

88
203

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

"DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HIV
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POR MEDIO
DE LA REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA."



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Tesis para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

Presentada por:

María Fernanda Martínez Salazar

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D.F., 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

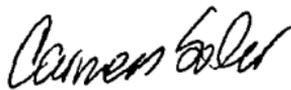
Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Homero Hernández Montes
Vocal	Prof. Carmen Soler Claudín
Secretario	Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos
1er. suplente	Prof. Saturnino de León Chapa
2do. suplente	Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas

Sitio donde se desarrolló el tema: Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA.

Asesor del Tema: M. en C. Carmen Soler Claudín

Sustentante: María Fernanda Martínez Salazar




AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento muy especialmente a Carmen Soler C. por haberme dado la oportunidad de trabajar en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos, así como también a Gerardo Kono, Ma. del Carmen Basualdo, Amine Barquet, Roberto Vázquez, Nina Valadéz, José Carmen Gudiño y Joel Vázquez, por brindarme toda su ayuda y amistad durante la realización de esta tesis.

Agradezco también al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, lugar donde se realizó esta tesis, y a todas las personas que colaboraron con nosotros para poder concluir este trabajo.

A mi mamá por todo su apoyo y cariño.

A mis hermanos: Gabriela y Luis Alberto.

A mis tíos: Salvador, Graciela y Enrique.

A mis primos: Paola y Sergio.

A mis amigos.

INDICE:

1. INTRODUCCIÓN

I. HISTORIA NATURAL DEL SIDA	1
II. EPIDEMIOLOGÍA DEL SIDA/HIV	1
III. AGENTE ETIOLÓGICO	4
IV. PATOGÉNESIS	6
V. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HIV	7

2. OBJETIVOS 13

3. MATERIALES Y MÉTODOS 13

4. RESULTADOS 23

ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MAGNESIO.	24
ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ENZIMA.	24
ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE OLIGONUCLEÓTIDOS.	25
LÍMITES DE DETECCIÓN.	26
IDENTIDAD DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.	27
MUESTRAS DE PACIENTES.	27
SENSIBILIDAD.	30
ESPECIFICIDAD.	30

5. ANALISIS DE RESULTADOS 31

6. CONCLUSIONES 35

7. BIBLIOGRAFIA 36

1. INTRODUCCIÓN

I. HISTORIA NATURAL DEL SIDA

En junio de 1981 se reportaron los primeros casos de SIDA, que incluían a cinco hombres jóvenes con deficiencia severa de su sistema inmunológico, sin ninguna causa conocida para ello. Pronto el Centro para el Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta, en Estados Unidos, adoptó una definición que sirviera de criterio para el seguimiento epidemiológico de la enfermedad. Se decía que una persona tenía SIDA si se encontraban infecciones oportunistas poco frecuentes tales como, neumonía ocasionada por *Pneumocistis Carinii* o tumores poco comunes, como el sarcoma de Kaposi. Posteriormente se han propuesto varias modificaciones a esa definición tomando en cuenta las observaciones que fueron realizándose con la aparición de nuevos casos.

Para 1983, el Instituto Pasteur reportó el aislamiento de un retrovirus al cual llamaron LAV (virus asociado a linfadenopatía) y menos de un año después se publicaron los datos de dos grupos en Estados Unidos en donde se comprobaba la etiología de esta enfermedad por el virus linfotrópico de células T humanas tipo III (HTLV-III) o ARV¹.

Se avanzó en el conocimiento de los mecanismos de transmisión y hoy sabemos que son: por vía sexual, por contacto con sangre y/o productos sanguíneos contaminados y/o de la madre al feto o al lactante.

II. EPIDEMIOLOGÍA DEL SIDA/HIV

Situación mundial

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que desde que inició la pandemia y hasta mediados de 1993, arriba de 13 millones de personas jóvenes y adultos han sido infectadas con el HIV, la mayoría de estas personas adquirieron el HIV a través de relaciones heterosexuales. De estas infecciones, 8 millones corresponden al sur del continente Africano; 1.5 millones a Norteamérica y oeste de Europa; 1.5 millones a Latinoamérica y el Caribe; 1.5 millones al sur de Asia, Medio Oriente y norte de África; 75,000 al este de Europa y 50,000 a Asia Central².

La misma OMS, estima que actualmente existen más de 3 millones de mujeres infectadas con el HIV en todo el mundo, la mayoría de ellas en edades entre 15 y 49 años y de éstas, el 80% se encuentra en el Subsahara africano. Se estima que tan sólo en Africa existen más de 2.5 millones de mujeres infectadas y en Latinoamérica 200,000. El aumento en el número de casos de mujeres se asocia con un aumento paralelo de los casos en niños, debido a que el 85% de todos los casos pediátricos fue contagiado a través de la transmisión perinatal, por lo que se estima que a la fecha existen entre 500,000 y un millón de niños infectados en el mundo³.

A la fecha, cerca de 2 millones de personas infectadas con HIV han desarrollado SIDA y la mayoría de ellas han muerto. El costo en términos de sufrimiento personal, disrupción de la familia e impacto en la comunidad es enorme.

En algunas ciudades de Africa donde la prevalencia de HIV es muy elevada, uno de cada tres adultos está infectado, cerca del 80% de las camas para adulto en algunos hospitales están ocupadas por pacientes con SIDA. Esto significa grandes costos, tanto directos como indirectos, ya que la mayoría de estas personas se encuentran en el grupo de edad productiva dentro de la sociedad y por lo tanto al caer enfermas y morir hay un decremento en la fuerza de trabajo. Todas estas razones hacen necesario encontrar mejores caminos para el tratamiento y el cuidado de personas infectadas con HIV así como también intensificar esfuerzos para prevenir y evitar la propagación del virus.

Situación en México

Hasta el 1 de mayo de 1994 en México se han reportado 18,560 casos. Doscientos siete de ellos fueron reportados en el último mes, dando un promedio diario de nuevos casos de 6.9. Considerando el retraso en la notificación, se estima que el número real de casos de SIDA en México es superior a 28,000. El 91.9% de los casos son atribuibles a transmisión sexual, los casos relacionados a transmisión sanguínea han ido disminuyendo, representando en 1993 el 8.0%. Las entidades con mayor razón de casos por habitante son: el Distrito Federal donde uno de cada 1,624 habitantes tiene SIDA o ha fallecido por este padecimiento, en el estado de Jalisco uno de cada 2,620 habitantes y en el estado de Morelos uno de cada 3,008. En lo que respecta a edad y sexo, la mayor parte de los casos notificados ocurrió en los grupos de 20 a 44 años, la razón hombre-mujer es diferente según los grupos de edad, para los grupos más afectados (20 a 44 años) esta razón varía entre seis y ocho hombres por cada mujer afectada, mientras que esta relación es de 1:1 en el grupo de menores de un año. En lo que se refiere a niños menores de 15 años se han notificado 545 casos de los cuales el 55.6% se transmitió por vía perinatal; 25.2% por transfusión sanguínea; 17.3% en hemofílicos y 2.0% por abuso sexual⁴.

Vías de transmisión

Las principales rutas de transmisión del HIV son a través de contacto sexual, transfusión sanguínea y/o hemoderivados de sangre contaminada y transmisión de madre a hijo, ya sea perinatalmente o a través de la leche materna.

Transmisión sexual:

La transmisión por contacto sexual puede ocurrir tanto entre personas homosexuales/bisexuales como heterosexuales y parece deberse al paso del HIV a través de las mucosas del aparato sexual, ya sea por contacto directo de éstas con fluidos corporales tales como semen o secreciones vaginales, o debido a la presencia de lesiones en las mismas, razón por la cual aumenta el riesgo de infección si existe alguna infección venérea.

Transmisión Sanguínea:

El virus de inmunodeficiencia humana parece ser transmitido eficientemente a través de sangre completa, linfocitos, paquetes de células rojas, plaquetas y plasma. Algunos productos derivados de plasma, como factores de coagulación (Factor VIII principalmente) fueron una gran fuente de contaminación hasta que su proceso de manufactura fue modificado. Otros productos preparados a partir de sangre tales como albúmina, fracciones de proteínas plasmáticas o vacuna de la hepatitis B resultan no ser infecciosos debido al modo de preparación de estos, que inactiva cualquier posible retrovirus contaminante. Se estima que antes de 1985, arriba de 95% de las personas que recibieron sangre contaminada o Factor VIII obtenido de sangre de individuos infectados fueron contaminados con el virus¹.

Transmisión vertical:

El número de niños que ha adquirido la infección por HIV de su madre ha ido aumentando debido al incremento de la infección con HIV entre mujeres en edad fértil, las cuales representan 80% del total de los casos de las mujeres infectadas. Todas las mujeres infectadas con el virus tienen el riesgo de transmitirlo a su producto, aunque todavía no es claro por qué sólo un cierto porcentaje de los hijos de madres HIV positivas se contagian. En México, la transmisión perinatal representa 55% de los casos de infección por HIV en pacientes menores de 1 año de edad¹. La posibilidad de que el niño adquiera la infección por HIV perinatalmente varía, según diversos estudios, dentro de un rango muy amplio que va de 15 a 40%¹.

Existen diferentes estudios que han tratado de determinar los factores y cofactores maternos que determinan la eficacia de este tipo de transmisión, se ha propuesto que: carga viral elevada, bajo nivel de la relación CD4/CD8, madres jóvenes y en etapa avanzada de la enfermedad, la presencia de corioamniotitis inversión del cociente CD4/CD8, ausencia de anticuerpos contra las glicoproteínas gp120 o de anticuerpos tipo IgA contra polipéptidos del HIV en la madre, son factores predisponentes a la transmisión vertical. Se debe aclarar que a pesar de que la presencia de síntomas en la madre es un factor importante que parece favorecer la transmisión perinatal, la ausencia de síntomas no descarta la posibilidad de que el bebé nazca infectado¹.

El mecanismo exacto por el cual ocurre la transmisión del virus de la madre al hijo se desconoce, aunque existen varias posibles rutas: a) en útero vía infección transplacentaria hacia el feto; b) durante el proceso de parto, por contacto con sangre infectada y/o secreciones y c) en el periodo postnatal a través de la leche materna.

III. AGENTE ETIOLÓGICO

Composición del virus

El agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es el virus de Inmunodeficiencia humana, del cual existen dos tipos reportados hasta ahora: HIV-1 y HIV-2. Estos virus pertenecen a la subfamilia de los Lentivirus, familia *Retroviridae*. La morfología de éstos es muy similar, tienen un diámetro de 100 nm, un núcleo que contiene dos moléculas de RNA de cadena sencilla y enzimas virales (transcriptasa reversa, e integrasa), rodeado por una membrana que contiene las glicoproteínas virales de la envoltura (gp120 y gp41 para HIV-1).

Las moléculas de RNA son de tipo positivo, de aproximadamente 10 Kb de longitud, cada una contiene en su estructura tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, seis genes reguladores y en cada uno de sus extremos una secuencia repetida terminal larga (*LTR*).

Las secuencias *LTR* no codifican para ninguna proteína, sirven para iniciar la expresión de otros genes del virus. Los genes estructurales codifican para las proteínas que forman la partícula viral o que tienen actividades enzimáticas indispensables para la replicación del virus: *gag* codifica para una proteína, p55, que es la precursora de las proteínas de la nucleocápside del virus (p24, p17 y p9); el gen *pol* codifica enzimas virales: transcriptasa reversa, endonucleasa (o integrasa) y una proteasa viral y el gen *env* codifica para un precursor glicosilado, gp 160, que es procesado en la glicoproteína externa de membrana gp120 y la glicoproteína transmembranal, gp41 (Cuadro 1).

CUADRO I

Genes y proteínas del HIV

Gen	Inmunogenicidad	Proteínas	Localización	Función	Replicación
<i>gag</i>	+	p55/p24/p17/ p9	Cápside	Proteínas estructurales del núcleo	+
<i>pol</i>	+	p66/p51/p31	Interior de la partícula	Transcripción reversa	+
<i>env</i>	+	gp160/gp120/ gp41	Membrana	Proteínas de la envoltura	+
<i>vif</i>	+	p23	Citoplasma/ membrana interna	Infectividad	+/-
<i>tat</i>	+	p14	Núcleo/ nucleolo	Activador de transcripción	+
<i>rev</i>	+	p19	Núcleo/ nucleolo	Modulador de transcripción. Expresión de proteínas estructurales	+
<i>nef</i>	++	p27	Citoplasma	Regulador negativo	-
<i>vpr</i>	+	p18	Desconocida	Desconocida	+
<i>vpu</i>	+	p15	Citoplasma/ membrana	Liberación de partículas virales	+
<i>vpx*</i>	+	p15	Citoplasma/ membrana	Liberación de partículas virales	+

*vpx solamente está presente en HIV-2, en sustitución de vpu que es exclusivo de HIV-1

Los genes reguladores *tat*, *rev* y *nef* desempeñan un papel muy importante en la regulación de la expresión viral. Las proteínas de *tat* y de *rev* regulan la transcripción y/o los fenómenos de postranscripción, y ambos son necesarios para que se lleve a cabo la replicación viral. El gen *nef* codifica para una proteína que ejerce una función de regulador negativo, de modo que cuando éste gen se modifica por mutaciones, el virus se replica mucho más*.

Ciclo de vida y replicación

El primer paso del ciclo de vida del HIV comienza cuando la glicoproteína externa gp120 se une a la molécula CD4, localizada en la superficie de las células T y también en pequeñas cantidades en otras células. La fusión subsecuente requiere de la membrana viral, posiblemente de la gp41 y de algunos otros factores celulares. La hipótesis más aceptada es que la entrada del virus se debe a un fenómeno de endocitosis mediada por un receptor. Una vez que el RNA viral ha penetrado en la célula, comienza el siguiente paso, que es la síntesis de DNA complementario a partir del RNA viral, empleando la enzima transcriptasa reversa como polimerasa. El DNA viral sintetizado puede quedarse como DNA citoplasmático no integrado, o bien se circulariza y se transporta al núcleo de la célula, incorporándose al DNA celular con la ayuda de la integrasa viral, a este DNA integrado se le conoce como provirus y permanece latente hasta que es activado.

La activación de la célula y la consecuente expresión del provirus produce nuevas partículas virales, de tal manera que algunas de las nuevas moléculas de RNA viral que se sintetizan, constituirán el material genético de una nueva generación de virus, mientras que otras moléculas de RNA van a actuar como RNA mensajero, traducándose en las proteínas estructurales y en las enzimas de las nuevas partículas de virus.

Las moléculas precursoras se agregan y por medio de un proceso de gemación abandonan la célula, obteniendo de esta manera la membrana que rodea a la partícula viral.

Existe otro mecanismo de infección característico del HIV, que consiste en la fusión de células infectadas y sin infectar, formando sincicios, esto ocurre por un proceso en el que la proteína de la envoltura vírica, gp120, presente en la superficie de la célula infectada, se une al receptor CD4 de otra célula no infectada, produciéndose la fusión de las membranas celulares; de esta manera el virus se transmite directamente de la célula infectada a la no infectada sin necesidad de pasar por la etapa de virus libre.

IV. PATOGÉNESIS

La infección por HIV provoca la disminución de los linfocitos CD4⁺, que se observa conforme progresa la enfermedad y está asociada con la aparición de variantes virales que pueden escapar de los anticuerpos neutralizantes o de los linfocitos T citotóxicos. Se han propuesto varias teorías para explicar esta disminución de células CD4⁺, como la muerte celular ocasionada por la fusión de una célula infectada con otras sin infectar, de la que resulta la formación de sincicios; la acumulación de DNA sin integrar, la cual tiene efecto citotóxico; y la formación de complejos intracelulares CD4-gp120.

Se han identificado varios mecanismos que, además de la disminución en CD4⁺, contribuyen a la inmunodeficiencia. Entre estos mecanismos está la respuesta inmunológica tanto celular como humoral contra algunos componentes del HIV, que inhiben o destruyen otras células del sistema inmunitario. Por ejemplo, hay evidencia

de que algunos anticuerpos contra la proteína de membrana del HIV, en lugar de neutralizar la infectividad viral estimulan la infección de macrófagos y monocitos, facilitando el proceso de absorción del virus a través de sus receptores membranales para la porción Fc de la IgG o para componentes de la vía del complemento. Por parte de la respuesta celular están los linfocitos T citotóxicos específicos para el HIV y el fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, que son capaces de lisar células infectadas por HIV y otras no infectadas pero que han absorbido pasivamente proteínas virales⁴.

V. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HIV

Es muy importante conocer el diagnóstico de la infección por HIV, ya que permite al paciente recibir un tratamiento médico óptimo desde un momento temprano de la infección y llegar a evitar el desarrollo de alguna enfermedad ocasionada por agentes oportunistas que puedan llegar a ser letales, tales como la neumonía ocasionada por *Pneumocystis carini*, que actualmente puede ser prevenida con una medicación temprana durante el curso de la infección. El diagnóstico temprano puede ofrecer también al paciente una manera de considerar su comportamiento para evitar transmitir el virus a otras personas.

Las maneras de diagnosticar la infección por HIV pueden ser detectando ya sea la respuesta inmune del individuo a la infección, o por la detección del virus mismo o de alguno de sus componentes.

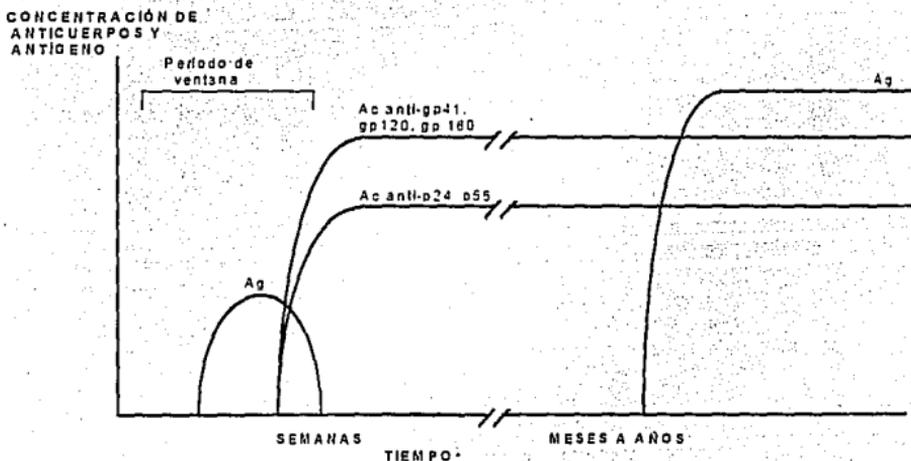


FIGURA 1

En la figura 1 se muestra una gráfica de la historia natural de la infección por HIV. Al entrar el virus al organismo, éste se replica, encontrándose en esta etapa una gran cantidad de virus libre y de sus proteínas en el torrente sanguíneo. Esta etapa

abarca un periodo que va de días a semanas y se caracteriza por no encontrarse cantidades detectables de anticuerpos. Posteriormente, el virus entra en un periodo de latencia, durante el cual puede encontrarse el provirus integrado dentro de la célula. En esta etapa los niveles de antígeno circulante empiezan a declinar y simultáneamente comienza una gran producción de anticuerpos (6 a 12 semanas) contra las proteínas virales. Los primeros anticuerpos que se producen son contra las glicoproteínas gp 120, gp41 y/o gp160 y finalmente contra las proteínas p24 y p17. En cualquier etapa de la infección se encuentran mayores niveles de anticuerpos contra las glicoproteínas externas que contra las proteínas de *gag* o de *pol*.

Esta etapa de latencia se caracteriza porque generalmente el individuo permanece asintomático durante periodos prolongados, que pueden durar de meses a años. La presencia posterior de partículas, o proteínas virales durante el transcurso de la infección nos indica periodos de replicación del virus, que usualmente va acompañada por síntomas en el paciente.

La etapa que comprende desde el momento de la infección, hasta la aparición de anticuerpos se le conoce como "periodo de ventana" y generalmente va de 0 a 6 semanas. Durante este periodo no es posible diagnosticar la infección con el HIV por medio de las técnicas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos anti-HIV en un individuo.

Respuesta inmune

La infección por HIV puede diagnosticarse por medio de la respuesta inmune del individuo hacia el virus, esto es, detectando los anticuerpos producidos por el individuo y que se encuentran en suero o plasma. Así, la presencia de anticuerpos contra el HIV implica que ha habido exposición e infección con el virus.

Actualmente se cuenta con una gran variedad de pruebas para la detección de anticuerpos anti-HIV, tales como: ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), inmunoelectrotransferencia (Western Blot), aglutinación y radioinmunoprecipitación (RIPA). De éstas, la aglutinación, el ELISA y el Western Blot (WB) son las pruebas de mayor uso.

Aglutinación: Esta técnica se basa en que partículas sensibilizadas con HIV inactivado son aglutinadas por la presencia de anticuerpos de HIV en muestras de suero o plasma. Este tipo de prueba tiene la ventaja de que se realiza en poco tiempo, no es muy costosa y no requiere equipo sofisticado. Como desventaja se reporta la subjetividad en su interpretación.

ELISA: La prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-HIV es el método más usado para determinar la infección por HIV en adultos y en niños de más de 15 meses de edad, reportándose una sensibilidad y especificidad en la mayoría de los ensayos de por lo menos 99.5 y 99.8% respectivamente. Esta técnica comúnmente detecta la presencia de anticuerpos de tipo IgG, por lo que en los casos de niños menores de 15 meses de edad, nacidos de madres seropositivas, se puede utilizar una modificación de esta prueba para detectar anticuerpos de tipo IgM o IgA en el

suero del infante, ya que estos anticuerpos no atraviesan la placenta y la presencia de estos, indica una respuesta inmune específica a la infección.

Existen una gran variedad de pruebas de ELISA disponibles comercialmente, la mayoría de ellas son usadas para detectar anticuerpos anti-HIV y han sido clasificadas como: competitivas, indirectas, sandwich, y ensayo de captura. La mayoría de estos tipos de ELISA consisten en una fase sólida, la cual contiene un antígeno viral, a la cual se agrega la muestra a analizar (suero o plasma), posteriormente se agrega una inmunoglobulina anti-IgG humana conjugada con una enzima y finalmente se adiciona un cromógeno el cual va a producir una reacción colorida si es que se encuentran presentes anticuerpos anti-HIV en el suero del paciente.

Algunas de las ventajas de estas pruebas de ELISA son: que los resultados pueden cuantificarse espectrofotométricamente; que son fáciles de realizar y que los reactivos son relativamente estables y baratos.

Las pruebas de aglutinación y las de ELISA son empleadas como pruebas de tamizaje, tanto para garantizar la seguridad de productos sanguíneos y tejidos humanos de donadores, como para realizar diagnóstico presuntivo de individuos con riesgo de infección.

Western Blot: El WB sigue siendo la alternativa más específica para el diagnóstico serológico confirmatorio del HIV; también es utilizado para monitorear el desarrollo de anticuerpos específicos a un tiempo dado de la infección y al igual que en el ensayo de ELISA, se puede hacer una modificación de esta prueba para poder detectar anticuerpos IgM o IgA en niños menores de 15 meses, nacidos de madres seropositivas.

El principio de esta técnica se basa en incubar el suero o plasma del paciente con tiras de nitrocelulosa que contengan proteínas virales, los anticuerpos específicos contra cada una de estas proteínas, si existen, se unen a los antígenos correspondientes, se añade una anti-Ig humana conjugada con una enzima y finalmente se añade un cromógeno que tiñe las tiras en bandas que corresponden a la distribución de los antígenos virales en las tiras de nitrocelulosa¹⁰.

El Western Blot tiene una sensibilidad equivalente a la prueba de ELISA, pero permite aseverar que la reacción es específica para el HIV. Tiene como inconvenientes la dificultad en la interpretación de resultados y su mayor complejidad técnica, por lo que se requiere de personal de laboratorio experimentado.

Radioinmunoprecipitación: Esta prueba está basada en la capacidad de los anticuerpos para unirse y co-precipitar con proteínas virales previamente marcadas radiactivamente por la incorporación de un aminoácido radiactivo en el medio de cultivo usado para la producción del virus. Esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad, pero tiene las desventajas de ser muy costosa y requiere de la utilización de radioisótopos y personal de laboratorio experimentado para la interpretación de los resultados.

Detección del virus

El HIV o sus componentes se puede encontrar presente en la sangre de la mayoría de los individuos infectados, ya sea en forma de virus libre o asociado a células y en formas completas o incompletas, por lo que el diagnóstico se puede hacer: por aislamiento viral, por detección de antígenos virales o identificación de genoma viral, considerando como evidencia de la infección la detección de cualquiera de los tres productos virales mencionados.

Estos tipos de metodologías se utilizan más comúnmente para aquellos casos en los que existen problemas para el diagnóstico serológico, como es el caso de parejas de seropositivos que permanecen seronegativas por largos periodos o en niños nacidos de madres seropositivas.

Aislamiento viral: Un diagnóstico definitivo de la infección con el HIV puede ser obtenido utilizando un cultivo celular para aislar el virus que se encuentra presente en las células mononucleares periféricas (CMP) y en algunos tejidos y fluidos corporales tanto de individuos sintomáticos como asintomáticos. Se requiere de un sistema de cócultivo en el cual el cultivo es preparado a partir de las CMP de un individuo sano activadas con polibren y utilizando en el medio Interleucina-2¹¹.

La presencia de HIV en cultivos celulares se puede determinar utilizando un ensayo inmunoenzimático para la detección de antígenos virales, midiendo la actividad de la transcriptasa reversa en el sobrenadante del cultivo; observando la formación de sincicios en el cultivo de células, y/o por inmunofluorescencia.

El éxito del aislamiento del HIV a partir de las CMP es de 100% para pacientes sintomáticos y ligeramente menor para individuos asintomáticos, aunque existen algunas variaciones en la eficiencia, tales como los niveles de virus en la muestra, o el grado de susceptibilidad del cultivo de las CMP a la infección.

Estas variables además del hecho de que el procedimiento para el cultivo es laborioso, requiere de bastante tiempo (de 2 a 6 semanas); es peligroso, es costoso y requiere de personal de laboratorio experimentado, ha limitado el uso de esta técnica para diagnosticar la infección por HIV, por lo que se ha restringido principalmente a casos perinatales y en ocasiones para individuos que presentan resultados serológicos indeterminados, se utiliza también para estudios de caracterización biológica del virus.

Detección de antígenos virales: Para realizar la detección de antígenos virales se utiliza una modificación de la prueba de ELISA descrita anteriormente, aunque ambas están basada en el mismo principio (reacción antígeno- anticuerpo). En esta prueba se utiliza una fase sólida con anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra las diferentes proteínas virales; se agrega la muestra a analizar, que puede ser el suero o plasma del paciente, o sobrenadante de cultivo; si los antígenos están presentes, estos se van a unir a los anticuerpos. Posteriormente se adiciona el conjugado, que consiste en anticuerpos anti-HIV marcados con una enzima, finalmente se agrega un substrato y en el caso de que se encuentren presentes los antígenos virales se va a producir una reacción colorida.

Esta técnica se utiliza para detectar la infección por HIV antes de que ocurra la seroconversión; para monitorear aislados virales *in vitro*, como marcadores pronósticos de la infección resulta ser relativamente poco sensible por lo que raramente se utiliza para diagnóstico, ya que puede suceder que los niveles de antígeno circulante sean tan bajos que no alcancen niveles detectables con la metodología disponible.

Identificación de genoma viral: Tanto el RNA viral, como el DNA proviral, pueden ser detectados por medio de técnicas de amplificación génicas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aunque también pueden utilizarse técnicas de hibridación tales como las de Southern Blot y Dot Blot, el inconveniente de estas técnicas es que tienen muy baja sensibilidad y es necesario trabajar con radiactividad. Por lo que la metodología más utilizada para la identificación del genoma viral es el PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La técnica de PCR ha sido ampliamente aplicada en los últimos años en diferentes áreas de la biología molecular y ha sido de gran ayuda para poder diagnosticar una gran cantidad de enfermedades infecciosas o genéticas.

Por medio de esta técnica es posible amplificar secuencias específicas de ácidos nucleicos, en el caso del HIV, podemos buscar ya sea DNA proviral, o RNA viral. En éste último caso es necesario primero transcribir el RNA a un DNA complementario utilizando una enzima transcriptasa reversa; una vez obtenido el DNA complementario, es posible amplificarlo de la misma manera que el DNA proviral².

La mayor limitación de esta metodología en el diagnóstico de HIV es que depende del número de células T infectadas o de partículas virales libres que se encuentren en el individuo en el momento del muestreo, mismas que en ocasiones pueden ser muy bajas y no se llega a alcanzar niveles detectables ocasionando resultados falsos negativos.

El principio de la técnica de amplificación *in vitro* esta ilustrado en la figura 2.

La primera etapa consiste en obtener el DNA de la muestra problema, esta obtención varía según el tipo de muestra que se tenga por lo que existen diferentes protocolos sencillos de realizar. El siguiente paso es emplear ese DNA como molde para ser copiado, para ello se prepara una reacción conteniendo dos oligonucleótidos (iniciadores o primeros) diferentes, los cuales son complementarios a los extremos de la región que se desee amplificar. A la reacción se le agregan los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) de adenina, guanina, citosina y timina, una DNA polimerasa (Taq polimerasa) y un amortiguador conteniendo Mg^{2+} .

Esta mezcla es entonces sometida a un proceso de amplificación a través de varios ciclos que incluyen tres pasos:

Paso 1.- Desnaturalización de la doble hebra de DNA.

Paso 2.- Alineación de los oligonucleótidos.

Paso 3.- Extensión o polimerización.

Estos 3 pasos se repiten aproximadamente de 30 a 40 veces, obteniéndose así una amplificación de la secuencia de DNA blanco de 2^n veces, donde n representa el número de ciclos¹³

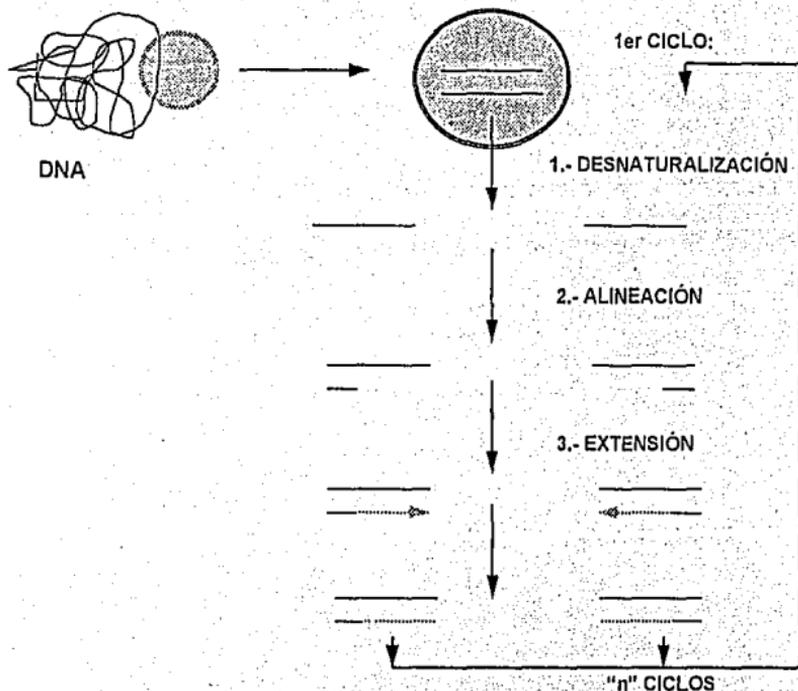


FIGURA 2

Los productos de la reacción de PCR son fragmentos de DNA, cuyo peso molecular estará definido por el segmento comprendido entre los dos iniciadores empleados. Una manera de analizar los productos amplificados es por medio de un gel de agarosa, la concentración de ésta debe de ser escogida tal que permita la resolución de los fragmentos de DNA dentro del rango del tamaño del producto esperado (aproximadamente del 1 al 2% para productos > 500 bp y de 2 a 4% para productos < 500bp)¹⁴, el gel es teñido con bromuro de etidio y por medio de un transiluminador de luz UV se pueden observar las bandas esperadas de la reacción, los productos amplificados se corren a la par con un marcador de peso molecular.

Estos productos también pueden visualizarse en un gel de acrilamida teñido con nitrato de plata, con esta tinción existe una mejor definición de las bandas esperadas.

El PCR en diagnóstico de infección por HIV se utiliza principalmente en los casos de niños nacidos de madres seropositivas, para personas de alto riesgo de contraer SIDA y que permanecen seronegativas por largos periodos, para la

descripción de la variabilidad genética entre diferentes aislados de virus, y para la resolución del estado de infección de individuos con resultados serológicos indeterminados.

Se ha reportado que la sensibilidad y la especificidad para detectar DNA viral en adultos infectados por medio de esta técnica es de aproximadamente 97 y 100% respectivamente¹⁴.

2. OBJETIVOS

En base a las dificultades que presenta el diagnóstico de la infección por HIV en pacientes pediátricos con la metodología tradicional y con la finalidad de implementar la técnica de PCR como método de diagnóstico, se plantearon los siguientes objetivos:

Generales:

—Diagnosticar la infección por HIV en pacientes pediátricos empleando la técnica de PCR.

Específicos:

- Estandarizar la técnica de PCR elaborando un procedimiento óptimo de trabajo.
- Establecer los límites de sensibilidad y especificidad de la técnica.
- Comparar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR con las de detección de antígenos virales y aislamiento viral.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Separación de células mononucleares periféricas:

SOLUCIONES EMPLEADAS

-PBS
Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4 en 800 ml de ddH_2O . Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1000 ml con agua bidestilada (ddH_2O).

-Azul de Tripano
Disolver 0.1 g de azul de Tripano en 2 ml de PBS.

- Colectar muestra de sangre completa con anticoagulante (heparina o EDTA).
- Diluir la muestra de sangre con PBS 1: 2 en condiciones estériles.
- Montar un gradiente de Ficoll, 1: 2 de ficoll-hypaque: sangre diluida, en tubos cónicos de 15 ml estériles.
- Centrifugar 30 min., a 20°C, a 1700 rpm.

- Colectar la capa superior correspondiente a plasma diluido 1:2 y conservar en alícuotas para serología.
- Colectar las células mononucleares periféricas (CMP) de la interfase con el Ficoll, colocándolas en un tubo cónico de 15 ml, estéril.
- Lavar las CMP con PBS estéril, diluyendo hasta 15ml. Centrifugar en las mismas condiciones 10 min.
- Resuspender el botón de CMP en un volumen conocido de PBS y contar en la cámara de Newbauer, tiñendo con azul de Tripiano.

Extracción de DNA:

SOLUCIONES EMPLEADAS

- STE 1 X

0.1 M de NaCl, 10 mM de Tris-Cl (pH=8.0), 1 mM de EDTA (pH 8.0).

- SDS 10%

Pesar 100 g de SDS grado electroforético en 900 ml de ddH₂O. Calentar hasta disolución. Ajustar el pH a 7.2 con HCl. Aforar a 1000 ml con ddH₂O.

-Proteinasa K (SIGMA)

Contiene 100 mg de Proteinasa K liofilizada. Se disuelve en 5 ml de ddH₂O filtrada y esterilizada. Alicuotar en tubos eppendorff.

-Fenol- cloroformo- alcohol isoamílico. Se mezclan en una proporción de 25:24:1, utilizando fenol ultrapuro previamente equilibrado a pH= 8.0¹⁶.

-Acetato de sodio 3 M

Disolver 408.1 g de acetato de sodio · 3H₂O en 800 ml de ddH₂O. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 1000 ml con ddH₂O.

-Etanol Absoluto.

-EtOH (etanol) 70%.

Tomar 70 ml de etanol absoluto y llevar a 100 ml con ddH₂O.

Por cada 10 millones de CMP:

- Resuspender en 4 ml de STE
- Agregar 50 µl de proteinasa K [20 µg/µl]
- Agregar 450 µl de SDS 10%
- Dejar incubando de una hora a toda la noche a 56°C
- Agregar un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y agitar.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 30 min.
- Separar la fase acuosa y repetir la extracción con fenol-cloroformo hasta que la fase acuosa se observe transparente.

- Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M.
- Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto.

Si se observa la precipitación de hebras de DNA, puede colectarse directamente. En caso contrario, o para obtener un mejor rendimiento, puede dejarse a -20°C toda la noche.

- Centrifugar a 4000 rpm durante 30 min.
- Tirar el etanol absoluto y lavar con EtOH al 70%.
- Dejar secar y disolver el DNA en ddH₂O filtrada y esterilizada, en proporción de 50 μl por cada millón original de CMP.

La concentración de DNA se determina midiendo la densidad óptica a 260nm. Para ello hacer una dilución 1:200 del DNA con ddH₂O, el valor de absorbancia se multiplica por 10 y el resultado es la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Para determinar pureza del DNA, también se lee la muestra a 280 nm y se calcula la relación DO₂₆₀/ DO₂₈₀. Este valor deberá estar entre 1.6 y 2.0.

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Procedimiento general:

Todas las soluciones deben prepararse en agua bidestilada, autoclaveada o filtrada y ser filtradas después de su preparación.

Solo deben emplearse pipetas serológicas desechables, estériles o micropipetas de desplazamiento positivo en el manejo de todos los reactivos.

- Preparar amortiguador 10 x :

KCl	500 mM
Tris-HCl, pH = 8.3	100 mM
MgCl ₂	25 mM*

* La concentración de MgCl₂ se ajusta dependiendo del par de iniciadores empleados.

- Preparar la Mezcla I en condiciones estériles:

Amortiguador 10 x	5 μl
Iniciador A	50 pM
Iniciador B	50 pM
dNTPs *	125 μM cada uno
Taq polimerasa	2 U
ddH ₂ O c.b.p.	35 μl

* dNTPs contiene: dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Estos nucleótidos se encuentran a una concentración Stock de 100 mM (Farmacia). Como solución de trabajo se preparan 1000 μl conteniendo 12.5 μl de cada dNTP de la solución stock.

- Marcar tubos eppendorff estériles y añadir a cada uno de ellos 35 μ l de la mezcla I y 2 gotas de aceite mineral.
- Añadir el DNA problema equivalente a 100,000 CMP.
- Ajustar el volumen final a 50 μ l con ddH₂O filtrada y esterilizada.
- Colocar los tubos en el ciclador de temperatura programado de acuerdo al par de oligonucleótidos empleados.

Controles positivos y negativos:

Control positivo: Se emplea DNA obtenido de células Molt permanentemente infectadas con el virus prototipo HTLV IIIb/ LAV, mantenidas en medio RPMI 1640, conteniendo 1% de solución de antibióticos-antimicóticos y 10% suero bovino fetal. El medio se cambia cada tercer día y se subcultiva de acuerdo a la densidad celular.

El número de células infectadas en el cultivo se determina por medio de inmunofluorescencia de células fijadas por el siguiente método:

Técnica de Inmunofluorescencia.

SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

-Acetona.

-Anticuerpos anti IgG humana de cabra conjugados con fluoresceína.

-Azul de Evans 0.04%.

-Glicina 50% en PBS pH 7.

- 1.- Muestrear el cultivo 1 ó 2 días después de alimentar.
- 2.- Centrifugar 1-2 ml de células a 1250 rpm durante 5 min.
- 3.- Remover el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de PBS.
- 4.- Colocar 15-20 μ l de la suspensión por pozo de la laminilla de microscopía, poner cada muestra por duplicado, marcar un pozo como positivo y otro como negativo. Hacer lo mismo con células infectadas y no infectadas para usarlas como controles. Dejar secar toda la noche en campana de bioseguridad.
- 5.- Fijar la laminilla en acetona 10 min, secar y procesar ó congelar a -70°C si no se va a utilizar en ese momento.
- 6.- Diluir los sueros positivo y negativo 1:4 en PBS. Añadir 20 μ l de suero positivo a cada pozo en la hilera marcada como positivo y 20 μ l de suero negativo en los pozos marcados como negativo.
- 7.- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
- 8.- Lavar cada portaobjetos 2 veces por 5 min en PBS con agitación. Hacer un tercer lavado con agua bidestilada y dejar secar al aire. Los lavados se descartan en solución desinfectante.

- 9.- Diluir el conjugado anti-IgG humano fluoresceinado 1:40 en PBS (centrifugar antes de usar para quitar agregados), y colocar 20µl en cada pozo.
- 10.- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
- 11.- Lavar 2 veces con PBS por 5 min.
- 12.- Colocar la laminilla en una caja de Kopic con 50 ml de agua bidestilada y 500 µl de azul de Evans al 0.04% e incubar 10 min a temperatura ambiente. Lavar con agua y dejar secar.
- 13.- Montar la laminilla con gliceraldehído al 50% en PBS. Observar con microscopio de fluorescencia inmediatamente o almacenar a 4°C en la oscuridad.
- 14.- El verde manzana brillante indica unión específica de los anticuerpos, mientras que el rojo, amarillo o verde claro indican un resultado negativo.

Control negativo: Se emplea DNA extraído de células Molt no infectadas mantenidas en las mismas condiciones que las infectadas, o bien, DNA obtenido de CMP de individuos donadores no infectados con el virus de inmunodeficiencia humana.

Detección de los productos amplificados.

La detección depende del peso molecular de los productos esperados, de acuerdo al par de iniciadores utilizados.

Pueden emplearse geles de agarosa de diferente concentración, dependiendo del tamaño del producto, teñidos con bromuro de etidio.

También pueden utilizarse geles de acrilamida, teñidos con bromuro de etidio o con nitrato de plata.

SOLUCIONES EMPLEADAS

- Solución amortiguador TAE 50 X

242 g Tris Base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M (pH=8) en 1000 ml de ddH₂O.

- Colorante de corrida

Glicerol 50%, SDS 1%, EDTA 100 mM, Azul de Bromofenol 0.25% y Xilen-Cianol 0.25%.

Preparación de los geles:

Agarosa:

1.- Pesar la cantidad de agarosa necesaria según la concentración del gel que se requiera.

2.- Disolver la agarosa en un volumen final de 25 ml de TAE 1 x, calentar hasta disolución.

3.- Verter la agarosa fundida sobre el formador de geles y colocar el peine adecuado. Enfriar hasta polimerizar y quitar el peine.

- 4.- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar TAE 1 x hasta cubrir el gel.
- 5.- Mezclar 10 μ l del producto amplificado con 1 μ l de colorante de corrida y colocar la mezcla en un pozo. Repetir con cada una de las muestras.
- 6.- Colocar en uno de los pozos el marcador de peso molecular (1 Kb GIBCO), diluyendo 1:10 con solución amortiguadora TAE 1 x y mezclar con 1 μ l de colorante.
- 7.- Conectar los electrodos y prender la fuente de poder.
- 8.- Aplicar 100 V y dejar correr durante aproximadamente 20 min, parar antes de que el colorante salga del gel.

Acrilamida:

SOLUCIONES EMPLEADAS

-ACRILAMIDA 40%

38.6 g de acrilamida, 1.3 g de N,N'- metilenbisacrilamida, agregar ddH₂O y calentar a 37°C hasta disolución. Aforar a 100 ml.

- Solución amortiguadora TBE 5 X

53g de Tris Base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5 M (pH= 8.0) y aforar a 1000 ml.

PERSULFATO DE AMONIO (APS).10%

Pesar 1 g de persulfato de amonio y aforar a 10 ml con ddH₂O.

SOLUCIÓN I

8.1 ml de acrilamida 40% + 2.5 ml TBE 20 x en 50 ml de ddH₂O.

Guardar en frasco ámbar.

Preparación de los geles:

- 1.- Utilizar una cámara Miniprotean II, colocar los espaciadores de 0.75mm y montar los vidrios en la cámara.
- 2.- Mezclar 5 ml de la solución I con 20 μ l de APS y 10 μ l de TEMED.
- 3.- Verter la mezcla inmediatamente en la cámara de electroforesis y colocar el peine adecuado, dejar polimerizar durante 30 min.
- 4.- Quitar el peine y enjuagar los pozos con ddH₂O y secar con papel absorbente.
- 5.- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y añadir solución amortiguadora de corrida TBE 1 x.
- 6.- Mezclar 10 μ l del producto amplificado y/o el producto ya cortado con 1 μ l de colorante de corrida y colocar la mezcla en cada pozo.
- 7.- Colocar en un pozo el marcador de peso molecular, diluyendo 1:10 con solución amortiguadora TBE 1 x y mezclar con 1 μ l de colorante de corrida.
- 8.- Conectar los electrodos y prender la fuente de poder.
- 9.- Aplicar 100 V y dejar correr durante aproximadamente 30 min, parar antes de que el colorante salga del gel.

Tinción con bromuro de etidio:

Teñir el gel (de agarosa o acrilamida) con una solución de 10 mg/ml de bromuro de etidio y observar en el transiluminador de luz UV.

Tomar fotografía.

Tinción con nitrato de plata (acrilamida):

SOLUCIONES EMPLEADAS

-Solución de Fijado

EtOH 10%- Ac. acético 1% en ddH₂O.

- Solución de tinción.

Se utiliza una solución 0.01M de AgNO₃.

- Solución de revelado

15 ml de NaOH 5 M, formaldehído 0.8%, y llevar el volumen a 100 ml con ddH₂O.

- Quitar el gel de los vidrios y colocarlo en una charola

- Agregar la solución de fijado y dejar en reposo durante 30 min

-Desechar la solución.

- Agregar la solución de tinción, cubrir la charola con papel aluminio y esperar 30 min

- Desechar la solución de tinción.

- Lavar el gel dos veces con ddH₂O.

- Agregar la solución de revelado, y agitar suavemente hasta la aparición de las bandas.

Identidad de los productos de amplificación:

Para comprobar la identidad de los productos de amplificación se utilizaron diferentes enzimas de restricción. Para cada par de oligonucleótidos utilizados se obtuvo el mapa de restricción de acuerdo a la secuencia reportada en la literatura para ese segmento, escogiéndose una enzima que produjera fragmentos claramente identificables.

SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

-Enzima Pst I

- Solución amortiguadora para Pst I

10 mM de Tris-Cl (pH 7.4), 50 mM de NaCl, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0.15% (w/v) Tritón X-100, 50% (w/v) de glicerol.

- Enzima Pvu II

- Solución amortiguadora para Pvu II .
50mM de Tris-Cl (pH 7.4), 50mM de KCl, 0.1 mM de Na₂EDTA, 10 mM de 2-mercaptoetanol, 500 µg/ml de BSA, 50% (v/v) de glicerol.

Para las digestiones:

- Colocar 8 µl del producto de amplificación de la reacción de PCR en un tubo eppendorff.
- Agregar 1 µl de la enzima de restricción correspondiente.
- Agregar 1 µl de solución amortiguadora adecuada para dicha enzima
- Incubar a 37°C, 1 h.
- Identificar los productos de la digestión corriendo en gel de acrilamida al 8 %, teñido con nitrato de plata tal y como se describió anteriormente.

Transferencia y detección por quimioluminiscencia:

La transferencia y detección por quimioluminiscencia se realizó a algunas de las muestras que amplificaron con el par de SK 145/SK 431 (ver pág. 23).

SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

- Gel de Agarosa al 1 %

- Amortiguador de Desnaturalización
NaCl 3 M, NaOH 0.4 M.

- Amortiguador de Transferencia
NaCl 3 M, NaOH 8 mM, sarkosyl 2 mM.

- Amortiguador de Neutralización (5x)
Pesar 79.95 g Na₂HPO₄, 60.25 g NaH₂PO₄-H₂O, y llevar a 1 l con ddH₂O.

- Aparato para transferencia "turbobloter" (Schleicher & Schuell)

Transferencia alcalina de DNA a membranas de Nylon:

- Colocar el gel de agarosa anteriormente mencionado en una charola con amortiguador de desnaturalización. Agitar suavemente durante 30 minutos. Tirar el amortiguador, añadir amortiguador fresco y repetir la incubación durante 30 minutos más.

- Lavar el gel en amortiguador de transferencia durante 15 minutos.

- Cortar una membrana de Nylon, del tamaño exacto del gel, sumergirla en ddH₂O durante 15 minutos.

- Ensamblar el "turbobloter" colocando hojas de papel filtro, la membrana de nylon y el gel, llenar la charola con 150-200 ml de amortiguador de transferencia. Permitir la transferencia durante 1 hora.

- Retirar la membrana y lavarla en amortiguador de neutralización durante 5 minutos.
- Hornear a 80°C en vacío durante 1-2 horas, o fijar el DNA con UV 1min. Almacenar a 4°C hasta su uso.

Hibridación con sonda SK 102:

SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

- Fosfato disódico 0.25 M, pH 7.2

13.4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 ml de H_3PO_4 85% y llevar a 200 ml con ddH₂O.

- Amortiguador de hibridación

0.25 M fosfato disódico, pH 7.2; EDTA 1 mM, SDS 7 %.

- SSC 20 x

Disolver 175.3 g de NaCl y 88.3 g de citrato de sodio en 800 ml de ddH₂O. Ajustar el pH a 7.0 con una solución de NaOH 10 N. Llevar a un volumen de 1000 ml con ddH₂O.

- SDS 10%

1. Mojar la membrana en fosfato disódico 0.25 M.
2. Tirar el fosfato disódico y añadir suficiente amortiguador de hibridación para cubrir totalmente la membrana, incubar 1-2 horas a 55°C.
3. Transferir la membrana a una bolsa de plástico sellable.
4. Añadir 10 ml de amortiguador de hibridación, conteniendo la sonda a utilizar (10 pMoles/ml concentración final).
5. Incubar a 55°C durante 2-4 horas.
6. Recuperar la membrana en una charola con 50-100 ml de una solución de SSC 2.X, SDS 1%, incubar 15 minutos a 55°C. Cambiar la solución por solución nueva e incubar por otros 15 minutos a 55°C.
7. Cambiar la solución por SSC 1 X, SDS 1% incubar 15 minutos a 55°C. Desechar la solución y agregar una nueva, incubar por otros 15 minutos a 55°C.
8. Lavar 2 veces con SSC 1 X a temperatura ambiente, 5 minutos cada vez.

Detección por quimioluminiscencia:

SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

- Amortiguador de bloqueo

Reactivo de bloqueo (Tropix Inc.) 0.2%, PBS 1 X, SDS 0.5%.

- Conjugado enzimático AVIDX-AP (Conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina. Tropix, Inc.)

- Amortiguador de lavado

PBS 1 X, SDS 0.5%.

- Amortiguador de ensayo
- Dietanolamina 0.1 M, MgCl₂ 1.0 mM. Ajustar pH a 10 con HCl.
- Sustrato quimioluminiscente (CSPD, Tropix inc)
- CSPD 50 µl en 5 ml de amortiguador de ensayo.
- Revelador y fijador para placas de rayos X.

1. Colocar la membrana en una charola y lavar 2 veces con 10 ml de amortiguador de bloqueo cada vez.
2. Tirar el amortiguador anterior y añadir nuevo hasta cubrir completamente la membrana. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Preparar 15 ml de conjugado AVIDX-AP en amortiguador de bloqueo, añadiendo 3 µl del conjugado a 15 ml de amortiguador justo antes de usarlo.
4. Tirar el amortiguador de bloqueo de la membrana y añadir el conjugado diluido, incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Tirar la solución del conjugado y añadir 20 ml de amortiguador de bloqueo y lavar 5 minutos con agitación.
6. Lavar 3 veces durante 10 minutos cada una, con 30 ml de amortiguador de lavado.
7. Lavar 2 veces, 2 minutos cada una, con 20 ml de amortiguador de ensayo.
8. Preparar el sustrato CSPD en amortiguador de ensayo preparado, justo antes de usarlo. Añadir este a la membrana después del último lavado. Agitar suavemente durante 5 minutos.
9. Colocar la membrana en una bolsa de plástico y exponer a una placa de rayos X durante 10 minutos y revelar la placa. Después de analizar los resultados, se puede exponer otra placa durante un periodo mayor o menor, dependiendo de los resultados. La membrana permanece luminiscente por 18-24 horas.

Cálculos de sensibilidad y especificidad:

Los cálculos para obtener la sensibilidad y especificidad se realizaron conforme a las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

Verdadero positivo: Es aquella muestra cuyo resultado en el ensayo en evaluación es positivo y el paciente si está infectado.

Verdadero negativo: Es aquella muestra cuyo resultado en el ensayo en evaluación es negativo y el paciente no está infectado.

Falso negativo: Es aquella muestra cuyo resultado en el ensayo en evaluación es negativo y el paciente si está infectado.

Falso positivo: Es aquella muestra cuyo resultado en el ensayo en evaluación es positivo y el paciente no está infectado.

4.- RESULTADOS:

Para la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon tres pares de oligonucleótidos:

1.- KSI 3'/KSI 5', los cuales amplifican una región de 319 pb de la región de env del genoma de HIV-1, KSI 3' es un oligonucleótido de 26 bases y reconoce las posiciones 7312-7330, KSI 5' es un oligonucleótido de 27 bases que reconoce las posiciones 7011-7029.

2.- SK 145/SK 431 amplifican un segmento de 142 pb de la región gag del genoma de HIV-1 y de 139 pb para HIV-2. SK 431 es un oligonucleótido de 27 bases que reconoce las posiciones 1481-1507 para HIV-1, y la posición 1233 a 1259 para HIV-2. SK 145 es un oligonucleótido de 30 bases y reconoce las posiciones 1366-1395 para HIV-1 y 1121-1150 para HIV-2. En la figura 2 se muestra la localización de las regiones de amplificación del genoma del HIV-1.

3.- GH 20/PC O4 son oligonucleótidos de 20 bases cada uno y amplifican un fragmento de 268 pb de DNA de la secuencia de beta-globina en DNA genómico humano, los cuales se utilizan para determinar si el DNA obtenido no contiene inhibidores para la reacción de PCR y/o eliminar falsos negativos.

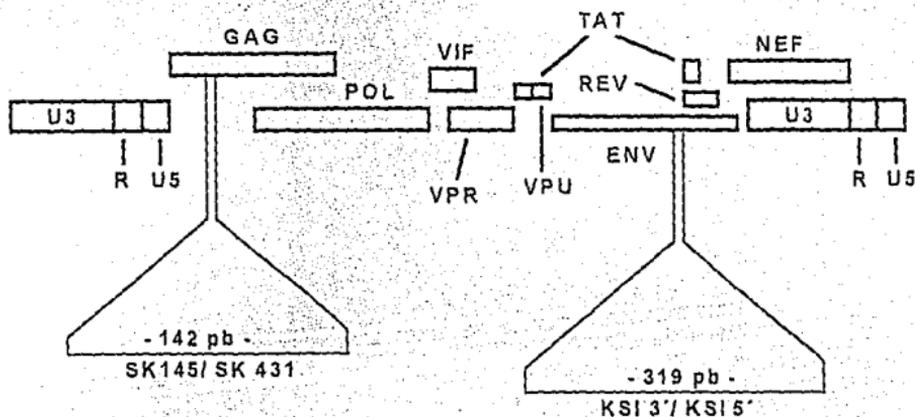


FIGURA 3. Localización genómica de los oligonucleótidos específicos para HIV-1 utilizados para el diagnóstico.

La primera parte del trabajo consistió en establecer las condiciones adecuadas y los parámetros de amplificación para cada par de iniciadores empleados. Los oligonucleótidos SK 145/SK 431 y GH 20/PC O4 fueron adquiridos comercialmente (Perkin Elmer) y las condiciones de amplificación están predeterminadas.

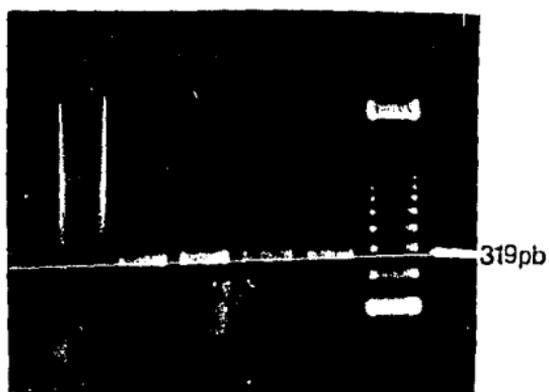
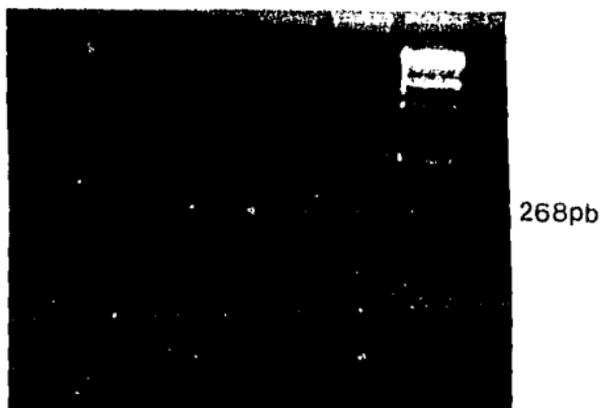


FIGURA 4. En la fotografía superior se muestra un gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio, presentando los productos de amplificación de 268 pb obtenidos con el par de oligonucleótidos GH 20/PC 04. El gel de la fotografía inferior corresponde a productos de amplificación de 319 pb obtenidos con el par de oligonucleótidos KSI 3'/KSI 5'.

El par KSI 3'/KSI 5' fue sintetizado por nosotros y se procedió a su estandarización en lo que respecta a la concentración óptima de iones magnesio, la concentración óptima de polimerasa y la concentración óptima de oligonucleótidos en la reacción.

ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MAGNESIO:

Para encontrar la concentración óptima de magnesio se determinó la eficiencia de amplificación de DNA extraído de células Molt permanentemente infectadas con la cepa prototipo HTLV-IIIb/LAV de HIV-1, se utilizó un rango de 1 mM a 3 mM de Mg^{2+} , y se mantuvieron los demás parámetros constantes.

El volumen final de todas las reacciones fue de 50 μ l, con las siguientes concentraciones finales de cada componente:

dNTPs	125 μ M
KSI 3'	50 pM
KSI 5'	50 pM
Taq polimerasa	1.5 U
DNA de células infectadas	3 μ g
Amortiguador sin magnesio	1 x

Se añadieron cantidades variables de $MgCl_2$ para obtener concentraciones finales de 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mM. Los tubos se colocaron en el ciclador de temperatura y se corrieron 40 ciclos a las siguientes temperaturas y tiempos: 1 min a 95°C; 1 min a 55°C; 2 min a 72°C. Los productos de amplificación se cuantificaron corriendo 10 μ l de la mezcla de cada reacción en un gel de agarosa al 2.5%, liñendo posteriormente con bromuro de etidio.

Nuestros resultados muestran que la concentración de 2.5 mM de iones magnesio es la que produce una mayor cantidad de producto de amplificación.

ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ENZIMA:

En este caso solo se modificó la concentración de Taq polimerasa, y se empleó la concentración óptima de magnesio obtenida en el experimento anterior. Los demás parámetros se mantuvieron constantes.

El volumen final de todas las reacciones fue de 50 μ l, utilizándose las siguientes concentraciones finales de cada componente:

dNTPs	125 μ M
KSI 3'	50 pM
KSI 5'	50 pM
DNA de células infectadas	3 μ g
Amortiguador (con Mg 2.5mM)	1 x

Se corrieron 6 tubos con las siguientes concentraciones de Taq polimerasa: 0.5, 1, 1.5, 2, y 2.5 U, utilizando el tubo 6 como control de reactivos. Las condiciones de corrida y detección fueron las mismas que las mencionadas para magnesio.

La concentración óptima de enzima en la reacción correspondió a 2 U en los 50 μ l de volumen final.

ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE OLIGONUCLEÓTIDOS:

Para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos, tanto la enzima como el magnesio se añadieron a las concentraciones determinadas como óptimas, modificándose sólo la concentración de oligonucleótidos. El volumen total de la reacción se mantuvo en 50 μ l.

dNTPs	125 μ M
Taq polimerasa	2 U
DNA de células infectadas	3 μ g
Amortiguador (con Mg 2.5mM)	1 x

Se incluyeron tubos con las siguientes concentraciones de oligonucleótidos: 1, 10, 20, 50, y 100 pM. Las condiciones de corrida y detección fueron las mismas que las mencionadas para magnesio.

La concentración óptima de oligonucleótidos encontrada correspondió a 50 pM.

Concentraciones óptimas determinadas para los distintos parámetros:

Parámetro	Concentración óptima
Magnesio**	2.5 mM
Taq polimerasa	2 U
KSI 3' / KSI 5'	50 pM

LÍMITES DE DETECCIÓN:

Se determinó el límite de sensibilidad para los dos pares de oligonucleótidos específicos para HIV, en términos de número de células infectadas, presentes en los 3 µg de DNA en la reacción, que eran capaces de amplificar. Para ello se utilizó la línea celular Molt infectada con el prototipo HTLV-IIIb/ LAV (IIIb/Molt) y considerando los reportes en la literatura, que indican que una célula infectada equivale a una copia de genoma proviral.

Primero se construyó una curva patrón, extrayendo DNA de distintos números de células, con lo cual se determinó que 3 µg de DNA equivalen a 100,000 células. Después se mezclaron células infectadas con células no infectadas en diferentes proporciones y se procedió a extraer el DNA de dichas mezclas, empleándose 3 µg del DNA obtenido en cada caso para la amplificación correspondiente.

Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

	KSI 3'/KSI 5'	SK 145/SK 431
dNTPs	125 µM	125 µM
Primero A	50 pM	25 pM
Primero B	50 pM	25 pM
Taq polimerasa	2 U	1.5 U
DNA	3 µg	3 µg
Amortiguador 10 x	5 µl	5 µl
ddH ₂ O c.b.p.	50 µl	50 µl

El PCR se corrió, con los dos pares de oligonucleótidos, usando las proporciones de células infectadas y no infectadas que se muestran en la siguiente tabla:

Tubo	células IIIb/Molt	células Molt	Nºcélulas infectadas en 3µg DNA	KSI 3'/KSI 5'	SK 145/SK 431
1	10x10 ⁶	0	100,000	(+)	(+)
2	1x10 ⁶	9x10 ⁶	10,000	(+)	(+)
3	100,000	10x10 ⁶	1,000	(+)	(+)
4	10,000	10x10 ⁶	100	(+)	(+)
5	5,000	10x10 ⁶	50	(+)	(+)
6	2,500	10x10 ⁶	25	(+)	(+)
7	1,250	10x10 ⁶	10	(+)	(+)
8	625	10x10 ⁶	5	(-)	(-)
9	50	10x10 ⁶	1	(-)	(-)
10*	0	10x10 ⁶	0	(-)	(-)

*El tubo 10 se usó como control negativo.

IDENTIDAD DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN:

La identidad de los productos de amplificación se comprobó utilizando enzimas de restricción específicas, que produjeran segmentos de tamaño fácilmente diferenciable. La siguiente tabla indica que enzima se empleó para digerir los productos de amplificación obtenidos con cada par de oligonucleótidos.

Para cada digestión se tomaron 8 μ l del producto de amplificación, se le agregaron 1 μ l de enzima y 1 μ l de solución amortiguadora de concentración salina adecuada a la misma; se incubó a 37°C durante 1 h, y se separaron los productos en el tipo de gel indicado en cada caso.

	KSI 3'/KSI 5'	SK 145/SK 431
Producto de amplificación	319 pb	142 pb
Enzima de restricción	Pvu II	Pst I
Tamaño de los fragmentos	246 y 73 pb	81 y 61 pb
Tipo de gel	Acrilamida 8%	Acrilamida 8%
Tinción	Bromuro de etidio y/o AgNO ₃	Bromuro de etidio y/o AgNO ₃

MUESTRAS DE PACIENTES:

Una vez establecidas las condiciones óptimas de amplificación y los límites de sensibilidad se procedió a estudiar muestras obtenidas de pacientes pediátricos, nacidos de madres infectadas con HIV. Se incluyeron en el estudio 42 muestras, 27 de ellas corresponden a niños menores de 18 meses (Grupo I), las 15 restantes a pacientes mayores de 18 meses (Grupo II), entre los cuales se encuentran algunos niños infectados por derivados sanguíneos (pacientes hemofílicos). Los datos generales de los pacientes y los resultados de: la detección de anticuerpos anti-HIV-1, tanto por ELISA como por Western Blot; el cultivo y la detección de antígenos virales en plasma se muestran en la Tabla I.

142 pb

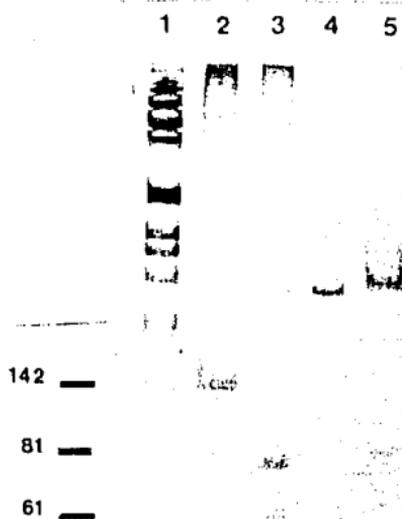


FIGURA 5. En la fotografía superior se muestra un gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio, presentando los productos de amplificación de 142 pb, obtenidos con el par de oligonucleótidos SK 145/SK 431. En la fotografía inferior se muestra un gel de acrilamida al 8%, teñido con nitrato de plata, presentando los productos de digestión, obtenidos con la enzima Pst I, del producto de amplificación de SK 145/SK 431. Se observan dos bandas, de 81 y 61 pb. Carril: 1) Marcador de peso molecular, 2) y 4) producto de amplificación sin digerir, 3) y 5) productos de digestión de los carriles 2) y 4).

TABLA I

GRUPO I

MUESTRA	EDAD	TRANSMISIO N	ESTADO CLÍNICO*	ELISA/WB **	CULTIVO***	ANTIGENO
P52	1d	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(+)
P69	1d	PERINATAL	ASINT	(+)	NC	(-)
P1	5d	PERINATAL	ASINT	(+)	NC	(-)
P101	1m	PERINATAL	NR	(+)	(+)	(+)
P94	2m	PERINATAL	ASINT	(-)	(-)	(-)
P106	3m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(+)
P97	4m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P21	4m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(+)
P111	4m	PERINATAL	NR	(+)	(-)	(-)
P112	4m	PERINATAL	ASINT	(+)	(+)	(-)
P72	5m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(+)
P77	5m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P98	6m	PERINATAL	ASINT	(+)	(+)	(+)
P16	9m	PERINATAL	ASINT	(+)	(-)	(-)
P8	10m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(+)
P78	10m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(-)
P108	10m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P65	11m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(+)
P60	12m	PERINATAL	ASINT	(+)	(-)	(-)
P103	12m	PERINATAL	ASINT	(+)	(-)	(-)
P48	14m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(-)
P79	14m	PERINATAL	SINT	(+)	(+)	(-)
P20b	15m	PERINATAL	ASINT	IND	(-)	(-)
P88	15m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P99	16m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P100	16m	PERINATAL	NR	(-)	(-)	(-)
P45	18m	PERINATAL	NR	(+)	(+)	(-)

GRUPO II

P92b	20m	PERINATAL	ASINT	IND	(-)	(-)
P30b	23m	PERINATAL	ASINT	(-)	(-)	(-)
P38	24m	PERINATAL	NR	(+)	NC	(+)
P42	24m	PERINATAL	NR	(+)	(+)	(+)
P87	32m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P96	36m	PERINATAL	NR	IND	(-)	(-)
P68b	48m	PERINATAL	ASINT	(-)	(-)	(-)
P73	52m	PERINATAL	ASINT	(-)	(-)	(-)
P95	59m	PERINATAL	ASINT	(+)	(-)	(-)
P28	77m	HEMOFILICO	ASINT	(+)	(+)	(+)
P102	90m	PERINATAL	ASINT	(+)	(+)	(+)
P66	108m	HEMOFILICO	ASINT	(+)	NC	(-)
P27	144m	HEMOFILICO	NR	(+)	NC	(-)
P70	187m	HEMOFILICO	NR	(+)	(+)	(+)
P25b	192m	HEMOFILICO	NR	(+)	(+)	(-)

*NR: No reportado, SINT: Sintomático, ASINT: Asintomático.

** IND: indeterminado

*** NC: no cultivado

Para determinar si un paciente menor de 18 meses está o no infectado hay que considerar la presencia de anticuerpos anti-HIV-1 de origen transplacentario, por esta razón, solo deben de evaluarse los parámetros específicos de infección en el niño, que son: cultivo viral o presencia de antígenos virales en plasma. Con estos datos se consideró como paciente infectado a aquel que tuviera la determinación de antígeno y/o cultivo positivo, como paciente no infectado aquellos que tuvieran antígeno y cultivo negativo. El caso de los pacientes 69 y 1, a los cuales no se les realizó cultivo y resultaron antígeno negativo se les consideró como indeterminados en términos de su estado de infección.

Los niños incluidos en el Grupo II son mayores de 18 meses, y en estos la serología puede ser utilizada para emitir un diagnóstico en los tres pacientes que no fueron sometidos a cultivo: P38, P66 y P27.

La Tabla II muestra para cada paciente el estado de infección considerando estos parámetros específicos, y los resultados obtenidos con nuestro estudio de PCR. Puede observarse que todas las muestras de DNA fueron amplificables con el par de oligonucleótidos del gen de globina, indicando que dicho material no contenía inhibidores presentes. Las dos últimas columnas muestran los resultados del PCR específico, indicando si el resultado es verdadero o falso.

TABLA II

GRUPO I

MUESTRA	DIAGNOSTICO	PCR Globina	PCR gag	PCR env
P52	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P69	INDETERMINADO	(+)	(-)	(-)
P1	INDETERMINADO	(+)	(-)	(-)
P101	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P94	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P106	INFECTADO	(+)	(-) (FN)	(-) (FN)
P97	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P21	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P111	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P112	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P72	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P77	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P98	INFECTADO	(+)	(-) (FN)	(-) (FN)
P16	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P8	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P78	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(+) (VP)
P108	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P65	INFECTADO	(+)	(-) (FN)	(+) (VP)
P60	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P103	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P48	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(+) (VP)
P79	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P20b	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P88	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P99	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P100	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P45	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

GRUPO II

MUESTRA	DIAGNOSTICO	PCR Globina	PCR gag	PCR env
P92b	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P30b	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P38	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(+) (VP)
P42	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P87	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P96	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P68b	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P73	NO INFECTADO	(+)	(-) (VN)	(-) (VN)
P95	INFECTADO	(+)	(-) (FN)	(-) (FN)
P28	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(+) (VP)
P102	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(-) (FN)
P66	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(+) (VP)
P27	INFECTADO	(+)	(-) (FN)	(-) (FN)
P70	INFECTADO	(+)	(-) (FN)	(-) (FN)
P25b	INFECTADO	(+)	(+) (VP)	(+) (VP)

FN: Falso negativo.

VP: Verdadero positivo

VN: Verdadero negativo

Con los datos presentados en la tabla anterior se determinaron los valores de sensibilidad y especificidad para los resultados obtenidos por PCR. Las 2 muestras que no fueron cultivadas del Grupo II (P69 y P1), no se consideraron en los cálculos de sensibilidad y especificidad, por lo tanto se incluyeron un total de 40 muestras para estos cálculos. Las fórmulas empleadas son las reportadas en materiales y métodos.

• SENSIBILIDAD

- Con el par KSI 3'/KSI 5', que amplifica env:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{7}{7+15} \times 100 = 31.8\%$$

- Con el par SK145/SK 431, que amplifica gag:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{16}{16+6} \times 100 = 72.7\%$$

• ESPECIFICIDAD

- Con el par KSI 3'/KSI 5', que amplifica env:

$$\text{Especificidad} = \frac{18}{18+0} \times 100 = 100\%$$

Con el par SK145/SK 431, que amplifica gag:

$$\text{Especificidad} = \frac{18}{18+0} \times 100 = 100\%$$

Para comparación se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba de detección de antígenos virales en plasma, incluyendo las mismas 40 muestras:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{13}{13+9} \times 100 = 59.9\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{18}{18+0} \times 100 = 100\%$$

Haciendo un cuadro comparativo de los valores de sensibilidad y especificidad entre las diferentes metodologías se tiene que:

MÉTODO	Nº PRUEBAS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
PCR (env)	40	31.8%	100%
PCR (gag)	40	72.7%	100%
Antígeno	40	59.9%	100%

5.- ANALISIS DE RESULTADOS

Analizando los resultados obtenidos en la evaluación de límites de detección de la metodología de PCR se observa que con ambos pares de oligonucleótidos se pueden detectar hasta un mínimo de 10 copias de genoma viral presentes en 3 µg de DNA. Si recordamos que cada copia de genoma proviral corresponde a una célula infectada, al observar como mínimo de detección 10 copias de genoma proviral en 3 µg de DNA, significa que en un paciente podremos detectar 10 células positivas en 100,000 células correspondientes a la cantidad de DNA incluida en cada ensayo. Se ha reportado que la cantidad de virus presente puede variar desde 1 célula infectada por cada 700 células mononucleares periféricas (CMP) hasta 1 por cada 80,000 CMP, lo cual hace un promedio de 1 célula infectada por cada 8,000 CMP¹⁷. Esta variación en el número de células mononucleares periféricas infectadas en un paciente varía ampliamente entre diferentes individuos, y en distintos momentos de la infección. Si se toma en cuenta que nosotros pusimos en cada corrida de PCR el DNA equivalente a 100,000 CMP, se puede pensar que en los casos que si se detectó amplificación existe mínimo 1 copia de genoma viral por cada 10,000 CMP, y en los casos que no amplificó existían menos de 10 copias de provirus por cada 100,000 CMP, quedando fuera de nuestros límites de detección.

Otro punto a considerar en los resultados, es el método utilizado para la detección de los productos de amplificación ya que en la última fase de este trabajo en que se empezó a trabajar con quimioluminiscencia, encontramos que por ejemplo, las

muestras P106 y P98 que eran negativas en geles de agarosa resultaron positivas por esta metodología. Al considerar estas dos muestras en los cálculos de sensibilidad para el par de oligonucleótidos de gag, se observó que aumentó la sensibilidad a 75%. Con el par de env no se realizó quimioluminiscencia, ya que hasta ahora no se cuenta con una sonda de hibridación específica para el segmento que este par amplifica.

Comparando los valores de sensibilidad obtenidos con los dos pares de oligonucleótidos empleados, (gag y env) se observa que se obtuvo una gran diferencia entre uno y otro (72.7 a 31.8) aunque se empleó la misma muestra de DNA y dicha muestra era amplificable con globina. Una posible explicación para esta diferencia es las regiones que amplifican cada par de oligonucleótidos: para el caso de SK145/SK431 se amplifica una región de gag del genoma viral que es muy conservada, mientras que en el caso de KS13'/KS15' se amplifica la región variable V3 que se encuentra en la glicoproteína externa del virus y que pertenece a la región env del genoma viral, y que se ha encontrado que este segmento resulta ser muy variable entre un virus y otro. Estos datos hacen pensar que es muy probable que en los casos que se obtuvieron resultados falsos negativos con este par de oligonucleótidos se deba a que los primeros no encuentren una secuencia homóloga en el virus presente en ese paciente y por lo tanto no lleguen a hibridarse y consecuentemente no amplifiquen.

En nuestro estudio encontramos que la sensibilidad de la prueba de antígeno es intermedia entre la de los dos oligonucleótidos, este resultado no es extraño, pues aunque dicha prueba es altamente específica, depende de los niveles del virus en sangre y este sólo es detectable en ciertos momentos de la infección en los cuales hay mayor replicación viral.

El aislamiento viral, aunque no es la prueba más sensible sigue considerándose como el "ensayo de oro", puesto que no produce resultados falsos positivos, por lo cual en este trabajo, el diagnóstico de los niños se realizó en base a los resultados obtenidos con este ensayo.

En la Tabla II observamos, que de los 42 niños estudiados, 18 de ellos se diagnosticaron como infectados por cultivo y/o antígeno, uno más se diagnosticó solamente por ser antígeno positivo, y finalmente, P95, P66 y P27 solo son positivos por serología, sin embargo, dada la edad de estos niños se deben considerar como infectados aunque sean cultivo, y antígeno negativos. Con estos datos tenemos un total de 22 niños infectados. Otros 18 niños fueron diagnosticados como no infectados por ser cultivo y antígeno negativo, y los dos restantes se consideraron indeterminados ya que no se les realizó cultivo, presentaron antígeno negativo y por su edad la serología no puede usarse para definir estado de infección.

Haciendo un análisis global con los resultados de PCR para los dos pares de oligonucleótidos, se tiene que:

Para gag, del total de los 40 niños diagnosticados se obtuvieron:

- 16 resultados positivos, todos ellos correspondieron a niños infectados, es decir verdaderos positivos.
- 6 dieron resultados falsos negativos, siendo que fueron diagnosticados como infectados.

-18 de ellos son verdaderos negativos ya que no amplificaron y fueron diagnosticados como no infectados.

-ningún niño clasificado como no infectado dio resultado positivo, es decir no hubo falsos positivos.

En base a estos datos podemos decir que con el par de oligonucleótidos para gag fue posible obtener el diagnóstico de infección en el 72.7% del total de casos de niños infectados (16 de 22).

Para env, del total de los 40 niños diagnosticados se obtuvieron:

-7 resultados positivos, todos ellos correspondieron a niños infectados, es decir verdaderos positivos.

-15 dieron resultados falsos negativos, siendo que fueron diagnosticados como infectados.

-18 de ellos son verdaderos negativos ya que no amplificaron y fueron diagnosticados como no infectados.

-tampoco con este par hubo falsos positivos.

Con el par de oligonucleótidos para env fue posible obtener el diagnóstico de infección en el 31.7% del total de casos de niños infectados (7 de 22).

Al analizar la correlación existente entre los resultados con los dos pares de oligonucleótidos, encontramos que solo 6 pacientes resultaron positivos con ambos, 10 dieron positivos a amplificación de gag y negativos al segmento de env del genoma y 1, el paciente 65, de 11 meses de edad y cultivo y antígeno positivo, curiosamente solo amplificó con env, siendo que este par de primeros corresponde a una región variable del genoma.

Haciendo un análisis de los resultados de PCR por grupo de edad, se observa: que para el Grupo I, de menores de 24 meses, 76.9% (10 de 13) de los pacientes clasificados como infectados fueron detectados con el par de oligonucleótidos para gag, todos ellos presentaron serología positiva; 7 se encuentran en estado clínico sintomático, y uno aun se encuentra en periodo asintomático; de dos de ellos no tenemos el reporte médico. Cinco de ellos son positivos a la detección de antígenos virales en plasma, indicando replicación viral activa.

Para el caso de env, tan sólo un 23% (3 de 13) de los pacientes diagnosticados como infectados fueron detectados por PCR con este par de oligonucleótidos, estos tres (P78, P65 y P48) presentan serología positiva y su estado clínico es sintomático. Solo el P65, que produjo un resultado negativo con gag, se correlaciona con la presencia de antígenos virales en plasma.

En el Grupo II, el porcentaje de niños infectados diagnosticados correctamente por PCR es ligeramente menor, el 66.6% (6 de 9) de los pacientes clasificados como infectados fueron positivos con el par de oligonucleótidos de gag, y 44.4% (4 de 9) con el par de env. Los 6 niños positivos a gag tienen serología positiva, 3 de ellos no se correlacionan con su estado clínico ya que son asintomáticos. Sólo cuatro se correlacionan con antígeno.

Los 4 pacientes que resultaron ser positivos por env (P38, P28, P66 y P25b), tienen serología positiva, P28 y P66 son clínicamente asintomáticos y de los otros dos

no se tienen datos clínicos. Sólo P38 y P28 concuerdan con los resultados de antígeno.

Al analizar los resultados considerando vía de transmisión, en los niños con posible modo de transmisión vertical de la madre encontramos:

- 17 infectados, lo que representa un 45.9% de los 37 pacientes de este grupo. Este dato no puede interpretarse como eficiencia de transmisión madre-hijo, puesto que son muestras no representativas del total de nacimientos de madres infectadas, de hecho existe una concentración de posibles positivos canalizados a nosotros por razones clínicas.

- 18 de los 37 niños menores de 18 meses resultó negativo (48.6%) por parámetros específicos, aunque puede observarse que solo 5 de ellos presentan serología negativa, otros 9 presentan serología indeterminada, indicando posiblemente sero-reversión de anticuerpos de origen materno y 4 menores de 18 meses presentan serología claramente positiva aunque no están infectados.

- 2 de los 37 pacientes se clasificaron como indeterminados (5.4%). Para estos pacientes (P69 y P1), ambos menores de 1 semana de edad, sería necesario tomar una segunda muestra para poder dar un diagnóstico preciso, ya que no se les pudo realizar cultivo por no disponer de suficiente material y las determinaciones de antígeno y de PCR resultaron negativas.

Para los niños que adquirieron la infección por derivados sanguíneos, aunque solo se incluyeron 5 pacientes en este estudio, encontramos que:

- 100% se diagnosticaron infectados, aunque 2 de ellos no habían sido cultivados, son serológicamente positivos y uno es además positivo por PCR. En estos casos, debido a la vía de transmisión, en la cual no puede presentarse paso transplacentario de anticuerpos y que además son niños de 9 y 12 años respectivamente, solo la serología positiva es diagnóstico de infección.

El paciente P95 representa un caso especial, ya que es negativo en todas las pruebas a excepción de la serología y considerando su edad (59 meses) no pueden ser anticuerpos maternos, por lo cual representa claramente un caso de falso negativo en cultivo, antígeno y PCR. Estos resultados podrían explicarse por una carga viral muy baja, que hace que ninguna de las metodologías sea suficientemente sensible para detectarlo. Si calculamos sensibilidad para cultivo considerando esta muestra encontramos que para los 37 niños diagnosticados, en los cuales se realizó cultivo, detectamos 18 de los 19 infectados, indicándonos una sensibilidad de 94.7% para esta prueba.

3. CONCLUSIONES

- El PCR es factible de ser estandarizado para su empleo en diagnóstico perinatal.
- Nuestra experiencia nos permite sugerir que para usar PCR como prueba definitiva de diagnóstico perinatal, se utilicen tres pares de oligonucleótidos, que amplifiquen regiones conservadas del genoma viral y que los resultados sean reproducibles en por lo menos dos de los tres pares.
- De no presentarse esta correlación, será necesario corroborar los resultados obtenidos por PCR con la determinación de antígenos virales en plasma y/o con aislamiento viral.
- Dado que todas las metodologías específicas están sujetas a la presencia de falsos negativos, no debe descartarse la posibilidad de que los pacientes perinatales menores de 18 meses, aún presentando resultados negativos en todas estas metodologías, puedan estar infectados, se recomienda colectar una segunda muestra después de esa edad para confirmar su estado de infección.
- Es necesario trabajar más esta área del diagnóstico de infección por HIV en nuestro país, ya que el número de casos de infección por HIV ocasionada por transmisión perinatal va en aumento, y el posible desarrollo de una metodología menos costosa, más accesible a ser aplicada en distintos lugares, y que garantice una sensibilidad y especificidad cercana a 100% es una necesidad urgente.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Schüpbach Jörg. Introduction and History. In: *Human Retrovirology, Facts and concepts*, Springer-Verlag (ed.) Berlin Heidelberg 1990, pp1-4.
- ² Merson M. Slowing the spread of HIV. Agenda for the 1990s. Science 1993; 260: 1266-1288.
- ³ Borkowsky W, MD, and Krasinski, MD. Perinatal Human Immunodeficiency Virus Infection: Ruminations on Mechanisms of Transmission and Methods of Intervention. Pediatrics 1992; 90: 133-136.
- ⁴ Boletín Mensual SIDA/ETS Editado por INDRE. Año 8, Número 5, Mayo de 1994.
- ⁵ Vermund S., Sheon A., Ebner S., Fischer R. Transmission of the Human Immunodeficiency Virus. In: *Aids Research Reviews*. Vol 1 Koff W., Wong- Staal., Kenedy R., (ed). Marcel New York: Marcel Dekker 1990, pp81-136.
- ⁶ Sison A. and Campos J: Laboratory methods for early detections of Human Immunodeficiency virus type 1 in newborns and Infants. Clin. Microbiol. Rev. 1992; 5:238-245.
- ⁷ Colie C., Sison A. et al. Cellular immune factors associated with mother-to- infant transmission of HIV. AIDS 1993; 7: 1427-1433.
- ⁸ Soler C. Vacunas para el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. En: *Vacunas, Ciencia y Salud*. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. México 1992; pp 421-425.
- ⁹ Constantine N., Callahan J., Watts D. Supplemental tests for HIV-1 Infection. In: *Retroviral Testing*, Essential for quality control and Laboratory Diagnosis. Family Health International, 1992, pp 59-87.
- ¹⁰ Mortimer P., Clewley J. Serological Test for Human Immunodeficiency Virus. In: *Current Topics in AIDS*. Vol. 1: Gottlieb (ed). John Wiley and Sons Ltd 1987.
- ¹¹ Gartner S. and Popovic M. Virus isolation and production. In: *Techniques in HIV research*. Anna Aldovini and Bruce D. Walker (ed) Stockton Press 1990. p3-10.
- ¹² Jackson D., Hayden J., and Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. PCR A practical approach. Mc Pherson, Quirke P., Taylor G. (ed) Oxford University Press 1991. pp 29-49.
- ¹³ Bell J. The polymerase chain reaction. Immunol. Today 1989; 10 : 351-355.

¹⁴Maniatis Sambrook, Fritsch. Gel electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning A laboratory manual* Vol. 1. Nolan C. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. pp. 6.2-6.62.

¹⁵Wages J., Hamdallah M., Calabro M., Fowler A., Oster C., Redfield R. and Burke D. Clinical performance of a polymerase chain reaction testing algorithm for diagnosis of HIV-1 infection in peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Virol.* 1991; 33: 58-63.

¹⁶Maniatis Sambrook, Fritsch . Appendixes. *Molecular Cloning A laboratory manual.* Vol. 3. Nolan C. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. pp. B-7.

¹⁷Simmonds P., Balfe P., Bishop J., and Brown A. Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Contain Provirus in small Numbers of Peripheral Mononuclear cells and Low Copy Numbers. *J. of Virol.* 1990; 64: 864-872.