

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Valor diagnóstico de la prueba PCR-ADN para VIH-1
a partir de muestras de sangre total impregnadas
en papel de filtro. Lima, 2013**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
MICROBIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. CUSE GUTIÉRREZ, Carmen Nilda

AYACUCHO – PERÚ

2014

Tesis
B712
Cus
Ej.2

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N° 246 – 2014 – UNSCH – F.C.B – D

Bach. Carmen Nilda Cuse Gutiérrez

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde con diez minutos, del día veintidós de diciembre del año dos mil catorce, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, reunidos los profesores Dr. Homero Ango Aguilar como miembro y presidente encargado mediante memorando N° 754 – 2014 UNSCH – FCB, e integrado por los profesores Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, Mg. Aurelio Carrasco Venegas y Mg. Gilmar Peña Rojas, y como secretario docente Blgo. Elbert Hermoza Valdivia, con la finalidad de recepcionar en acto público, la exposición de la tesis “Valor diagnóstico de la prueba PCR-ADN para VIH-1 a partir de muestras de sangre total impregnadas en papel de filtro. Lima 2013, presentado por la bachiller en Ciencias Biológicas Carmen Nilda Cuse Gutiérrez, con la que pretende optar el título profesional de Bióloga con mención en la especialidad de Microbiología.

Inicialmente se da a conocer, mediante su lectura, el memorando N° 754 – 2014 – UNSCH – FCB, de encargo de la presidencia del acto, al Dr. Homero Ango Aguilar, así como la documentación presentada para la sustentatoria y estando en orden el Sr. presidente encargado autoriza a la sustentante para que pueda dar inicio con su exposición, lo que es realizado inmediatamente con el agradecimiento a la universidad, facultad, familiares, docentes y compañeros de estudios; la exposición debe tener una duración máxima de cuarenta y cinco minutos.

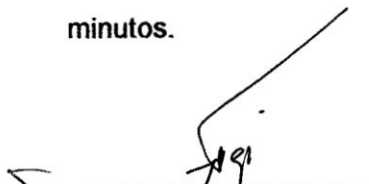
Transcurrida la sustentación y concluida esta por parte de la sustentante, el Sr. presidente encargado pide a los miembros del jurado evaluador para que puedan realizar las preguntas y aclaraciones que crean necesarias, a las mismas que la Srta. sustentante da respuesta en forma satisfactoria.

Una vez concluida con esta sección de preguntas, el Sr. presidente invita a la sustentante y público asistente puedan hacer abandono del auditorio en forma momentánea con la finalidad de realizar la calificación, previa una discusión de la misma; obteniendo el siguiente resultado.

Miembro jurado evaluador	Exposición	Rspta a preguntas	Promedio
Dr. Homero Ango Aguilar	17	17	17
Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich	18	18	18
Mg. Aurelio Carrasco Venegas	18	18	18
Mg. Gilmar Peña Rojas	19	17	18
		Promedio	18

Concluida la calificación la Srta. sustentante obtuvo la nota promedio de dieciocho (18) que es Aprobatorio, e inmediatamente se invita a la sustentante pueda ingresar al auditorio al igual que el público asistente, con la finalidad de dar a conocer el resultado públicamente, e imponer la medalla respectiva, como también efectuar el juramento de Ley.

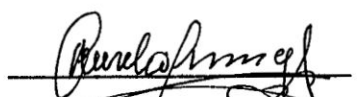
Concluye, el acto de sustentación con la firma de los jurados al pie del presente acta de sustentación en fe de conformidad, siendo las seis de la tarde con cuarenta minutos.



Dr. Homero Ango Aguilar
Miembro-Presidente




Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich
Miembro



Mg. Aurelio Carrasco Venegas
Asesor



Mg. Gilmar Peña Rojas
Miembro



Blgo. Elbert Hermoza Valdivia
Secret. docente

A mis padres: Teodosio y Carmen

A mis hermanos: Miguel Ángel y Karina

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por forjarme académicamente creando en mí, espíritu de superación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por cobijarme en sus claustros.

A la escuela de formación profesional de Biología y su plana docente por sus sabias enseñanzas, valores y principios inculcados durante mi formación profesional.

Al Instituto Nacional de Salud (INS) por brindarnos apoyo para desarrollar mi proyecto de tesis.

A mis padres, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo y cariño mantenido a través del tiempo. Mis hermanos, por estar siempre conmigo y darme su apoyo en cada momento de mi vida.

Al asesor externo Dra. Soledad Romero Ruiz, del Laboratorio de VTS-VIH/SIDA del INS por su asesoramiento en el desarrollo del presente trabajo de investigación. Al personal del laboratorio VTS-VIH/SIDA, que colaboró en el presente trabajo, en especial a Fany.y Susan.

Al asesor interno Mg. Aurelio Carrasco Venegas, por sus observaciones en la elaboración y desarrollo del presente estudio.

A todas las personas que colaboraron de alguna manera para desarrollar el presente estudio.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
INDICE GENERAL	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXO	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	XVI
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	4
2.3. Marco teórico	7
2.3.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	7
2.3.2. Etiología del VIH	7
2.3.3. Estructura y genoma	7
2.3.4. Ciclo de replicación	9
2.3.5. Variabilidad genética	10
2.3.6. Historia natural de la infección	11
2.3.7. Mecanismos de transmisión	12
2.4. Marco legal	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Ubicación de la zona de estudio	25
3.2. Población	25
3.3. Muestra	25
3.4. Sistema de muestreo	26
3.5. Metodología	26
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentración de componentes utilizados en PCR	29
Tabla 2.	Condiciones de ciclamiento en el termociclador	29
Tabla.3.	Concentración de componentes utilizados en la segunda ronda del PCR	30
Tabla.4.	Condiciones de ciclamiento en el termociclador (segunda ronda)	30
Tabla.5.	Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
Tabla.6.	Especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana	8
Figura 2.	Estructura genómica del VIH	9
Figura 3.	Replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana	10
Figura 4.	Curso clínico de la infección natural por el VIH-1	12
Figura 5.	Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
Figura 6.	Capacidad predictiva de una prueba diagnóstica	22
Figura 7.	Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de sangre en papel de filtro	34
Figura 8.	Especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de sangre en papel de filtro	36

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Amplificación de la segunda ronda de PCR	49
Anexo 2.	Consentimiento informado	50
Anexo 3.	Preparación de reactivos	55
Anexo 4.	Fotografía de materiales empleados para la extracción de ADN	56
Anexo 5.	Flujograma de procesamiento de muestras	57
Anexo 6.	Flujograma de extracción de ADN	58
Anexo 7.	Matriz de consistencia	59

RESUMEN

La infección por el VIH es un problema de salud pública distribuida mundialmente; en la actualidad se conocen dos tipos virales: el VIH-1 con distribución universal y el VIH-2 concentrado en África Occidental. En nuestro país se ha descrito la circulación del VIH-1. La serología es la forma más sencilla para el diagnóstico de la infección por el VIH, detecta anticuerpos contra el virus. Sin embargo presentan inconvenientes a la hora de hacer un diagnóstico temprano de la infección por el VIH. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha mostrado buenos resultados tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección por el VIH-1; existen diversas pruebas de PCR desarrollados para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), siendo el más indicado el PCR-ADN proviral que permite detectar al VIH en la fase inicial de la infección, donde la prueba serológica no es útil (recién nacido de madres infectadas con VIH o con antecedentes de riesgo de infección durante el embarazo y personas con periodos de ventana más largos de lo habitual). Por tanto el presente estudio tuvo como objetivo determinar el valor diagnóstico de la prueba PCR-ADN proviral para el diagnóstico del VIH-1, evidenciada por la sensibilidad y la especificidad de un ensayo de PCR anidada utilizando muestras de sangre impregnadas en papel de filtro FTA. La investigación aplicada fue básico descriptivo. El estudio se desarrolló en el Instituto Nacional de Salud (INS), laboratorio de VTS-VIH/SIDA gracias al convenio entre la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga con la mencionada institución. Se trabajó con muestras de sangre positivas a VIH recepcionadas en el INS en el periodo de febrero a marzo del 2014, y muestras negativas colectadas de personal voluntario previa firma del consentimiento informado. El papel de filtro FTA tiene una matriz con una formulación patentada, que lisa las células de las manchas de sangre seca (DBS) en papel de filtro y conserva el ADN; facilitando la colección, transporte y almacenamiento de las muestras de sangre, además requiere pequeña cantidad de muestra, disminuye riesgos de contaminación y desarrolla un principio de extracción de ADN rápido y sencillo. Se amplificó la región Pol del VIH-1 obteniendo una sensibilidad del 95% y especificidad de 100%. Por tanto la PCR-ADN proviral es un método sensible y específico además de ser rápido y sencillo para el diagnóstico temprano del VIH-1.

Palabras claves: VIH, valor diagnóstico, sensibilidad y especificidad

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los métodos de tamizaje y confirmación de la infección por el VIH se basan en la detección de anticuerpos circulantes a través de los métodos serológicos como *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), *Western Blot* (WB), Inmunofluorescencia indirecta (IFI), entre otras. Las desventajas de estos métodos radican en que no confieren un resultado oportuno debido al tiempo que lleva la seroconversión (10 - 14 días y a veces hasta 6 meses), además que ésta varía de persona a persona.¹ A pesar de su alta sensibilidad (99%), fáciles y rápidos de manejar son poco específicos. La inmunofluorescencia se utiliza como prueba confirmatoria del diagnóstico serológico de VIH, es una técnica simple de fácil ejecución, con el inconveniente de que necesita un microscopio de epifluorescencia y de un personal altamente capacitado y con experiencia en las lecturas de las láminas.²

La PCR ha mostrado buenos resultados, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección, es altamente sensible, detecta mínimas cantidades de ADN y es altamente específica que detecta secuencias específicas de ADN.³

En la actualidad contamos con técnicas de PCR-ADN que utilizan sangre entera; colectadas de 1 a 4 ml, en contraste, la PCR-ADN con DBS en papel de filtro omite la necesidad de separar las células mononucleares y la necesidad de centrifugación.

Se ha desarrollado un método sencillo en base a un protocolo modificado, empleado por Ingrid Beck⁴ que utiliza muestras de sangre sobre papel de filtro (tarjetas FTA) y un buffer de lavado (kit comercial). La tarjeta tiene una matriz impregnada con una fórmula patentada que destruye las células y mantiene la integridad del ADN. Además requieren pequeña cantidad de muestra, no requiere venopunción, que resulta una situación traumática en caso de niños,

conlleven un menor riesgo biológico, no necesitan refrigeración y son fáciles de transportar.

La PCR-ADN con DBS en papel de filtro constituye una buena alternativa para el diagnóstico oportuno del VIH-1 por ser altamente sensible y específica en caso de niños de madres seropositivas, personas con situación de riesgo, gestantes, entre otros.

Por lo cual para el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Determinar el valor diagnóstico de la técnica PCR-ADN con muestras de sangre total impregnadas en papel de filtro para la detección de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)

Objetivos específicos:

- Determinar la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-ADN) con muestras de sangre total impregnadas en papel de filtro.
- Determinar la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-ADN) con muestras de sangre total impregnadas en papel de filtro.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El diagnóstico precoz de la infección por el VIH-1 en los niños no se puede lograr con las pruebas de anticuerpos convencionales, debido a la persistencia de los anticuerpos maternos transferidos pasivamente que persisten por hasta 18 meses después del nacimiento.⁴ Se deben realizar métodos directos que detecten al virus o alguno de sus componentes. La detección del ADN por PCR es un método establecido para determinar el estado de la infección en niños nacidos de madres seropositivas y, combinado con muestras de sangre seca (DBS) en papel de filtro provee una metodología sencilla para el diagnóstico del VIH-1 en los niños y algunos casos especiales:

Se desarrolló un ensayo de PCR "*in house*" de una sola ronda dirigido a la región pol, utilizaron como muestra DBS en papel de filtro. Para la validación utilizaron estándares celulares conocidos en número de copias, para luego ser aplicado a un grupo de niños con estado de infección conocido. Finalmente comparó con los resultados de un laboratorio de referencia utilizando un método automatizado. Encontrando un 92.8% y 98.3% de sensibilidad y especificidad respectivamente para el método "*in house*" comparable con el método automatizado.⁵

En otro estudio se evaluó un ensayo con la tecnología *Amplicor* PCR-DNA con muestras de DBS y sangre total de niños en Tailandia. Los resultados obtenidos fueron de 96% a 100% de sensibilidad y 100% de especificidad. Por tanto concluyeron que DBS se puede utilizar con precisión en lugar de sangre total⁶.

Se evaluó la validez diagnóstica de la PCR-ADN por *Amplicor* de Roche (versión 1.5) en ADN extraído de punción de talón infantil impregnados en papel de filtro (S&S) Encontrando un 98.68% de sensibilidad y una especificidad del 100% comparado con los resultados de extracción manual.⁷

Para la detección del VIH por *nested* PCR, utilizaron muestras de sangre en papel de filtro de niños nacidos de madres seropositivas. Se analizaron 109 muestras de niños en los que se desconocía su estado de infección de los cuales 26 (23.8%) resultaron positivos y 83 (76.2%) negativos por PCR. Este método constituye un ensayo simple para la detección del VIH en muestras de sangre colectadas en papel filtro reduciendo largos pasos de extracción y purificación del ADN y facilita el transporte y manejo de las muestras.⁸

Se desarrolló una prueba de *nested* PCR-ADN con muestras de sangre en papel de filtro para evaluar la sensibilidad y especificidad. Las muestras fueron tomadas en dos países (Washington y Perú). Amplificando la región pol, obteniendo una sensibilidad y especificidad de 98.4% y 98.3% respectivamente, dos de esas muestras pertenecían a otros subtipos (A y C), y en el caso de muestras de Perú (madres e hijos seropositivos por ELISA) el ensayo tuvo una sensibilidad de 99% y una especificidad del 100%. Asimismo realizaron el límite de detección utilizando la línea celular 8E5 obteniendo de 5 a 10 copias/5 µl de sangre. Concluyendo que la PCR con muestras de sangre en papel de filtro es un método práctico, económico, sensible y específico para el diagnóstico del VIH-1.⁴

Un trabajo realizado en Cuba, con el fin de determinar la utilidad de papel filtro con muestras de sangre seca en la detección de ADN proviral, se incluyeron 50 muestras donde se incluyeron niños nacidos de madres seropositivas y 60 muestras procedentes de donantes voluntarios de sangre. Las muestras fueron tomadas en papel de filtro N°903 (Schlecher & Schuell) la extracción por elusión y la amplificación a partir del gen gag. El 92% de los seropositivos analizados resultaron positivos por PCR, no se encontró positividad en los seronegativos; el procedimiento empleado resultó útil en el diagnóstico de VIH-1 a partir de muestras de sangre en papel filtro.⁹

2.2. Marco conceptual

- **ADN.** Ácido Desoxirribonucleico. Es una compleja cadena de polímeros unidos por puentes de hidrógeno, estructuralmente está formado por nucleótidos. En casi todos los organismos celulares el ADN está organizado en forma de cromosomas, situados en el núcleo de la célula. Material genético de todos los organismos vivos encargado de la replicación, el ADN se copia a sí mismo cada vez que una célula se

reproduce y transmite a la descendencia la información que contiene. De acuerdo a la complejidad que presenta un organismo vivo, el ADN podrá ser más o menos complejo. En este sentido el ADN de los individuos resulta ser más complejo que el que presenta una bacteria.³

- **Amplificación.** Es el aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular, para ello es necesario conocer al menos parcialmente la secuencia del fragmento a amplificar. Básicamente se trata de replicar una y otra vez un mismo fragmento de ADN y, para ello se realiza un experimento *in vitro* tal como lo hacen las células *in vivo* para replicar su ADN.⁸
- **Dicotómica.** Una medida nominal referida a pruebas diagnósticas que tiene sólo dos resultados (ejemplos son el género: masculino o femenino; la supervivencia: si o no); llamada también binaria.⁸
- **Desnaturalización.** Cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos donde pierden su estructura nativa, por lo general irreversible, de esta forma pierden su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas. El ADN se desnaturaliza por altas temperaturas produciendo una separación de la doble hélice, que ocurre por la ruptura de los puentes de hidrógeno. En el caso de proteínas debido a: precipitación, hidrólisis de enlaces peptídicos, efecto de ácidos diluidos, álcalis diluidos, calentamiento o irradiación.
- **Diagnóstico.** Análisis que se realiza para determinar cualquier situación y sus tendencias. Esta determinación se realiza en base a datos y hechos recogidos y ordenados sistemáticamente que permiten juzgar mejor que es lo que está pasando. Conjunto de signos que sirven para fijar el carácter peculiar de una enfermedad.¹⁰
- **E. D. T. A.** Ácido etilendiaminotetraacético, es una sal que tiene efecto quelante, actúa sobre el calcio, al fijarlo impide su activación y por ende, la coagulación sanguínea.
- **Electroforesis.** Migración de partículas cargadas eléctricamente (iones), dispersos en un medio líquido, por la acción de un campo eléctrico lo más homogéneo posible. La velocidad de desplazamiento es por tanto proporcional a la intensidad de campo y a la carga iónica e inversamente proporcional al radio de la partícula y a la viscosidad del medio.⁸

- **Enfermedad.** Alteración del estado de salud del cuerpo animal.
- **Especificidad.** La especificidad nos indica la capacidad de nuestro estimador para dar como casos negativos los casos realmente sanos; proporción de sanos correctamente identificados. Es decir, la especificidad es la capacidad de la prueba para detectar la ausencia de la enfermedad en sujetos sanos.⁸
- **Hibridación.** Es la unión complementaria de ácidos nucleicos (ADN o ARN) Técnica de biología molecular que se utiliza para detectar una molécula diana partiendo de una sonda complementaria a ella. En las técnicas de hibridación se parte de dos poblaciones de ácidos nucleicos: un conjunto homogéneo de ácidos nucleicos de secuencia conocida que actúa como sonda y otro conjunto heterogéneo de ácidos nucleicos de secuencia desconocida donde queremos detectar la secuencia diana.⁴
- **Infección.** Es un término clínico que indica la contaminación, desencadena una respuesta inmunológica y daño estructural del hospedero, causada por microorganismos patógenos, es decir, existe invasión con lesión tisular por esos mismos gérmenes (hongos, bacterias, protozoos, virus, etc.), sus productos o ambos a la vez.¹¹
- **ADN Polimerasa.** Enzima que tiene la capacidad de sintetizar ADN a partir de un oligonucleótido iniciador y una hebra de ADN molde. Es importante por su característica de ser una enzima termoestable y termoactiva, soportan altas temperaturas requeridas para la desnaturalización del ADN. La primera enzima termoestable fue la aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* denominada comúnmente Taq ADN polimerasa.⁸
- **PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa, más conocida como PCR por las siglas derivadas del inglés (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica in vitro de secuencias específicas de ácidos nucleicos de amplificación enzimática exponencial. La reacción ocurre en un equipo denominado termociclador que permite cambiar diferentes temperaturas para que se lleve a cabo el proceso.⁸
- **Sensibilidad.** La sensibilidad nos indica, la capacidad de nuestro estimador para dar como casos positivos los casos realmente enfermos; proporción de enfermos correctamente identificados. Es decir, la

sensibilidad es la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad en sujetos enfermos.¹

2.3. Marco teórico

2.3.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

El VIH fue descubierto por primera vez en 1983, numerosos trabajos ha demostrado su relación con el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); se caracteriza por diversas manifestaciones clínicas, entre ellas el daño al sistema inmune manifestándose mediante la destrucción de células CD4 o células T y a largo plazo se manifiesta por la susceptibilidad a enfermedades oportunistas, neoplasias malignas asociadas y degeneración del sistema nervioso central (SNC).¹⁰

2.3.2. Etiología del VIH

El VIH es un retrovirus que pertenece a la familia *Retroviridae* y género *Lentivirus*, caracterizado por presentar un marcado poder citolítico, de infectar células del sistema inmune y de producir infecciones lentas.¹¹ Estos virus tienen una serie de características específicas que son determinantes en la compleja patogenia de la infección como la gran diversidad genética y genoma complejo, ciclo vital con dos fases (ARN y ADN proviral), se replica mediante un mecanismo inverso al habitual en los virus ARN; el papel fundamental lo juega una enzima llamada transcriptasa reversa. Sus células huésped son los linfocitos CD4+, macrófagos, células nerviosas de la microglía y células dendríticas residentes en mucosas (células de *Langerhans*)¹. Existen dos tipos del VIH, denominados VIH-1 y VIH-2. El primero fue descubierto en la década de 1980, es el más virulento e infeccioso que el VIH-2 y es el causante de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2 es menos contagioso, se encuentra confinado en los países de África Occidental.¹¹

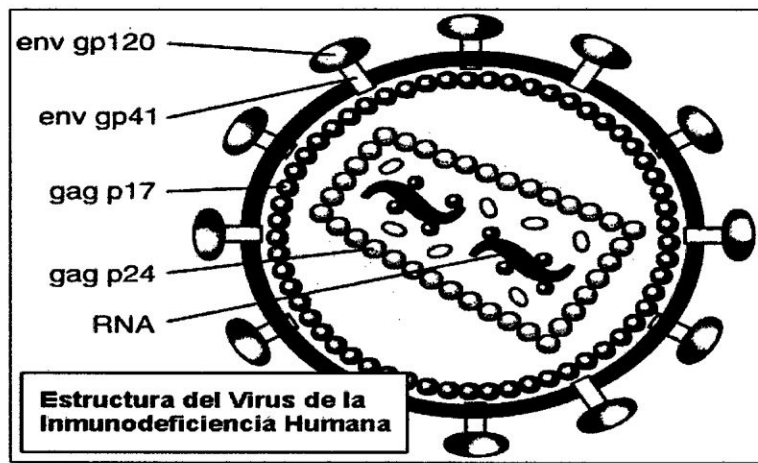
2.3.3. Estructura y genoma

Estructura

Desde el punto de vista morfológico el VIH es una partícula esférica de 90 a 120 nm de diámetro y su envoltura externa está formada en un 5-10% de componentes propios del virus (glucoproteínas-gp) y de un 90-95% de componentes de la membrana de donde se originó¹². La estructura comprende un core (centro) que contiene las nucleoproteínas, rodeado de una envoltura compuesta por membrana celular donde se insertan las glucoproteínas de superficie (gp 120) y transmembrana (gp 41). El núcleo central alberga la

información genética en dos cadenas idénticas de ARN, las proteínas estructurales codificadas por el gen gag que constituyen la matriz y cápside del virus, proteínas funcionales codificadas por el gen pol (transcriptasa reversa, integrasa y proteasa).³

FIGURA 1. Estructura del virus de la Inmunodeficiencia Humana

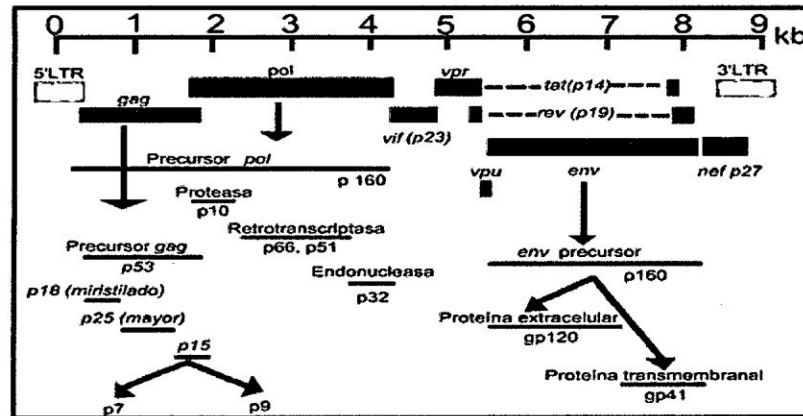


Fuente: Hernandez¹³.

Genoma

El genoma del VIH-1 y VIH-2 son similares, están constituidos por una cadena de ARN monocatenario protegido por una envoltura de membrana.¹² Ambos están compuestos por 3 genes estructurales (gag, pol y env) y seis genes reguladores nef, rev, vif, tat, vpu y vpr (vpx en caso de VIH-2) encargados de la regulación de la síntesis y replicación viral.¹⁹ El provirus, forma integrada del genoma del VIH, mide aproximadamente 9.8 Kb. Ambos extremos del provirus tienen una secuencia nucleotídica denominada LTR (*long terminal repeats*) que sirven de receptores de proteínas tanto celulares como virales, que activan la transcripción del virus.¹³

FIGURA 2. Estructura genómica del VIH



Fuente: Rosas¹³.

2.3.4. Ciclo de replicación

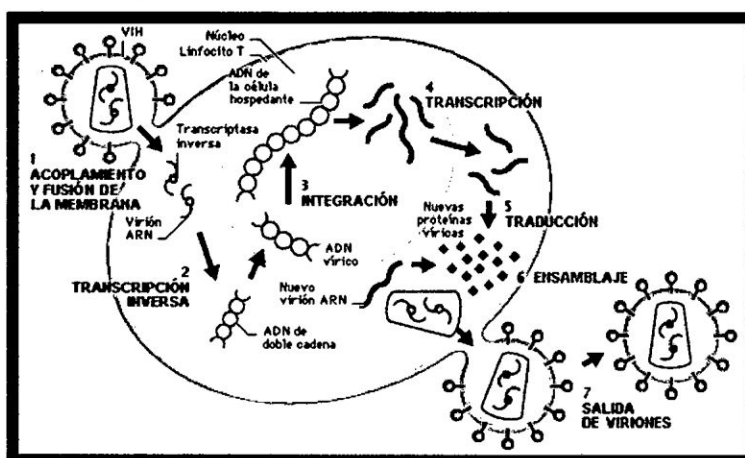
El ciclo biológico del VIH se divide en dos etapas bien diferenciadas: la primera etapa del ciclo, comprende desde el reconocimiento celular hasta la integración del ADN viral al ADN huésped. El reconocimiento celular está relacionado con la sensibilidad a los receptores CD4 presentes en los linfocitos T4, además de correceptores de quimiocinas que en los linfocitos es CXCR4 y en los macrófagos CCR5.¹⁵ El primer paso de este proceso es el acoplamiento de la gp 120 a los receptores CD4 auxiliado por los correceptores. Esta unión origina un cambio conformacional en gp 120, que permite plegarse a gp 41 y esta a su vez fusiona la envoltura viral con la membrana celular. Una vez dentro de la célula el virus pierde la envoltura liberándose el ARN viral, y por acción de la transcriptasa reversa comienza el proceso de retrotranscripción (transformación de ARN viral en ADN viral), este ADN es transportado al interior del núcleo de la célula y una vez en el núcleo el ADN lineal se integra a la célula del huésped mediante la integrasa viral, y se forma el provirus. El provirus puede permanecer transcripcionalmente inactivo durante meses o años.¹³

La segunda etapa del ciclo comprende desde la biosíntesis de los componentes virales hasta la salida de los viriones infectantes. El inicio de la transcripción del provirus, depende de factores celulares y virales que interactúan con las secuencias reguladoras localizadas en la región U3 de la LTR. Estos elementos celulares se unen al promotor viral y aumentan la expresión genética del VIH-1 en respuesta a la estimulación celular por diferentes mecanismos. El ARN generado es procesado en el núcleo y transportado al citoplasma con ayuda de la proteína viral Rev, donde se traduce dando las distintas proteínas, que viajan

hasta los centros de ensamblaje para formar los nuevos viriones, liberados por un proceso de gemación a través de la membrana plasmática.¹³ Una proteína importante en la formación de los viriones es la proteasa viral, enzima que provoca la ruptura de la poliproteína Gag en proteínas de la cápside y nucleocápside (p6, p9, p17 y p24) y de la poliproteína Pol precursora de todas enzimas virales (transcriptasa reversa, integrasa y proteasa).

La maduración final de los viriones y del ensamblaje de las proteínas virales se produce al final del ciclo. Este complejo nucleocápside abandona la célula llevándose un fragmento membranar dando fin al proceso de ensamblaje y salida del virión.¹³

Figura 3. Replicación del virus de la Inmunodeficiencia Humana



Fuente: Rosas¹³

2.3.5. Variabilidad genética

Como virus ARN que es, su genoma presenta muchas variantes (cuasiespecies). En relación con la envoltura (gen env) se conocen al menos 9 genotipos con una clara distribución geográfica: en Occidente predomina el B, en África subsahariana el A y C, y en el Sur este asiático el C, B y E. En relación con el gen gag se conocen 7 subtipos. Aunque existe cierta controversia, esta distribución geográfica puede explicar la diferente epidemiología.¹⁶ En África subsahariana y sudeste asiático, donde habitan el 90% de los afectados por el VIH, la transmisión es heterosexual en el 90%, mientras en Occidente es fundamentalmente homosexual y parenteral. El tropismo que manifiestan los diferentes subtipos por las células de *Langerhans* del epitelio femenino es muy alto, al menos para el subtipo E, y muy bajo para el subtipo B.

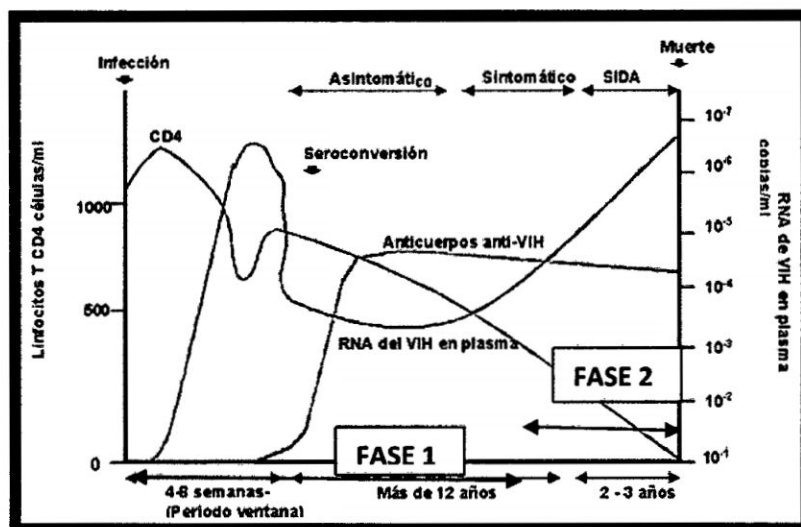
Los retrovirus tienen capacidad de recombinación (forma de reproducción "sexual" primitiva) derivada de poseer 2 filamentos de ARN. Si en una célula huésped existen dos provirus diferentes, a la hora de la replicación, uno de los filamentos de un provirus puede recombinarse con el del otro dando lugar a una progenie heterocigota con las características de ambos (tropismo, resistencias a antirretrovirales).

2.3.6. Historia natural de la infección

Después de la infección primaria, la alta replicación viral inicial conduce a una rápida diseminación del virus en órganos linfoides y otros tejidos del paciente infectado. Entre 2 ó 3 semanas post-infección y asociado con el desarrollo de una fuerte respuesta celular T citotóxica, que precede a la aparición de anticuerpos se produce una drástica caída en los niveles de ARN vírico en plasma y un restablecimiento del número de células T CD4+. Este nivel basal de replicación viral se denomina *set point* y varía de un individuo a otro constituyendo un importante marcador virológico de progresión de la enfermedad.¹⁰ Después de la primoinfección, se inicia la fase clínicamente asintomática, de duración variable, entre la infección primaria y el desarrollo del SIDA. Durante el período asintomático de la infección, la replicación del virus es continua, pero el individuo mantiene una fuerte respuesta inmune frente al virus, estableciéndose un estado de equilibrio, en el cual la producción y eliminación del virus alcanza valores semejantes.¹³ Como resultado, los niveles de ARN vírico en plasma permanecen estables. Pero el número de células T CD4+ disminuye lentamente con una tasa media estimada de 25-60 células/ μ l/año y el virus invariablemente escapa al control inmune. La última etapa de la enfermedad, en ausencia de tratamiento antirretroviral, se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH-1 y coincide clínicamente con una marcada disminución en el número de células T CD4+ (< 300 células/ μ l) y una profunda alteración del estado general del paciente, caracterizada por la aparición de infecciones oportunistas graves, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas.¹⁶ La infección primaria se caracteriza por la presencia de altos niveles de virus en la sangre, que disminuyen hasta alcanzar un valor estacionario en la fase asintomática (Fase 1). La aparición de síntomas clínicos se ve acompañada de un nuevo aumento en los niveles de viremia en sangre que permanecen elevados durante todo el periodo terminal (Fase 2). El nivel de linfocitos CD4+ disminuye durante la infección aguda aunque posteriormente se recuperan

alcanzando niveles ligeramente inferiores a los iniciales. Durante la Fase 1 su nivel va disminuyendo paulatinamente, en muchos individuos el inicio de la Fase 2 se acompaña de un marcado descenso en el número de linfocitos CD4+. El número de linfocitos CD8+ se eleva durante la infección primaria retornando a la normalidad durante toda la Fase 1, solo durante la Fase 2 se produce una disminución clara en los niveles de linfocitos CD8+. Por último, el número de linfocitos CD8+ específicos frente al VIH-1 que se ha mantenido constante durante la Fase 1, comienza a disminuir con anterioridad a la aparición de síntomas y a partir de este momento desciende rápidamente a medida que la enfermedad progresa.¹⁶

Figura 4. Curso clínico de la infección natural por VIH-1



Fuente: Campos¹⁷.

2.3.7. Mecanismos de transmisión

Los modos de transmisión del VIH de un individuo a otro son los principales determinantes de las características epidemiológicas del SIDA. El virus se transmite por tres vías principales:

- **Transmisión Sexual.** Es el modo más frecuente de transmisión, ya sea entre varones homosexuales o entre parejas heterosexuales. El virus está presente en el semen y accede a la pareja no infectada, a través de la mucosa rectal traumatizada, o a través de la mucosa vaginal. También puede ocurrir la transmisión de mujeres infectadas a varones.¹⁰
- **Transmisión Parenteral.** La inoculación de un receptor con sangre o hemoderivados infectados es la segunda vía más frecuente de

transmisión del VIH. Los pacientes infectados por esta vía pueden infectar a otros individuos por contacto sexual.

- **Transmisión Vertical.** La transmisión del VIH de madre a hijo es responsable de la mayor parte de los casos de SIDA pediátrico. Este tipo de transmisión ocurre con mayor frecuencia en el útero o durante el parto, aunque también es posible la transmisión por la lactancia materna.

2.3.8. Diagnóstico

En el diagnóstico de la infección por el VIH, para considerar un resultado positivo se recomienda el uso de tres técnicas con distinto principio, siendo obligado entre una de ellas el *Western Blot* como prueba confirmatoria.¹⁸ Las pruebas serológicas de cuarta generación acortan el periodo de ventana de 13 a 15 días. La detección del genoma del VIH (ADN proviral / ARN) y la viremia plasmática (carga viral), complementan al diagnóstico en situaciones complejas y se utiliza para el seguimiento de los pacientes infectados por VIH para contribuir en la decisión de inicio de tratamiento respectivamente.

2.3.8.1. Diagnóstico del VIH por métodos serológicos

Enzimoimmunoanálisis (EIA)

La detección de anticuerpos específicos frente al VIH-1 es el primer paso que debe realizarse para establecer si una persona está infectada o no por este retrovirus. El método más usado es el Enzimoimmunoanálisis (EIA), su principio se basa en la utilización de proteínas víricas, parcialmente purificados, obtenidas de lisado de células (EIA de primera generación), o por medio de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos (EIA de segunda y tercera generación) y pruebas de cuarta generación basadas en la detección simultánea de anticuerpos y complejos inmunes antígeno p24/ anticuerpo y tienen una alta sensibilidad y especificidad superior al 95.5%.¹⁸

Con las pruebas de tercera y cuarta generación el 50% de los infectados puede detectarse en las tres primeras semanas de infección; la muestra que se utiliza es suero, plasma, hisopado gingival, orina, secreciones.¹⁹

Western Blot (WB)

Es la técnica más ampliamente utilizada, básicamente consiste en la separación de proteínas (antígenos) por electroforesis y transferidas a un papel de nitrocelulosa. Estas proteínas fijadas son expuestas al suero del paciente, en el cual los anticuerpos específicos se unen a las proteínas presentes dando un patrón de bandas, cuya interpretación depende del criterio que se adopte en el

laboratorio.¹⁹

La positividad en el WB para VIH-1 requiere la presencia de al menos 2 bandas de la envoltura, la negatividad resulta de la ausencia de bandas y los restantes patrones se consideran indeterminados. Una de las limitaciones del WB es el diferente valor predictivo diagnóstico que tiene cada una de las bandas. (OMS) Las bandas del core p17 y p24 pueden ser fruto de reactividad inespecífica, detectándose hasta en el 15-20% de los donantes de sangre no infectados. La presencia de anticuerpos frente a las proteínas de la envoltura es mucho más específica, aunque también se han descrito falsos positivos. Sin embargo, la sensibilidad del WB es mayor para detectar anticuerpos frente a proteínas del core que de la envoltura.¹⁹

Actualmente existen WB que incorporan, junto al lisado viral, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos correspondientes a proteínas de la envoltura, en un intento por salvaguardar la sensibilidad frente a estos antígenos, que son los más específicos.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta técnica se ha usado ampliamente como prueba confirmatoria para la infección por el VIH- 1. Su desempeño es bueno pero requiere de personal debidamente entrenado para su lectura y de microscopio de fluorescencia.²⁰

En esta técnica se utilizan linfocitos infectados por el VIH, fijados con acetona, sobre los que se deposita el suero problema. Cuando se añade a esta preparación una IgG humana marcada con fluoresceína se reconoce la reacción antígeno-anticuerpo.

Los estudios comparativos efectuados indican que esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad similar al WB, aunque su interpretación puede mostrar una gran subjetividad y su realización es más compleja.

2.3.8.2. Diagnóstico del VIH por métodos moleculares

Otra técnica muy utilizada actualmente en el diagnóstico del VIH es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite la amplificación de mínimas cantidades de ADN o ARN.¹⁹ Es una técnica de gran utilidad tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección. Estos métodos generalmente se utilizan en el diagnóstico de niños menores de 18 meses, en algunos casos de resultados indeterminados por otros métodos y, principalmente en el seguimiento de la infección y terapia.¹⁹

El ADN utilizado en esta técnica puede ser extraída a partir de sangre total con

anticoagulante o plasma; en algunos estudios se ha visto la utilización de sangre impregnada en papel dando buenos resultados debido a que emplean pequeñas cantidades de sangre y son estables a temperatura ambiente durante periodos prolongados, no requieren cadena de frio para su transporte y además conllevan un menor riesgo biológico.²¹

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica altamente sensible y específico que permite detectar pequeñas cantidades de ADN.¹⁹ La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica que permite la síntesis enzimático "*in vitro*" de secuencias específicas de ADN por acción de una polimerasa. Esta técnica fue desarrollada por Mullis en 1985, toma como modelo el proceso natural de replicación del ADN y consiste en la ejecución de varios ciclos consecutivos siguiendo para cada ciclo tres pasos, cada una con distintas condiciones establecidas de temperatura y tiempo.²¹ El producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza que favorece la tarea de los investigadores empeñados en ampliar nuestros conocimientos sobre estructura y función de los genes.²¹

Tipos de reacción en cadena de la polimerasa

- **PCR Anidada o *nested* PCR.** Es una técnica muy sensible en la que el producto de una amplificación es utilizada como molde para una segunda amplificación con cebadores que se hallan dentro de la primera secuencia amplificada.²² Esta PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. Pero tiene la desventaja de que no permite cuantificar la muestra.
- **PCR *in situ*.** Consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o celular, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación (preparaciones fijas en un portaobjetos). Esta técnica realiza una primera amplificación de ADN blanco y luego la detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas de ADN/ARN (detectan cantidades pequeñísimas de genoma) Es útil para amplificar específicamente poblaciones de secuencias de menor representación²³.
- **PCR múltiple.** Esta técnica permite amplificar simultáneamente más de una secuencia, para ello se combina dos o más pares de cebadores en un mismo tubo de amplificación junto con los demás reactivos para amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN. La ventaja de la

utilización de esta técnica radica en la información sobre varios locus en una sola reacción, menor cantidad de ADN molde para el análisis, uso de menor cantidad de reactivos.²⁴

- **PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).** Es una variante de la PCR en la que usamos ARN como molde inicial en lugar de ADN, emplea una transcriptasa inversa (como Tth) para realizar la síntesis de un ADN complementario al ARN (ADNc).²⁴ De esta forma el desarrollo de una RT-PCR tendría como primer paso, la retrotranscripción a partir de ARN, seguido de la amplificación a partir de la primera hebra de ADNc y finalmente el desarrollo del PCR estándar.
- **PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR).** Es una amplificación en la que los productos de la PCR se detectan de forma directa durante los ciclos de amplificación utilizando sondas marcadas con fluorescencia. Permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original. Tiene varias ventajas sobre los métodos clásicos de la PCR simple o anidada. Solo se utiliza un par de primers, aportando una sensibilidad próxima o igual a la PCR anidada tradicional, pero con un riesgo de contaminación mucho más bajo.²²

Extracción y purificación del ADN

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular; los métodos de extracción nos permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos como la reacción en cadena de la polimerasa. La calidad y pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis, para obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados tomando en cuenta algunos criterios.²³

- Ácido nucleico diana
- Organismo fuente
- Material inicial (sangre, plasma, hisopado, etc.)
- Uso posterior (PCR, clonación, RT-PCR, etc.)

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar el ácido nucleico del resto de las células. El procedimiento de lisis debe tener un equilibrio entre ser lo

suficientemente fuerte como para lisar la célula y a la vez ser suficientemente suave para preservar el ácido nucleico.²³

Uno de los métodos de extracción ampliamente utilizada, es el fenol-cloroformo; que en la actualidad ha sido desplazada por diversos métodos de extracción comercial patentado.

Extracción del ADN por el método Fenol / Cloroformo / Alcohol isoamílico

Este método comprende tres etapas principales:

- **Lisis de la membrana celular.** Esta etapa comprende la rotura de la membrana celular y nuclear utilizando el tampón de extracción que contiene tris HCl, EDTA y SDS (tratamiento químico) y proteína K (digestión enzimática). Todas las membranas biológicas presentan la misma estructura general integrada por moléculas de lípidos y proteínas unidas por interacción no covalente, a este nivel actúan la proteinasa K y el detergente SDS rompiendo la membrana²⁵. El SDS del tampón de extracción captura los lípidos que conforman la membrana. El EDTA, es un componente quelante que se une al magnesio, un cofactor de la desoxirribonucleasa; al unirse el magnesio al EDTA, la acción de la desoxirribonucleasa disminuye. El tris HCl confiere a la solución la capacidad amortiguadora del pH.
- **Extracción.** La combinación de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico se utiliza con el objetivo de desnaturalizar y eliminar las proteínas, además el cloroformo facilita la separación de las fases acuosa y orgánica, si el pH de la solución acuosa no se ha equilibrado debidamente (pH 7,8 – 8,0), los ácidos nucleicos tenderán a repartirse en la fase orgánica. La adición de la mezcla cloroformo y alcohol isoamílico se realiza para eliminar por completo las impurezas de la capa acuosa y además para eliminar los residuos de fenol que pueden inhibir la PCR.
- **Precipitación.** Para concentrar el ADN suele realizarse la precipitación utilizando alcohol absoluto y acetato de sodio, en estas condiciones el detergente que es más soluble en alcohol que en agua, puede eliminarse, mientras que los ácidos nucleicos precipitan. El posterior tratamiento con alcohol al 70% permite una mayor purificación o elución de los ácidos nucleicos de la sal.

Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

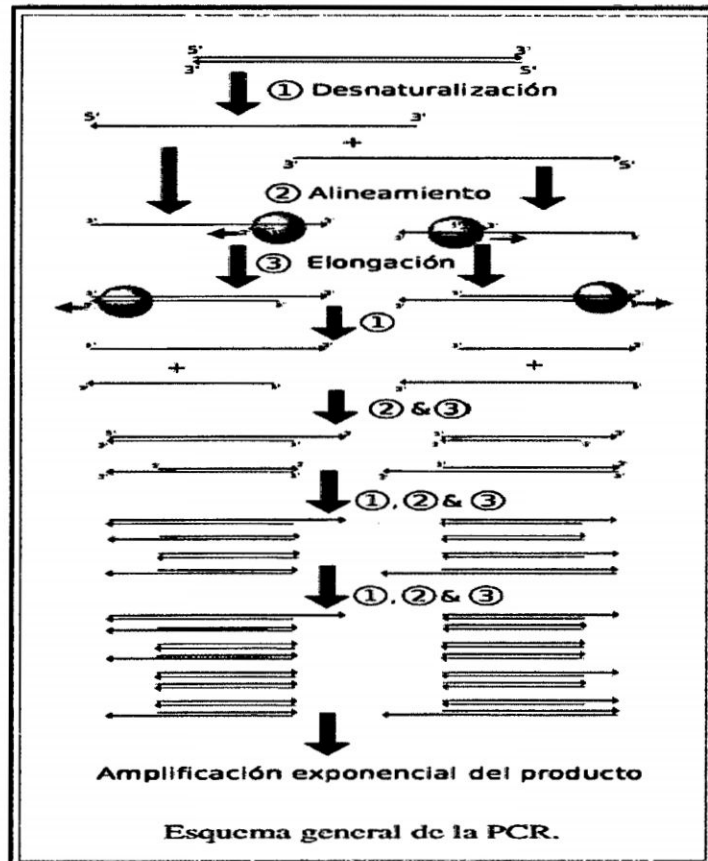
El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura denominados ciclos, cada ciclo suele consistir de 2 a 3 pasos a diferentes temperaturas.²⁴

La temperatura y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de la enzima, concentración de iones divalente, dNTPS, temperatura de unión de cebadores y longitud de ADN que se desea amplificar.²⁴

Desnaturalización inicial: El tubo con la mezcla de reacción de PCR es sometido a altas temperaturas de 90 a 95°C durante un tiempo a fin de desnaturalizar todo el ADN e inactivar proteasas y DNAsas.

- **Desnaturalización.** La doble cadena del DNA se desnaturaliza separándose en una sola hebra, esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que produce la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas para que los oligonucleótidos iniciadores puedan unirse a sus secuencias del DNA complementario. Si el DNA se desnaturaliza parcialmente este tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los *primers* y una posterior extensión.
- **Hibridación.** Llamada también fase de *annealing*, una vez que el DNA esta desnaturalizado se disminuye hasta la temperatura comprendido entre los 40 y 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se quiera amplificar.
- **Extensión o polimerización.** En esta etapa la temperatura se eleva, para una óptima actividad enzimática de la Taq polimerasa que reconoce un segmento del DNA bicatenario libre. La taq polimerasa sintetiza exclusivamente en la dirección 5' a 3', por lo que los nucleótidos libres solo son añadidos en el extremo 3' de los primers que han hibridado con el DNA diana en el paso anterior y comienza la síntesis de la cadena complementaria. El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento que se desea amplificar.
- **Extensión final.** Después del último ciclo de PCR se da lugar a esta etapa final, que permite que los productos de amplificación parciales terminen de completarse.²⁴

Figura 5. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



Fuente: Rodríguez²⁴

Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa

Como la finalidad del PCR es obtener muchas copias de ADN, se requiere un ADN molde, primers y otros componentes para llevar a cabo la reacción:

- **Muestra de ADN (ácido desoxiribonucleico):** La muestra biológica usada puede ser obtenida a partir de sangre, suero, orina y de otros fluidos biológicos. Es importante que el ADN esté libre de impurezas a fin de que la sensibilidad del ensayo no se vea disminuida.²⁴
- **Iniciadores o Primers.** Son oligonucleótidos pequeños (15 a 20 nucleótidos) de cadena simple que se diseñan de tal manera que sean complementarios a los extremos 5' de las hebras del segmento de ADN que se desea amplificar. La especificidad del PCR depende del diseño de los iniciadores.²⁴
- **Taq polimerasa.** Son enzimas que sintetizan ADN a partir de un oligonucleótido iniciador y una hebra de ADN molde, son enzimas termoestables y termoactivas, que son activas a temperaturas a las

cuales la hibridación de los iniciadores al ADN a amplificar ocurre con alta rigurosidad. La primera enzima termoestable que fue utilizada para propósitos de amplificación fue aislada del *Thermus aquaticus* que es denominada Taq DNA polimerasa. La actividad de esta enzima, así como la fidelidad de la misma depende de la concentración de iones Mg^{2+} libre de los desoxiribonucleótidos y del pH del *buffer* de reacción.

- **Ión Magnesio.** Es importante porque afecta la unión entre los oligonucleótidos iniciadores y el molde de ADN. Es necesario, además considerar que los nucleótidos secuestran iones Mg^{2+} del medio, por lo que la concentración milimolar de este ión debe ser superior a la concentración de los nucleótidos. Actúa como cofactor de la Taq polimerasa y en la temperatura de hibridación.
- **Desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs).** La concentración de cada uno de ellos en la mezcla de reacción debe ser equimolar para minimizar los errores de una falsa incorporación de nucleótidos. Para el PCR debe estar en el rango de 20 – 200 μM a fin de tener especificidad y fidelidad óptima a altas velocidades de incorporación.
- **Buffer de reacción.** Los componentes del buffer de reacción incluyen Tris – HCl, gelatina o albúmina sérica bovina (100 $\mu g/mL$) y detergentes no iónicos como el Tween 20. Estos componentes pueden ser utilizados a fin de estabilizar la actividad de la Taq ADN polimerasa.
- **Agua.** Un factor muy importante en el PCR es la calidad de agua a utilizar en la reacción, se sugiere de alta pureza, tridestilada, desionizada, libre de DNA contaminante o DNAsas²⁵.

Electroforesis

La electroforesis es un método en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de un soporte, que en este caso puede ser la agarosa, un polisacárido cuyas diluciones se trabajan de 0,5 a 2%; tienen la propiedad de permanecer líquidas por encima de los 50°C aproximadamente y, formar un gel semisólido al enfriarse.²⁶ Este gel está constituida por una matriz tridimensional de fibras poliméricas, embebidas en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas de ácido nucleico en mayor medida cuanto más grandes sean estas.²⁶ Para determinar la concentración del DNA se utiliza como patrón un marcador de peso molecular, el cual se corre paralelo al DNA muestra.

Existen factores que influyen en la migración electroforética de ácidos nucleicos en geles de agarosa:

- Tamaño del poro.
- Electroendosmosis.
- Los ácidos nucleicos (formas y tamaño).
- Buffer de electroforesis.
- Buffer de la muestra de ácido nucleicos.
- Intensidad de corriente.

Corrida electroforética: Puesto que la carga eléctrica de un ácido nucleico es proporcional a su longitud en nucleótidos, la electroforesis separa los fragmentos de ácido nucleico según su tamaño o longitud, expresado en nucleótidos (si son de hebra sencilla) o en pares de bases (si son de doble hebra, caso común del DNA).²⁶

Visualización de los productos de amplificación

La detección de los productos de amplificación se realiza directamente por la observación de las bandas fluorescentes de ADN sobre un gel de agarosa después de la tinción con bromuro de etidio (se intercala entre las bases y presenta fluorescencia cuando inciden radiaciones ultravioleta), en un transiluminador de luz ultravioleta; y la evaluación de la longitud de la banda de ADN por comparación con un marcador de peso molecular confirma la presencia de ADN diana de la muestra.²⁶

Ventajas del uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La utilización de esta nueva tecnología proporciona ventajas entre las que destacan:

- Amplifica solamente el fragmento de ADN de interés, requiere de una sola molécula de ADN para generar millones de copias (altamente sensible) y es selectivo en presencia de grandes cantidades de ADN (altamente específico)
- El estado de conservación de la muestra es hasta cierto grado indiferente, siempre que se conserve la secuencia diana.

Aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se aplicó inicialmente como una técnica en laboratorios de investigación, debido a su robustez y rapidez; pero su gran especificidad y sensibilidad ha permitido el desarrollo de técnicas de diagnóstico para determinadas enfermedades, siendo utilizada en muchos campos de la investigación y la

medicina clínica.²⁶ Así, se ha convertido en una herramienta fundamental en campos tan diversos como la investigación (clonación de genes, detección de clones recombinantes, estudio de ADN de fósiles), paleontología, antropología, medicina forense y criminalística (estudios filogenéticos o etnográficos, filiación, identificación de individuos y de sospechosos, así como en el análisis de la evidencia en casos de asesinato, violación, etc.), sanidad animal y mejora genética (detección de enfermedades genéticas e infecciosas, pureza de razas, etc.) y medicina (diagnóstico de enfermedades). Dentro de la microbiología e infectología, se ha utilizado para identificar el DNA de parásitos, virus y bacterias, incluyendo estudios de resistencia a antibióticos.²⁵

Sensibilidad y especificidad

En 1947, Yerushalmy introduce los términos de sensibilidad y especificidad como indicadores estadísticos que evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica.^{27, 28}

Figura 6. Capacidad predictiva de una prueba diagnóstica

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Fuente: Molinero²⁸

Sensibilidad

La sensibilidad en epidemiología es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en una prueba diagnóstica un resultado positivo. Que es lo mismo que decir, lo contrario, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba complementaria para detectar la enfermedad.

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

Especificidad

La especificidad indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos (no enfermos) a los que efectivamente lo son, es decir, la especificidad es la probabilidad de que la prueba identifique como no enfermo a aquél que efectivamente no lo está.

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

2.4. Marco legal

Aspectos éticos y legales

Toda investigación que involucra la participación de seres humanos se realiza dentro de tres principios éticos: respeto por las personas, beneficencia y justicia; estos principios se encargan de velar la preparación responsable de protocolos de investigación²⁹.

2.4.1. Participación de voluntarios

La participación de seres humanos será para la obtención de sangre total, quienes deberán ser voluntarios mayores de 18 años previo conocimiento y firma de consentimiento informado las mismas que serán utilizadas como muestras negativas en la evaluación de la técnica en estudio.

2.4.2. Consecuencias de la participación en el estudio

Con respecto a la beneficencia, la validación de esta técnica de diagnóstico cumple con el propósito de contar con una técnica que desplace las dificultades en cuanto a la extracción, transporte y conservación de las muestras, debido a que no requiere cadena de frío para el transporte o conservación. Además de ser aplicado en el diagnóstico confirmatorio para niños pequeños, en quienes es traumática la extracción por punción venosa.²⁹

2.4.3. Confidencialidad de la información

La información sobre datos del paciente, resultados, factores de riesgo, datos epidemiológicos y otros se almacenarán en una base del laboratorio protegidos con clave de acceso y solo estará disponible para los investigadores y el comité de ética en el caso que lo solicitara. No se publicará ninguna información que pudiera identificar al paciente del cual proviene la muestra de sangre, será mantenido en anonimato³⁰.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Ubicación de la zona de estudio

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Salud-Lima, en el Laboratorio de Virus de Transmisión Sexual -VIH/SIDA del Centro Nacional de Salud Pública. Las muestras utilizadas fueron procedentes de diferentes departamentos del Perú, de pacientes confirmados por pruebas serológicas (IFI o LIA) y que están en el programa de Tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA).

El laboratorio de investigación donde se desarrolló el presente estudio, cuenta con un nivel de bioseguridad tipo II, con áreas adecuadas para el manejo y proceso de técnicas moleculares y el diagnóstico de VIH-1.

b. Población

La población estuvo constituida por muestras de sangre total con anticoagulante EDTA provenientes de pacientes infectados con VIH previamente diagnosticados mediante pruebas serológicas confirmatorias como IFI o LIA, recepcionadas en el laboratorio de VTS/VIH-SIDA del Instituto Nacional de Salud (INS)

c. Muestra

La selección de muestras se realizó por métodos no probabilísticos, a través de un muestreo por conveniencia, se seleccionaron muestras de un periodo comprendido entre enero y febrero 2014.

En el presente estudio se evaluaron 219 muestras de sangre total entre muestras positivas y negativas a VIH (100 muestras de sangre total positivas a VIH y 119 muestras de sangre total negativas a VIH de las cuales 50 fueron de HTLV o Hepatitis B, pero negativas a VIH-1.

d. Sistema de muestreo

3.4.1. Criterios de selección de las muestras positivas a VIH-1

Criterios de inclusión

Muestras de sangre total con anticoagulante EDTA de pacientes positivos a VIH-1 mediante pruebas serológicas confirmatorias como IFI o LIA.

Criterios de exclusión

Muestras de sangre total con anticoagulante EDTA de personas negativas a VIH-1, congeladas, centrifugadas o coaguladas.

3.4.2. Criterios de selección de las muestras negativas a VIH-1

Criterios de inclusión

Muestras de sangre total con anticoagulante EDTA de personas aparentemente sanas, negativas a VIH-1 mediante las pruebas serológicas de ELISA e IFI.

Muestras de sangre total con anticoagulante EDTA positivos a HTLV y Hepatitis B, pero negativos a VIH-1. Estas muestras se utilizaron como control de especificidad analítica.

Criterios de exclusión

Muestras de sangre total con anticoagulante EDTA positivas a VIH-1, congeladas, centrifugadas o coaguladas.

Además, entre las muestras positivas a otras etiologías, se descartaron las coinfectadas con VIH-1.

3.5. Metodología

3.5.1. Aplicación de muestras de sangre en papel de filtro⁴

El protocolo original que se utilizó, desarrollado por Ingrid Beck⁴ fue modificado en función de los materiales disponibles proporcionados por el laboratorio de VTS-VIH/SIDA del INS. A diferencia del presente trabajo, que se empleó los componentes para el PCR por separado; en el protocolo original de Ingrid Beck utilizaron el *buffer* PCR que incluía el MgCl₂ a una concentración de 15 mM.

- Se rotuló las tarjetas (FTA *Classic card Whatman* cat # WB-120205) con su respectivo código de identificación de las muestras.
- Con ayuda de una micropipeta se colocó 125 µL de sangre total en cada círculo de la tarjeta, haciendo movimiento circular concéntrico para homogenizar la muestra (con la finalidad de evitar la formación de encharcamiento del papel).
- Se dejó secar el papel por 24 horas a temperatura ambiente, el secado se hizo de manera natural, no se usó ninguna acción física o química para facilitar el secado.
- Transcurrido el tiempo de secado, se guardó el papel FTA en bolsas con cierre hermético y desecantes (este procedimiento permitió almacenar las

muestras de sangre impregnadas en papel a temperatura ambiente por periodos prolongados o hasta el momento de su uso)

3.5.2. Extracción de ADN a partir de muestras impregnadas en papel filtro⁴

- Con ayuda del cortador (micro *punch* de 3 mm de diámetro), se tomaron cuatro discos de 3 mm de las muestras de sangre impregnada en papel y se colocaron cada uno en tubos de amplificación de 0,2 mL (las muestras se analizaron por duplicado para el VIH-1 y para la beta globina humana, que fue un control de extracción y amplificación)
- Para usar el cortador de una muestra a otra, se limpió perforando de 3 a 5 veces en papel filtro limpio.
- A cada tubo de amplificación conteniendo el papel filtro de 3 mm, se agregó 200 µL de solución limpiadora para FTA (*Whatman* cat # WB 120204) Se dejó incubar por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente, dándole una agitación manual suave por tres veces durante el tiempo de incubación.
- Transcurrido el tiempo de incubación, utilizando una micropipeta se aspiró la solución limpiadora y se eliminó.
- Se repitió los dos pasos anteriores por dos veces más.
- Se añadió 200 µL de *buffer* (Tris – EDTA) TE (10 mM tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8,0) a cada tubo de amplificación, se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (con agitación manual suave por tres veces durante el tiempo de incubación)
- Al igual que los pasos anteriores se retiró el *buffer* TE y se repitió el proceso una vez más.
- Terminando con el proceso de lavado se dejó secar los discos en los mismos tubos de amplificación a temperatura ambiente por espacio de 1 hora.

3.5.3. Preparación del master mix para la PCR

- Una vez capturado el ADN de cada una de las muestras impregnados en el papel FTA, se realizó la técnica de PCR. Se utilizó un kit de amplificación por PCR, Invitrogen que contenía la enzima Taq DNA polimerasa, 10X *buffer PCR* y 50 mM cloruro de magnesio, 10 mM dNTP, *Applied Biosystems*.
- La mínima contaminación de los materiales a usar, podría implicar la contaminación de los productos amplificados; uno de los contaminantes más frecuentes en el PCR son los amplicones obtenidos en la primera amplificación, por tanto fue importante el uso de puntas de pipeta con filtros de aerosol, y separar las áreas de PCR (pre y post PCR)
- Para controlar la sensibilidad del ensayo de PCR y evitar falsos positivos, se utilizó un control positivo a VIH-1 obtenido a partir de cultivo celular, además de un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el ADN molde, los cuales fueron incluidos en cada ejecución de PCR. Ambos controles se corrieron por ambas rondas de amplificación (*Nested PCR*).
- La región a amplificar, fue la transcriptasa reversa del VIH-1 codificada por el gen Pol, usando los *primers*, RT1: GTTGACTCAGATTGGTTGCAC (*forward*) y RT2: GTATGTCATTGACAGTCCAGC (*reverse*) utilizados en la primera ronda de amplificación; RT3: TATCAGGATGGAGTTCATAAC (*forward*) y RT4: GGATGGCCCAAAGTTAAAC (*reverse*) empleados para la segunda ronda de amplificación, estos *primers* son específicos de la transcriptasa reversa. Adicionalmente se amplificó el gen beta globina como control de extracción y amplificación, para ello se empleó los *primers*, Hu Beta 3: CGG.CTG TCA TCA CTT AGA CCT C (*forward*) y Hu Beta 4: CTT CAT CCA CGT TCA CTT TGC (*reverse*).
- Para dar inicio el desarrollo de la PCR, se rotuló los tubos de amplificación que contenían los *dried blood spot* (DBS) discos de papel con muestras de sangre, lavados y secos.
- La reacción de amplificación del ADN se realizó en el termociclador, las concentraciones de cada componente de la reacción fueron variadas a fin de encontrar las condiciones óptimas de amplificación para un volumen final de 100 μ L (cuadro N°1)

Tabla 1. Concentraciones de componentes utilizados en PCR

Componentes de PCR	Concentración inicial	Concentración final	Para una reacción
Buffer PCR	10 X	10 X	10 μ L
dNTPSs		2 mM	8 μ L
MgCl ₂	50 mM	13 mM	2,6 μ L
Primer RT 1		20 pmol	1 μ L
Primer RT 2		20 pmol	1 μ L
Taq Polimerasa	5 U		0,5 μ L
Agua PCR			76,9 μ L
Volumen total			100 μL

- Se añadió 100 μ L del master mix a cada tubo rotulado de 0,2 mL para la determinación de VIH-1.
- También se preparó master mix para la amplificación de la beta-globina (gen humano, utilizado como control interno), se siguió el mismo protocolo del VIH-1. Del mismo modo se agregó 100 μ L del master mix para la detección de la beta globina.
- Los tubos con el master mix y la muestra fueron colocados en un termociclador, el cual se programó para 35 ciclos con las condiciones de ciclado que se presentan en la (Tabla 2)

Tabla 2. Condiciones de ciclamiento en el termociclador

Etapas de PCR	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 ° C	5 minutos
Desnaturalización	94 ° C	30 segundos
Hibridación	55 ° C	30 segundos
Extensión	72 ° C	1 minuto
Extensión final	72 ° C	7 minutos
Punto final	4 ° C	

La desnaturalización fue a 94° C con la finalidad de romper los puentes de hidrogeno y separar la doble cadena de ADN, seguido de la hibridación a 55°C para el apareamiento de los *primers* y la cadena de ADN a amplificar, y una extensión o polimerización para la activación de la Taq polimerasa. Finalmente una extensión final a 72°C para que los productos amplificados se terminen de completar.

Para la segunda ronda de reacción, se preparó el master mix para la misma cantidad de muestras de la primera ronda con un volumen final de 50 μ L.

Tabla 3. Concentraciones de componentes utilizados en la segunda ronda del PCR

Componentes de PCR	Concentración inicial	Concentración final	Para una reacción
Buffer PCR	10 X	10 X	5 μ L
dNTPSs		2 mM	4 μ L
MgCl ₂	50 mM	13 mM	1,3 μ L
Primer RT 3		20 pmol	1 μ L
Primer RT 4		20 pmol	1 μ L
Taq Polimerasa	5 U		0,5 μ L
Agua PCR			33,2 μ L
ADN			4 μ L
Volumen total			50 μ l

Tabla 4. Condiciones de ciclamiento en el termociclador (segunda ronda)

Etapas de PCR	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 ° C	5 minutos
Desnaturalización	94 ° C	30 segundos
Hibridación	55 ° C	30 segundos
Extensión	72 ° C	1 minuto
Extensión final	72 ° C	7 minutos
Punto final	4 ° C	

Luego de preparar el master mix de la segunda ronda, 46 μ L de master mix para cada muestra, se rotuló con los mismos códigos de la primera ronda y se agregó 4 μ L de ADN amplificado de la primera ronda. Este procedimiento se realizó en un área diferente (área post PCR).

Se cerró bien las tapas de los tubos y se llevó al termociclador con el mismo programa de la primera ronda, con 35 ciclos de amplificación.

3.5.4. Electroforesis

Una vez obtenido los productos amplificados, se realizó la corrida electroforética. Se preparó el gel de agarosa al 1,5 % (esta se licuó por espacio de 5 minutos en el horno microondas) ya diluida la agarosa y alcanzando una temperatura de

25°C se vertió en los soportes de la cámara electroforética; una vez gelificado la agarosa se colocó en la cámara de electroforesis.

Se vertió *buffer* de corrida (TAE 1X) y se procedió a sembrar las muestras por duplicado.

Se cargó 10 µL de amplificado de la segunda ronda más 1 µL de tampón de carga (*loading buffer*). En el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular (*Gene ruler 100bp plus DNA ladder-Fermentas*) para poder facilitar la determinación del tamaño del ADN de la muestra; en los últimos pocillos se colocó el control positivo, control negativo y el blanco.

La corrida electroforética se realizó a 110 voltios por 60 minutos, transcurrido el tiempo de corrida se colocó el gel en bromuro de etidio por espacio de 3 minutos, luego se transfirió al agua para limpiar el exceso de bromuro aproximadamente 10 minutos. Finalmente se procedió a observar el gel teñido en el transiluminador.

El tamaño del producto amplificado observado corresponde a una banda de 665 pb para el resultado positivo a VIH-1 y en cuanto a la beta-globina se observó una banda de 228 pb para un resultado positivo al gen de la beta-globina.

3.6. Tipo de investigación. Básico – descriptivo.

Se consideraron muestras por duplicado para diagnóstico de VIH-1 y también para la beta globina humana como control de extracción.

El control positivo para VIH-1 a partir de la línea celular H9 infectada con el VIH-1.

El control negativo, a partir de células no infectadas por el VIH-1. Se siguió el protocolo empleado por Ingrid Beck⁴ con algunas modificaciones en cuanto a los reactivos empleados en la PCR (En el protocolo de referencia emplearon reactivos de la marca Sigma, que tiene una presentación del *buffer* PCR que contiene 15 mM de MgCl₂, mientras que en el presente trabajo se utilizó un kit para PCR de Invitrogen, que tiene los reactivos por separado.

3.7. Análisis de datos. Para el análisis de datos se aplicó los estimadores estadísticos de sensibilidad y especificidad para variable categórica binaria, las cuales se representaron en tablas de 2x2, clasificando los resultados de pruebas dentro de las categorías positivo o negativo con el estado del resultado de muestras de sangre total, sometida a la técnica de PCR-ADN para el diagnóstico de la infección por el VIH-1. Los resultados de sensibilidad y especificidad se expresaron en porcentaje.

3.8. Aspectos bioéticos

Consentimiento informado.

Para la obtención de las muestras negativas, se hizo firmar a los participantes, un consentimiento informado revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación, del Instituto Nacional de Salud, que indica la autorización para participar en el estudio.

IV. RESULTADOS

Tabla 5. Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

		Criterio de referencia (ELISA + IFI)		
		Positivo	Negativo	Total
PCR	Positivo	95	0	95
	Negativo	5	119	124
	Total	100	119	219

Sensibilidad: 95% (IC: 95% 88.17% - 98.14%)

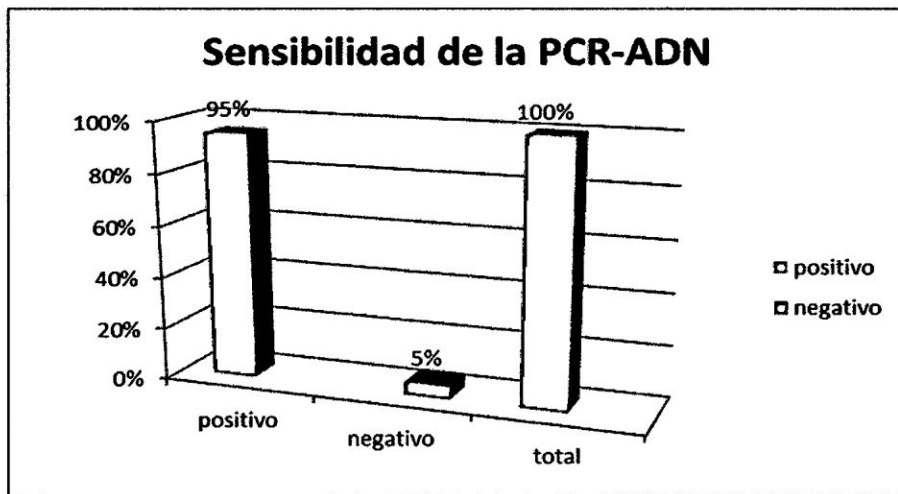


Figura 7. Sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de sangre en papel de filtro.

Tabla 6. Especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR	Criterio de referencia (ELISA + IFI)		
	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	95	0
Negativo	5	119	124
Total	100	119	219

Especificidad: 100% (IC: 95% 96.10% - 99.92%)

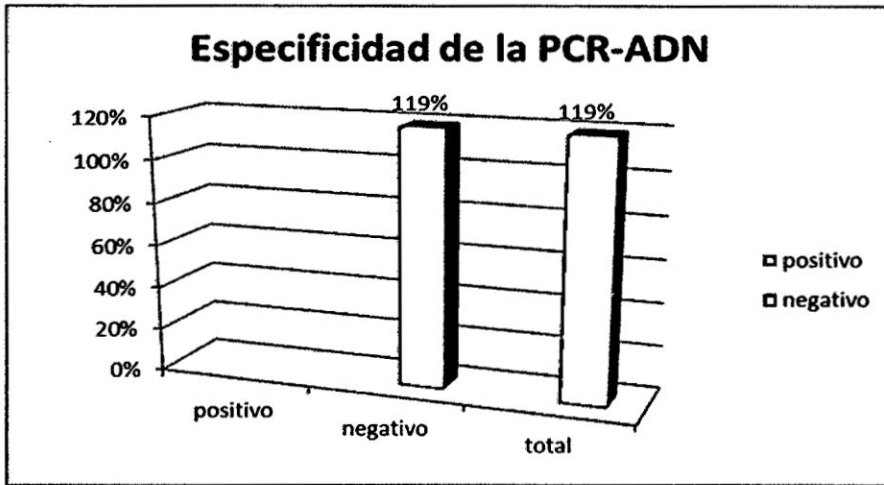


Figura 8. Especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de sangre en papel de filtro.

V. DISCUSIÓN

La tabla 5, muestra los valores de sensibilidad diagnóstica determinada por PCR, este método utilizó pequeñas cantidades de sangre entera aplicados en papel de filtro FTA, especialmente formulado y patentado mantiene la integridad del ADN contenido en la muestra. Se ha utilizado una metodología empleada por Ingrid Beck⁴, el cual fue modificado en función de las condiciones del laboratorio de VTS-VIH/SIDA del INS.

De un total de 219 muestras, 100 de ellas fueron determinadas como positivas y 119 como muestras negativas por pruebas de tamizaje y confirmatorias (ELISA e IFI respectivamente). Frente a estos reportes, se determinó la sensibilidad de la PCR amplificando la transcriptasa reversa (RT) codificada por el gen Pol del VIH-1, encontrando 95 muestras positivas (verdaderos positivos) y 5 muestras negativas (falsos negativos) obteniéndose una sensibilidad del 95% (95/100) con un índice de confianza del 95%.

La figura 7, muestra gráficamente el resultado de sensibilidad obtenidas a partir de la PCR utilizando muestras de sangre impregnadas en papel de filtro, positivas al VIH-1.

En la tabla 6, se muestra los resultados obtenidos sobre especificidad diagnóstica de la PCR. De un total de 119 muestras negativas caracterizadas por ELISA e IFI, se encontró una especificidad de 100% (119/119) por lo tanto ninguna muestra fue positiva por PCR, los resultados fueron respaldados por estudios de Ingrid Beck⁴ que reportó una especificidad del 100%. Entonces podemos decir que, los *primers* RT1, RT2, RT3 y RT4 que amplifican la transcriptasa reversa son específicos para la región pol del VIH, más no de otros virus como los que utilizamos dentro de las muestras negativas (HTLV y Hepatitis B) que pudieran generar reacciones cruzadas por compartir cuadros clínicos similares al del VIH. Por tanto la técnica de PCR es capaz de detectar

como correctamente negativos a la mayor proporción de individuos que no presentan la enfermedad.

La figura 8, es la representación gráfica de la especificidad que presentó la PCR teniendo en cuenta la metodología empleada por Ingrid Beck⁴. No se empleó los reactivos mencionados en la publicación por motivos de adaptación de la técnica a las condiciones del laboratorio; se utilizó reactivos de distinta marca y principalmente se modificó la concentración del cloruro de magnesio; a diferencia del autor que utilizó un *buffer* PCR que contenía 15 mM de cloruro de magnesio, en el presente estudio se utilizó *buffer* PCR y cloruro de magnesio por separado a una concentración de 13 mM donde se observó bandas más específicas a diferencia de la concentración a 15 mM.

La sensibilidad obtenida en el presente trabajo (95%) fue ligeramente menor a la obtenida por Beck⁴ quien utilizó dos grupos de muestra (grupo de niños y adultos de Washington, además muestras de niños de madres seropositivas en Perú) obteniendo un 98% (62/65) y 99% (101/102) de sensibilidad respectivamente. En el trabajo realizado, las 5 muestras que no amplificaron el RT podría deberse a la presencia de inhibidores de la sangre que no fueron degradados en el momento del lavado; en el caso del trabajo del autor citado, encontraron que los 3 falsos positivos se debían, uno a la poca cantidad de copias en la muestra, y los otros dos fueron determinados como pertenecientes a otro subtipo del VIH, que los *primers* no pudieron amplificar.

Cabe mencionar, que para la amplificación del PCR se utilizó reactivo que estaban disponibles en el laboratorio.

En cuanto a la especificidad se obtuvo igual resultado (100%) con el encontrado por Beck⁴ con muestras tomadas de niños de madres seropositivas en Perú y no así con las muestras de Washington (98%).

Chohan et al. evaluó una PCR in house de una sola ronda, utilizando papel de filtro S&S (Schleicher & Schuell) obteniendo una sensibilidad de 92.8% y una especificidad de 98.3% Cabe mencionar que los valores obtenidos por estos autores, probablemente se debieron a la utilización de una muestra de mayor diámetro (8 mm) a diferencia de nuestro caso que se utilizó 3 mm de diámetro equivalente a 5 ml de sangre total. La cantidad de muestra es importante, a mayor cantidad de muestra por círculo habrá mayor probabilidad de presencia de inhibidores de la PCR. La extracción de ácidos nucleicos se hizo de manera convencional, que conlleva mayor tiempo de procesamiento, y el tamaño de la

muestra podría generar inhibiciones por contener mayor número de copias de VIH⁹.

Es importante también indicar que el uso de esta metodología, es más sencilla, requiere pequeñas cantidades de muestra, las que se podrían obtener por punción del talón, del dedo, siendo menos traumática en caso de recién nacidos. La sensibilidad y especificidad obtenida para la PCR utilizando DBS es similar en comparación con estudios previos que utilizaron el mismo tipo de muestra, y no necesariamente un *nested* PCR. Así por ejemplo Leelawiwat, et al. reportaron sensibilidad de la prueba de PCR de 96% y especificidad de 100% en niños de Tailandia, a su vez se determinaron en paralelo la carga viral por PCR en tiempo real, observándose una alta correlación entre ambas técnicas. En otro estudio (Patton et al. evaluaron la validez del PCR con DBS colectados del talón de pacientes pediátricos en papel filtro S&S 903 al igual que Chohan et al., utilizando tecnología automatizada Amplicor de Roche[®], obteniendo 98.68% de sensibilidad a pesar de la persistencia de falsos negativos al realizar repeticiones y una especificidad del 100% comparado con los resultados de extracción manual. Trabajos similares al anterior demuestran la utilidad del uso de este tipo de muestras (DBS) no sólo en la extracción y amplificación por métodos convencionales sino también con métodos automatizados; la elección del método estará en función de la realidad de cada lugar.

Se ha utilizado también DBS en el diagnóstico serológico del VIH, lo cual permite establecer prevalencia de anticuerpos en la población estudiada, sin embargo no permite diferenciar en el caso de niños menores de dos años, si los anticuerpos son maternos o propios, así mismo en el caso de individuos con periodos de vida más largos de lo habitual⁹.

El diagnóstico precoz de la infección por VIH-1 en niños no se puede lograr debido a la persistencia de los anticuerpos maternos que se mantienen hasta los 18 meses de nacido. La detección de ADN del VIH-1 por PCR es un método establecido para detectar el estado de la infección en niños de madres seropositivas, y, además en casos especiales como la seroconversión tardía en algunos pacientes¹.

En general el uso de muestras de sangre seca (DBS) tiene muchas ventajas a diferencia del uso de sangre total líquida.

La simplicidad del método radica en el tipo de muestra y la capacidad de lisar y fijar el ADN en las fibras de papel evitando los procedimientos de centrifugación

y extracción de manera convencional. La utilidad de la prueba radica en la facilidad de transporte de muestras, es necesaria poca cantidad de muestra, además de no usar materiales punzocortantes que reducen el riesgo de contaminación.

Se necesitan ensayos sensibles y específicos de bajo costo que puedan usarse en países tanto en desarrollo y desarrollados para diagnosticar el VIH-1 en recién nacidos para determinar el pronóstico, guiar el tratamiento y reducir la infección perinatal por el VIH-1.

VI. CONCLUSIONES

- La sensibilidad de la prueba de PCR-ADN para la detección de VIH-1 utilizando muestras de sangre impregnadas en papel de filtro fue de 95% con un índice de confianza de 95%
- La especificidad de la prueba de PCR-ADN para la detección de VIH-1 utilizando muestras de sangre impregnadas en papel de filtro fue de 100% con un índice de confianza de 95%, Como parte de un control interno de extracción se amplificó el gen de la beta globina humana, un gen presente en todo el desarrollo de la vida del ser humano, mostrando un 98% de amplificación tanto en muestras negativas como en muestras positivas, concluyendo que hubo una buena extracción y amplificación del ADN. Dentro del 2% que no amplificó para la beta globina humana, se encuentran las muestras positivas que no amplificaron por alta concentración de inhibidores presentes en la muestra.

VII.RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se recomienda evaluar parámetros de temperatura, humedad para determinar la viabilidad del tiempo de almacenamiento de muestras de sangre impregnadas en papel filtro.
- Se recomienda realizar un estudio relacionando esta metodología con la concentración de hemoglobina presente en la muestra para determinar los posibles inhibidores de la PCR y así disminuir la presencia de falsos negativos.
- Aplicar el estudio a una población de niños menores de 2 años, quienes presentan mayor cantidad de células asociadas al VIH-1 en los que se pudiera determinar un límite de detección para la PCR.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

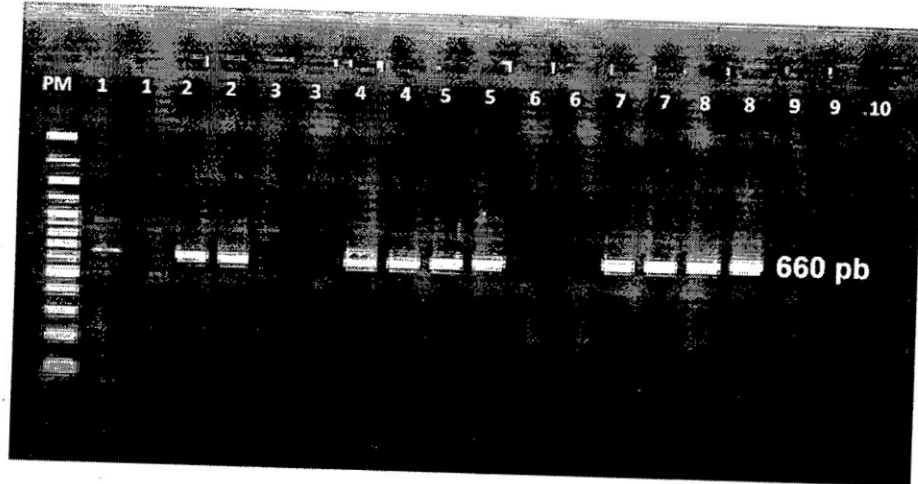
1. Guías para diagnóstico, tratamiento antirretroviral y monitorización adultos y embarazadas. Infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-SIDA) OPS- Uruguay; 2006
2. Valverde A, Romero R. Manual de Procedimientos. Ministerio de Salud. INS Manual de procedimientos para diagnóstico del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) por inmunofluorescencia indirecta. Serie de Normas Técnicas N° 29 – 2001
3. OPS. “Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH en niños en Latinoamérica y el Caribe: en la ruta hacia el acceso universal. Recomendaciones para un enfoque de Salud Pública”. Washington, D.C.: OPS; 2008 (Documento Técnico. Políticas. FCH/AI – 2008/002)
4. Beck I, Drennan K, Melvin A, Mohan K, Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B DNA in Dried Blood Samples for Diagnosis in Infants in the Field. *Journal of Clinical Microbiology*; 2001.
5. Chohan B, Emery S, Wamalwa D, Stewart G, Majiwa M, et al. 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. *Biomed centr Ltd. USA*; 2011.
6. Leelawiwat W; Young NL; Chaowanachan T; Ou CY; Culnane M; Vanprapa, N et al. Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: Stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of Virological Methods, Tailandia*; 2009; 155(2): 109-117.
7. Patton JC, Sherman G, Coovadia AH, Stevens WS, Meyers TM. Ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay modified for use on dried whole-blood spots as a reliable, affordable test for infant diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*; 2006.
8. Lorenzana I y Murillo W. Aplicación del PCR-ADN en el diagnóstico de la infección por VIH-1 en infantes. *Rev med de Honduras, volumen 71. Honduras*; 2005.
9. Rolo F, Mato J, Blanco M, Diaz H y Lubian A. Detección de la infección por VIH mediante la RCP en muestras de sangre seca en papel de filtro. Laboratorio de investigación del SIDA, Apartado 23031, La Habana-Cuba; 2003.
10. Abbas A, Litchman A, y Pober J. Inmunología celular y molecular. 4ta ed. Editorial McGraw Hill-Interamericana; 2006.
11. Sandons Martin, Virginia. Evolución del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), en pacientes no progresores con virus ancestrales. Madrid; 2010.
12. De Vita V, Hellman S, Rosember, S. SIDA: Etiología, diagnóstico, tratamiento y prevención. Ed. Salvat S.A., España; 2005.
13. Rosas A, Hernández P, Nájjar I, Guzmán R y Castañeda F. Características estructurales y funcionales del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enf.Inf. Microbiol*; 2013. 33(4): 163-173
14. Organización Panamericana de la Salud (OPS) Infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-SIDA) Guías para diagnóstico, tratamiento antirretroviral y monitorización adultos y embarazadas. Uruguay; 2006.
15. ONUSIDA. Informe sobre la epidemia mundial del sida. Ginebra: ONUSIDA-OMS; 2008.

16. Levy, Jay A. HIV and the pathogenesis of AIDS. Washington, D. C.: Wiley-Blackwell; 1998.
17. Campos Delgado, D. y Palacios, E. Análisis y control de la dinámica del VIH-1. Universidad Autónoma San Luis de Potosí. México; 2010
18. García F. Diagnóstico del laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica Elsevier; 2006.
19. Ospina S. Revisión de tema. Diagnóstico de la infección por el Virus de la inmunodeficiencia humana. Vol 10-4. Medellín-Colombia; 2006.
20. Boshell J, Álvarez C, Marrugo S, Rojas MC, Rodríguez BM, González M. Indirect immunofluorescence as a supplementary test for confirming HIV-1 infection: the experience of the National Institute of Health, Biomédica; 1993-2004.
21. Sherman G, Stevens G, Jones SA, Horsfield P, Stevens WS. Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings. J Acquir Immune Defic Syndr; 2005.
22. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Cap. 1.1.3. 2006.
23. Walker J y Gingolf E. Biología molecular y biotecnología. 2da. Edic. Edit. Acribia. España. 2004.
24. Rodríguez N y Barrios Miguel A. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. Universidad central de Venezuela; 2006.
25. Cortázar Martínez, A y Silva Rincón, Elsa P. Métodos físico- químicos en biotecnología – PCR. Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
26. Yábar Varas, Carlos A. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N° 38. Instituto Nacional de SALUD. Lima; 2005.
27. Feinstein A. Clinical biostatistics. XXXI. On the sensitivity, specificity and discrimination of diagnostic tests. Clin Pharmacol; 2005.
28. Molinero, Luis. Valoración de las pruebas diagnósticas. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. Madrid; 2008.
29. Organización Mundial de la Salud. Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos. OMS; 2008
30. Ministerio de Salud – Instituto Nacional de Salud. Aspectos Éticos, Legales y Metodológicos de los Ensayos Clínicos para su uso por los Comités de Ética. MINSAL-INS. Lima; 2010.
31. Sambrook J, Fritsch E y Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edic. All rights reserved. United States of America; 1989.

IX. ANEXOS

Anexo 1

Amplificación de la segunda ronda de PCR, región Pol del VIH-1, utilizando los *primers* RT3 Y RT4, obteniendo una banda de 660 pb en gel de agarosa 1,5%. PM: marcador de peso molecular, 2, 4, 5, 7: muestras por duplicado positivas a VIH-1, 8: Control positivo, 9: Control negativo y 10: Blanco.



Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio: “Valor diagnóstico de la prueba PCR-ADN para VIH-1 a partir de muestras de sangre total impregnadas en papel de filtro. Lima 2013”

Investigador responsable: Bach. Carmen Nilda Cuse Gutiérrez

Financiador: Instituto Nacional de Salud

Introducción: El Instituto Nacional de Salud (INS) del Ministerio de Salud (MINSA) está financiando una investigación para evaluar una técnica de diagnóstico para la detección del virus del VIH-1, utilizando muestras de sangre impregnadas en papel, a diferencia de otro tipo de muestras (sangre total, suero o plasma) no requiere cadena de frío para su transporte (refrigeración). La información de este estudio es de mucha importancia para mejorar el diagnóstico del VIH, facilitar la toma de muestra, disminuir los problemas de transporte de muestras y evitar situaciones traumáticas debido al pinchazo de la aguja sobre todo en niños menores de 18 meses en los cuales existe la dificultad en el momento de la toma de muestra.

Por ello requerimos su participación voluntaria como donante de muestra de sangre total “persona aparentemente sana” al cual se le hará un descarté por ELISA para VIH-1, la muestra donada de sangre total se impregnará en papel filtro para efectuar la validez de la técnica. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

¿Por qué se está realizando este estudio?

En el presente estudio se pretende evaluar una técnica de diagnóstico molecular para la detección del virus del VIH-1, utilizando muestras de sangre impregnadas en papel de filtro, que utilizaría pequeñas cantidades de muestra. La información de este estudio nos facilitaría la toma de muestra a fin de disminuir los problemas de transporte de muestras que requieren refrigeración así como evitar situaciones traumáticas debido al pinchazo de la aguja sobre todo cuando se trata de niños pequeños en los cuales existe la dificultad en el momento de la toma de muestra.

185636

1. ¿Cómo va a ser su participación?

Usted participará respondiendo a unas preguntas sobre algunos datos y le realizarán la extracción de sangre en tubo al vacío con anticoagulante EDTA.

2. ¿Quién participa?

Todas aquellas personas mayores de 18 años que voluntariamente acceden participar en el presente estudio.

3. ¿Qué procedimientos le realizarán?

Si participa en el estudio, se le tomará una muestra de sangre por venopunción de aproximadamente 6 mL (tres cucharitas de té), y sólo en una oportunidad. Este procedimiento nos permitirá realizar todas las pruebas necesarias para evaluar la especificidad de la técnica de diagnóstico molecular para VIH-1. La recolección de la muestra se realizará por personal de laboratorio debidamente entrenado.

La muestra que usted nos done será sometida a un diagnóstico de VIH-1 y será procesada en los laboratorios de Referencia Nacional del Instituto Nacional de Salud. Ud. Contará con los resultados de ELISA para VIH, en un período de 15 días a 20 días, contando desde el momento en que su muestra es ingresada al laboratorio. Después del transcurso de dicho tiempo, Ud. podrá tener acceso a sus resultados a través del investigador del estudio.

4. ¿Qué riesgos, incomodidades o molestias tendrán los participantes?

La toma de muestra de sangre puede asociarse con sensaciones indeseables por el "pinchazo de la aguja" y raramente puede presentarse la aparición de un moretón (hematoma) en la zona donde se tomó la muestra. Esta es una complicación transitoria y que no produce riesgos.

5. ¿Qué beneficios tendrá si participa?

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica por su participación en este estudio, ni tampoco se le cobrará por ello.

En caso de resultar Reactivo a la prueba de tamizaje para VIH-1, esta será confirmada; si resultase positivo a VIH-1 en la prueba confirmatoria, se buscará enrolarlo al sistema TARGA en un establecimiento de salud a donde tenga fácil acceso y atención gratuita.

Con su participación la comunidad podría beneficiarse de los resultados del estudio ya que estos servirán para fortalecer los programas de prevención, vigilancia y monitoreo, principalmente en niños pequeños de madres

positivas a VIH-1, establecidos por la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de ITS, VIH y SIDA (ESNITSS) del Ministerio de Salud en nuestro país.

6. ¿Se va a saber mi identidad?

Su muestra será manejada con la mayor confidencialidad y será almacenada en el Laboratorio de VETS-VIH/SIDA del Instituto Nacional de Salud, a la cual sólo tendrá acceso el investigador principal del proyecto. Nunca se publicará su nombre tampoco otra información que pueda identificarlo.

7. ¿A quién se le puede pedir más información?

Usted puede hacer preguntas acerca de cualquier aspecto que no esté claro, en este momento o en el futuro. Si Usted desea hacer consultas más adelante, puede contactar a la Investigadora Principal Bach. Carmen Nilda Cuse Gutiérrez, e-mail: carmencg.bio@gmail.com teléfono: 984890713; también puede contactarse con la coordinadora del Laboratorio de VETS-VIH/SIDA Blga. Soledad Romero Ruiz sromero@ins.gob.pe a través de los teléfonos: 7481111 anexo 1544.

8. ¿Mi muestra será utilizada para estudios posteriores?

Siempre y cuando Usted dé su consentimiento su muestra será conservada a -80°C por un período de 2 años o hasta que se agote, con el fin de realizar estudios destinados a la investigación sobre el VIH.

Estas pruebas permitirán contribuir con información destinada a mejorar la prevención y tratamiento de la infección por VIH. En caso no desee conservar su muestra para posteriores estudios deberá consignarlo en este documento (Ver: CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO PARA EL USO DE SU MUESTRA PARA ESTUDIOS POSTERIORES). Cualquiera que sea su respuesta, no afectará su participación en el estudio.

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

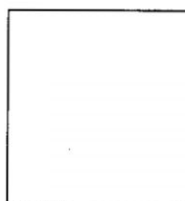
He leído o me ha sido leída la información contenida en todas las páginas de este documento. Tuve la oportunidad de hacer preguntas relacionadas con mi participación que fueron resueltas de manera satisfactoria y entendible. Doy mi consentimiento voluntario para participar

NOMBRE DEL PARTICIPANTE: _____

FIRMA DEL PARTICIPANTE: _____

FECHA Y HORA: _____

Si el participante no puede leer y/o firmar:



Huella Pulgar Derecho del voluntario:

**CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO PARA EL USO DE SU MUESTRA
PARA ESTUDIOS POSTERIORES**

**Por favor marcar con un aspa para manifestar su consentimiento sobre la
conservación de su muestra para posteriores estudios.**

Deseo que se conserve mi muestra para posteriores estudios: (Cualquiera que
sea su respuesta no afectará su participación en el estudio)

Si

NO

Certifico que he leído o he escuchado la lectura de manera completa y
entendible de este documento de consentimiento informado al posible
participante y que el paciente ha tenido la oportunidad de hacer preguntas que
han sido resueltas de manera satisfactoria. Confirmo que el participante ha dado
su consentimiento de manera voluntaria.

NOMBRE DEL INVESTIGADOR:

FIRMA DEL INVESTIGADOR: _____

FECHA Y HORA: _____

**Una copia de este Documento de Consentimiento Informado se le ha
entregado al participante _____ (Iniciales del participante)**

Anexo 3

Preparación de reactivos³¹

Preparación de Tris–acetato (TAE 50X)

Reactivos	Cantidad	Conc. final
Tris base	242 g	1,9 M
Ácido acético glacial	57,1 g	57,1%
EDTA 0.5M PH 8,0	100 ml	0,05 M

Completar con 1L de agua bidestilada

Preparación de EDTA 0.5 M pH 8.0

Reactivos	Cantidad
EDTA	93 g
NaOH	57 ml
Agua PCR	350 ml

Preparación de *buffer* TRIS- EDTA (TE) pH 8.0

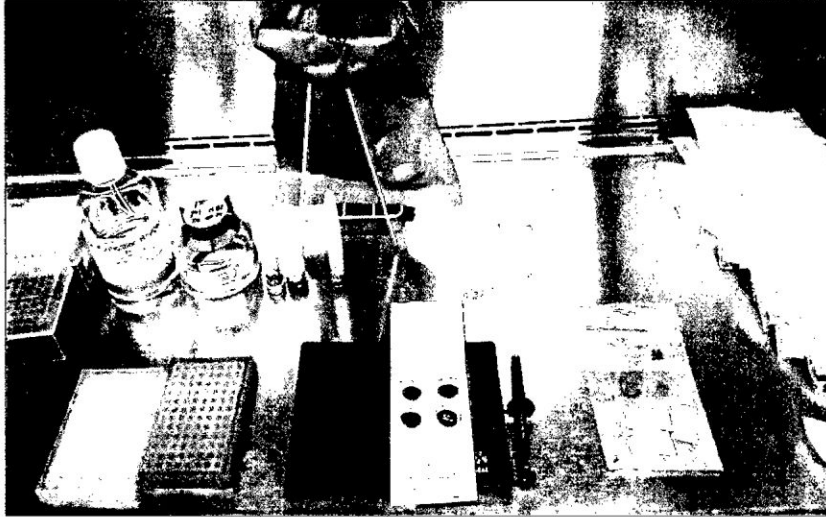
(10 mM Tris -HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8,0)

Reactivos	Cantidad
10 mM Tris- HCl	10 ml
0,1 mM EDTA pH 8,0	200 ml

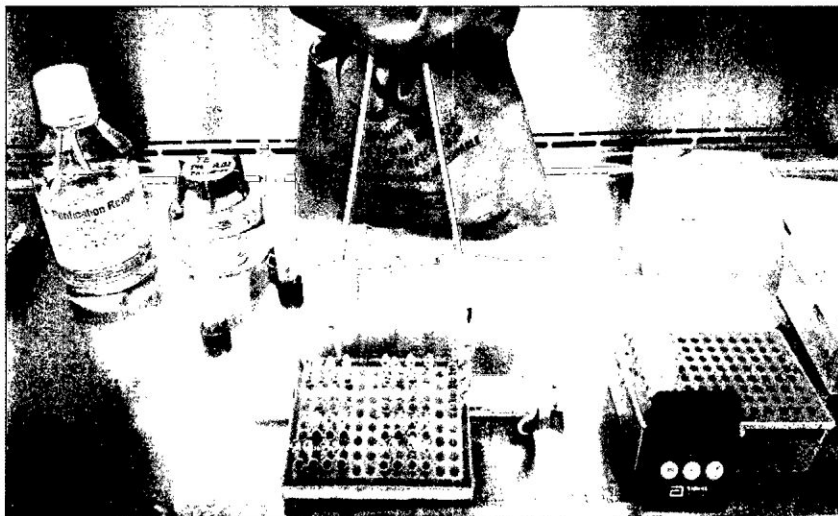
Completar con agua PCR o agua bidestilada.

Anexo 4

Materiales empleados para la extracción de ADN (buffer FTA, buffer TE, papel FTA impregnado con muestra de sangre, *micro punch* de 3 mm.)



Extracción de ADN, tubos de amplificación conteniendo los círculos de 3 mm para ser lavados con los buffers de extracción.



ANEXO 5

Flujograma de procesamiento de muestras

Impregnación, secado y almacenamiento de muestras de sangre en tarjetas FTA (*Classic card Whatman*)



1. Identificación de la muestra



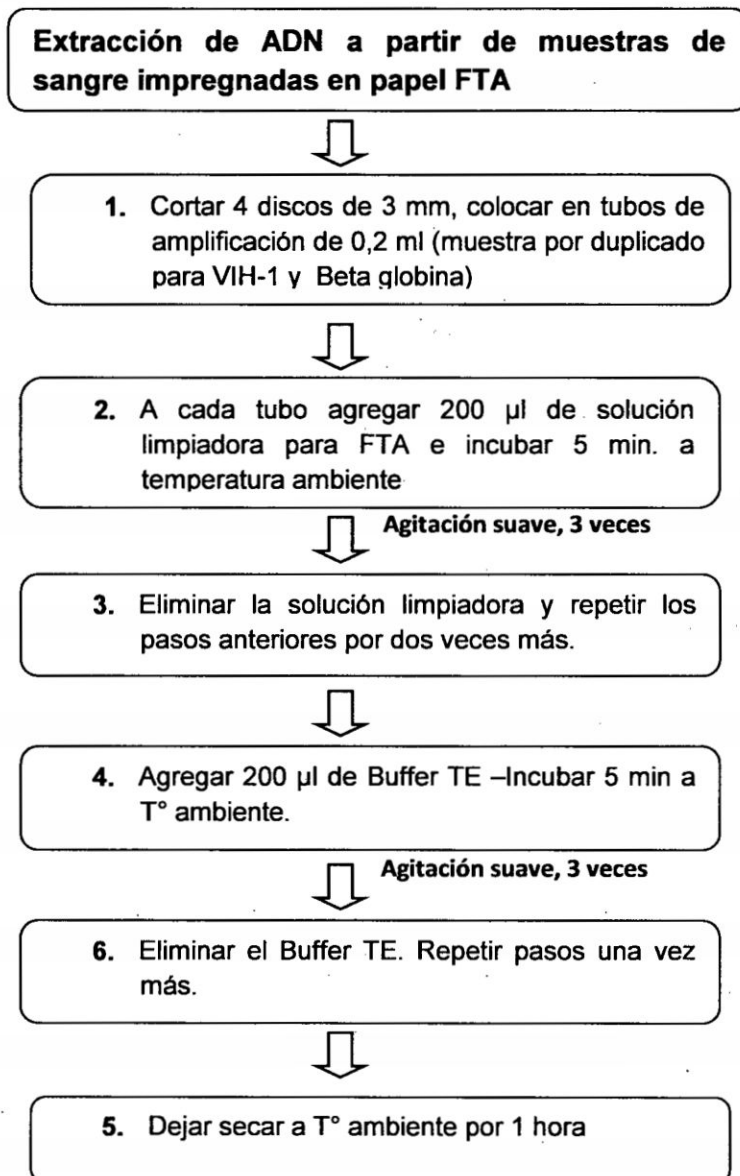
2. Aplicación de 125 μ l de sangre total en las tarjetas FTA



3. SECADO(24horas) y ALMACENAMIENTO de tarjetas FTA a temperatura ambiente

ANEXO 6

Flujograma de extracción de ADN



Anexo 7
Cuadro 5. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>"Valor diagnóstico de la prueba PCR-ADN para VIH-1 a partir de muestras de sangre total impregnadas en papel de filtro. Lima 2013"</p>	<p>¿Cuál será el valor diagnóstico de la técnica de PCR-ADN para VIH-1 a partir de muestras de sangre de filtro?</p>	<p><u>Objetivo General:</u></p> <p>Determinar el valor diagnóstico de la técnica PCR-ADN con muestras de sangre en papel filtro para la detección de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1).</p> <p><u>Objetivos específicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-ADN) con muestras de sangre en papel filtro. • Determinar especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-ADN) con muestras de sangre en papel filtro. 	<p><u>VIH:</u> El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus, subfamilia lentivirus (11). Estos virus tienen una serie de características específicas que son determinantes en la compleja patogenia de la infección por el VIH. Gran diversidad genética; en el ciclo vital hay 2 fases, virión infectante (ARN) y provirus (ADN)</p> <p><u>Epidemiología:</u> El VIH está ampliamente difundido a nivel mundial; África es el continente con más casos, seguido de Asia y en tercer lugar América Latina.</p> <p><u>Vías de transmisión:</u> Se puede adquirir a través la vía sexual en un 97%, 2% vertical y 1% parenteral</p> <p><u>Periodo de transmisibilidad:</u> La contagiosidad es de 7 días antes y 14 días después de la aparición del exantema.</p> <p>Pruebas diagnósticas.- se emplean pruebas de tamizaje como el ELISA y pruebas confirmatorias: IFI, western blot, LIA, ETC</p>	<p>La prueba de PCR ADN permite identificar VIH-1 a partir de muestra de sangre infectada impregnada en papel filtro con alta sensibilidad y especificidad.</p>	<p><u>VARIABLE DEPENDIENTE</u></p> <p>Valor diagnóstico de la prueba</p> <p><u>INDICADORES:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Especificidad • Sensibilidad <p><u>VARIABLE INDEPENDIENTE</u></p> <p>Técnica de PCR-ADN para el diagnóstico de VIH-1 utilizando muestras de sangre sobre papel filtro.</p> <p><u>INDICADORES:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Técnica de PCR-ADN Para VIH- 1 • Muestras de sangre en papel filtro 	<p>Muestras: 250 muestras de sangre total (positivas a VIH y sangre negativas a VIH) e impregnadas en papel filtro.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100 muestras de sangre positivas a VIH. • 100 muestras de sangre negativas a VIH, previa firma de consentimiento informado. • 50 muestras de sangre positivas a HTLV y Hepatitis B y negativos a VIH. <p><u>Procedimientos:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Selección de las muestra de sangre. 2. Impregnación de muestras de sangre en el papel filtro. 3. preparación de ADN para su procesamiento en PCR 4. Técnica de PCR-ADN para VIH y electroforesis. <p><u>Análisis de datos:</u> La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR-ADN- VIH se determinará utilizando pruebas diagnósticas con tablas de 2 x 2 (positivos y negativos) del total de muestras</p>

**BIBLIOTECA E INFORMACION
CULTURAL
U.N.S.C.H.**