = \frac{VN}{VN + FP} :$$

En donde,

VP: Verdaderos positivos

VN: Verdaderos negativos

FP: Falsos positivos

FN: Falsos negativos

2.7 Criterios éticos de la investigación

Para la realización de este estudio se contó con la autorización de la máxima autoridad del Instituto Nacional de Investigación en Salud INSPI; además, con la aprobación del Comité de Ética de la misma Institución.

Para salvaguardar la confidencialidad de la información y la relación personal de salud – paciente, se pide autorización de participación en el estudio tanto a las madres como a sus hijos previa información pertinente y consentimiento informado.

Los datos recolectados son de exclusivo uso del investigador y serán manejados bajo estricta confidencialidad según reglamentos y lineamientos establecidos por las leyes vigentes en el Ecuador.

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1 Antecedentes de la unidad de análisis o población

Se recolectaron 36 muestras sanguíneas, desde enero a diciembre del 2011, de recién nacidos expuestos, con una edad promedio de 9,7 días \pm 2,4, que fueron conservadas hasta su procesamiento. Las edades de los neonatos estuvieron desde los ocho días de nacidos hasta 15 días (Figura 1). En el periodo establecido para el estudio, se recolectaron 36 muestras de individuos que acudieron al laboratorio de virología del Instituto de Investigación, quienes en su mayor parte, asistieron a los 8 días de nacidos, pues esta es la recomendación emitida por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, en el Manual de Atención Integral al PVVS (MSP, 2012), es decir, 19 pacientes, mientras que en menor cantidad acudieron a los 11, 12, 13, 14 y 15 días.

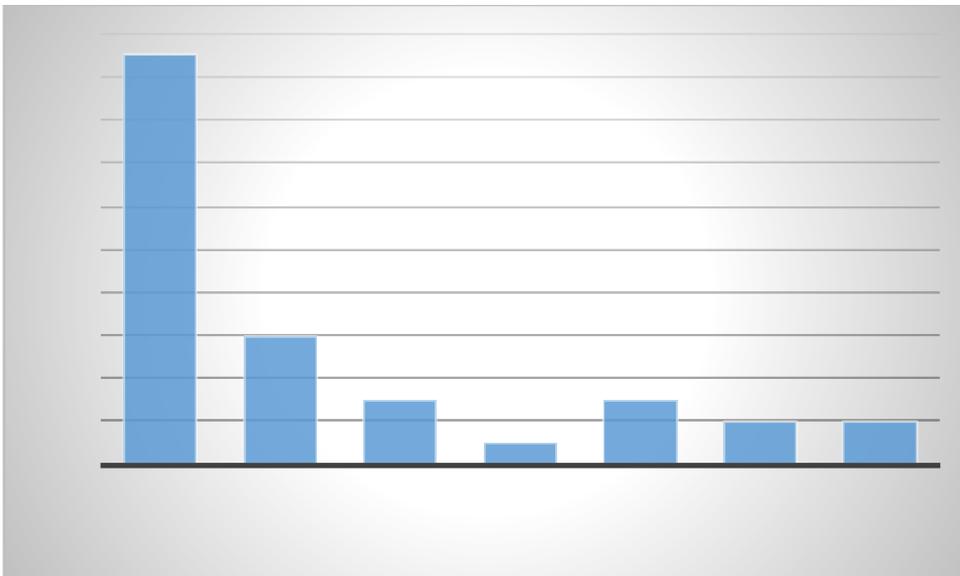
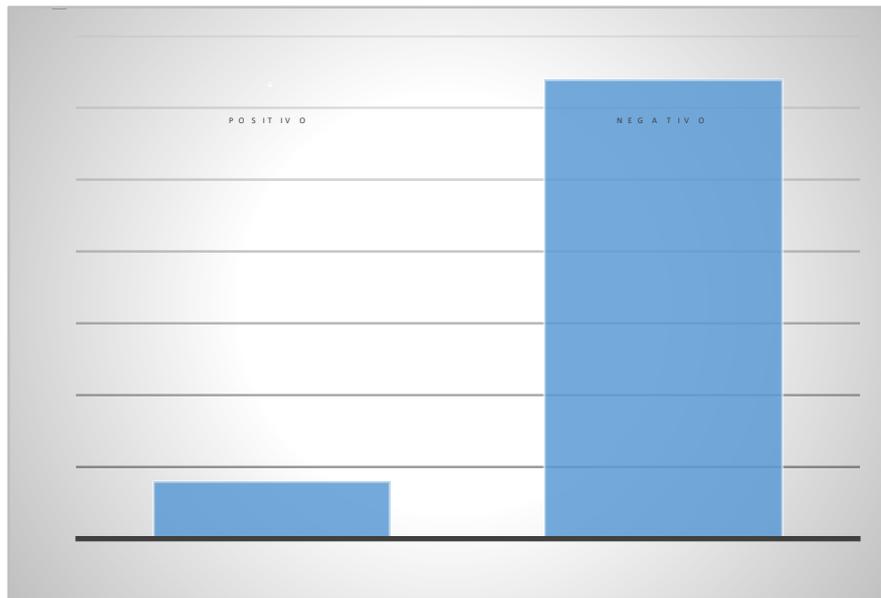


Figura 1. Distribución etaria de los neonatos expuestos. Muestra las edades en las que se extrajeron las muestras para el diagnóstico de VIH DNA proviral.

Fuente: La Autora

Al año y medio de edad se les realizó una prueba serológica confirmatoria por Western blot, encontrando que de todos los individuos participantes en este estudio, 4 fueron positivos para infección por VIH, es decir, se infectaron a través de transmisión vertical. Los individuos positivos y negativos para VIH fueron confirmados al año y medio por Western



blot

Figura 2. Serología de individuos por Western blot. Muestra 4 resultados positivos por Western blot, del total de muestras analizadas (36).

(Figura

Fuente: La Autora

2).

3.2 Implementación de la prueba de PCR anidada para detección de VIH – 1 DNA proviral en menores del año y medio de edad, hijos de madres seropositivas y validación de la técnica.

Posterior a la recolección de muestra (linfocitos) y su confirmación, se procesa la prueba molecular. Para la primera PCR, con la extracción de una secuencia externa de una región no variable del virus, de las 36 muestras analizadas en la extracción y

en el gel de agarosa, cinco muestras dieron positivo, es decir, presentaron una banda con un peso de 296pb, como se observa en las Figuras 3 y 4.

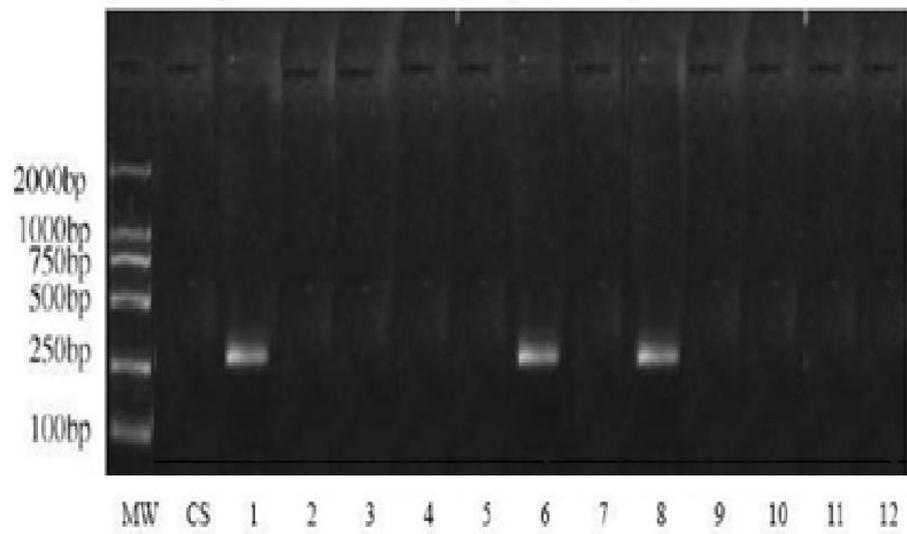


Figura 3. Gel de agarosa al 2% . Electroforesis en gel de agarosa del producto de la primera amplificación de PCR, donde se puede que no existe bandas en el control del sistema CS, y las muestras 1, 6, y 8 muestran una banda de 296pb, lo que indica amplificación de secuencias genómicas del VIH.

Fuente: La Autora

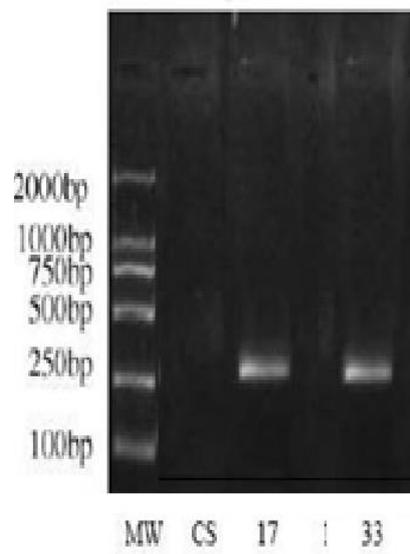


Figura 4. Gel de agarosa al 2% . Electroforesis en gel de agarosa del producto de la primera amplificación de PCR, donde se puede que no existen bandas en el control del sistema CS, y las muestras 17 y 33 muestran una banda de 296pb, lo que indica amplificación de secuencias genómicas del VIH, se omiten los resultados de muestras que no presentaron bandas visibles.

Fuente: La Autora

Para la segunda PCR, con la extracción de una secuencia interna de una región no variable del virus ya amplificada, de las 36 muestras analizadas en la extracción y en el gel de agarosa, las mismas cinco muestras dieron positivo, es decir, presentaron una banda con un peso de 110 pb, como se observa en las Figuras 5 y 6.

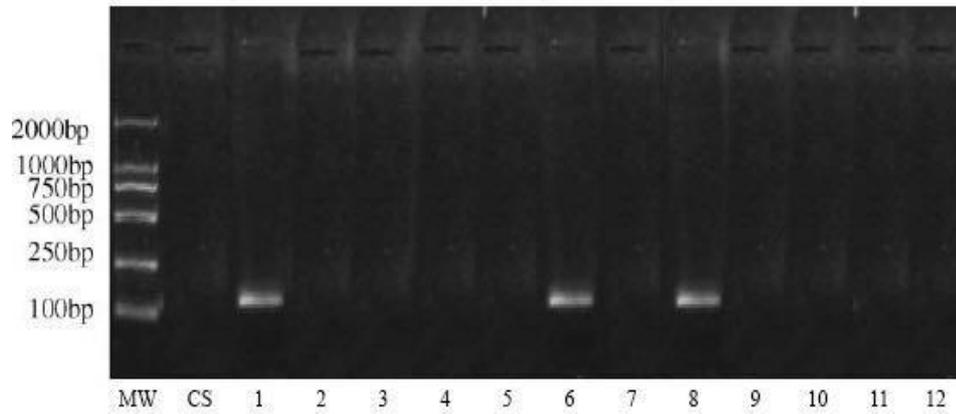


Figura 5. Gel de agarosa al 2% . Electroforesis en gel de agarosa del producto de la segunda amplificación de PCR donde se puede que no existe bandas en el control del sistema CS, y las muestras 1, 6, y 8 muestran una banda de 131 pb, lo que indica amplificación de secuencias genómicas de VIH del producto previamente amplificado., se omiten los resultados de muestras que no presentaron bandas visibles.

Fuente: La Autora

Figura 6.

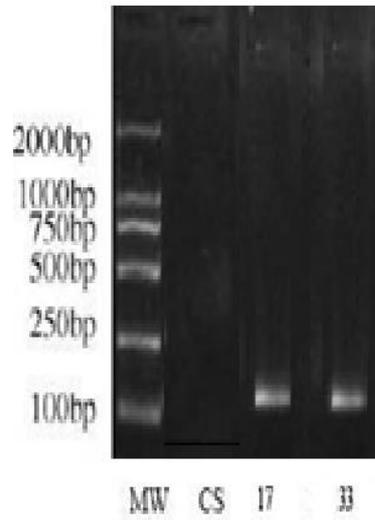


Figura 6. Gel de agarosa al 2% . Electroforesis en gel de agarosa del producto de la segunda amplificación de PCR donde se puede que no existe bandas en el control del sistema CS, y las muestras 17 y 33 muestran una banda de 131 pb, lo que indica amplificación de secuencias genómicas de VIH del producto previamente amplificado., se omiten los resultados de las muestras que no mostraron amplificación.

Fuente: La Autora

La sensibilidad de la técnica implementada en el laboratorio de virología, para la detección de infección por VIH en menores del año y medio fue del 100% pues todas las muestras positivas en la PCR anidada fueron muestras de individuos confirmados con Western blot. La Especificidad de la técnica implementada en el laboratorio de virología, para la detección de infección por VIH en menores del año y medio, fue del 96.9% , ya que una prueba en PCR anidada fue falsa positiva.

Capítulo 4

DISCUSIÓN

4.1 Contrastación empírica:

La implementación de la técnica resultó exitosa, la recuperación de linfocitos es uno de los procesos más delicados, sin embargo ningún estudio reporta alguna dificultad en este paso.

Ya en el proceso mismo de la PCR, la extracción de DNA se la hizo con un método convencional utilizando el kit comercial QIAamp mini kit blood de Qiagen, siguiendo su protocolo, que consiste en lisis celular de linfocitos, purificación de ácidos nucleicos en columnas de sílica gel y finalmente, la elución de los ácidos nucleicos para su amplificación, mismo que se basó en estudios realizados por Albert y Fenyo en 1990 con ciertas modificaciones, tomando algunas referencias también de otro estudio, el de Coutré y otros, 1990.

Las amplificaciones de PCR mostraron buenos resultados con los controles del sistema y de la beta globina, permitiendo validar el ensayo. Las altas sensibilidad (100%) y especificidad (96,9%) de la técnica implementada presentan un alto nivel de confianza ($p < 0,03$) puesto que fueron comparados con una prueba de oro 100% confirmatoria como es Western blot.

Debido a que en países en desarrollo aún no se puede disponer de técnicas comerciales disponibles a costos accesibles, el desarrollo casero de las técnicas moleculares se convierte en una alternativa para varios diagnósticos, teniendo entre sus grandes ventajas el precio y, su sencilla implementación, si se siguen las instrucciones y procedimientos descritos.

En los últimos años, no hay estudios similares reportados que hayan realizado el mismo tipo de validación, algunos de las investigaciones revisadas como Chohan, y otros, 2011; Seu, Mwape, & Bradford, 2014; Chang, y otros, 2015; y, Chohan, y otros, 2011, han realizado investigaciones para diagnósticos y comparaciones de desempeños, utilizando kits comerciales.

Esto hace, que el presente estudio, brinde una opción confiable para que se utilice para diagnosticar infección temprana por VIH en recién nacido, incluso si se valida con muestras confirmadas de pacientes adultos, la misma técnica puede extender su alcance a diagnósticos para casos especiales, en especial para determinar infecciones recientes por VIH.

4.2 Limitaciones:

No se ha validado la técnica para diagnósticos tempranos en casos especiales de mayores de 18 de meses de edad post – contacto con VIH.

4.3 Líneas de investigación:

Los resultados arrojados en la investigación establecen una línea de base para continuar con estudios más concernientes a la mejora del diagnóstico en casos especiales, a la accesibilidad a conocer el estado serológico precoz, establecer un conocimiento epidemiológico real de la enfermedad en el país; todo esto con el fin de seguir desarrollando estrategias que mitiguen la infección por VIH y el estado pueda seguir cumpliendo con las metas propuestas en el Plan del Buen Vivir, sobretodo, en mejorar la calidad de vida en las personas con enfermedades crónicas y catastróficas, un derecho humano universal.

4.4 Aspectos relevantes

La implementación de la técnica de detección de DNA proviral del VIH-1 en menores del año y medio, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,9%, determina que es una técnica recomendable para realizar un diagnóstico oportuno y precoz para los recién nacidos. Dado que el Ecuador, aún no puede satisfacer la demanda de un diagnóstico de VIH para neonatos expuestos, esta técnica implementada satisfactoriamente permitirá darle al Estado, una alternativa para ser incorporada en el algoritmo recomendado por el Ministerio de Salud Pública en el Manual de Atención Integral al PVVS.

Estudios recientes no pueden contrastarse con el realizado, pues ya aplican kits comerciales para sus investigaciones, esto avala aún más a la presente técnica como la alternativa “casera” para un diagnóstico molecular del VIH precoz en el Ecuador.

Capítulo 5

PROPUESTA

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), se ha convertido en la pandemia del siglo XXI; a 30 años de su inicio, se logró redefinirla como una enfermedad crónica, gracias a las respuestas sanitarias oportunas y el desarrollo tecnológico; este último ha aportado significativamente en el diagnóstico oportuno del VIH, pilar fundamental en llegar a su control.

Su diagnóstico fue inicialmente complicado, pero en los últimos tiempos, la lucha contra esta enfermedad, ha desarrollado varias estrategias de mitigación, en el campo diagnóstico se han tecnificado varios procedimientos y su accesibilidad ha tratado de llegar a todas las poblaciones de la tierra.

El VIH, agente etiológico del SIDA, ha causado la mayor pandemia mundial afectando todo tipo de población, siendo los hijos de madres seropositivas, un sector muy vulnerable por efectos sanitarios y sociales. La ineffectividad de un diagnóstico con técnicas tradicionales por la persistencia sérica de anticuerpos maternos requiere una prueba precoz que determine su infección, evitando tratamiento profiláctico innecesario y la revisión del esquema de inmunización.

Debido a que por transferencia transplacentaria los anticuerpos maternos del tipo IgG pueden estar presentes en el niño hasta el año y medio de vida, el diagnóstico antes de esa edad debe realizarse exclusivamente a través de ensayos virológicos.

La técnica de elección es la PCR anidada para detección de DNA proviral (material genético viral insertado en el DNA genómico humano), sin embargo, la

disponibilidad comercial en el Ecuador es nula por su difícil implementación y costos elevados, ya que no es una técnica de demanda poblacional, lo que la convierte en un negocio no atractivo para las comercializadoras y prestadoras de salud.

Empero, dado la problemática que un niño expuesto acarrea, lo hace vulnerablemente atractivo para la intervención directa por parte del Ministerio de Salud Pública, para cumplir con sus normas establecidas y que por ley amparan a todo ecuatoriano: el derecho a la salud y atención sin discriminación de cualquier índole, por ello, el presente trabajo permitirá brindar una alternativa de elección y sustentable para un diagnóstico oportuno en esta población, incluso la técnica puede ser aplicada en casos de riesgo.

Un diagnóstico precoz con un resultado fiable evitará intervenciones innecesarias, mitigando consecuencias no deseadas con dichas intervenciones, incluyendo aquellas que se desprenden a nivel social y económico.

Todo esto aportaría directamente con los objetivos expuestos en el Plan Nacional del Buen Vivir. Colaborando con el éxito en la ejecución del cumplimiento de aquellos objetivos inherentes a la salud y bienestar.

C o n c l u s i o n e s y r e c o m e n d a c i o n e s

El procedimiento de la implementación de la técnica fue exitoso, cumpliendo con los criterios de validación del ensayo.

La sensibilidad de la técnica implementada en el laboratorio de virología, para la detección de infección por VIH en menores del año y medio fue del 100% pues todas las muestras positivas en la PCR anidada fueron muestras de individuos confirmados con Western blot.

La Especificidad de la técnica implementada en el laboratorio de virología, para la detección de infección por VIH en menores del año y medio, fue del 96.9% , ya que una prueba en PCR anidada fue falsa positiva.

La sensibilidad y especificidad de la técnica implementada fue superior al 95% , lo que la convierte en herramienta diagnóstica confirmatoria para casos de neonatos expuestos.

La técnica implementada en el laboratorio de virología del Instituto Nacional de Investigación en Salud, puede ser considerada para ser incluida en el algoritmo diagnóstico de VIH en neonatos expuestos, en la Manual de Atención de PVVS, del Ministerio de Salud Pública.

Bibliografía

- Albert, J., & Fenyo, E. (1990). Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal Clin Microbiology*, 28(7), 1560-1564.
- Alcamí, J. (2008). Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(12), 3-10.
- Araújo, L. F. (2014). El origen del SIDA después de tres décadas de sus diagnósticos. *Sicología y Sociedad*, 26(1), 248-249.
- Arcia Anaya, E., Montoya Guanin, C., & Rugeles López, M. (2014). Reservorios del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1): mecanismos de latencia y estrategias terapéuticas. *Iatreia*, 27(3), 320-329.
- Cañizal, A. M., Fernández, G. S., Zapiola, I., & Bouzas, M. B. (2010). Utilización del ensayo Cobas Amplicor Monitor HIV-1 en el diagnóstico temprano de la infección por HIV en pediatría. *Actualizaciones en SIDA*, 18(67), 18-24.
- Chang, J., Tarasova Vedapuri Shanmugam, M. T., Shanmugam, V., Azarskova, M., Nguyen, S., Hurlston, M., . . . Nizova, N. (2015). *Journal Clin Microbiol*, 53(12), 3853-3858.
- Chauca, E. (2004). *Historia Natural de la infección por VIH*. Lima: Lim aedit.
- Chohan, B., Emery, S., Wamalwa, D., John-Stewart, G., Majiwa, M., Ng'ayo, M., . . . Overbaugh, J. (2011). Evaluation of a single round polymerase chain reaction assay using dried blood spots for diagnosis of HIV-1 infection in infants in an African setting. *BMC Pediatric*, 11(1), 111-118.
- Cordeiro, N., & Taroco, R. (2006). Retrovirus y VIH. En U. d. República, *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (2da ed., págs. 449-476). Montevideo: Instituto de Higiene.
- Coutlie, F., Saint-Antoine, P., Olivier, C., Voyer, H., Kessous-Elbaz, A., Berrada, F., . . . Viscidi, R. (1991). Evaluation of Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Using Nonisotopic Solution Hybridization for Detection of Polymerase Chain Reaction-Amplified Proviral DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11), 2461-2467.
- Delgado, R. (2011). Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 58-65.
- Emerman, M., & Malim, M. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, 1880-1884.
- Fonseca, C., & Prieto, F. (2005). Manejo de la Infección materna con VIH y del recién nacido expuesto. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 56(1), 68-81.
- García, F., Álvarez, M., Bernal, C., Chueca, N., & Guillot, V. (2011). Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(4), 297-307.

- León-Leal, J. A., González-Faraco, J. C., Pacheco, Y., & Leal, M. (2014). La infección por VIH en la infancia y la adolescencia: avances biomédicos y resistencias sociales. *Pediatría Integral*, 18(3), 161-174.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., & Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 24(4), 99-103.
- Márquez, P. (2012). Detección de ADN proviral de VIH-1 en niños menores de 18 meses, provenientes de madres confirmadas. *Tesis de Postgrado*.
- McCutchan, F., Carr, J., & Robb, M. (2002). Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18(17), 1281-1290.
- Mesa-Mazo, M., Vergaño-Salazar, J., Sánchez-Botero, C., & Muñoz-Loaiza, A. (2010). Modelo matemático para la dinámica de transmisión del VIH/SIDA en una población sexualmente activa. *Salud Pública*, 12(2), 308-316.
- MSP. (2012). Manual de Atención Integral. Ecuador: Ministerio de Salud Pública.
- NIH. (2016). *VIH/SIDA*. Bethesda: Biblioteca Nacional de los Estados Unidos.
- Noda Albelo, A., Vidal Tallet, L., Pérez Lastre, J., & Cañete Villafranca, R. (2013). Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. *Revista Cubana de Medicina*, 2, 118-127.
- Oladokun, R., Korsman, S., Ndabambi, S., Hsiao, N., Hans, L., Williamson, C., . . . Eley, B. (2015). False-negative HIV-1 polymerase chain reaction in a 15-month-old boy with HIV-1 subtype C infection. *S Afr Med Journal*, 105(10), 877.
- OPS. (1996). *SIDA: Preguntas y respuestas comunes*. Washington: Organización Panamericana de la Salud.
- Ramírez, L. S. (2004). Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. *Investigación Clínica*, 56(2), 143-152.
- Seu, L., Mwape, I., & Bradford, G. (2014). Single genome amplification of proviral HIV-1 DNA from dried blood spot specimens collected during early infant screening programs in Lusaka, Zambia. *Journal Virol Methods*, 203(1), 97-101.
- Todd, S., Anderson, C., Jolly, D., & Craik, C. (2000). HIV protease as a target for retrovirus vector-mediated gene therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2), 168-188.
- UNAIDS. (2015). *El SIDA en cifras*. Ginebra: UnAids.
- UNICEF. (2016). *La Pandemia del SIDA y el Acceso Universal a la Atención*. Región Latinoamérica.
- UNICEF. (2013). Atención integral de niños, niñas y adolescentes con VIH. En MSN, *Métodos de laboratorio para el diagnóstico de VIH* (págs. 4-22). Argentina.
- WHO. (2003). *VIH/SIDA: resistir a un agente portador*. España: Organización Mundial de la Salud.

Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado

| | |
|---|------------------------------------|
| CONSENTIMIENTO INFORMADO | |
| Yo..... con Noéula | |
| Entiendo y autorizo ser realizado el toma de sangre para el examen del VH/SIDA (resúmen PCR) a mi hijo(a)..... | |
| FECHA: | FIRMA REPRESENTANTE O MADRE |

Anexo 2: Hoja de recolección de datos



INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE Y MEDICINA TROPICAL 'L. IZQUIERDO' - ZONA NOROCCIDENTAL

SUBPROCESO DE INMUNOLOGIA - LABORATORIO DE HIVSIDA

INVESTIGACIÓN DEL DNA PROMITAL PARA VIH EN MENORES DE 18 MESES

SEMANA: _____

| GENERICOS | ESPECIFICO | IMK1 GLOB | # | TOTAL | ESPECIFICO | IMK1 FOR | # | TOTAL | ESPECIFICO | IMK2 FOR | # | TOTAL |
|----------------|------------|-----------|----|-------|------------|----------|----|-------|------------|----------|----|-------|
| | | | 10 | | | | 10 | | | | 10 | |
| AGUA | | 13,85 | | 13,85 | | 13,85 | | 13,85 | | 17,85 | | 17,85 |
| BUFFER PCR 10X | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 |
| MOL 2 (50mM) | | 0,75 | | 7,5 | | 0,75 | | 7,5 | | 0,75 | | 7,5 |
| DNIPS (25Mm) | | 0,2 | | 2 | | 0,2 | | 2 | | 0,2 | | 5 |
| | Primer CC3 | 1,25 | | 125 | Primer JA4 | 1,25 | | 125 | Primer JA5 | 1,25 | | 125 |
| | Primer CC4 | 1,25 | | 125 | Primer JA7 | 1,25 | | 125 | Primer JA6 | 1,25 | | 6,25 |
| laqPa | | 0,2 | | 2 | | 0,2 | | 2 | | 0,2 | | 2 |
| MUESTRA | | 5 | | | | 5 | | | | 1 | | |

GEL FASIA 20 MUESTRAS 90h de IAE 1x + 1,8g de agarosa
ELECTROFORESIS DE 90A 110V POR 30 MIN A 10X

MUNAJE

5u de MPM 50pb + 10u de H₂O
3u H₂O + 2u loading Buffer + 10u muestra/control
5u de MPM 100pb + 10u de H₂O

| | RESULTADO | RESULTADO | RESULTADO | RESULTADO |
|-------------------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| POCULO 1 MPM 50pb | 6 | 11 MPM 100pb | 16 | |
| 2 CN | 7 | 12 | 17 | |
| 3 CF | 8 | 13 | 18 | |
| 4 | 9 | 14 | 19 | |

5 _____

10 _____

15 _____

20 _____

CN
CNE
CI
CIE
CS

Control Negativo Interno (muestra negativa del laboratorio)
Control Negativo Externo (cultivo de linfocitos sanos)
Control Positivo Interno (muestra positiva del laboratorio)
Control Positivo Externo (cultivo de linfocitos infectados)
Control Sistema (agua)

Anexos 3: Procedimiento de PCR anidada para DNA proviral de VIH -1

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN PARA LA DETECCION DEL ADN PROVIRAL DE VIH -1 EN PBM C

Aislamiento del ADN proviral de VIH -1

- Pipetear 20 µl QIAGEN Proteasa (o proteinasa K dentro del tubo de microcentrifuga de 1.5 ml)
- Adicionar 200 µl de muestra en el tubo de microcentrifuga (5 x 10⁶ linfocitos en 200 µl PBS)
- Adicionar 200 µl de Buffer AL a las muestras Mezclar por pulso – vortexear por 15 seg.
- Incubar a 56° C por 10 minutos
- Centrifugar brevemente el tubo de microcentrifuga de 1.5 ml para remover gotas de la tapa.
- Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) a las muestras, y mezclar por pulso o vortexear por 15 segundos. Después de mezclar centrifugue brevemente el tubo de microcentrifuga para remover las gotas de la tapa.
- Cuidadosamente aplique la mezcla del paso anterior a las QIAamp Spin Column (en un tubo de colección de 2 ml) cerrar la tapa sin tocar los bordes, y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Coloque el QIAamp Spin Column en un tubo de colección de 2 ml limpio y descarte el tubo que contiene el filtrado.
- Cuidadosamente abrir el QIAamp Spin Column y adicionar 500 µl de buffer AW 1. Cierre la tapa sin tocar los bordes y centrifugue a 8000 rpm por 1 min. Coloque el QIAamp Spin Column en un tubo de colección de 2 ml limpio, y descarte el tubo que contiene el filtrado.
- Cuidadosamente abrir el QIAamp Spin Column y adicionar 500 µl de buffer AW 2. Cierre la tapa sin tocar los bordes y centrifugue a 14000 rpm por 3 minutos.
- Coloque el QIAamp Spin Column en un nuevo tubo de colección de 2 ml, y descartar el tubo de colección que contiene el filtrado. Centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
- Coloque el QIAamp Spin Column en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, y descartar el tubo de colección que contiene el filtrado. Cuidadosamente abrir el QIAamp Spin Column y adicionar 50 µl de buffer AE o agua destilada. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto, y luego centrifugue a 8000 rpm por 1 minuto.
- Para almacenar el ADN por largo tiempo, eluir en buffer AE y almacenar a -20°C es recomendable, el ADN almacenado en agua es sujeto a hidrólisis ácida.

PCR DEL GEN BETA GLOBINA

El procedimiento se basa en iniciadores descritos por Saiki et al 1985. Se utilizó un único par de iniciadores PCO3 y PCO4, definen una secuencia de 110 pb, en una región conservada del gen beta globina humana, que codifica una porción del locus HLA-DQα. Presentes en todos los humanos, el uso de estos iniciadores serán utilizados para verificar la calidad del ADN extraído y descartar la posibilidad de obtener falsos negativos resultando ser muy adecuadas para la creación de un banco de ADN y por lo tanto, también adecuadas para la amplificación.

Las células lisadas que fueron negativas en PCR con estos iniciadores serán excluidas para el estudio, esta técnica será considerada como control interno positivo, para la técnica de PCR anidada específica del ADN proviral de VIH-1.

Como controles positivos se utilizara dos controles positivos para VIH -1 (1 control interno y 1 control externo) y 3 controles negativos (1 control interno, 1 control externo y 1 control del mix de la reacción llamado control del sistema (CS)).

REACTIVOS

Primer CO3 5'ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'

Primer CO4 5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

10X Blue Juice Gel loading Buffer (tampon de depósito)

Set de DNTP's

50X TAE buffer

Etanol 100%

H2O ultra pura libre de ADNasa y ARNasa

PREPARACION DEL PREMIX

- Marque los tubos de PCR (tubos de 0.2 ml) para la reacción de amplificación. Manipule cuidadosamente cada uno de los tubos evitando contaminar (cuando son removidos del paquete, cuando son envasados para su esterilización o cuando se abren y tapan durante el procedimiento, evitando tocar en todo momento con el guante la tapa interna).
- No olvidar incluir los tubos rotulados como controles, dos controles positivos para VIH -1 (1 control interno y 1 control externo) y 3 controles negativos (1 control interno, 1 control externo y 1 control del mix de la reacción llamado control del sistema (CS)).
- Calcule y llene el formato de registro "Protocolo de PCR del gen BGH", según la cantidad de reacciones a trabajar. Por cada 10 reacciones hay que agregar un volumen extra de mezcla para suplir el error de pipeteo. Seguir el ejemplo de : **OJO**
- En la cabina de flujo laminar del área blanca, colocar los reactivos específicos, para realizar el premix.
- Marcar un tubo madre en donde se coloca todos los ingredientes del premix. Esta mezcla de reactivos tiene en su composición H2O libre de ADNasa y ARNasa, Cl2Mg, desoxinucleotidos (que le aportan la materia prima para la formación de nuevas cadenas), la enzima Taq polimerasa (que es termo estable), el buffer con el que actúa la enzima y los primers o iniciadores, que son oligonucleótidos sintéticos específicos para cada fragmento a amplificar.
- Prepare la cantidad de premix de PCR para el número de reacciones que fueron calculadas, tomando la alícuota correspondiente y agregando en el tubo madre todos los ingredientes, trabaje todo el tiempo sobre hielo, luego el premix se homogeniza mediante pipeteo.
- Se distribuye 20 µl del premix en cada uno de los tubos (tubos de capacidad 0.2 ml) los que fueron rotulados con su respectiva codificación, se puede utilizar una sola punta nueva con filtro y estéril para distribuir el premix en todos los tubos.
- Agregar 5 µl de agua ultra pura al tubo codificado como CS (control del sistema).
- Transferir los tubos de la hielera del área blanca a una hielera del área de extracción de muestras.
- Guardar las alícuotas de los reactivos ya utilizados de inmediato a -20° C.

- Los tubos que contienen el premix pueden ser guardados a -20° C hasta su uso o hasta después de dos horas.
- La hielera que contiene los tubos con el premix es transportada a la cabina de flujo laminar del área gris para colocar 5 µl de volumen de ADN a cada tubo según lo rotulado.

Tabla N° Ejemplo preparación de premix para PCR de BGH

MEZCLA DEL ADN EXTRAIDO CON EL MIX

- Utilizar pipetas y puntas con filtro que correspondan al área de extracción de ADN.
- Retire 30 minutos antes del congelador -80° C el ADN extraído, en caso de estar congelado y luego deben ser colocados sobre hielo inmediatamente.
- Adicionar 5 µl de ADN muestra apropiadamente a cada tubo que contiene 20 µl de premix, según como corresponda se codificación, de igual manera a los controles positivos y negativos y 5 µl de H₂O al control negativo del sistema, el volumen final de cada reacción es de 25 µl.
- Utilizar siempre puntas nuevas con filtro y estériles, para cada una de las muestras y controles, con la finalidad de evitar contaminación cruzada. Tratar en lo posible mantener cada uno de los tubos cerrados todo el tiempo cuando no son usados.

CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN

Programar el termociclador según el protocolo de la tabla N°, este programa sirve para la amplificación del gen de la BGH. Utilice instructivos para uso del equipo.

Colocar los tubos dentro de la máquina de PCR (termociclador), en donde la reacción de cada una de los tubos es llevada cabo in-vitro.

Retirar los tubos del termociclador y migre el producto amplificado del gen de BGH sobre gel de agarosa al 2%. En caso, de no migrar el producto amplificado en ese día, guardar los productos de PCR en -20° C.

Programación del termociclador

| TEMPERATURA | TIEMPO | NUMERO DE CICLOS |
|-------------|--------|------------------|
| 94 °C | 5 m in | 1 |
| 95 °C | 30 seg | 30 |
| 46 °C | 30 seg | |
| 72 °C | 30 seg | |
| 72 °C | 5 m in | 1 |
| 4 °C | & | |

VISUALIZACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO

PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA

Preparar la cantidad necesaria del reactivo de TAE 1X, que servirá para la preparación del gel de agarosa y como buffer de corrida en la cubeta de electroforesis.

Armar el molde de la cubeta de electroforesis, con sus respectivos peines que contenga una cantidad de pocillos suficientes para cubrir nuestra demanda de muestras.

Preparar un gel de agarosa al 2%, pesando en la balanza analítica 2 g de agarosa por cada 100 ml de TAE 1X.

En una fiola coloque el TAE 1X más la agarosa y posteriormente mezcle todo este contenido.

Coloque la fiola que contiene el TAE 1X más la agarosa dentro del microondas.

Calentar en el microondas la solución de agarosa TAE-1X y mezclarla de cuando en cuando hasta que esté completamente homogénea y transparente (aproximadamente de 2-3 minutos)

Retire la fiola, con cuidado.

Dejar que se enfríe un poco hasta aproximadamente los 55° C.

Vaciar todo el contenido dentro del molde de la cubeta de electroforesis previamente armada, procurando que no se formen burbujas.

Esperar a que solidifique el gel de agarosa.

Agregar TAE 1X dentro de la cubeta, hasta bañar por completo el gel de agarosa

Retirar las peinetas con mucho cuidado.

PROCEDIMIENTO 2

Preparar en cantidad necesaria del reactivo de TBE 1X, que servirá para la corrida en la cubeta de electroforesis.

Armar el molde de la cubeta de electroforesis, con sus respectivos peines que contenga una cantidad de pocillos suficientes para cubrir nuestra demanda de muestras.

Preparar un gel de agarosa al 2%, pesando en la balanza analítica 2g de agarosa por cada 100 ml de SYBR safe DNA gel Stain TAE 1X.

En una fiola coloque el SYBR safe DNA gel Stain TAE 1X más la agarosa y posteriormente mezclar todo el contenido.

Colocar la fiola que contiene SYBR safe DNA gel Stain TAE 1X más la agarosa dentro del microondas.

Calentar en el microondas la solución de agarosa SYBR safe DNA gel Stain TAE 1X y mezclarla de cuando en cuando hasta que esté completamente homogénea y transparente (aproximadamente de 2-3 minutos)

Retire la fiola, con cuidado.

Dejar que se enfríe un poco hasta aproximadamente los 55° C.

Vaciar todo el contenido dentro del molde de la cubeta de electroforesis previamente armada, procurando que no se formen burbujas.

Esperar a que solidifique el gel de agarosa.

Agregar TBE 1X dentro de la cubeta, hasta bañar por completo el gel de agarosa

Retirar las peinetas con mucho cuidado.

CARGADA DE LAS MUESTRAS EN EL GEL DE AGAROSA Y CORRIDA ELECTROFORETICA

Reactivos

TAE 1X

Loading Buffer (azul de bromofenol), concentración de trabajo 6X

Marcador de peso molecular de 100pb y 50pb

Agua grado PCR

Molde del gel de agarosa

Muestra de ADN

Procedimiento

Anotar en el formato de registro "Protocolo de PCR del gen BGH" la ubicación de las muestras a depositar, en el que se detalle el orden de las muestras que se colocarán en el gel.

En un pedazo de papel parafilm disponer por cada muestra: 2 µl del tampón de azul de bromofenol y 3 µl de agua PCR y 10 µl de amplicón.

En el primer pocillo del gel colocar 10 µl de agua ultra pura más 5 µl del marcador de peso molecular de 100pb.

Con la ayuda de una micropipeta deposite en cada pocillo del gel de agarosa cada una de las muestras, así también de los controles positivos y negativos, además debe incluir el MPM de (50pb o 100pb). Por ejemplo, como indica la tabla N°

| M P M 50pb | CS | C- | C- (PS para VIH) | Muestra N° 1 | Muestra N° 2 | C+ VIH-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 µl de MPM 50 µl + 10 µl de H2O ultra pura | 2 µl loading buffer 6X + 3 µl H2O + 10 µl de cada muestra | 2 µl loading buffer 6X + 3 µl H2O + 10 µl de cada muestra | 2 µl loading buffer 6X + 3 µl H2O + 10 µl de cada muestra | 2 µl loading buffer 6X + 3 µl H2O + 10 µl de cada muestra | 2 µl loading buffer 6X + 3 µl H2O + 10 µl de cada muestra | 2 µl loading buffer 6X + 3 µl H2O + 10 µl de cada muestra |

MIGRACIÓN ELECTROFORETICA DEL GEL DE AGAROSA

Reactivos

TAE 1X

Procedimiento

Cubrir la cubeta de electroforesis, con la tapa que le corresponde

Colocar los electrodos de la cámara de electroforesis disponiendo la carga negativa en el extremo donde están las muestras depositadas y el extremo positivo en el lado opuesto. (El ADN migra hacia el lado positivo).

Encender la fuente de poder

Programar el voltaje de la fuente de poder de 90 a 110pb.

Apagar la fuente de poder.

Los electrodos de los otros extremos, conéctelos a la fuente de poder de tal manera que corresponda al polo negativo y el otro al polo positivo.

Encienda nuevamente la fuente de poder

Deje migrar las muestras más o menos por 45 minutos.

Apagar la fuente, cuando se observe que las muestras hayan migrado lo necesario.

PROTOCOLO DE LA SEGUNDA PCR

Descongelar los productos del primer PCR si es necesario

Marcar los tubos de PCR, para la reacción de amplificación. Manipular cuidadosamente cada uno de los tubos evitando contaminar (cuando son removidos del paquete, cuando son envasados para su esterilización o cuando se destapan, evite tocar con el guante la tapa interna).

Prepara el segundo premix de PCR en una cámara de flujo laminar en la sala libre de ADN (área blanca). La preparación se realiza con los respectivos iniciadores JA5 y JA6 para la PCR, trabajar todo el tiempo sobre hielo, por cada muestra se debe añadir 24 μ l de premix, pero se puede realizar una reacción más de premix para suplir el error de pipeteo. El total de volumen requerido es de 24 x 6 = 144 μ l, más una reacción de más