

Detección del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en menores de 18 meses provenientes de madres seropositivas

Virus detection of human immunodeficiency type 1 in children under 18 months from seropositives mothers

Patricia Márquez^{1*}

Martha Sánchez¹

César Bedoya^{2,3}

Maylen Espinosa²

Iliana Caicedo⁴

Cindy Nacipucha¹

Cosme Hidalgo¹

Tatiana Sivilaca¹

Angel Ortiz⁵

1. Área de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Leopoldo Izquieta Pérez”, Ecuador.

2. Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Leopoldo Izquieta Pérez”, Ecuador.

3. Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica de Litoral, Ecuador.

4. Dirección Técnica del área de ensayos clínicos del ARCSA, Ecuador.

5. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

*Autor para correspondencia: nemomarquezbazan@yahoo.com

RECIBIDO: 30/09/2017

APROBADO: 16/11/2017

RESUMEN

Actualmente la transmisión materna infantil es la primera causa de infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana a nivel mundial en poblaciones pediátricas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa es la técnica molecular más eficiente para la identificación del ADN del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 en niños menores de 18 meses, nacidos de madres seropositivas. En Ecuador, no existen estudios anteriores publicados sobre la aplicación de las técnicas moleculares en la detección del virus en infantes, motivo que llevó a la realización de la presente investigación, cuyo objetivo principal es detectar el ADN del Virus de la Inmunode-

ABSTRACT

Currently, maternal child transmission is the first cause of infection by the Human Immunodeficiency Virus worldwide in pediatric populations. The Polymerase Chain Reaction is the most efficient molecular technique for the identification of the DNA of the Human Immunodeficiency Virus type 1 in children under 18 months, born to seropositive mothers. In Ecuador, there are no previous published studies on the application of molecular techniques in the detection of the virus in infants, a reason that led to the realization of this research, whose main objective is to detect the DNA of Human Immunodeficiency Virus type1 in children of 18

ficiencia Humana tipo1 en menores de 18 meses provenientes de madres seropositivas al Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Para esto, se analizaron 118 muestras de sangre periféricas de niños menores de 18 meses nacidos de madres positivas al Virus de la Inmunodeficiencia Humana durante el embarazo correspondiente a 59 pacientes. Las muestras provienen de diferentes centros de salud y hospitales, las cuales fueron tomadas en dos ocasiones diferentes separadas por un período de 6 meses para una mejor confirmación del caso. Una Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada fue realizada para la amplificación de una región conservada del gen gag del VIH-1. De las 59 muestras investigadas, en una primera instancia, el 15,25% fueron positivas, mientras que, en la segunda ocasión las muestras positivas constituyeron el 20,33% del total, con lo cual se demuestra que la negatividad de estas pruebas a una edad temprana no excluye definitivamente la infección.

Palabras clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada, región conservada, Transmisión Vertical

months from mothers seropositive to the Human Immunodeficiency Virus. For this, 118 peripheral blood samples from children under 18 months born to mothers positive to the Human Immunodeficiency Virus during pregnancy corresponding to 59 patients were analyzed. The samples come from different health centers and hospitals, which were taken on two separate occasions separated by a period of 6 months for a better confirmation of the case. A nested Polymerase Chain Reaction was performed for the amplification of a conserved region of the HIV-1 gag gene. Of the 59 samples investigated, in the first instance, 15.25% were positive, while, on the second occasion, positive samples constituted 20.33% of the total, which shows that the negativity of these tests an early age does not definitively exclude infection.

Keywords: Chain reaction of nested polymerase, conserved region, vertical transmission

INTRODUCCIÓN

Actualmente la transmisión materna infantil es la primera causa de infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a nivel mundial en poblaciones pediátricas. En 2009, se reportaron aproximadamente 370.000 infecciones infantiles por VIH transmitidas verticalmente y se calcula que 2,5 millones de niños de todo el mundo estaban viviendo con el VIH, de los cuales más del 90% de estos niños están en el África subsahariana. En ausencia de cualquier intervención las tasas de transmisión son de un 15%-45%. Se estima que, durante el embarazo, el parto y la lactancia, el 70,0% adquirirá la infección en el parto o el alumbramiento, 10,0% durante la gestación y 20,0% durante la lactancia. La comunidad mundial se comprometió

prevenir la transmisión materno infantil, eliminar las nuevas infecciones pediátricas por VIH para el año 2015 y mejorar la supervivencia y salud materna, neonatal e infantil (OMS, 2015).

El diagnóstico de la infección por VIH mediante pruebas serológicas indirectas en niños menores de 15 meses no es fiable (ELISA); esto se debe, a que contiene los anticuerpos maternos circulantes como consecuencia de la inmunidad pasiva de madre a hijo (Lukong, Tshimwanga, & Mfuh, 2013).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica molecular más eficiente para la identificación del ADN del VIH tipo 1 (VIH-1) en niños menores de 18 meses nacidos de ma-

dres seropositivas (de Rivera & Barahona, n.d.), (Chohan *et al.*, 2011), (Ngo-Giang-Huong *et al.*, 2008), (Piwowar-Manning, Lugalia, Kafufu, & Jackson, 2008), (Kairiyama *et al.*, 2007), (Jeffrey J Germer, 2006), (Nesheim *et al.*, 1997), (Pane *et al.*, 1995), (Yourno, 1993), (Albert & Fenyö, 1990). En la actualidad estas pruebas son utilizadas en estudios epidemiológicos moleculares y para la confirmación y monitoreo de infección vertical.

Según la ONUSIDA, En el Ecuador, para el año 2016 alrededor de 33.000 [24 000 - 41 000] personas viven con el virus; 35 niños entre 0 a 4 años de edad, 14 niños entre 5 a 9 años, 361 niños y adolescentes entre 10 a 19 años han adquirido VIH durante el último año (MSP, 2016).

No obstante, hasta la actualidad, no existen estudios anteriores publicados sobre la aplicación de las técnicas moleculares en la detección del virus en infantes por lo que se llevó a cabo el presente estudio con el objetivo de detectar el VIH-1 en menores de 18 meses provenientes de madres positivas al Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una investigación descriptiva de tipo serie de casos clínico desde enero del 2007 a enero del 2008 a 59 pacientes investigados referidos de diferentes centros de salud de las ciudades de Guayaquil (Maternidad Marianita de Jesús, Maternidad del Guasmo, Maternidad Enrique C. Sotomayor, Hospital Guayaquil, Hospital Francisco Icaza Bustamante, Hospital del IESS Teodoro Maldonado Carbo, Hospital de Infectología José Daniel Rodríguez, INHMT "LIP" Portoviejo, INHMT "LIP" de Babahoyo y INHMT "LIP" de Esmeralda). Se les tomó por dos ocasiones muestra de sangre periférica separadas por un período de 6 meses, lo cual sumó 118 muestras analizadas. Las mismas fueron procesadas en el Instituto Nacional de Higiene

y Medicina Tropical "Leopoldo Izquieta Pérez" - INHMT "LIP".

Tabla 1. Centros de Salud participantes.

Centros	Nº muestras
Maternidad Marianita de Jesús	6
Maternidad del Guasmo	6
Maternidad Enrique C. Sotomayor	3
Hospital Guayaquil	30
Hospital Francisco Icaza Bustamante	2
Hospital del IESS Teodoro Maldonado Carbo	2
Hospital de Infectología José Daniel Rodríguez	1
INHMT LIP Portoviejo	4
INHMT LIP de Babahoyo	4
INHMT LIP de Esmeraldas	1
Total	59

Criterios de inclusión:

- Estar de acuerdo con participar en la investigación a través de la firma del consentimiento informado por parte de los padres o representantes del niño.
- Tener menos de 12 meses.
- Ser hijo de madres seropositivas para el VIH.

Criterios de exclusión:

Todo paciente que no cumpla con los criterios antes referidos

Recolección y preparación de la muestra

A todos los niños se les tomó muestras de sangre periférica (3-4 ml) por venopunción de la vena radial colectadas en tubos con anticoagulante EDTA 0,05M con el objetivo de obtener Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC). Los niños fueron muestreados por dos ocasiones con un intervalo de seis meses, la muestra de sangre fue procesada para la obtención de linfocitos de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. "Lymphocyte Separation Medium Lonza walkersville, Inc, U.S.A" ("Lonza Walkersville Inc," n.d.).

Controles Negativos y positivos

Para este estudio se utilizaron controles positivos y negativos de las líneas celulares de linfocitos infectados VIH-1 y linfocitos no infectados (K562), siendo ambas líneas derivadas del clon H9. Estas líneas celulares fueron utilizadas por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Dr Leopoldo Izquieta Pérez” (LVINHMT-LIP) en el área de cultivo celular.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción a partir de los linfocitos de los infantes muestreados y de líneas celulares a utilizar como controles negativos y positivos. En todos los casos se utilizó el kit comercial Qiagen® Blood DNA Mini (Qiagen, Venlo, Netherlands) de extracción de ADN siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Evaluación de la calidad del ADN

La calidad del ADN fue evaluada mediante la realización de un gel de electroforesis de ADN al 1% para la visualización del ADN total y través de la amplificación del gen de la b globina humana empleando los cebadores PCO3 (5' ACA CAA TCG TGT TCA TCA TGC 3') y PCO4 (5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3').

Amplificación

Se realizó una PCR anidada usando en la primera amplificación los cebadores JA4 (5' GAA GGC TTT CAG CCC AGA AG3') y el cebador antisentido JA7 (5' TAT TTG TTC CTG AAG GGT AC3'). En la segunda reacción se emplearon cebadores internos denominados JA5 (5' ACC ATC AAT GAG GAA GTC GC3') como cebador sentido y el JA6 (5' TAT TTG TTC CTG AAG GGT AC3') como antisentido (Albert & Fenyo, 1990). Ambos reconocen una región de la secuencia del gen gag que codifica el grupo de antígenos específicos de proteínas estructurales del core

y del virión de VIH-1, obteniendo productos de amplificación de 296 (primera PCR) y 131 (segunda PCR) pares de bases (pb). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 ul, utilizando 2.5 ul de buffer 10 X, 0.75 ul de Cl₂Mg 50Mm, 0.2 ul de DNTP's 25mM, 0.2 ul de Taq polimerasa 5 U/ul y 5 ul de ADN. Las mezclas de reacción se colocaron en un Termociclador (BIO-RAD). El programa de la PCR incluyó un paso de desnaturalización previa a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos que consistieron de desnaturalización previa a 94°C por 30 segundos, 47°C de temperatura de hibridación y extensión a 75°C por 30 segundos, un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min para la primera PCR. La segunda reacción se realizó tomando 1ul del producto de amplificación de la primera reacción y el programa de amplificación de PCR fue similar al de la primera con la diferencia de que el paso de hibridación fue de 41°C. La detección del producto final amplificado se realizó, mediante migración en geles de agarosa al 2% conteniendo. La fotodocumentación se realizó usando el transiluminador de UV con el software Gel DocXR modelo 170-8170 (Bio Rad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PCR anidada para el análisis de VIH-1 en infantes, permitió la obtención de productos de amplificación de 296 y 131pb en la primera y segunda PCR respectivamente (Figura 1 y 2).

Se muestra que la detección del virus en la segunda reacción de PCR anidada se incrementa, lo que evidencia que este método tuvo mayor poder discriminativo en estos casos que una PCR simple o convencional. Resultados semejantes al del presente estudio se refieren en la literatura. Tal es el caso de una investigación llevada a cabo en Suecia, donde realizaron una comparación entre PCR anidada y convencional en un grupo de pacientes. La PCR en dos pasos fue más sensible que la PCR simple, incluso en

asintomáticos con valores de CD4+ dentro de la normalidad (Albert & Fenyo, 1990). Por otro lado, Fischer y colaboradores mostraron resultados semejantes en niños pequeños igualmente (Fischer *et al.*, 2004).

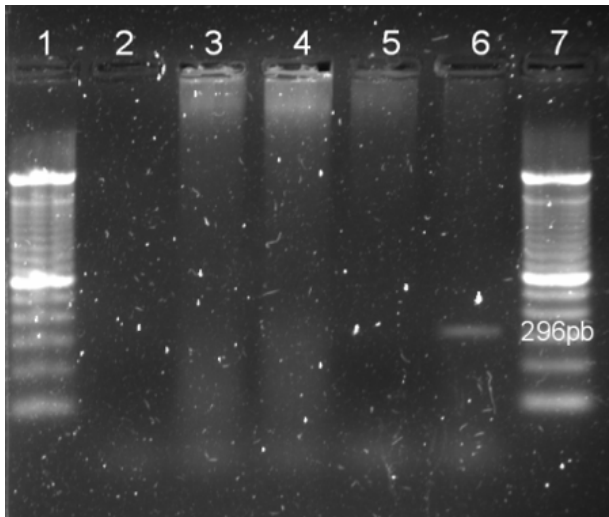


Figura 1. Primera reacción de la PCR anidada. Producto de amplificación, 296pb. Carril 2-5, muestras negativas. Carril 6, muestra positiva. Carril 1 y 7, marcador de peso molecular 100pb.

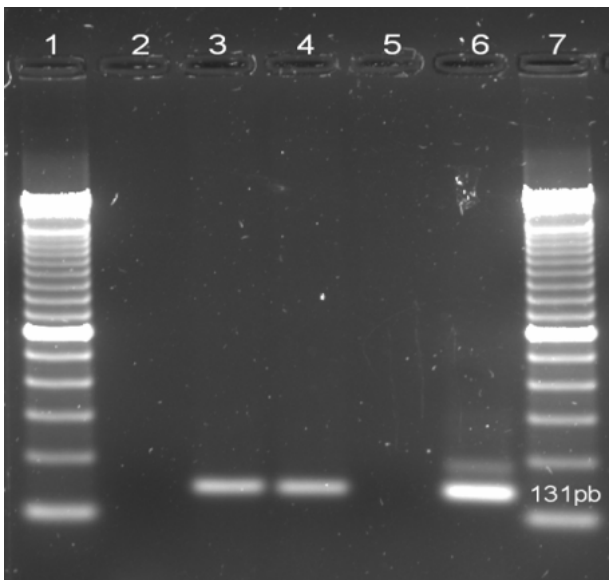


Figura 2. Segunda reacción de la PCR anidada. Producto de amplificación, 131pb. Carril 2 y 5, muestras negativas. Carril 3,4 y 6, muestras positivas. Carril 1 y 7, marcador de peso molecular 100pb

Debemos hacer referencia, que el método antes descrito además de ser sensible, es sencillo y rápido, lo que permite sea utilizado en el diagnóstico clínico de pacientes, sobre todo, en aquellos individuos con resultados negativos en las pruebas serológicas pero con riesgo de infección.

Los resultados de la detección del ADN del VIH-1, obtenidos en los 59 infantes investigados tanto en la primera como en la segunda toma de muestra, se reflejan a continuación (Tabla1). De los 59 pacientes investigados, 9 resultaron positivos en la primera toma de muestra, mientras que, la positividad se incrementó en los mismos pacientes al realizarle por segunda vez la detección viral seis meses después, siendo el total de positivos en esta última ocasión de 11 pacientes.

Tabla 2. Distribución comparativa por grupos de edades de los resultados del primer y segundo análisis por PCR..

Edad de infantes (meses)	Resultados PCR	
	1er análisis	2do análisis
1	2(+)	2(+)
	3(-)	1(+) y 2(-)
2	3(+)	3(+)
	30(-)	1(+) y 29(-)
3	0(+)	0(+)
	11(-)	11(-)
4	2(+)	2(+)
	1(-)	1(+)
>5 hasta 12	2(+)	2(+)
	5(-)	5(-)

CONCLUSIONES

La PCR anidada resultó ser sensible al aumentar la detección de casos positivos después de la segunda reacción, lo que concuerda con la mayoría de los estudios citados en la literatura.

El número de casos positivos se incremen-

tó después de una segunda toma de muestra lo que evidencia que la negatividad de estas pruebas a una edad temprana no excluye definitivamente la infección y es necesaria su repetición.

La PCR anidada y realizada en diferentes momentos, permite realizar un diagnóstico oportuno, discriminativo y un buen seguimiento de niños nacidos de madres seropositivas.

RECOMENDACIONES

Utilizar esta metodología para la identificación temprana del VIH-1 en niños menores de 18 meses como un diagnóstico molecular dentro de los esquemas de vigilancia del Ministerio de Salud Pública, con el objetivo de mejorar el diagnóstico y por tanto la calidad de vida en la población ecuatoriana y sobre todo en infantes.

Realizar este método molecular a menores de 18 meses con madres seropositivas en varias ocasiones después de un resultado negativo, con el fin de confirmar o descartar la presencia del VIH-1.

AGRADECIMIENTOS

Al creador de todas las cosas por darme salud y la fe necesaria para seguir en el camino de la búsqueda del conocimiento. A mis padres por todo su amor, por tolerar y por comprender mis momentos de ausencia. Gracias a mi querido Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical, que abriéndome las puertas me permitió desarrollar esta investigación, que podría ser de mucho interés para el país. Al Dr. Luigi Martini, que durante su administración como director del INHMT "LIP" dio luz verde, para el desarrollo de esta investigación, brindando su total apoyo. A mis compañeros de trabajo que contribuyendo con su participación permitieron la cristalización de esta investigación y en especial agradezco a la Dra. Aracely Álava y Dr. Carlos Mosquera, sus fabulosas aportaciones a

mis conocimientos, por toda su ayuda y apoyo en los conocimientos compartidos.

LITERATURA CITADA

Albert J., and E. M. Fenyö. 1990. "Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction with Nested Primers." *Journal of Clinical Microbiology* 28 (7): 1560–64.

Chohan Bhavna H., Emery Sandra., Wamalwa Dalton., John-Stewart Grace., Majiwa Maxwell., Ng'ayo Musa., Froggett, Steve., and Overbaugh Julie. 2011. "Evaluation of a Single Round Polymerase Chain Reaction Assay Using Dried Blood Spots for Diagnosis of HIV-1 Infection in Infants in an African Setting." *BMC Pediatrics* 11: 18. doi:10.1186/1471-2431-11-18.

De Rivera Ivette Lorenzana., and Barahona Wendy Murillo. 2014. "Aplicación del PCR-ADN, en el diagnóstico de la Infección Por VIH-1 En Infantes." Accessed June 23.

Fischer A., Lejczak C., Lambert C., Servais J, Makombe N., Rusine J., Staub T., Hemmer R., Schneider F., Schmit, J. C., and Arendt, V. 2004. "Simple DNA Extraction Method for Dried Blood Spots and Comparison of Two PCR Assays for Diagnosis of Vertical Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission in Rwanda." *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 16–20. doi: 10.1128/JCM.42.1.16-20.2004.

Jeffrey J Germer., and Tara M. Gerads. 2006. "Detection of HIV-1 Proviral DNA with the AMPLICOR HIV-1 DNA Test, Version 1.5, Following Sample Processing by the MagNA Pure LC Instrument." *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 37 (3): 195–198. doi:10.1016/j.jcv.2006.08.001.

Kairiyama Claudia., Benhaim Marcela., Bures-ti Patricia., Citatti Sergio., Pengue Claudia., Perroni Nancy., Pittaluga Sergio., and Tonelli María C. 2007. "Detección de VIH Proviral Por Nested-PCR Utilizando Metodología Casera (in House)." *Bioquímica y Pa-*

tología Clínica 71 (1): 49–53.

“Lonza Walkersville Inc. 2014. Manta. Accessed July 1. <http://www.manta.com/c/mmnxtt2/lonza-walkersville-inc>

Lukong Christopher S., Tshimwanga Edourd D., and Mfuh Anita Y. 2013. “The Role of Polymerase Chain Reaction in Early Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection in Infants.” *Annals of African Medicine* 12 (4): 232. doi:10.4103/1596-3519.122692.

MSP. 2016. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Disponible en: http://www.salud.gob.ec/informacion-estadistica-de-produccion-de-salud/https://public.tableau.com/profile/publish/BASE_INCIDENCIA_VIH_2016/VIHSIDA#!/publish-confirm

Nesheim S., Lee F., Kalish M. L., Ou C. Y., Sawyer M., Clark S., Meadows L., Grimes V., Simonds R. J., and Nahmias A. 1997. “Diagnosis of Perinatal Human Immunodeficiency Virus Infection by Polymerase Chain Reaction and p24 Antigen Detection after Immune Complex Dissociation in an Urban Community Hospital.” *The Journal of Infectious Diseases* 175 (6): 1333–36.

Ngo-Giang-Huong Nicole., Khamduang Wootichai., Leurent Baptiste., Collins Intira., Nantasen Issaren., Leechanachai Pranee., Sirirungsi Wasna., et al. 2008. “Early HIV-1 Diagnosis Using in-House Real-Time PCR Amplification on Dried Blood Spots for Infants in Remote and Resource-Limited Settings.” *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999) 49 (5): 465–471. doi:10.1097/QAI.0b013e31818e2531.

OMS. 2015. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/hiv/topics/mtct/es/>

Pane F, Buttò S, Gobbo M. L, Franco M, Butte-roni C, Pastore L, Maiorano G, Foggia M, Cataldo P T, and Guarino A. 1995. “Direct Detection of Proviral Gag Segment of Human Immunodeficiency Virus in Peripheral Blood Lymphocytes by Colorimetric PCR Assay as a Clinical Laboratory Tool Applied to Different at-Risk Populations.” *Journal of Clinical Microbiology* 33 (3): 641–47.

E. Piwowar-Manning., L. Lugalia., B. Kafufu., and J. Brooks Jackson. 2008. “Comparison of Results Obtained with Amplicor HIV-1 DNA PCR Test Version 1.5 Using 100 versus 500 Microliters of Whole Blood.” *Journal of Clinical Microbiology* 46 (3): 1104–5. doi:10.1128/JCM.02259-07.

“(QIAampR Blood DNA Mini Kit Handbook) - Buscar Con Google.” 2014. Accessed July 1. [https://www.google.com.ec/search?q=\(QIAampR++blood+DNA+Mini+Kit+Handbook\)&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&channel=sb&gfe_rd=cr&ei=dvqyU6qoC-KTQ8ges5YGoCw](https://www.google.com.ec/search?q=(QIAampR++blood+DNA+Mini+Kit+Handbook)&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&channel=sb&gfe_rd=cr&ei=dvqyU6qoC-KTQ8ges5YGoCw)

Yourno J, & Conroy J, 1992. “A novel polymerase chain reaction method for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filter paper”. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 30(11):2887-2892.