



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR



**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN VIH-1 A PARTIR DE ADN
PROVIRAL PROVENIENTE DE PACIENTES REFERIDOS AL INSTITUTO
NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Oriana Solange Uzcátegui Antonucci como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología.

Tutor: MSc. Lic. Marwan Said Aguilar.

Asesora Académica: Victoria Helena Navas Gil.

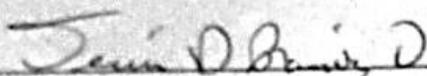
Caracas - Venezuela

Octubre, 2019

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) BR. ORIANA SOLANGE UZCÁTEGUI
ANTONUCCI**

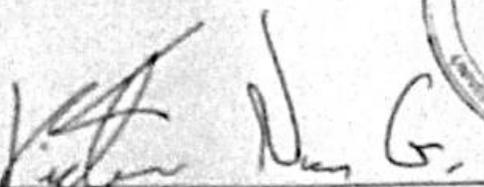
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Oriana Solange Uzcátegui Antonucci, C.I: 19967382, titulado "ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN VIH-1 A PARTIR DE ADN PROVIRAL PROVENIENTE DE PACIENTES REFERIDOS AL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de octubre del año 2019, dejando constar que la Prof. Victoria Navas actuó como coordinadora del jurado examinador.


Prof. Jesús Ramirez




Prof. Gladys Ameli


Prof. Victoria Navas
(Tutor - Coordinador)


Prof. Marwan Aguilar
(Tutor)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ellos he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, y permitieron que logre culminar mi carrera profesional.

A mi novio Carlos, por ser el apoyo incondicional de mi vida, gracias por todo el amor y confianza, durante todos estos años, gracias por estar siempre conmigo en momentos felices y difíciles y nunca rendirnos.

A mis amigos con todos los que compartí durante toda mi carrera, en especial a mi amiga Génesis.

A mis perritos, por estar siempre conmigo, durante la carrera y mientras escribía esta tesis.

Quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a mi tutor de tesis el Lic. Marwan Aguilar, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, a todas las personas que me han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito, en especial a aquellos que abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades del VIH	1
1.2 Estructura del VIH	2
1.3 Ciclo de vida del VIH	4
1.4 Etapas de la Infección y trasmisión	6
1.5 Transmisión vertical de VIH	9
1.6 Técnicas de Diagnóstico para VIH disponibles	10
1.7 PCR en el diagnóstico de VIH	13
1.8 Importancia de la PCR en el diagnóstico de VIH.	16
2. ANTECEDENTES	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo general	22
3.2 Objetivos específicos.	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Muestras biológicas	23
4.2 Extracción de ADN proviral	23
4.3 Análisis bioinformático de los “ <i>primers</i> ” empleados en la identificación de VIH-1	24
4.4 Estandarización de la PCR múltiple anidada para la detección de ADN proviral del VIH 1.	24
4.5 Visualización de los productos amplificados por electroforesis.	27

4.6 Sensibilidad Analítica de la técnica de PCR múltiple estandarizada.	27
4.7 Especificidad Analítica de Técnica de PCR múltiple estandarizada.	27
4.8 Análisis estadísticos	28
4.8.1 Sensibilidad y especificidad diagnóstica de la Técnica de PCR Múltiple estandarizada.	28
4.8.2 Análisis estadístico de los factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR múltiple VIH-1 estandarizada.	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Población a estudiar	31
5.2 Análisis estadístico de los factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR múltiple VIH-1 estandarizada.	31
5.3 Análisis bioinformático de los “ <i>primers</i> ” empleados en la identificación de VIH-1	34
5.4 Estandarización de la PCR múltiple anidada para la detección de ADN proviral del VIH 1.	36
5.5 Sensibilidad Analítica de la técnica de PCR múltiple estandarizada	40
5.6 Especificidad Analítica de Técnica de PCR múltiple estandarizada	41
5.7 Sensibilidad y Especificidad Diagnóstica de la Técnica de PCR múltiple estandarizada (Análisis estadístico)	41
6. DISCUSIONES	43
6.1 Estandarización de la PCR múltiple anidada para la detección VIH a partir de ADN proviral.	43
6.2 Sensibilidad y Especificidad analítica de la PCR múltiple estandarizada para la detección del VIH-a partir de ADN proviral.	46
6.3 Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la PCR múltiple estandarizada para la detección del VIH-1 a partir de ADN proviral.	47
6.4 Factores de transmisión materna infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR Múltiple estandarizada.	48
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Pág.
Tabla 1. Clasificación de la infección por VIH propuesta por el CDC en 1993. (Menéndez 1995)	9
Tabla 2. Secuencia de los primers a utilizar, para las regiones <i>Env</i> y <i>Gag</i> del VIH, primera ronda y segunda ronda.	25
Tabla 3. Mezcla de reacción de PCR anidada para la amplificación de la región <i>Env</i> .	25
Tabla 4. Programa de amplificación inicial de la PCR convencional para la amplificación de la región genética <i>Env</i> a dos rondas. (D Ángel y col 2007).	26
Tabla 5. Tabla de contingencia 2x2.	29
Tabla 6. Formula de los parámetros	29
Tabla 7: Población analizada por la PCR múltiple estandarizada. (n=60)	31
Tabla 8: Factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR múltiple VIH-1 estandarizada.	33
Tabla 9: Datos de Cargas virales recopiladas de los pacientes positivos a la PCR Múltiple estandarizada.	34
Tabla 10: Programa de amplificación optimizado para la PCR múltiple.	38
Tabla 11: Mezcla de reacción estandarizada de la PCR múltiple.	39
Tabla 12: resultados de la PCR múltiple comparada con PCR convencional del laboratorio usada como estándar de referencia	42
Tabla 13: valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la PCR múltiple estandarizada.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. Estructura del VIH	3
Figura 2. Representación esquemática del genoma del VIH-1	3
Figura 3. Ciclo de vida del VIH.	6
Figura 4. Curso típico de la infección por VIH.	8
Figura 5. Representación esquemática de los distintos pasos de una reacción de PCR. (Méndez y Pérez 2004).	15
Figura 6. Blast de las secuencias correspondiente al primer E80 para la región <i>Env</i>	34
Figura 7a. PCR in silico (Amplifix) con iniciadores de la región <i>gag</i>	35
Figura 7b. PCR in silico (Amplifix) con iniciadores de la región <i>env</i>	35
Figura 8. Registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR región <i>gag</i> .	36
Figura 9. Registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR región <i>env</i> .	36
Figura 10: registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR múltiple con gradiente de temperatura.	37
Figura 11: registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR múltiple	38
Figura 12. Sensibilidad analítica de la PCR múltiple estandarizada.	40
Figura 13. Especificidad analítica de la PCR múltiple estandarizada.	41
Figura 14. Diagrama de las posiciones de los amplicones de la PCR en relación con el genoma del VIH-1.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Env	Región <i>Envoltura</i> VIH-1
Gag	Región <i>Gag</i> VIH-1
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CV	Carga Viral
TV	Transmisión Vertical

RESUMEN

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN VIH-1 A PARTIR DE ADN PROVIRAL PROVENIENTE DE PACIENTES REFERIDOS AL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”

Oriana Solange Uzcátegui Antonucci

El diagnóstico temprano de la infección perinatal por el VIH-1 es importante para su manejo clínico temprano antes de que aparezcan complicaciones derivadas de la infección de VIH y mejorar así la calidad y esperanza de vida del paciente. El objetivo de este trabajo es la estandarización de una PCR-múltiple anidada, para amplificar las regiones conservadas *env* y *gag* del VIH-1. Para ello se analizaron 60 muestras sanguíneas de niños, entre edades comprendidas de 15 días a 24 meses, referidos al Instituto de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR). Todas las muestras se colectaron de manera estéril con EDTA, seguido de una centrifugación para la extracción de la capa leucocitaria o Buffy Coat, Posteriormente el ADN proviral fue extraído mediante el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit. Se realizó un Análisis bioinformático de los “*primers*” empleados en la identificación; donde se puede inferir que los cebadores son muy específicos en relación con sus objetivos respectivos como se confirmó a partir de los resultados BLAST y PCR *in silico*. Seguido se realizaron cambios en la mezcla de reacción y programa de amplificación de la PCR convencional, logrando estandarizar la PCR Múltiple cebadores específicos de la región *Gag* (209) y la región *Env* (337pb) del VIH-1, con la adición de un control de beta-globina (268pb). Para la visualización del producto amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 2% con tinción con bromuro de etidio. El límite de detección (valor hasta cuantas copias del virus puede llegar a detectar el método), se presentó en la dilución 1:125, que equivale a 2545 copias/ml. Para evaluar la especificidad analítica del ensayo, se usaron 15 muestras de pacientes infectados con VHB, VHC o CMV, los cuales no revelaron ninguna banda de amplificación. Para validar la sensibilidad y especificidad de la PCR Múltiple estandarizada, se comparó los resultados obtenidos de la PCR estandarizada con los resultados de PCR convencional del “laboratorio de Hepatitis y Sida” usada como estándar de referencia, obteniéndose una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93,75%, con un Kappa de Cohen de 0,96. De esta manera se logró estandarizar la técnica de PCR Múltiple, para su aplicación en el diagnóstico clínico lo que permitirá optimizar los protocolos de detección del VIH-1 con un menor gasto de reactivos, corroborando así la utilidad de la PCR como herramienta molecular en el diagnóstico oportuno de la infección perinatal por el VIH-1.

Palabras claves: VIH, PCR múltiple, Diagnóstico, transmisión vertical.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades del VIH

El VIH o Virus de la Inmunodeficiencia Humana, agente etiológico causante del Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida o SIDA, es un retrovirus que ataca al sistema inmunitario de la persona infectada, pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. (Ospina S 2006). Los retrovirus reciben este nombre debido a que sus genomas tienen codificada una enzima poco frecuente, la transcriptasa inversa, que permite la transcripción del ADN a partir del ARN. (Menéndez 1995)

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue descubierto y considerado como el agente de la naciente epidemia de sida por el equipo de Luc Montagnier en Francia en 1983. (Chávez y Castillo 2013). Los primeros casos del denominado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se reconocieron en el verano de 1981 en Estados Unidos de América, tras la aparición de un número inusual de informes de neumonía por *Pneumocystis carinii* y sarcoma de Kaposi en hombres jóvenes, en los que posteriormente se comprobó que eran homosexuales y presentaban marcado deterioro de la inmunidad. (Menéndez 1995)

Actualmente, el Sida, en algunos países se ha convertido en la primera causa de muerte entre los adultos de 25 a 54 años, con importantes costes sociales y económicos. (Menéndez 1995)

Según la OMS el VIH sigue siendo un importante problema de salud pública mundial, en 2018, había aproximadamente 37,9 millones de personas que vivían con el VIH con 1,7 millones de personas que se infectaron a nivel mundial. El África subsahariana, que sufre la mayor carga del VIH y SIDA en todo el mundo, representa aproximadamente el 64% de todas las nuevas infecciones por el VIH. Otras regiones afectadas significativamente por el VIH y el SIDA son Asia y el Pacífico, América Latina y el Caribe y Europa oriental y Asia central.

En el 2018 había 1,7 millones de niños menores de 15 años viviendo con VIH. La mayoría de los casos en niños se debe a infección vertical.

Datos de la Unicef afirman que desde 1982 hasta el 2005 se han registrado 50.000 casos de Sida en Venezuela. La prevalencia estimada de VIH en la población venezolana de 15 a 49 años es

de 0.7% y se viene observando un ascenso sostenido de casos en las mujeres y en los jóvenes de 15 a 25 años.

Estadísticas señalan que desde el 2010, las nuevas infecciones por el VIH han aumentado en un 24%. En 2016, la República Bolivariana de Venezuela tuvo 6500 (5800 - 7100) nuevas infecciones por VIH y 2500 (2100 - 2900) muertes relacionadas con el SIDA. Hubo 120 000 (110 000 - 130 000) personas que vivían con VIH en 2016, de las cuales el 61% (55% - 67%) tenían acceso a la terapia antirretroviral.

Existen dos tipos del VIH, llamados VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es más virulento e infeccioso que el VIH-2 y es el causante de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2 es menos infeccioso y se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental. (Heyndrickx y col 2000; Ospina 2006)

Se distinguen tres grupos diferentes de VIH-1: grupo M ("Main", principal), que es prevalente a nivel mundial; grupo O ("Outlier", externo), grupo N y el grupo P. Los grupos y subtipos de VIH-1 están distribuidos de manera desigual en todo el mundo (Heyndrickx y col 2000; Gueudin y col 2011, Cappy y col 2016)

1.2 Estructura del VIH

En general, los retrovirus se componen de: *capa externa o envoltura* formada por una glucoproteína de superficie y una proteína transmembrana; una *cápside viral o core* que incluye las proteínas de la matriz, cápside y nucleocápside; enzimas como la transcriptasa reversa, la proteasa y la integrasa, las cuales son muy importantes para la replicación del virus, y otras proteínas no esenciales (*fig. 1*) (Ospina 2006)

La Capa externa o envoltura, formada por una membrana lipídica, donde se insertan las glucoproteínas gp120 (glucoproteína de superficie) y gp41 (glucoproteína transmembranal) y proteínas derivadas de la célula huésped entre las que se encuentran receptores celulares y antígenos. (Codina y otros 2002)

Debajo de la membrana lipídica, se encuentra *la capa intermedia o matriz* hecha de proteína matriz o p17, la cual contiene las proteínas esenciales y el núcleo. La proteasa es una enzima que parte las recién creadas poliproteínas del VIH durante la replicación viral en los componentes de sus proteínas constituyentes (Chávez y Castillo 2013)

La *capa interior* o cápside membrana exterior del núcleo de los viriones y está compuesta por moléculas de una proteína conocida como p24. La cápside también contiene varias proteínas, específicamente, la transcriptasa inversa (RT) (convierte el ARN viral en ADN proviral), la integrasa (IN) (necesaria para la inserción del ADN proviral en el ADN genómico celular), Vif, Vpr, Nef y p7, el interior se encuentra la nucleocápside que contiene el genoma viral. (Chávez y Castillo 2013)

El *genoma* del VIH consta de dos copias idénticas de ARN de cadena simple idénticas, de polaridad positiva y está compuesto por tres genes principales, denominados *Gag*, *Env* y *Pol*, los cuales codifican las proteínas de la cápside, la *envoltura* y las enzimas y una serie de genes reguladores (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx* y *tev*). La organización de los genomas es siempre la misma, 5'-*gag-pol-env-3'*. (fig. 2) (Ospina 2006, Chávez y Castillo 2013)

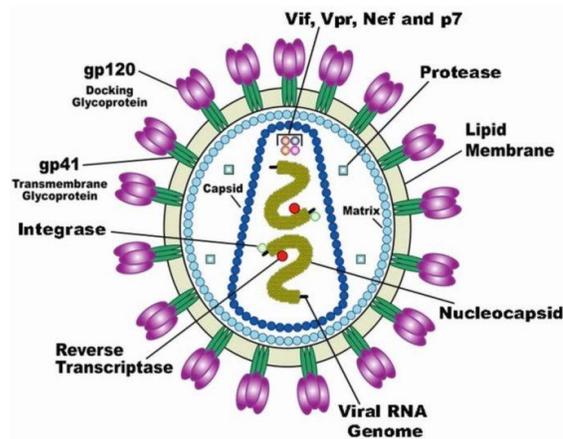


Figura. 1. Estructura del VIH (tomado de <https://www.projectinform.org/es/glosario/estructura-y-funcion-del-vih/>)

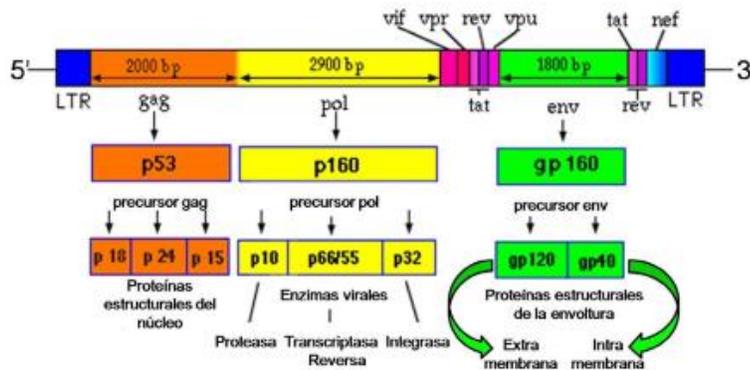


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VIH-1 (tomado de www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html).

1.3 Ciclo de vida del VIH

El VIH tiene un ciclo vital que puede ser tan corto como 1,5 días, desde el ensamblado en una célula infectada hasta la infección de una nueva célula. El VIH utiliza la *transcriptasa inversa* para mediar su conversión de ARN a ADN. Esta enzima no corrige errores, y proporciona variabilidad de copias. Dado que la vida media del virus es corta y las copias de ADN son altamente variadas, por la alta cantidad de errores de transcripción, existe una alta tasa de mutación. Muchas de las mutaciones son inferiores al virus original (frecuentemente pierden la habilidad de reproducirse) o no implican ninguna ventaja, pero algunas son superiores al virus base y pueden habilitar al virus para resistir el tratamiento antirretroviral. (Dibulla y col 2002; Heyndrickx y col 2000)

Las células que el VIH invaden esencialmente son los linfocitos T CD4+, pero también en menor medida los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de microglía del cerebro. La replicación viral tiene pues lugar en tejidos diversos (de ganglios linfáticos, intestino, cerebro, timo, entre otros). Los órganos linfoides, sobre todo los ganglios linfáticos, constituyen la principal sede de su replicación. El virus está presente en numerosos líquidos del organismo, en particular la sangre y las secreciones genitales. (Chávez y Castillo 2013)

Desde su ingreso en la célula hospedadora, la cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) viral comienza su transformación en una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) por acción de la enzima transcriptasa inversa que forma parte del virus. La integrasa y otros cofactores actúan para que el ARN del virus se fusione con el ADN de la célula hospedadora a través de la transcripción en el genoma de la célula que aloja al virus. De esta manera, la célula queda infectada por el virus. Después de este proceso, los Lentivirus reaccionan de dos maneras posibles: puede ocurrir que el virus entre en latencia mientras la célula infectada continúa en funciones, o bien, que el virus comience a replicarse activamente y libere viriones capaces de infectar otras células. (Smith y Daniel 2006)

Este proceso, que se realiza en siete pasos o etapas, se llama el ciclo de vida del VIH. (*fig. 3*). Las siete etapas del ciclo de vida del VIH son:

1. **Enlace:** Cuando el virus ataca a un linfocito CD4, el virus se fija a las moléculas en la superficie del linfocito CD4: primero a un receptor del CD4 y luego a un correceptor CCR5 o CXCR4. (Cordeiro y Taroco 2006)
2. **Fusión:** Después de que el virus se une a un linfocito CD4 huésped, la *envoltura* del virus se fusiona con la membrana del linfocito CD4. Esta fusión permite que el VIH entre al linfocito CD4. Una vez adentro, el virus libera su ARN y sus enzimas, tales como la transcriptasa inversa y la integrasa. (Cordeiro y Taroco 2006)
3. **Transcripción inversa:** Una vez que se encuentra dentro de un linfocito CD4, el VIH libera y emplea la *transcriptasa inversa* (enzima del VIH) para convertir su ARN del VIH en ADN del VIH lo que le permite al VIH entrar al núcleo del linfocito CD4 y unirse con el ADN de la célula. (Cordeiro y Taroco 2006)
4. **Integración:** Una vez que se encuentra dentro del núcleo del linfocito CD4 huésped, el VIH libera la *integrasa*, enzima que emplea para insertar (integrar) su ADN vírico en el ADN de la célula huésped. (Cordeiro y Taroco 2006)
5. **Multiplificación:** Una vez que el VIH se integra dentro del ADN del linfocito CD4 huésped, comienza a emplear el mecanismo de ese linfocito para crear cadenas largas de proteínas. Esas cadenas de proteínas son elementos constitutivos para producir más copias del virus. (Cordeiro y Taroco 2006)
6. **Ensamblaje:** Durante el ensamblaje, el nuevo ARN del VIH y las proteínas víricas producidas por el linfocito CD4 huésped salen a la superficie de la célula y se ensamblan dentro de un VIH inmaduro (no infeccioso). (Cordeiro y Taroco 2006)
7. **Gemación:** Durante la gemación, el VIH inmaduro (no infeccioso) se impulsa hacia el exterior del linfocito (célula) CD4 huésped. Una vez fuera del linfocito CD4, el nuevo virus libera proteasa, una enzima del VIH. La proteasa actúa para separar las cadenas largas de proteína que forman el virus no infeccioso. Las proteínas víricas más pequeñas se combinan para formar el VIH maduro, infeccioso. (Cordeiro y Taroco 2006)

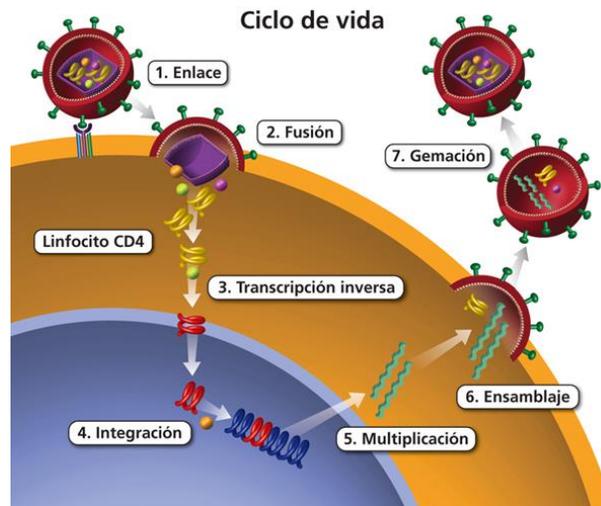


Figura 3. Ciclo de vida del VIH. (Tomado de <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/>)

Los medicamentos contra el VIH protegen el sistema inmunitario al bloquear el virus en diferentes etapas de su ciclo de vida. El medicamento utilizado para tratar el VIH se llama terapia antirretroviral o TAR, los antirretrovirales, inhiben enzimas esenciales, la transcriptasa inversa, retro transcriptasa o la proteasa, con lo que reducen la replicación del VIH. De esta manera se frena el progreso de la enfermedad y la aparición de infecciones oportunistas. Diferentes antirretrovirales se utilizan en varias etapas del ciclo vital del VIH (Soto 2010).

1.4 Etapas de la Infección y transmisión

La infección por VIH se clasifica en diversas etapas, identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos. (Chávez y Castillo 2013).

Etapa 1: infección aguda por VIH. La fase de la infección aguda por VIH inicia en el momento del contagio. En un plazo de días, el VIH infecta no sólo las células expuestas inicialmente sino también los ganglios linfáticos. Un porcentaje importante de personas que contraen el virus son pacientes asintomáticos, aunque entre el 40% hasta el 80% de los casos de contagio con VIH-1 presentan manifestaciones clínicas, tales como fiebre, malestares musculares, inflamación de los ganglios, sudoración nocturna, diarrea, náuseas y vómito. El cuadro de la infección aguda por VIH aparece entre dos y seis semanas después de la exposición al virus, y desaparece unos pocos días después. (Menéndez 1995; Chávez y Castillo 2013, Mercado y Del Rosario 2014)

En esta fase, el VIH se reproduce rápidamente y se propaga por todo el cuerpo. Durante la fase aguda de la infección, las pruebas tradicionales, pruebas serológicas, siempre darán negativo porque no detectan directamente el VIH, sino los anticuerpos producidos como respuesta por el

sistema inmune, a los 10 a 20 días aparece el antígeno p24 circulante, las pruebas de carga viral, arrojarán como resultado una elevada cantidad de copias del VIH, lo cual aumenta considerablemente su riesgo de transmisión (Chávez y Castillo 2013, Llano 2004, Mercado y Del Rosario 2014)

Etapa 2: Infección Crónica (inactividad o latencia del VIH) infección asintomática por VIH. A medida que la infección aguda evoluciona a infección crónica, el VIH todavía está activo, pero se multiplica más lentamente y disminuyen las concentraciones del virus. Posteriormente, se produce una interacción entre el sistema inmunitario y la replicación viral que conduce a un punto de equilibrio entre la carga viral y el recuento de células CD4+, fenómeno conocido como latencia, lo que usualmente ocurre luego de la seroconversión paralelo con la recuperación del conteo de CD4. Las personas pueden no tener ningún síntoma o enfermarse durante este tiempo. Para las personas que no toman medicamentos para tratar el VIH, este período puede durar una década o más, pero algunos pueden progresar más rápido en esta etapa. La causa de esto es que, mientras el virus sigue reproduciéndose de manera constante y aumenta la carga viral en su anfitrión, disminuye también la capacidad de recuperación del sistema inmune. Las personas que toman medicamentos para tratar el VIH pueden estar en esta etapa durante varias décadas. Al final de esta fase, la carga viral de una persona comienza a subir y el recuento de células CD4 comienza a disminuir. (Chávez y Castillo 2013)

Etapa 3: síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es la fase más severa de la infección del VIH, se produce un incremento de la actividad replicativa del virus, igualándose la carga viral circulante y la de los órganos linfoides y generándose una disminución de los linfocitos T CD4 circulantes en sangre periférica. (Llano 2004)

Sin tratamiento, las personas con SIDA generalmente sobreviven alrededor de 3 años. Las personas son diagnosticadas con SIDA cuando su recuento de células CD4 cae por debajo de 200 células/mm o si desarrollan ciertas enfermedades oportunistas. (Cordeiro y Taroco 2006)

En el curso de la infección temprana por VIH, la carga viral se incrementa agudamente durante las primeras semanas hasta un pico, bajando rápidamente en semanas o meses a un estadio estable o “nivel de equilibrio”, lo que usualmente ocurre luego de la seroconversión paralelo con la recuperación del conteo de CD4; a partir del cual la carga viral en plasma se mantiene estable por un período relativamente largo hasta la progresión de SIDA. Se piensa que el “nivel de equilibrio” es el resultado de la tasa de replicación del VIH y la respuesta inmunológica del huésped. (Fig. 4) (Mercado y Del Rosario 2014)

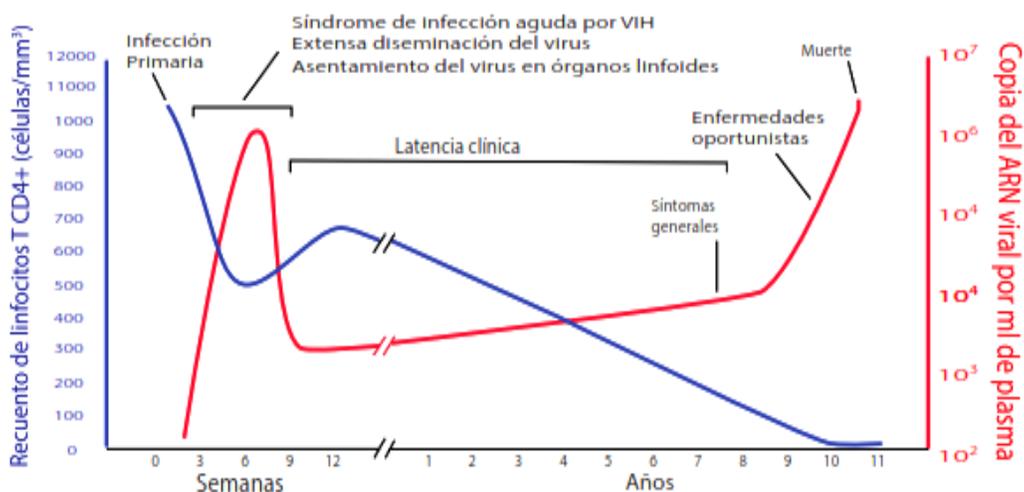


Figura 4. Curso típico de la infección por VIH. En azul, evolución del recuento de linfocitos T CD4+. En rojo, evolución de la carga viral. (Mercado y Del Rosario 2014)

Clasificación de la infección por VIH (Menéndez 1995; Llano 2004)

A partir de 1993 el CDC ha propuesto un nuevo sistema de clasificación, esta incluye como casos de SIDA a todos los pacientes con niveles de células CD4+ inferiores a 200/mm³ (A₃ B₃ C₃) aunque no tengan manifestaciones clínicas indicadoras de SIDA. (Tabla 1)

- **Categoría A:** pacientes con infección primaria o asintomática.
- **Categoría B:** pacientes que presentan o hayan presentado síntomas que no pertenecen a la categoría C, pero que están relacionados con la infección de VIH.
- **Categoría C:** pacientes que presentan o hayan presentado algunas complicaciones incluidas en la definición de sida de 1987 de la OMS: **Infecciones oportunistas**, bronquitis y neumonía, Procesos neoplásicos.

Tabla 1. Clasificación de la infección por VIH propuesta por el CDC en 1993. (Menéndez 1995)

Linfocitos CD4+	A Infección aguda, asintomática.	B Infección sintomática no A ni C.	C Condiciones indicadoras de SIDA.
>500 cel./ml	A1	B1	C1
200-499 cel./ml	A2	B2	C1
<199 cel./ml	A3	B3	C2
Sida			

1.5 Transmisión vertical del VIH

El VIH se puede transmitir a través del intercambio de una variedad de fluidos corporales de personas infectadas, como la sangre, la leche materna, el semen y las secreciones vaginales. . (Ospina 2006). El VIH se puede transmitir por vía sexual, vía sanguínea, o vía materna, conocida como transmisión perinatal o vertical.

La Transmisión Vertical constituye la principal vía por la cual los niños contraen VIH, puede ocurrir:

La Transmisión in útero, durante el embarazo, se ha identificado VIH en el tejido fetal a la octava semana de gestación, y es responsable del 10% al 25% de los casos.

La Transmisión intraparto, durante el parto, representa entre 40 y 80% de los casos y es causada por el contacto fetal con la sangre y el líquido amniótico, a través del canal del parto por ascenso del virus a través de la vagina, absorción del virus a través del tracto digestivo o micro transfusiones sanguíneas.

La Transmisión postparto, donde la lactancia materna es el mecanismo de transmisión en 14% a 30% de los casos, Cuanto mayor sea el tiempo de amamantamiento mayor es el riesgo. (Cortes y otros 2006).

La transmisión vertical del VIH ha representado una proporción importante de la mortalidad en menores de cinco años y, en muchos países, el SIDA es causa de entre un 30% y un 50% de las muertes infantiles. (The european collaborative study 1988, Torres y otros 2010)

El principal factor de riesgo para la TV del VIH es la carga viral plasmática en la madre > 1.000 copias/ml. Otros factores que aumentan el riesgo son la ausencia de tratamiento antirretroviral, el parto pre término, los CD4 < 200 células/ μ L, la no realización de cesárea electiva y la ausencia de tratamiento con Zidovudina en el parto y en el recién nacido. (The european collaborative study 2008)

Sin intervenciones específicas para reducir el riesgo de transmisión, las tasas estimadas de transmisión materno infantil o vertical varían del 14% al 25% en Europa y América y un 42% en África, otros autores estiman una tasa promedio de transmisión vertical del 24%. Cortes y otros 2006, D Ángelo y col 2007, Torres y otros 2010, Newell ML 2004, Medicina fetal Barcelona 2017).

Desde la publicación, en 1994, de los resultados del denominado protocolo ACTG 076 (EE.UU.) que demostró una reducción de un 67,5% de la transmisión vertical de la infección por VIH mediante el tratamiento con zidovudina (AZT) durante la gestación, se han ido introduciendo diferentes recomendaciones sobre el uso de antirretrovirales durante el embarazo y otras intervenciones preventivas para la reducción de la TV del VIH hasta un 1-2%, estas recomendaciones incluyen el uso de tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), que consigue reducir la carga viral a valores indetectables, la supresión de la lactancia materna y la cesárea electiva, entre otras prácticas, lo que aumenta la sobrevivencia de las mujeres con infección con VIH, permitiendo un número cada vez mayor de embarazos planificados y bien controlados en esta población. (Ramos y otros 2003, Más y otros 2013)

1.6 Técnicas de Diagnóstico para VIH disponibles

El diagnóstico de la infección por el VIH se establece al aislar el virus en cultivo, detectar el antígeno P24, medir la respuesta de anticuerpos o detectar su ácido nucleico. Actualmente se disponen de diferentes tipos de pruebas en varios formatos, en general, con muy buena sensibilidad y especificidad. (Fiaron 2005; Ospina 2006)

En el curso de la infección se pueden utilizar varios marcadores víricos para identificar la infección y monitorizar su tratamiento.

En el momento en que el virus entra en el cuerpo, empieza a multiplicarse, apareciendo grandes cantidades del mismo en sangre. Esta es la característica que permite detectar la infección en este momento, el primer marcador que aparece la **carga viral**, cuantificación de número de copias de ARN de los virus presentes en plasma, se puede detectar por técnicas de amplificación aproximadamente a las dos semanas de la infección, generalmente a los 10-12 días. Prácticamente al mismo tiempo se puede detectar el ADN proviral_(García y col 2010)

El antígeno p24 aparece en suero a los 11-13 días, Es una prueba altamente específica, pero su sensibilidad no es óptima, presentando falsos negativos; limitándose su uso al diagnóstico precoz, cuando hay signos clínicos de primo infección o presunción de exposición, su concentración permanece alta y detectable en sangre aproximadamente por un mes y medio después de la infección. Los niveles del antígeno p24 disminuyen a medida que el organismo va produciendo anticuerpos y ya no vuelven a aumentar hasta que la enfermedad se encuentra en una fase muy avanzada (García y col 2010; Álvarez 2017)

El intervalo de tiempo que existe entre la infección y la aparición de anticuerpos o **seroconversión**, se conoce como **período ventana**, y se caracteriza por presencia de ADN proviral, ARN-VIH, antígeno p24 y ausencia de anticuerpos específicos. La producción de anticuerpos contra el VIH ocurre después de un período inicial de intensa replicación viral, con altos niveles de ARN y antígeno P24; se asume que, como en todas las infecciones virales, primero aparece la inmunoglobulina M y, luego, la G. (Ospina 2006; Álvarez 2017)

El estadio de la enfermedad y su pronóstico o el efecto de una terapia antiviral con antirretrovirales se mide bien con una combinación de dos parámetros: Población de linfocitos T CD4/ml: Se determina mediante citometría de flujo y Cuantificación de la carga viral (copias/ml), mediante PCR cuantitativa. (Cordeiro y Taroco 2006)

El diagnóstico de infección se realiza detectando la presencia de **anticuerpos específicos**. Las pruebas para detección de anticuerpos contra el VIH se dividen en: *pruebas de tamizaje o presuntivas, las cuales poseen una alta sensibilidad y buena especificidad, y las pruebas confirmatorias*, cuya característica es la alta especificidad. La muestra que se utiliza para la detección de anticuerpos es de suero o plasma, aunque se dispone de pruebas que utilizan hisopado de mucosa gingival o yugal (saliva), orina o secreciones vaginales. (Ospina 2006)

Pruebas de tamizaje

Prueba de Elisa. En la infección temprana existe un corto período en el que hay presencia del antígeno p24 del VIH-1 en ausencia de anticuerpos contra el mismo. Este antígeno puede detectarse por técnicas de ELISA (**Enzimoimmunoanálisis de adsorción**). La positividad de la prueba de antígeno p24 se detecta en un tiempo estimado de 26,4 días. (Maroto 2000; Ospina 2006).

Se puede clasificar de la siguiente manera, según su generación: de primera generación, que usan lisados virales como antígeno y que se acompañan de alta frecuencia de falsos positivos; pruebas de segunda generación, que usan proteínas recombinantes del VIH, péptidos sintéticos o ambos como antígenos; pruebas de tercera generación, que usan péptido/proteína recombinantes; y pruebas de cuarta generación, que se basan en la detección simultánea de anticuerpos y complejos inmunes antígeno P24/anticuerpo y tienen una alta sensibilidad y especificidad (Ospina 2006)

Se caracterizan por una alta sensibilidad, cercana al 100%, y una buena especificidad (99,5% Y 99,9%). La especificidad depende de la calidad del antígeno que contiene la prueba, que es el componente que define su generación hoy en día sólo son aceptables los ELISA de tercera y cuarta generación. (García y col 2010; Álvarez 2017)

Pruebas confirmatorias: estas pruebas están orientadas a confirmar la presencia de la infección por el VIH en un paciente con una prueba presuntiva. Se basan en la detección de anticuerpos contra el virus o sus componentes.

Western Blot es la técnica más ampliamente utilizada y consiste en que las proteínas constitutivas del virus se separan dependiendo de su peso molecular por electroforesis y, luego, se transfieren a un papel de nitrocelulosa. Estas proteínas fijadas son expuestas al suero del paciente, en el cual los anticuerpos específicos se unen a las proteínas presentes dando un patrón de bandas, cuya interpretación depende del criterio que se adopte en el laboratorio de acuerdo con lo definido por organismos internacionales. El resultado de la prueba de Western Blot se informa como negativo cuando hay ausencia total de bandas; El resultado indeterminado puede deberse a un período inicial de seroconversión o a un falso positivo, sobre todo cuando se trata de una sola banda, usualmente la p24. (Ortiz y Eiros 2000; Ospina 2006; Pacheco y Monzon 2001)

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) se utiliza ampliamente como prueba confirmatoria para la infección por el VIH-1 y lo siguen haciendo laboratorios con amplia experiencia con la prueba

(Ortiz y Eiros 2000). Se basa en el uso de células infectadas que son fijadas a un portaobjetos, utilizando como control células no infectadas del mismo origen. El suero problema es incubado para reaccionar con los antígenos presentes en las células infectadas y su presencia se demuestra por medio de un antisuero anti IgG humano marcado con un fluorocromo. La lectura de resultado se realiza con un microscopio de fluorescencia. La IFI es una técnica rápida, económica y fiable, su mayor limitación está en la subjetividad de interpretación de la lectura de la lámina. (Pacheco y Monzon 2001)

Adicional existen diferentes pruebas para detectar el ácido ribonucleico (ARN) del virus, tales como la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA, LCx), y el ADN ramificado (bDNA), la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, PCR Múltiple, PCR mester, RT-PCR, PCR en tiempo real). (Ameli y col 2013)

1.7 La PCR en el diagnóstico de VIH

En los casos en que las pruebas de anticuerpos pueden ser insuficientes para determinar si un paciente está infectado o en etapa de infección por VIH muy tempranas, es necesario para llevar a cabo PCR, un método de amplificación de ácido nucleico que permite la detección de ADN viral integrado en el ADN genómico de la célula huésped. La PCR también es particularmente útil en la prueba de bebés de madres VIH-positivas; estos bebés pueden portar anticuerpos maternos hasta los 18 meses de edad. (Fearon 2005; Ospina 2006; Kairiyama y col 2007, Basualdo col 2014)

La PCR también se puede utilizar de forma cuantitativa para medir la carga proviral en muestras de ADN o cantidad de ARN de VIH en muestras de sangre o suero. La viremia plasmática o carga viral del VIH se define como el número de copias de ARN del virus que se encuentra presentes en plasma. Los resultados se notifican como el número de copias de ARN del VIH por milímetro de sangre. Las pruebas de la carga viral se emplean para diagnosticar la infección aguda por el VIH, guiar las posibilidades de selección del tratamiento y vigilar la respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR). (Muñoz 1998; Fearon 2005; García y col 2010)

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se basa en la fabricación de nuevas cadenas de ADN simple a partir del original mediante enzimas específicas denominadas ADN polimerasas. Estas enzimas tienen la propiedad de realizar copias del ADN original a partir de una cadena simple

de ADN siempre que tenga un iniciador. Los ciclos de desnaturalización y fabricación (replicación) consecutivos dan lugar a miles de copias del ADN original delimitado por los iniciadores (Rubio y col 2011).

Para que la PCR tenga lugar, los componentes básicos e indispensables de la misma son: ADN molde que se desea amplificar, ADN polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN y tampón, reacción que ocurre en un termociclador (Sambrook y Russell 2001).

Los protocolos básicos de PCR constan de los siguientes pasos: el primer paso es una Desnaturalización térmica del ADN que se va a usar como molde, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas. Por último, se da la reacción de extensión, por parte de la ADN polimerasa que copia el ADN entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos iniciadores. Este proceso de tres pasos es entonces repetido un número determinado de veces (25-35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto. (*fig. 5*). (Torres y Baca, 1995; Méndez y Pérez 2004)

Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueada por el par de oligonucleótidos. De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar muy bajas cantidades de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores. (Méndez y Pérez 2004).

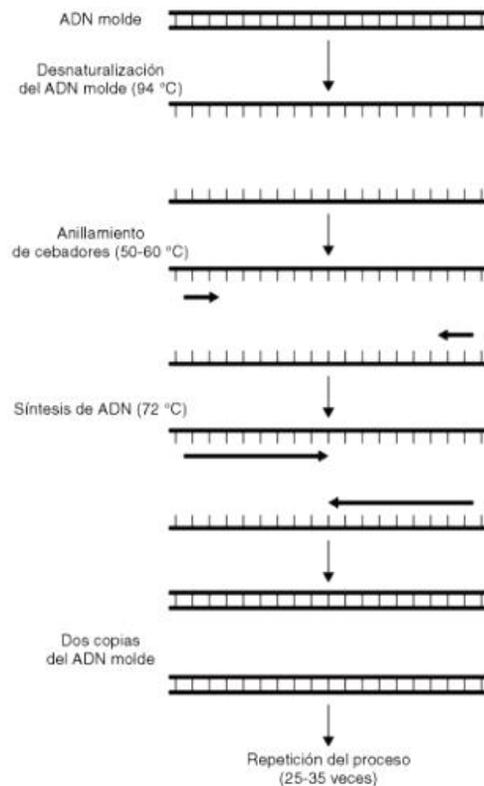


Figura 5. Representación esquemática de los distintos pasos de una reacción de PCR. (Méndez y Pérez 2004).

La PCR **múltiple** es una variante de la PCR tradicional (PCR punto final) en la que se amplifican distintos fragmentos de ADN diana simultáneamente (como si se realizaran muchas reacciones en cadena de la polimerasa individuales en una misma reacción), mediante el uso de múltiples pares de cebadores en una mezcla de reacción. (Méndez y Pérez 2004, Rubio y col 2011).

La PCR Múltiple fue descrita por primera vez en 1988 por Chamberlain, Gibbs, Ranier, Nguyen y Caskey como un método para detectar deleciones en el gen de la distrofina, causa de la Distrofia Muscular de Duchenne. En 1990, Ballabio, Ranier, Chamberlain, Zollo, and Caskey la usaron como método de screening para encontrar deleciones en el gen del esteroide sulfatasa (STS). En 2008, La PCR Múltiple fue utilizada para el análisis de micro satélites y SNPs, entre muchas otras áreas. (Markoulatos 2002)

Los ensayos de PCR múltiplex son técnicamente más exigentes en comparación con los protocolos convencionales de PCR monoplex. La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentran directamente influenciada por los diversos componentes que integran la

técnica, como la concentración de magnesio, la concentración de ADN polimerasa, la calidad del ADN molde y el programa de amplificación, así como también es importante un buen diseño de los cebadores. (Méndez y Pérez 2004; Rubio y col 2011; Bolívar y col 2014)

En la PCR **múltiple anidada** se realizan dos PCR consecutivas, en la primera se utilizan un par de cebadores llamados externos; en la segunda se usan cebadores complementarios a secuencias de ADN contenidas en los fragmentos que se amplificaron en la primera PCR (cebadores internos) que flanquean una región central que es la que queremos amplificar. La idea que persigue esta técnica es que los productos de la primera amplificación son un molde ideal para la segunda amplificación, mucho mejor que el ADN genómico original.

La ventaja de esta PCR es que se obtiene la información de varios loci en una sola reacción, utilizando menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos. La PCR Múltiple tiene el potencial de ahorrar considerablemente tiempo y esfuerzo en el laboratorio, sin comprometer la utilidad del experimento. (Elnifro y col 2000)

La eficacia de las pruebas de PCR, como cualquier método de diagnóstico, se determina a través de dos parámetros: *Sensibilidad* y *Especificidad*, parámetros importantes para cuantificar la capacidad de diagnóstico de la prueba. (Altman y Bland 1994)

La *Sensibilidad* determina la capacidad de la prueba para detectar la infección en sujetos enfermos y se representa como el porcentaje de resultados positivos en pacientes infectados (Donis 2012; Álvarez 2017), es decir, estima la proporción de verdaderos positivos que se identifican correctamente mediante la prueba. (Altman y Bland 1994)

Por otro lado, la *Especificidad* indica la capacidad de una prueba para identificar aquellos que no tienen la enfermedad, y es igual al número de sujetos que resultan negativos a la prueba y que no tienen la enfermedad, dividido entre el número de personas que no tienen la enfermedad o están sanos (Donis 2012; Álvarez 2017), en otras palabras, da idea de la capacidad de una prueba para detectar correctamente individuos sanos.

1.8 Importancia de la PCR en el diagnóstico de VIH

Las ventajas que aporta la PCR como método de diagnóstico para VIH hacen que este método sea utilizado de forma rutinaria:

- *En el diagnóstico de personas que se sospechan pueden estar infectadas y requieren de atención*, detección directa del virus integrado (ADN proviral), a partir del ADN de células mononucleares de sangre periférica de personas infectadas y durante el período de ventana (antes de la generación de anticuerpos específicos para el VIH). (Ameli y col 2013)

- *Resolver el estatus de infección de individuos* con prueba de Western Blot indeterminado.

- *Diferenciación de la infección* entre VIH-1 y VIH-2.

- *En la seguridad de transfusiones, productos hemoderivados y donaciones de órganos*, donde son examinadas las muestras para detectar VIH mediante pruebas de PCR y descartar así infecciones recientes, que no serían detectables por pruebas de anticuerpos debido a su mayor periodo de ventana. (Cordeiro y Taroco 2006)

- *En el pronóstico y prevención de la enfermedad*: la medida de la carga viral puede predecir cuánto tiempo una persona se mantendrá saludable, ya que cuanto mayor es la carga viral, la enfermedad progresa más rápido y mayor es el riesgo de transmitir el VIH. (Cordeiro y Taroco 2006)

- *En la evaluación de la eficacia del tratamiento antirretroviral* en personas VIH positivas. (Cordeiro y Taroco 2006)

- *En la aplicación de programas de vigilancia serológica* de esta infección (estudios de incidencia y prevalencia, tendencias en grupos poblacionales, etc.) o en programas de investigación clínica, farmacológica, virológica e inmunológica (Cordeiro y Taroco 2006)

Principalmente en:

En el diagnóstico de bebés nacidos de madres VIH positivas, debido a que su sangre conserva anticuerpos maternos (IgG) adquiridos tras placentariamente hasta los 18 meses de edad lo que interferiría con pruebas basadas en anticuerpo. La PCR presenta una alta sensibilidad en la detección de secuencias de ADN proviral con una especificidad del 30-50% en las primeras

semanas de vida y entre el 95-100% en los niños mayores de 1 mes (Rivera y Murillo 2003, D Ángel y col 2007

El objetivo de este proyecto es el de estandarizar una PCR múltiple anidada como método de optimización en el diagnóstico y seguimiento de la infección del VIH en el recién nacido, la importancia de un diagnóstico precoz reside en la posibilidad de iniciar un tratamiento temprano antes de que aparezcan complicaciones derivadas de la infección y mejorar así la calidad y esperanza de vida del paciente. Esperando obtener con esta metodología desarrollada una alta sensibilidad y especificidad, que sea rápida y confiable para su aplicación en el diagnóstico clínico lo que permitirá optimizar los protocolos de detección del VIH-1, principalmente para pacientes menores de 18 meses de edad.

3. ANTECEDENTES

La PCR ha revolucionado el campo del diagnóstico de las enfermedades infecciosas. El hecho de estandarizar y optimizar aplicaciones individuales de la PCR ha permitido desarrollar variantes del método. Para superar la desventaja inherente del alto costo y para mejorar la capacidad diagnóstica de la prueba, se ha desarrollado la PCR Múltiple, reacciones que consiguen detectar de forma simultánea y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés. Los esfuerzos para mejorar la sensibilidad y especificidad, y para facilitar la automatización del proceso han dado lugar a numerosas publicaciones relacionadas a la aplicación de la PCR Múltiple en el diagnóstico de agentes infecciosos virales. (Markoulatos 2002; Méndez y Pérez 2004; Bolívar y col 2014)

Albert J y Fenyo E en 1990, en su estudio titulado “Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers” el principal objetivo de los autores fue desarrollar y evaluar un protocolo de PCR simple, específico y sensible para la detección de VIH-1 en muestras clínicas. Como resultados obtuvieron que el VIH-1 se pueda detectar en el 100% de los lisados de células de individuos infectados mediante PCR con cebadores anidados y visualización simple en geles de agarosa. La amplificación de la PCR fue en dos pasos, primero con cebadores externos y luego con cebadores internos anidados dentro del primeros cebadores, diseñados para amplificar *Gag* y la región *Env* del VIH-1. Estos autores afirman que una amplificación de dos pasos, aumenta la especificidad de la PCR.

Zazzi M y otros en 1992, en su estudio “Simultaneous Amplification of Múltiple HIV-1 DNA Sequences from Clinical Specimens by Using Nested-Primer Polymerase” desarrollaron un protocolo sensible y específico de PCR con cebadores anidados para la amplificación simultánea de tres secuencias de ADN de VIH-1 de muestras clínicas. Las muestras de ADN se amplificaron primero con los pares de cebadores externos *gag*, *pol* y *Env*, y luego con los tres pares de cebadores internos correspondientes en la misma reacción de dos pasos. Una prueba de PCR múltiple anidada fue suficiente para detectar el ADN del VIH-1 en todos los 80 individuos seropositivos al VIH-1 y ninguno de los 50 donantes de sangre sanos seronegativos del VIH-1. Concluyeron que el procedimiento de PCR múltiple anidada proporciona un medio atractivo para la detección directa simple, rápida y rentable del ADN del VIH-1 en muestras de pacientes.

Aulicino y otros en el 2006, en su trabajo “genetic diversity in Argentina and early diagnosis of perinatal infection” desarrollaron una PCR múltiple anidada artesanal (nPCR), usada para el diagnóstico temprano de la infección por HIV-1 en niños expuestos por vía perinatal en Argentina. En la nPCR Múltiple desarrollada por los autores amplificaron fragmentos de las regiones *gag* y *env* del HIV-1 junto con un control interno de β -actina. La nPCR se utilizó para el diagnóstico de infección en 1316 niños en un período de 7 años, donde obtuvieron una especificidad de 100% y una sensibilidad de 99.2%, con sólo 2 falsos negativos. Concluyeron que la detección del ADN proviral del VIH-1 por medio de una PCR anidada múltiple demostró ser una herramienta muy valiosa para el diagnóstico de la infección por VIH-1 en población pediátrica.

Kairiyama y otros en el 2007 en su estudio titulado “Detección de VIH proviral por nested-PCR utilizando metodología casera (in house)”, estos autores desarrollaron una metodología de PCR anidada cualitativa in house como un método de detección de VIH proviral como ayuda diagnóstica para infección por VIH neonatal, para ello estudiaron treinta pacientes con serología positiva VIH, amplificaron por PCR anidada dos regiones específicas del gen *gag* del VIH, y obtuvieron como resultados en las treinta muestras la amplificación exitosa de las dos regiones del gen *gag* VIH, concluyeron que esta metodología tiene un alta sensibilidad, es rápida y confiable, lo que la hace apta para su aplicación en diagnóstico pediátrico a un costo accesible para instituciones públicas, lo que permite mejorar el diagnóstico clínico en aquellos casos en que los métodos serológicos son inaplicables.

D Ángelo y otros en 2007 en su estudio “detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante la PCR, en neonatos de madres seropositivas”, Los objetivos de este trabajo fueron la detección del ADN proviral del VIH-1 mediante la técnica de PCR en neonatos de madres seropositivas al VIH-1, la amplificación del material genético de cada muestra se efectuó por dos ensayos de PCR a dos rondas, utilizando iniciadores conservados de los genes *Env* y *Gag* del VIH-1, corroboraron la utilidad de la PCR como herramienta molecular en el diagnóstico oportuno de infección perinatal por el VIH-1. Señalaron que el uso simultáneo de iniciadores de la región de *Env* y *Gag* del VIH-1, aumenta la posibilidad de detectar la infección del VIH en forma temprana.

Castro y otros en el 2015, en su estudio “Implementación del ensayo de carga viral COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0 para el diagnóstico de la infección congénita por HIV-1.” el objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño del ensayo de carga viral (CV) COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0 (Roche), y su concordancia con una PCR múltiple anidada *in-house*, para la detección del ADN

proviral, afirman que el diagnóstico de infección congénita por HIV que se realiza en la actualidad por técnicas *in-house* que detectan el ADN proviral, el riesgo de falsos negativos se minimiza utilizando oligonucleótidos que permiten amplificar diferentes regiones del genoma viral, lo cual aumenta la sensibilidad de la técnica en las muestras tempranas ya que la sensibilidad de los métodos virológicos de detección de ácidos nucleicos es menor del 50% durante las primeras semanas de vida.

Assih y otros en el 2016 en su estudio “Molecular diagnosis of the human immunodeficiency, Hepatitis B and C viruses among blood donors in Lomé (Togo) by multiple real time PCR” tuvo como objetivo evaluar la eficacia de una PCR múltiple en tiempo real para diagnosticar simultáneamente los tres principales virus de infección por VHB, VHC y VIH. Compararon la sensibilidad y la especificidad de la PCR múltiple con el ELISA. Concluyeron que la PCR múltiple es una prueba de diagnóstico directo que se dirige a los ácidos nucleicos de estos virus, mientras que ELISA es una prueba serológica dirigida a antígenos o anticuerpos. Por lo tanto, durante las ventanas serológicas ELISA puede dar resultados falsos negativos. La importancia del kit múltiple PCR probado en este estudio es su capacidad para diagnosticar los tres virus junto, la PCR múltiple es una técnica más rápida y simple que ELISA. Los datos también mostraron que la PCR múltiple era más sensible en la detección del VHB. La sensibilidad de ELISA para la detección de VHC y VIH fue más elevada en comparación con la PCR múltiple. La PCR múltiple fue más específica que el ELISA para la detección del VHC y el VIH.

Los métodos moleculares como el diagnóstico genómico viral utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, aplicadas a la detección y cuantificación de genomas virales, son más sensibles y no exponen a falsos positivos asociados con la enfermedad y/o contaminación (Assih y col 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estandarizar una técnica de PCR múltiple anidada, utilizando iniciadores altamente conservados de las regiones genéticas de *Gag* y la región *Env*, para el diagnóstico de VIH-1 a partir de ADN proviral, en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar la estandarización de la PCR múltiple anidada para la detección VIH a partir de ADN proviral.
- ✓ Determinar la sensibilidad Y especificidad analítica de la PCR múltiple anidada para la detección del VIH-1 a partir de ADN proviral.
- ✓ Determinar sensibilidad y especificidad diagnostica de la PCR múltiple anidada para la detección del VIH-1 a partir de ADN proviral.
- ✓ Realizar el análisis estadístico de los resultados.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Muestras biológicas.

Población a estudiar. Para la estandarización de la PCR múltiple anidada se analizaron 60 muestras sanguíneas de niños, entre edades comprendidas de 15 días a 24 meses, referidos al Instituto de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR). Todas las muestras se colectaron de manera estéril con EDTA, las cuales se le extrajo la capa de células blancas (Buffy Coat) para su posterior extracción del ADN proviral mediante kit comercial.

Adicionalmente se emplearon 15 muestras de pacientes infectados con VHB, VHC o CMV para evaluar la especificidad analítica del ensayo.

Se recolecto la información referente a la historia clínica de cada paciente, tales como: edad, tratamiento antirretroviral, tipo de alimentación, tipo de parto, signos, síntomas y otros datos importancia clínica.

4.2 Extracción de ADN proviral.

Para la extracción del Buffy Coat (fracción enriquecida en leucocitos a partir de sangre total) se realiza por centrifugación de la sangre a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se observarán 3 fracciones. La fracción superior es el plasma; la intermedia es el Buffy Coat que contiene los leucocitos concentrados; y la fracción inferior contiene los eritrocitos.

Para la extracción de ADN proviral se emplearon columnas de sílica gel, del estuche comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se transfieren 20 µL de la solución stock de **Proteinasas K** a un tubo de eppendorf de 1,5 mL que contiene 200 µL de muestra.
2. se añaden 200 µL de **buffer AL (Tampón de lisis)**, se mezcla 15 segundos en vórtex. El lisado se volverá marrón durante la incubación. Se incuba a 56°C por 10 min.
3. Seguidamente se añaden 200 µL de **etanol 96%**, se mezcla por vórtex 15 segundos y se centrifuga.
4. Se pasa la mezcla anterior por una **columna de QIAamp** sin mojar los bordes, se tapa bien y se centrifuga a 6000g por 1 min, se coloca la columna en un tubo de lavado de 2 mL limpio y se desecha el tubo contenedor del filtrado.
5. Se abre cuidadosamente la columna y se añaden 500 µL de **buffer Aw1** sin mojar los

bordes, se centrifuga a 6000g por 1 min, posteriormente se coloca la columna en un tubo de lavado de 2 mL y se descarta el que posee el filtrado.

6. Se abre la columna y se añaden 500 µL de **buffer Aw2** se centrifuga a 6000g por 1 min, posteriormente se coloca la columna en un tubo de lavado de 2 mL y se descarta el que posee el filtrado.
7. Se Centrifuga a 3 minutos a la máxima velocidad.
8. Se coloca la columna en un tubo eppendorf nuevo y se añaden 200 µL de **buffer AE**, se incuba a temperatura ambiente por 15 min, se centrifuga a 6000g por 1 min. El ADN se almacenará -20°C, hasta su posterior procesamiento.

La Concentración y Pureza del ADN proviral extraído se determinó por los métodos descritos por Sambrook y Russell (2001). La concentración y pureza del ADN se estimó en un espectrofotómetro UV/Visible BioPhotometer Plus de Eppendorf, midiendo la absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280).

4.3 Análisis bioinformático de los “*primers*” empleados en la identificación de VIH-1

Se realizó un alineamiento de secuencias del iniciador de la región *Gag* y *Env* del VIH-1 especificidad mediante **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) y PCR **in silico** mediante el programa **Amplifx**, el cual tiene como objetivo demostrar y confirmar el tamaño de un único amplicón y 100% de especificidad sin interferencia con otras especies del género *Lentivirus*, y *sin interferencia con* otros patógenos humanos como otros virus, bacterias, entre otros.

4.4 Estandarización de la PCR múltiple anidada para la detección de ADN proviral del VIH 1.

Para la amplificación del material genómico se efectuó una PCR múltiple a dos rondas (PCR Múltiple anidada), utilizando iniciadores altamente conservados de las regiones genéticas de *Gag* y la región *Env* del VIH-1. (D Ángelo y col 2007, Zazzi 1992)

Para la amplificación de la región genética Env, se emplearon en la primera ronda los iniciadores (externos): E80 y E105 (Sanders-Buell y col 1995). Posteriormente, en la segunda ronda los iniciadores (internos): E110 Y E125 (Sanders-Buell y col 1995) para definir una secuencia de aproximadamente 337 pares de bases de una región altamente conservada del gen *Env*.

Para la amplificación de la región Gag, se emplearon los iniciadores (externos) MZ13 y MZ14 (Zazzi 1992) en la primera ronda de amplificación y posteriormente los iniciadores (internos) MZ8 Y MZ9 (Zazzi 1992) en la segunda ronda para definir una secuencia amplificada de

aproximadamente 209pb. La secuencia de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado correspondiente se muestran en la *tabla 2*.

Tabla 2. Secuencia de los primers a utilizar, para las regiones *Env* y *Gag* del VIH, primera ronda y segunda ronda.

Región	Ronda	Iniciadores	Ubicación	Tamaño del amplicón esperado (pb)
<i>Env</i>	Primera ronda	E80: CCAATTCCCATACATTATTGTG	6858 a 6879	678
		E105: GCTTTTCTACTTCCTGCCAC	7502 a 7522	
	Segunda ronda	E110: CTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAA	7002 a 7025	337
		E125: CAATTTCTGGGTCCCCTCTGAGG	7315 a 7338	
<i>Gag</i>	Primera ronda	MZ13: TACATCAGCCATATCACCT	1224 a 1243	473
		MZ14: GAACCGGTCTACATAGTCTC	1677 a 1696	
	Segunda ronda	MZ8: GCATTATCAGAAGGAGCCAC	1316 a 1335	209
		MZ9: AGGGTACTAGTAGTTCCTGC	1505 a 1524	

Para la elaboración inicial de la mezcla maestra de la PCR múltiple anidado a estandarizar, se partió de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la región de *Env*, de acuerdo a las especificaciones de la *tabla 3*. (D Ángel y col 2007).

Tabla 3. Mezcla de reacción de PCR anidada para la amplificación de la región *Env*.

Reactivo (primera ronda)	Cantidad (µL)	Reactivo (segunda ronda)	Cantidad (µL)
Buffer 10x	5 µL	Buffer 10x	5 µL
MgCl₂ (25 mM)	5 µL (2,5 mM)	MgCl₂ (25 mM)	5 µL (2,5 mM)
dNTPs (10 mM)	1 µL (200µM)	dNTPs (2.5 mM)	1 µL (200µM)
cebadores: Región <i>Env</i>. (E80, E105)	1 µL c/u (400nM)	cebadores: Región <i>Env</i>. (E110, E125)	1 µL c/u (400nM)
H₂O	31,75 µL	H₂O	34,75 µL
taq polimerasa (5 U/µL)	0,25 µL	taq polimerasa (5 U/µL)	0,25 µL
Extracto de ADN	5 µL	Extracto de ADN	2ul
Total	50 µL	Total	50 µL

La amplificación de los fragmentos fue llevada a cabo en un volumen de 50 µL para cada ronda, el volumen de muestra o controles que se utilizaron para la primera ronda de amplificación

fue de 5 μ L del extracto de ADN y para la segunda ronda 2 μ L del producto amplificado obtenido en la primera ronda de amplificación.

Se empleó un termociclador, cuya programación se realizó inicialmente de acuerdo a las condiciones de la PCR convencional para la amplificación de la región *Env*. (D Ángel y col 2007)

Tabla 4. Programa de amplificación inicial de la PCR convencional para la amplificación de la región genética *Env* a dos rondas. (D Ángel y col 2007).

Paso	Primera ronda			Segunda ronda		
	Tiempo	Temp	Ciclos	Tiempo	Temp	Ciclos
Desnaturalización inicial	2 min	95°C	1	2 min	95°C	1
Desnaturalización	30seg	95°C	35	30seg	95°C	35
Hibridación	30seg	55°C		30seg	55°C	
Extensión	1min	72°C		1min	72°C	
Extensión final	7min	72°C	1	7min	72°C	1

En cada reacción de PCR múltiple anidada, se amplificó un fragmento de ADN de **268 pb** del gen que codifica la beta-globina humana utilizando los cebadores **PC04** 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3', **GH20**; 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'.

Igualmente se incluyó como control positivo un extracto de ADN proviral proveniente de un paciente positivo para el VIH (según pruebas serológicas y análisis confirmatorio por Western-Blot), y agua grado biología molecular como control negativo de reacción.

4.5 Visualización de los productos amplificados por Electroforesis.

Los resultados de la amplificación se comprobaron por medio de una electroforesis, para lo cual se utilizó un gel de Agarosa preparado al 2% con un buffer TAE al 0,5% coloreado con bromuro de etidio.

Para preparar el gel de agarosa al 2 % se pesó en una balanza analítica 0,8-1,6 gr de agarosa y se sirve en una fiola 40-80 mL de Buffer TAE 1X. Posteriormente la mezcla se calienta hasta su punto de hervor, de manera que se homogenice. Se añade 1 μ L de Bromuro de Etidio

(BrEt) en la fiola y se deja enfriar para servirlo en el molde de electroforesis. Una vez polimerizado, se coloca en la cámara sumergiéndolo en el buffer de corrida.

Se utiliza una solución tamponada (buffer de carga) que se homogeneizara con la muestra de ADN previo a su siembra en el gel de agarosa, con el objeto de que la mezcla sedimente en el fondo del pocillo debido a su viscosidad y densidad. Se sirven 8-16 μL de cada producto de PCR junto a 2-4 μL del buffer de carga en cada pocillo del gel.

Para la corrida electroforética se empleó una cámara de electroforesis submarina Hoefer Mighty Slim Sx 250 power supply con fuente de poder. La corriente eléctrica se establece en 120 v y la corrida se detuvo en el momento en el que el marcador (colorante) de menor peso se aproxima a 2 cm del borde del gel.

Para la visualización los productos se observaron con el Transiluminador de Luz Ultravioleta marca Uvitec. Con cada electroforesis se utilizó un marcador de peso molecular a fin de poder comparar e inferir el resultado de una amplificación dada. Los geles se fotografían bajo luz UV, evidenciándose la fluorescencia del Bromuro de Etidio intercalado entre las bases del ácido nucleico. El tamaño de bandas esperadas para los productos de amplificación región *Env* del VIH-1 es de 337pb, para la amplificación de la región *Gag* de 209pb y una banda intermedia de 268pb producto de la amplificación de la beta-globina.

4. 6 Sensibilidad Analítica de la técnica de PCR múltiple estandarizada.

Para establecer el **límite de detección o sensibilidad analítica** de la prueba se realizaron diluciones seriales (desde 1:1 hasta 1:500.000) a partir de las muestras extraídas de ADN proviral de paciente VIH-1 positivo con carga viral conocida.

4.7 Especificidad Analítica de Técnica de PCR múltiple estandarizada.

El parámetro de especificidad analítica del ensayo, se evaluó analizando la posible reacción cruzada de muestras de pacientes positivos a otros virus. (Reyes y col 2015, Pool y col 2017). Para esto se usaron 15 muestras de pacientes infectados con VHB, VHC o CMV.

4.8 Análisis Estadísticos.

4.8.1 Sensibilidad y especificidad diagnóstica de la Técnica de PCR Múltiple estandarizada.

El propósito de esta investigación es lograr la estandarización una técnica de PCR múltiple-anidado para ser utilizada como prueba diagnóstica de elección a futuro; para alcanzar este objetivo es necesario evaluar la utilidad de las pruebas de diagnóstico, es decir, su capacidad para detectar a una persona con enfermedad o excluir a una persona sin enfermedad, por medio de varios parámetros como, la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo(VPP) y valor predictivo negativo (VPN). (Altman y Bland 1994).

La sensibilidad y especificidad diagnóstica del múltiple PCR se evaluó comparando los resultados de datos obtenidos en las muestras analizadas en la PCR múltiple anidada desarrollada, con los resultados de la PCR que se realiza de rutina en el Laboratorio de Programas Especiales Hepatitis y Sida del instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” al que llamaremos Gold Estándar.

Para aplicar estos conceptos se realizó un **test estándar de oro**, donde se comparan los resultados de un test diagnóstico con los resultados de un test de rutina o convencional al que llamaremos “prueba de oro (Gold estándar)”, con estos resultados se construye una tabla de contingencia 2x2.

	Verdadero diagnostico (Gold estándar)		
Resultado de la prueba	Enfermo	Sano	Total
Positivo	Verdaderos positivos (A)	Falsos positivos (B)	Pruebas positivas (A+B)
Negativo	Falsos negativos (C)	Verdaderos negativos (D)	Pruebas negativas (C+D)
Total	Número de pacientes con enfermedad (A + C)	Número de pacientes sin enfermedad (B + D)	Total, de total

Tabla 5. Tabla de contingencia 2x2.

Las fórmulas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo van expresadas por las fórmulas que se proporcionan en la tabla 6. También se calculó el valor de concordancia mediante el estadístico kappa de Cohen. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el programa Excel.

SENSIBILIDAD (S) = A / A+C	VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP) = A / (A + B)
ESPECIFICIDAD (E)= D / (B + D)	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN) = D / (C + D)

Tabla 6. Formulas de los parámetros.

4.8.2 Análisis estadístico de los factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR múltiple VIH-1 estandarizada.

Se analizaron los resultados colectados de **los factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población** tipo de parto, tipo de alimentación que recibió el bebé, y si la madre recibió terapia antirretroviral, para determinar si existe una relación entre estas características y los resultados obtenidos en la PCR Múltiple estandarizada. Para establecer si hay una correlación entre las variables, es decir si las variables son independientes o dependientes entre sí, se realizó una **prueba de chi-cuadrado**, donde se compara el valor p con el nivel de significancia (denotado como α o alfa; $\alpha = 0.05$).

Hipótesis que someteremos a prueba:

Valor $p > \alpha$: las variables son independientes (Acepta H_0)

Valor $p \leq \alpha$: Las variables tienen una asociación estadísticamente significativa (Rechazar H_0) se concluye que hay una asociación estadísticamente significativa entre las variables.

5. RESULTADOS

5.1 Población a estudiar

Se analizaron 60 muestras de niños en edades comprendidas entre 15 días y 24 meses de edad, donde 33 eran niños (55%) que pertenecen al sexo masculino y 27 (45%) al sexo femenino. De estas muestras 45/60 (75%) resultaron positivas para la amplificación de material genómico del VIH-1 y 15/60 (25%) resultaron negativos, como muestran los datos de la tabla 7.

Tabla 7: Población analizada por la PCR múltiple estandarizada para la detección de VIH-1. (n=60)

Sexo	PCR Positivo	PCR Negativo	TOTAL
Masculino	25	8	33 (55%)
Femenino	20	7	27 (45%)
Total	45 (75%)	15 (25%)	60 (100%)

5.2 Análisis estadístico de los factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR múltiple VIH-1 estandarizada.

En la tabla 8 se observan características de los niños analizados por la PCR múltiple estandarizada, donde tenemos el tipo de parto (vaginal o cesárea), si los niños recibieron o no lactancia materna, y por último si la madre recibió o no terapia antirretroviral durante el embarazo.

Para determinar si hay una correlación entre las variables, es decir si las variables son independientes o dependientes entre sí, se realizó una prueba de chi-cuadrado, donde se comparó el valor p con el nivel de significancia (denotado como α o alfa; $\alpha = 0.05$).

En relación al **tipo de parto**, 37 de 60 niños (62%) nacieron por parto vaginal de los cuales 31 de 37 (84%) estaban positivos por VIH-1, así mismo, 23 de 60 niños (38%) nacieron por cesárea, donde 14 de 23 niños (61%) nacidos por cesaría resultaron positivos por VIH-1. (Tabla 8)

Para determinar si existe una relación estadística entre el tipo de parto, y el resultado de la prueba. Se plantearon las siguientes Hipótesis:

H0: “El tipo de parto es independiente del resultado de la prueba”.

H1: “El tipo de parto depende el resultado de la prueba”.

Al realizar el estadístico encontramos que las diferencias son estadísticamente significativas, ya que el valor de $p= 0,0463 < \alpha =0.05$, por lo que se rechaza la hipótesis nula. Lo que indica que hay una relación entre el tipo de parto y el resultado del diagnóstico.

En relación al **tipo de alimentación** se pudo documentar que 29 de 60 niños (48%) recibieron lactancia materna y 31 de 60 niños (52%) no recibieron lactancia materna, es importante resaltar que 28 de los 29 niños (97%) que recibieron lactancia materna estaban positivos por VIH-1; y 17 de 31 niños (55%) que no recibieron lactancia materna eran positivos por VIH-1; así mismo 14 de 31 (45%) niños que no recibieron lactancia materna resultaron negativos por VIH-1. (Tabla 8)

Para determinar si existe una relación entre el tipo de alimentación que recibió el niño, y el y el resultado de la prueba. Se plantearon las siguientes Hipótesis:

H0: “El tipo de alimentación recibida es independiente del resultado de la prueba”.

H1: “El tipo de alimentación depende el resultado de la prueba”.

Al realizar el estadístico encontramos que las diferencias son estadísticamente significativas, ya que el valor de $p=0,0002 < \alpha =0.05$, por lo que se rechaza la Hipótesis nula. Lo que indica que hay una relación entre el tipo de alimentación que recibió el niño y el resultado del diagnóstico.

20 de 60 (33%) niños analizados por PCR-múltiple anidada estandarizada para VIH-1 sus **madres recibieron terapia antirretroviral (TAR) durante el embarazo**, donde 9 de los 20 niños (45%) estaban positivos por VIH-1; 40 de 60 niños (67%), sus madres no recibieron terapia antirretroviral, donde 36 de los 40 niños (90%) resultaron positivos para VIH-1. Así mismo 11 de 20 niños (55%) cuyas madres recibieron terapia antirretroviral (TAR) resultaron negativos por VIH-1. (Tabla 8)

Para determinar si existe una relación entre que las madres recibieran TAR durante el embarazo, y el resultado de la prueba. Se plantearon las siguientes hipótesis:

H0: “madres recibieron TAR durante el embarazo es independiente del resultado de la prueba”.

H1: “madres recibieron TAR durante el embarazo depende el resultado de la prueba”.

Al realizar el estadístico el valor de $p=0,0001 < \alpha =0.05$, por lo que se rechaza la hipótesis nula. Existen diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que si hay una relación entre las variables.

Tabla 8: Factores de transmisión materno infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR múltiple VIH-1 estandarizada.

Características		PCR Positivo	PCR Negativo	TOTAL
Tipo de parto	Vaginal	31/37 (84%)	6/37 (16%)	37 (62%)
	Cesárea	14/23 (61%)	9/23 (39%)	23 (38%)
Tipo de Alimentación	Recibió Lactancia materna	28/29 (97%)	1/29 (3%)	29 (48%)
	No recibió lactancia materna	17/31 (55%)	14/31 (45%)	31 (52%)
Madre terapia antirretroviral durante el embarazo	Recibió	9/20 (45%)	11/20 (55%)	20 (33%)
	No recibió	36/40 (90%)	4/40 (10%)	40 (67%)
Total		45 (75%)	15 (25%)	60 (100%)

Se encontró ADN proviral del VIH-1 en un 75% (45/60) de las muestras evaluadas, donde 35 pacientes tenían datos de carga viral, según los datos clínicos recopilados; de los cuales el 82,85% (29/35) mostraron elevados niveles de carga viral, mayor a >100.000 copias/ml (>5.0 log₁₀) como muestran los datos de la tabla 9, el resto de los pacientes (10/45) no tenían datos de carga viral.

Tabla 9: Datos de Cargas virales recopiladas de los pacientes positivos a la PCR Múltiple estandarizada.

CARGAS VIRALES ALTAS >100.000 copias/ml (5.0 log10)	29 (83%)
CARGAS VIRALES INTERMEDIAS de 100.000 a 10.000 copias/ml (5.0 log10-4.0 log10).	5 (14%)
CARGAS VIRALES BAJAS <10.000 copias/ml	1 (6%)
Total	35 (100%)

5.3 Análisis bioinformático de los “*primers*” empleados en la identificación de VIH-1

La especificidad de los cebadores se verificó mediante la realización de la BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para garantizar que los oligonucleótidos-primers seleccionados amplificará la secuencia diana en la región conservada del gen seleccionado de interés y asegurarse que no haya interacción con otros géneros o especies. Todos los oligonucleótidos empleados, produjeron un porcentaje de identidad (identity) y de cobertura de la secuencia diana (query coverage) del 100%. (Figura 6)

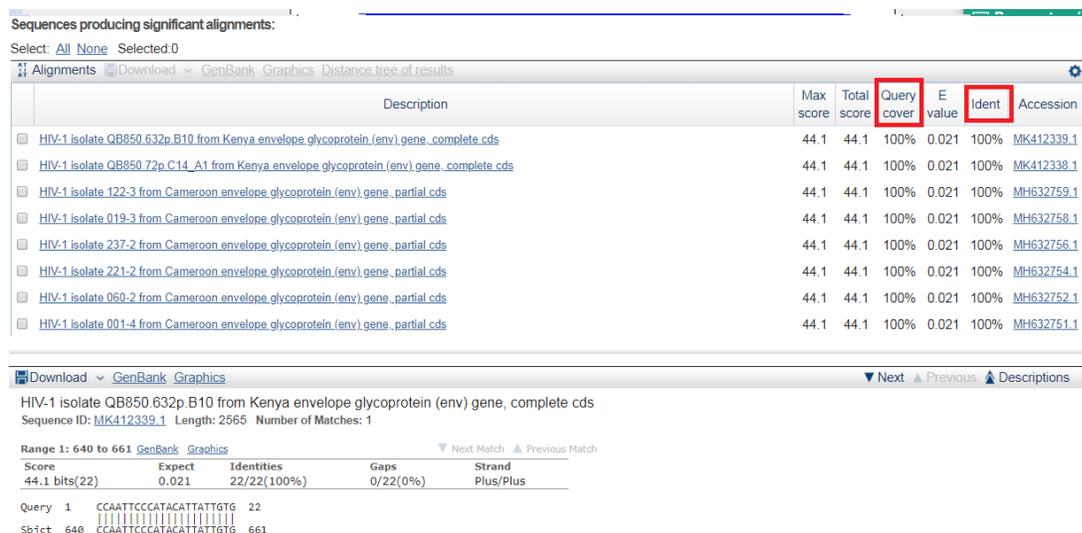


Figura 6: Blast de las secuencias correspondiente al primer E80 para la región *Env*.

Los iniciadores específicos se evaluaron mediante pruebas de PCR virtual o PCR in silico (Amplifx) para validar el tamaño del producto de amplificación. Se ingresa la secuencia consenso de VIH-1 (K03455.1 Human immunodeficiency virus type 1 (HXB2)) y los pares de primers para cada región. La evaluación in silico para la región *gag* resulto en el producto de amplificación de pares de base esperado para los cebadores (209pb) (Figura 7a); la amplificación in silico para la región *Env* mostro un producto de 337 pb. (Figura 7b).

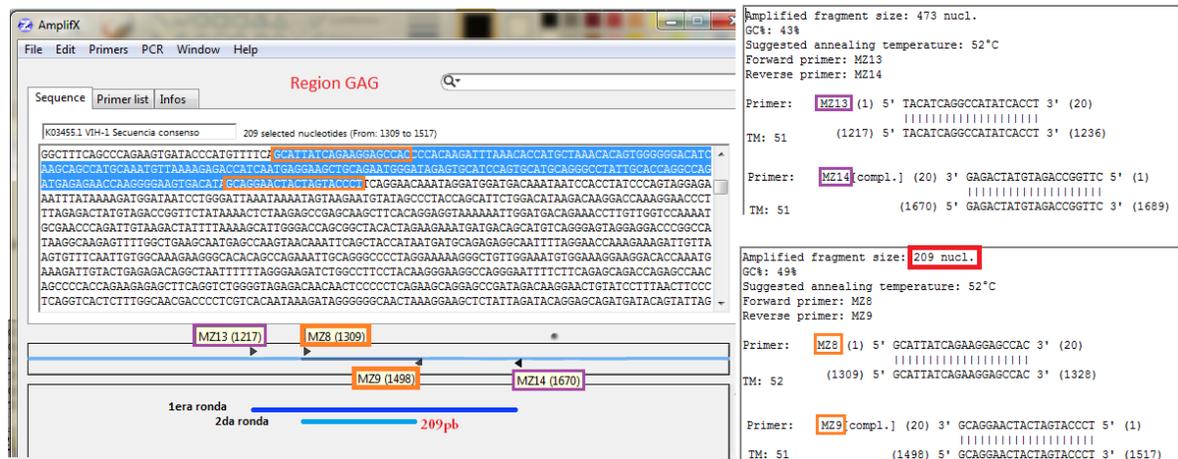


Figura 7a: PCR in silico (Amplifx) con iniciadores de la región *Gag*.

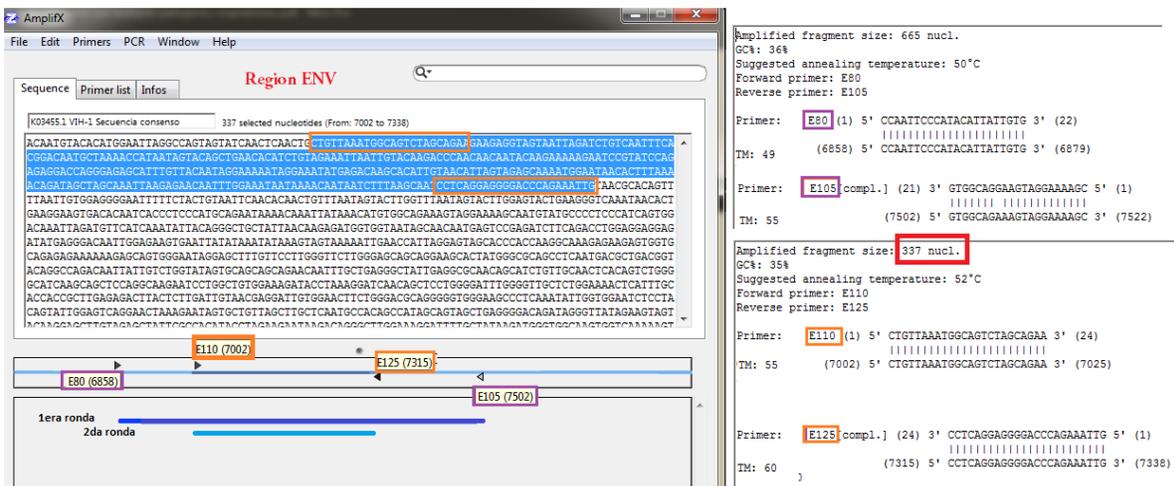


Figura 7b: PCR in silico (Amplifx) con iniciadores de la región *Env*.

5.4 PCR múltiple anidada para la detección de ADN proviral del VIH 1.

Comenzando con los parámetros indicados en la literatura (Zazzi 1992, D Ángelo y col 2007), mezcla de reacción de la PCR convencional para la región de *Env* (tabla 3), con un cambio en la concentración de los cebadores de *Gag* (0,5 μ L c/u (200nM)); y el programa de amplificación de la PCR convencional (tabla 4), se amplificó bajo estas condiciones iniciales la región de *Gag* y *Env* por separado.

Al realizar la PCR, la electroforesis reveló una banda de 209 pb (figura 8) producto de una correcta amplificación de la región de *gag*, así como una banda de 337pb, producto de la amplificación de la región de *Env*. (Figura 9)

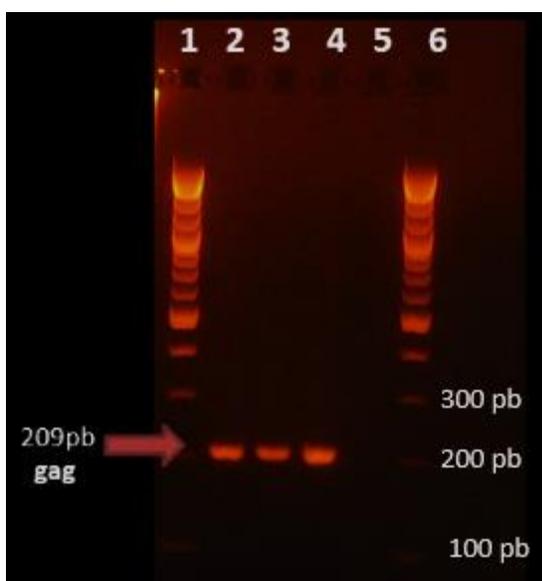


Figura 8: registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR región *gag*.

Carriles 2,3: Muestra 1, muestra 2.

Carril 4: control positivo.

Carril 5: control negativo

Carril 1 y 6: Marcador de peso molecular de 100 pb (resaltadas las bandas de 300, 200 y 100 pb)

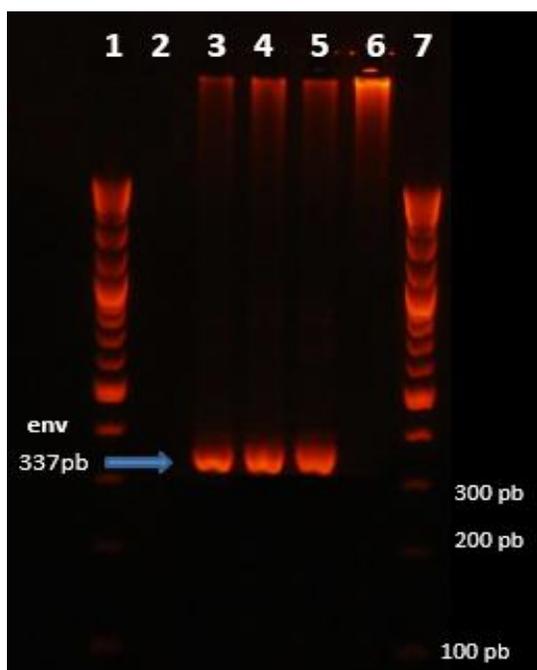


Figura 9: registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR región *Env*.

Carril 2: vacío.

Carriles 3,4: Muestra 1, muestra 2.

Carril 5: control positivo.

Carril 6: control negativo

Carril 1 y 7: Marcador de peso molecular de 100 pb (resaltadas las bandas de 300, 200 y100 pb)

Seguido se realizó una PCR con gradiente de temperatura con la finalidad de obtener una temperatura de alineación óptima para las dos regiones a amplificar, las temperaturas van desde los 60°C hasta los 50° (A, B, C, D, E, F, G, H) con las mismas condiciones de amplificación para la primera y segunda ronda, donde se incluyeron los cebadores para las dos regiones en una misma reacción.

En la figura 10 se puede observar que la temperatura óptima de alineamiento se encuentra entre las temperaturas E, F Y G (53,9; 52; 50,17), donde la temperatura E la banda es más intensa tanto para la amplificación de la región *gag* como para *Env*, tanto como para el gel A y el gel B.

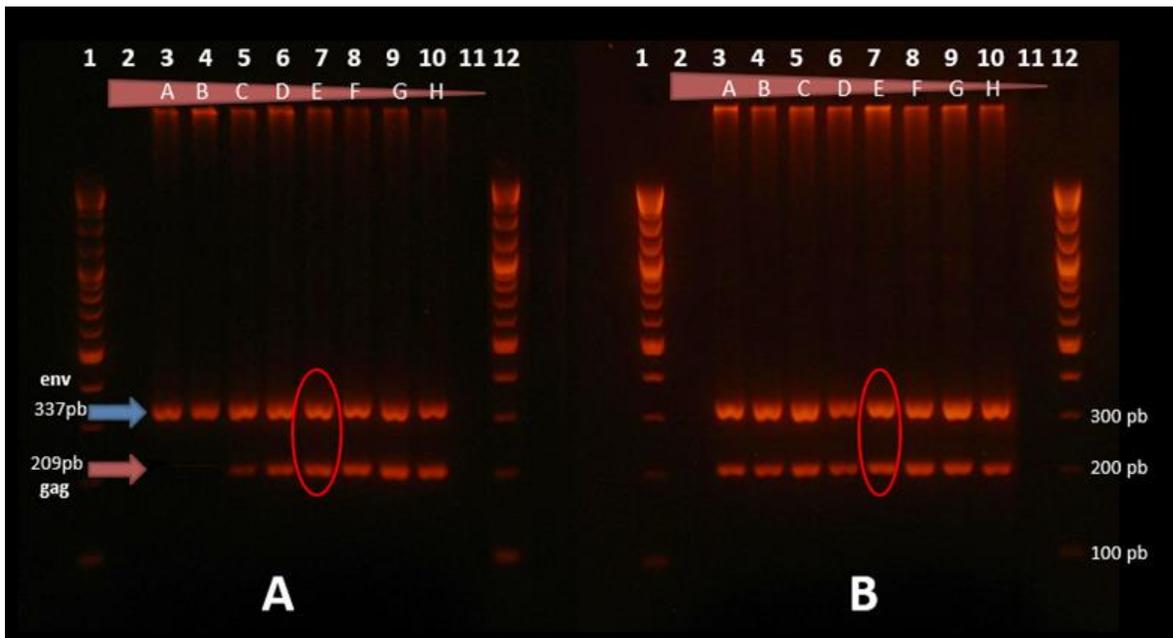


Figura 10: registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR múltiple con gradiente de temperatura. Gel A (Muestra 2) Gel B (Control +). Carriles 3 al 10: Gradiente de Temperatura, Carril 2 y 11: Vacío Carril 1 y 12: Marcador de peso molecular de 100 pb (resaltadas las bandas de 300, 200 y100 pb)

Por consiguiente, una vez determinada la temperatura de alineamiento óptimo para los dos cebadores, se optimizo el programa de amplificación, con una temperatura de alineación de **54°C** para las 2 rondas (tabla 10).

Tabla 10: Programa de amplificación optimizado para la PCR múltiple.

Paso	Primera ronda			Segunda ronda		
	Tiempo	Temp	Ciclos	Tiempo	Temp	Ciclos
Desnaturalización inicial	2 min	95°C	1	2 min	95°C	1
Desnaturalización	30seg	95°C	35	30seg	95°C	35
Hibridación	30seg	54°C		30seg	54°C	
Extensión	1min	72°C		1min	72°C	
Extensión final	7min	72°C	1	7min	72°C	1

Además, en la mezcla de reacción se agregó un control interno de b-globina, el cual constituye un control de calidad de una eficiente extracción de ácidos nucleicos y de que el DNA está en condiciones de amplificación. Al realizar la PCR múltiple estandarizada, la electroforesis reveló una banda de 209 pb y una banda de 337pb como se muestra en la figura 11, producto de la correcta amplificación de la región *gag* y *Env* respectivamente, así como también una banda intermedia de 268 pb correspondiente a la amplificación de la b-globina.

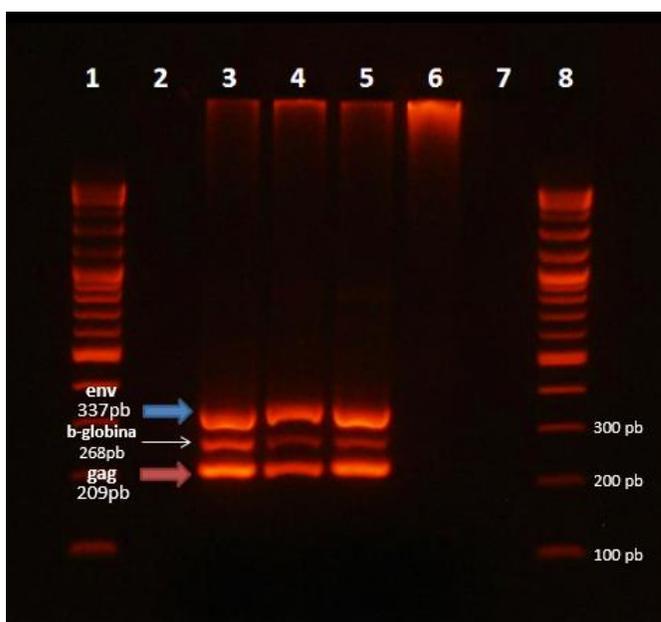


Figura 11: registro fotográfico de electroforesis en Gel de agarosa al 2%, Productos de amplificación PCR múltiple estandarizada.

Carriles 3 y 4: Pacientes positivos PCR convencional (Muestra 1, Muestra 2)

Carriles 5: Control positivo

Carril 6: Control negativo

Carril 2 y 7: Vacío

Carril 1 y 8: Marcador de peso molecular de 100 pb. (Resaltadas las bandas de 300, 200 y 100 pb)

Finalmente, la composición estandarizada de la mezcla de reacción consta de:

Tabla 11: Mezcla de reacción estandarizada de la PCR múltiple.

Reactivo (primera ronda)	Cantidad (μL)	Reactivo (segunda ronda)	Cantidad (μL)
Buffer 10x	5 μL	Buffer 10x	5 μL
MgCl₂ 25 mM	6 μL (3 mM)	MgCl₂ 25 mM	6 μL (3 mM)
dNTPs 10 mM	1 μL (200μM)	dNTPs 2.5 mM	1 μL (200μM)
cebadores: Región <i>gag</i> (MZ13, MZ14)	0,5 μL c/u (200nM)	cebadores: Región <i>gag</i> (MZ8, MZ9)	0,5 μL c/u (200nM)
cebadores: Región <i>env.</i> (E80, E105)	1 μL c/u (400nM)	cebadores: Región <i>env.</i> (E110, E125)	1 μL c/u (400nM)
		Beta globina (GH20, PC04)	0,5 μL c/u (200nM)
H₂O	29,75 μL	H₂O	31,75 μL
taq polimerasa 5 U/μL	0,25 μL (1,25 U/ 50μL)	taq polimerasa 5 U/μL	0,25 μL (1,25 U/ 50μL)
Extracto de ADN	5 μL	Extracto de ADN	2ul
Total	50 μL	Total	50 μL

5.5 Sensibilidad Analítica de la técnica de PCR múltiple estandarizada.

Se hicieron 5 diluciones 1:5, partiendo del valor inicial de carga viral 318.130cel/ml. Dichas diluciones fueron sometidas a amplificación empleando el protocolo de PCR múltiple estandarizado, encontrando que el límite de detección (valor hasta cuantas copias del virus puede llegar a detectar el método), donde se amplificaron las dos bandas se presentó en la dilución 1:125, que equivale a 2545 copias/ml, como muestra la figura 12.



Figura 12. Sensibilidad analítica de la PCR múltiple estandarizada. Carril 1-6: diluciones 1:1 a 1:50000. Carril 7: control positivo. Carril 8: control negativo. Carril 9: marcador de peso molecular.

5.6 Especificidad Analítica de la Técnica de PCR múltiple estandarizada.

Para evaluar la especificidad analítica del ensayo estandarizado, se usaron 15 muestras de pacientes infectados con VHB, VHC o CMV. Los resultados de la especificidad de la PCR múltiple no revelaron ninguna banda de amplificación cuando se analizó con muestras de pacientes positivos a otros virus, como muestra la figura 13.

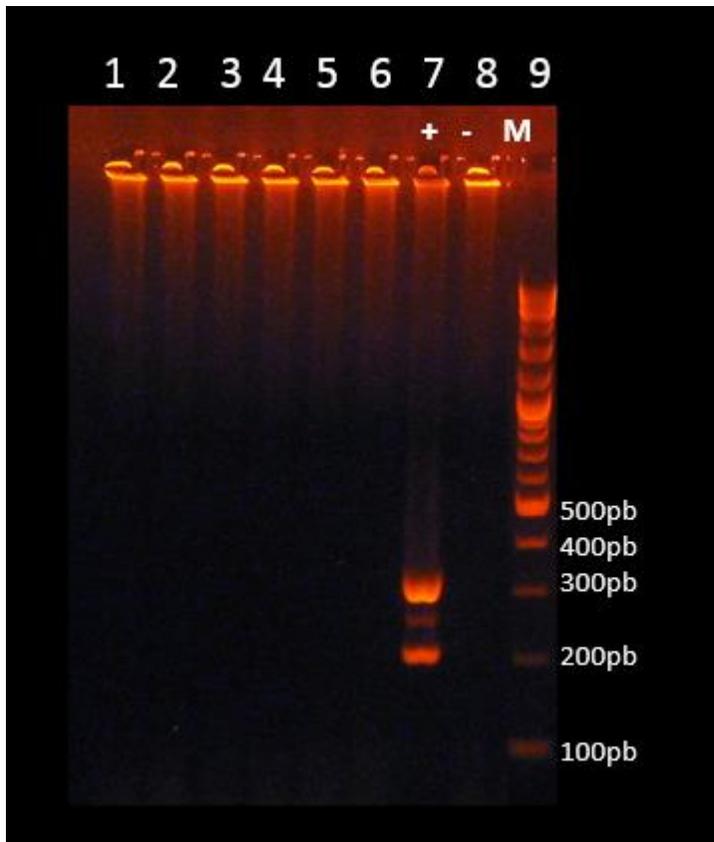


Figura 13. Especificidad analítica de la PCR múltiple estandarizada. Carril 1- 6: muestras de pacientes positivos a otros virus. Carril 7: control positivo. Carril 8: control negativo. Carril 9: marcador de peso molecular.

5.7 Sensibilidad y Especificidad Diagnostica de la Técnica de PCR múltiple estandarizada.

Para validar la capacidad predictiva de las pruebas de detección se midió sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo. Estas variables se evaluaron mediante los procedimientos tradicionales utilizando tablas de contingencia, donde se consideró a la prueba de PCR convencional del “laboratorio de Hepatitis y Sida” como estándar de referencia.

Tabla 12: resultados de la PCR múltiple comparada con PCR convencional del laboratorio usada como estándar de referencia (n=60)

		Referencia. PCR convencional del laboratorio.		Total	
		Positivos	Negativos		
Prueba PCR múltiple anidada estandarizada	Positivos	44	1	45	Verdadero Positivo
	Negativos	0	15	15	Verdadero Negativo
Total		44	16	60	Falso Positivo
					Falso Negativo

Tabla 13: valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la PCR múltiple estandarizada.

Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Eficacia	kappa
100 %	93,75 %	97,78 %	100 %	98,33 %	0,96
					Muy bueno

La tabla 12 y 13 resume los datos obtenidos en la PCR, donde se observa una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93,75%, y Kappa de Cohen de 0,96, lo que indica que existe una excelente concordancia entre las dos pruebas. Con un valor predictivo positivo de 97.78% y un valor predictivo negativo de 100%, igualmente eficacia de 98,33%.

6. DISCUSIÓN

La infección por el VIH y el SIDA, se han podido conocer, seguir, y controlar, gracias a la disponibilidad de pruebas diagnósticas. Una prueba diagnóstica en un individuo infectado puede significar una mejora en la calidad de vida y muchos años de vida ganados, al mismo tiempo que permitirá evitar nuevas infecciones. (Ospina 2006)

Durante la última década, siempre se ha alcanzado establecer un diagnóstico rápido, sensible y fiable de los agentes causales de las enfermedades infecciosas. La aplicación de técnicas microbiológicas y bioquímicas convencionales, ha pasado a ser complementada con la aplicación de métodos moleculares de diagnóstico. En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más sensible y la que se aplica más satisfactoriamente en el diagnóstico clínico. (Méndez y Pérez 2004)

Los ensayos serológicos no permiten el diagnóstico precoz de la infección por VIH-1 debido a la persistencia de anticuerpos maternos contra el VIH-1 en lactantes durante los primeros 12-18 meses de vida, por esto la utilidad de las pruebas virológicas como la PCR para el diagnóstico de VIH-1. La OMS recomienda el uso de pruebas virológicas de base molecular para determinar el estado de infección para los bebés expuestos al VIH-1 durante las primeras 4-6 semanas de vida o lo antes posible.

6.1 Estandarización de la PCR múltiple anidada para la detección VIH a partir de ADN proviral.

El procedimiento estandarizado se basa en los iniciadores descritos en el protocolo de D Ángelo y otros 2007 para la región *env* usados en la PCR convencional del laboratorio y los iniciadores descritos por Zazzi 1992 para la región de *gag*. La PCR múltiple anidada estandarizada usa iniciadores altamente conservados de las regiones genéticas de *Gag* y la región *Env* del VIH-1. Esta técnica incrementa la sensibilidad, por tratarse de dos regiones amplificadas y también incrementa la especificidad ya que la segunda PCR solo amplificara si la primera fue correcta.

La PCR múltiple tiene como objetivo amplificar simultáneamente diferentes secuencias blanco, por lo que requiere que los reactivos y el programa de amplificación utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada región diana y no inhibir la de las

demás, por lo que algunos parámetros, como la concentración de sales y cebadores, y la cantidad de ADN polimerasa, concentración de magnesio y primers, pueden ajustarse experimentalmente.

La selección de los primers es uno de los pasos más importantes en la estandarización de la PCR múltiple. Para la optimización de la PCR múltiple se evaluaron los cebadores para la amplificación génica de la región *Gag* y *Env* del VIH, que se han utilizado en PCR en formatos convencionales con buenas sensibilidad y especificidad (Zazzi 1992, D'Ángelo y col 2007).

El análisis, verificación y validación *in silico* de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR, a través de algoritmos computacionales, es una alternativa que permite a los investigadores aceptar o rechazar los pares de cebadores potenciales para la PCR experimental *in vitro* sin desperdiciar ningún producto químico, así como el costo relacionado. (Orozco y otros 2016).

Por tanto, uno de los objetivos de esta investigación fue evaluar la especificidad de los primers empleados para la detección y amplificación del gen *gag* y *Env* de VIH-1. El análisis bioinformático de las secuencias indicó que los cebadores presentaron alineamientos con el blanco correspondiente a estudiar y se corroboró la especificidad (100%) de las secuencias con VIH-1 sin interferencia ni reacciones cruzadas con otros virus. (Ver figura 5).

Con el fin de asegurar que cada par de cebadores amplificará la secuencia diana en la región conservada del gen seleccionado y predecir el resultado del producto de amplificación y sus secuencias de ADN, se realizó el análisis de PCR *in silico* al ingresar la secuencia consenso del VIH-1 (K03455.1 Human immunodeficiency virus type 1 (HXB2) y alinear con los primers, mostrando la amplificación de una banda de 209pb y 337pb (Ver Figura 6a y 6b) indicativa de amplificación del gen *gag* y *Env*, coherente con el tamaño del producto de amplificación esperado (Ver Tabla 2).

Por los resultados obtenidos en el análisis bioinformático, se puede inferir que los cebadores son muy específicos en relación con sus objetivos respectivos como se confirmó a partir de los resultados BLAST y PCR *in silico*, en general los datos obtenidos demostraron que todos los cebadores pueden ser utilizados en una reacción múltiple.

Al emplear diferentes juegos de primers es necesario considerar algunas condiciones en la escogencia de cebadores, es importante que no interactúen entre ellos mismos, que todos tengan una temperatura de hibridación similar y que cada par de cebadores amplifique productos de

tamaños lo suficientemente diferentes como para poder ser separados y diferenciados (Rubio y col 2011; Méndez & Pérez, 2004).

El principal cambio en el proceso de estandarización, estuvo relacionado con el cambio de temperatura de alineación. Con la finalidad de evaluar las condiciones óptimas para la PCR múltiple, se realizó una PCR con gradiente de temperatura de alineamiento (figura 9), con el objetivo de obtener una temperatura de alineación óptima para las dos regiones.

La especificidad de la PCR depende de la temperatura empleada en la fase de hibridación. Si la temperatura de alineamiento es demasiado baja, entonces se podrían generar productos de amplificación inespecíficos, afectando la especificidad, observándose en los geles múltiples bandas que no corresponden al producto esperado. Cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde; en condiciones de temperaturas de hibridación elevadas el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Pero si la temperatura es muy alta, el rendimiento del producto deseado y a veces la pureza se reduce debido a la pobre hibridación de los cebadores, disminuyendo la sensibilidad de la PCR. (McPherson y otros 1991).

Considerando esto se estableció que la temperatura óptima para los juegos de cebadores de las dos regiones de interés es de 54°C (E), a temperaturas muy elevadas las bandas son más tenues y se dejan de visualizar los productos, y a temperaturas muy bajas empiezan a aparecer bandas inespecíficas. (Figura 9).

Finalmente, la composición estandarizada de la mezcla de reacción y los cambios en la temperatura de alineamiento del programa, al realizar la PCR, la electroforesis reveló una banda de 209 pb correspondiente a la región *gag*, y una banda de 337pb correspondiente a la región *Env* (figura 10), revelando así la especificidad de la técnica para detectar VIH-1 como se esperaba y reportan (Zazzi 1992, D Ángelo y col 2007) coincidiendo con los resultados del BLAST (Figura 5)

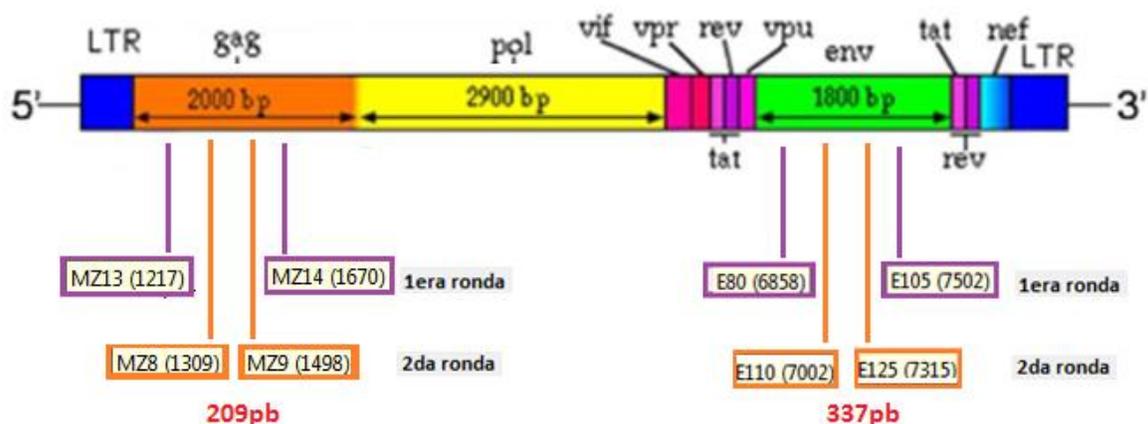


Figura 14. Diagrama de las posiciones de los amplicones de la PCR en relación con el genoma del VIH-1.

Además, se obtuvo una exitosa amplificación de una banda de 268 pb correspondiente al control de β -globina en cada una de las muestras y control positivo (figura 10). La amplificación del gen de la β -globina humana, es un control interno de la PCR, es un marcador excelente de eficiencia de amplificación y procesamiento de la extracción del ADN, además mediante esta amplificación se puede comprobar la ausencia de inhibidores e integridad del ADN. (Coutlée y otros 1995).

6.2 Sensibilidad y Especificidad analítica de la PCR múltiple anidada para la detección del VIH-a partir de ADN proviral.

La sensibilidad analítica del ensayo o límite de detección (valor hasta cuantas copias del virus puede llegar a detectar el método), se encontró que la PCR múltiple estandarizada es confiable hasta la detección de 2545 copias/ml, lo que sugiere que es apropiado para el diagnóstico temprano de la infección por VIH-1.

Del total de las muestras evaluadas de pacientes positivos al VIH-1, el 82,85% (29/35) mostraron elevados niveles de carga viral, mayor a >100.000 copias/ml (>5.0 log₁₀). Generalmente los niños con infección no tratada por VIH presentan cargas virales extremadamente altas (mayores a 100.000 copias/mL). (Reyes y otros 2018).

La especificidad analítica es la capacidad de los cebadores de amplificar exclusivamente el gen de interés, se evalúa analizando si existe una posible reacción cruzada con muestras de pacientes positivos a otros virus. Los resultados de la PCR múltiple estandarizada no revelaron ninguna banda de amplificación cuando se analizó con muestras de pacientes positivos a otros virus.

Martin y otros en el 2017, evaluaron la especificidad analítica de una técnica para el diagnóstico de VIH en infantes, donde usaron muestras de pacientes infectados con VHB, VHC o CMV y dieron resultados negativos de amplificación.

Otra forma de corroborar esto es con los resultados del análisis bioinformático, donde se pudo observar que los cebadores presentaron alineamientos con el blanco correspondiente a estudiar y con especificidad (100%) de las secuencias con VIH-1.

6.3 Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la PCR múltiple anidada para la detección del VIH-1 a partir de ADN proviral.

Aunque las pruebas serológicas identifican la mayoría de los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de cebadores de las regiones conservadas del genoma del VIH-1, proporciona información útil en situaciones clínicas específicas, especialmente en niños menores a 18 meses,

Según varios autores, la sensibilidad de la PCR puede aumentarse con el uso de más de un par de cebadores, igualmente el uso de cebadores anidados aumenta la especificidad de la PCR (Albert y Fenyo 1990; Coutlée y otros 1995, Vázquez y otros 2004, Kairiyama y otros 2007,).

Numerosos autores han evaluado la sensibilidad y especificidad de los ensayos de ADN del VIH-1 para el diagnóstico de infección por VIH-1 en lactantes y niños pequeños, con estimaciones tan altas como 90% a 100% por 1 mes de edad. (Kline y otros 1994, Bremer y otros 1996, Cunningham y otros 1999, Lambert y otros 2003, Read S. 2017)

Aulicino y otros en el 2006, desarrollaron una PCR múltiple anidada artesanal (nPCR), usada para el diagnóstico temprano de la infección por HIV-1 , amplificaron fragmentos de las regiones *gag* y *env* del HIV-1 junto con un control interno de β -actina, donde obtuvieron una especificidad de 100% y una sensibilidad de 99.2%. Igualmente Basualdo y otros en el 2004, evaluaron la sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa, con iniciadores para una

región altamente conservada del gen gag demostró tener sensibilidad de 98.3% y especificidad de 100%.

Los datos de sensibilidad y especificidad (100% y 93,75% respectivamente) obtenidos en la prueba de PCR múltiple estandarizada (tabla 13) son similares a los obtenidos en estudios previos. Los datos de este estudio muestran que la PCR es muy sensible y muy específica en el diagnóstico de VIH-1 en niños menores de 24 meses de edad.

La sensibilidad de las pruebas virológicas es menor en las primeras semanas de vida, y puede resultar en falsos negativos, es muy importante tener en cuenta que el no poder detectar el virus no excluye la infección en el niño, ya que se ha demostrado que, si la infección se adquirió en el momento del parto o después del parto el número de células infectadas puede ser muy reducido y estar por debajo de los límites de detección, de la PCR. La sensibilidad aumenta con el aumento de la edad del bebé, (40% durante la 1ª semana de vida, aumentando la sensibilidad al 96% con especificidad del 99% a partir del mes). (Bremer y otros 1996, Basualdo y otros 2004, Gonzales y otros 2015, Abdollahi y Saffar en 2016, Read S. 2017)

Para aumentar la sensibilidad en las primeras semanas de vida y aumentar la posibilidad de detectar la infección del VIH en forma temprana, minimizando el riesgo de falsos negativos se deben utilizar oligonucleótidos para diferentes regiones de VIH y siempre seleccionado las regiones más conservadas. (Muñoz 1998, Rivera y Murillo 2003, D Ángelo y otros 2007, castro y otros 2015).

A pesar de que la PCR tiene una sensibilidad y especificidad alta, se recomienda no utilizar la PCR como único ensayo diagnóstico, es necesario confirmar un resultado positivo con una nueva muestra, tener mucho cuidado en la interpretación de los resultados en los recién nacidos y evaluar los hallazgos clínicos, sobre todo en las primeras semanas de vida del niño. No es conveniente dar un diagnóstico final de no-infección mientras no hayan desaparecido los anticuerpos maternos tipo IgG lo cual ocurre en la mayoría de los casos entre los 12 y 18 meses de vida.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un diagnóstico de VIH sistemático a todos los niños expuestos al VIH- 1, se realicen dentro de los primeros 14 días de vida, de 1 a 2 meses de edad y de 3 a 6 meses de edad, con pruebas virológicas que tengan una sensibilidad de al menos, el 95%. (Gonzales y otros 2015, Read S. 2017)

6.4 Factores de transmisión materna infantil del VIH-1 presentados en la población analizada por la PCR Múltiple estandarizada.

Se han identificado diversos factores relacionados con la transmisión de VIH. Entre los factores maternos se reconoce la adquisición del virus antes o después del parto, el estado clínico de la madre, tipo de parto, siendo el parto vía vaginal el que presenta una mayor exposición al riesgo de transmisión de VIH, si la madre recibe tratamiento antirretroviral y si el diagnóstico de infección por VIH fue antes o durante el embarazo. (Cortes y otros 2006)

El parto es el período en el que se producen la mayor parte de los casos de transmisión vertical (70% de los casos), El VIH está presente en las secreciones y en la sangre que el niño encuentra a su paso en el canal vaginal; el contacto con estas sustancias, su aspiración y deglución pueden ser determinantes en la adquisición de la infección. La tasa de transmisión de VIH esta entre un 24-27% para niños que tuvieron parto vía vaginal. (Sopera S 1997)

Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0463$), entre los resultados de los niños que nacieron por parto vaginal y son positivos al VIH-1, 31 de 37 niños (84%) y los niños que nacieron por cesárea y son positivos, 14 de 23 niños (61%). Varios estudios han mostrado una reducción del 30 al 51 % del riesgo de transmisión del VIH-1 a los niños nacidos mediante cesárea (Sopera S 1997)

La lactancia materna puede ser responsable de uno entre un tercio y la mitad de las infecciones por VIH en bebés cuando las intervenciones no están disponibles. La tasa de transmisión de **lactancia materna** por una madre infectada aumenta el riesgo en un 5–20% a un total de 20 a 45% si se prolonga la lactancia. Algunos autores postulan que el riesgo más alto de transmisión de VIH es entre el primer y quinto mes de vida, los recién nacidos que nacían sin el virus de VIH y que recibían lactancia materna de madres seropositivas tienen un riesgo de un 10.3% de contraer el virus. El riesgo de transmisión de madre a hijo aumenta si una madre que está amamantando está recién infectada, debido a los niveles inicialmente altos de virus. Se aconseja el reemplazo de la lactancia materna por otras formas de alimentación. (The european collaborative study 1988, Newell ML. 2004, Torres y otros 2010)

Se observó una diferencia significativa ($p=0,0002$) entre los resultados de positividad, donde 28 de los 29 niños (97%) recibieron lactancia materna, y 17 de 31 niños (55%) no recibieron lactancia materna; esto concuerda con lo explicado anteriormente, un buen número de casos de la

transmisión vertical del VIH-1 se deben a la lactancia materna. Torres y otros en el 2010, confirmaron que la administración de leche artificial o leche de vaca desde el nacimiento se asoció con una menor incidencia de transmisión del VIH en comparación con la lactancia materna. (Torres y otros 2010)

Se han estudiado muchas medidas para prevenir la transmisión vertical, entre ellas el uso de terapias farmacológicas, que consiste en administrar un medicamento **antirretroviral a las madres** y al recién nacido; cabe destacar que la terapia antirretroviral (TAR) es un factor importante en la prevención de la TV ya que reduce en un 40%-50% el riesgo de transmisión. (Torres y otros 2010)

La Monoterapia con zidovudina durante el segundo y Tercer trimestre del embarazo, por vía intravenosa durante parto y para el bebé durante seis semanas reduce sustancialmente el riesgo en una población que no está amamantando. (Newell ML. 2004). Actualmente se están ensayando tratamientos antivirales más eficaces para disminuir la carga viral y mejorar la situación inmunológica de la madre. La combinación de AZT más Lamivudina y un inhibidor de las proteasas (triple terapia), puede disminuir la tasa de transmisión del VIH desde la madre al hijo al 2%. (Sopera S 1997).

Se observó una proporción estadísticamente más baja de bebés VIH-1 positivos cuyas madres recibieron TAR durante el embarazo, es decir 9 de 20 niños (45%), en contraste con la encontrada entre los hijos de madres que no recibieron TAR, 36 de los 40 niños (95%), diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0001$). Este es un resultado esperado y solo demuestra la eficacia de la terapia antirretroviral en la prevención vertical del VIH-1.

La introducción del tratamiento antirretroviral y la implementación de las diferentes medidas preventivas de la transmisión vertical (cesárea electiva en casos seleccionados, lactancia artificial, profilaxis intraparto, tratamiento del recién nacido) ha reducido la tasa de TV del VIH a cifras inferiores al 2%, si se aplican las distintas medidas de forma óptima. (Newell ML 2004, Medicina fetal Barcelona 2017).

Se logró estandarizar una técnica de PCR Múltiple rápida y confiable, con menos gastos de reactivos, para su aplicación en el diagnóstico clínico lo que permitirá optimizar los protocolos de detección del VIH-1, con esto se corroboró la utilidad de la PCR como herramienta molecular en el diagnóstico oportuno de la infección perinatal por el VIH-1. El diagnóstico temprano de la

infección en el recién nacido es muy importante para el manejo clínico, para el inicio de una terapia antirretroviral lo más pronto posible, así como para la profilaxis de infecciones oportunistas.

7. CONCLUSIONES

1. Por los resultados obtenidos en el análisis bioinformático, se puede inferir que los cebadores son muy específicos en relación con sus objetivos respectivos como se confirmó a partir de los resultados BLAST y PCR in silico, en general los datos obtenidos demostraron que todos los cebadores pueden ser utilizados en una reacción múltiple.
2. Se logró estandarizar una técnica de PCR múltiple anidada para la detección de VIH-1, amplificando las regiones génicas conservadas *Env* (337pb) y *Gag* (209), con la adición de un control de b-globina (268pb).
3. El límite de detección (valor hasta cuantas copias del virus puede llegar a detectar el método), se presentó en la dilución 1:125, que equivale a 2545 copias/ml.
4. Los resultados de la especificidad de la PCR múltiple no revelaron ninguna banda de amplificación cuando se analizó con muestras de pacientes positivos a otros virus.
5. La sensibilidad y especificidad diagnóstica de la PCR múltiple estandarizada fue de 100% y 93,75% respectivamente, con un Kappa de Cohen de 0,96.
6. Se encontró que existe una relación estadísticamente significativa entre los Factores de transmisión materna infantil del VIH-1 y los resultados obtenidos por la PCR Múltiple estandarizada para la detección de VIH-1.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdollahi, A. y Saffar, H. 2016. El diagnóstico de la infección por VIH en lactantes y niños. *Revista iraní de patología*. **11 (2)**: 89–96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4939637/>. (Consultado 6 de Julio de 2019)

Albert, J., Fenyo, E. 1990. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal of clinical microbiology*. **28**: 1560-4. https://www.researchgate.net/publication/20776471_Simple_sensitive_and_specific_detection_of_human_immunodeficiency_virus_type_1_in_clinical_specimens_by_polymerase_chain_reaction_with_nested_primers. (Consultado 11 de mayo de 2018)

Altman, D., Bland, J. 1994. Statistics note, diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *British Medical Journal*, **308**: 1552. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x>. (Consultado 11 de mayo de 2018)

Álvarez, R. 2017. Interpretación de las pruebas usadas para diagnosticar la infección por virus de la inmunodeficiencia humana. *Acta Med Peru*, **34(4)**:309-16. <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v34n4/a09v34n4.pdf> (consultado 15 de abril de 2018)

Ameli, G., Gutiérrez, C., D'Angelo, P., Rangel, H. 2013. Optimización de la técnica de PCR reversa para la detección del VIH en plasma de pacientes infectados. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **33(2)**: 157-161. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000200013&lng=es&tlng=es. (Consultado 3 de mayo de 2018)

Assih, M., Feteke, L., Bisseye, C., Ouermi, D., Djigma, F., Karou, S., Simpoire J. 2016. Molecular diagnosis of the human immunodeficiency, Hepatitis B and C viruses among blood donors in Lomé (Togo) by multiple real time PCR. *Pan African Medical Journal*. **25**:242. <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/25/242/full/#ref9> (consultado 1 de mayo de 2018)

Aulicino, P., Gómez, M., Kopka, J., Mangano, A., Ovejero, M., Sen, L. 2006. Hiv-1 genetic diversity in Argentina and early diagnosis of perinatal infection. *Medicina (Buenos Aires)*, **66(4)**, 319-326. De http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802006000400006&lng=es&tlng=en. (Consultado 2 de mayo de 2018)

Basualdo, Ma y col. 2004. Detección de anticuerpos IgA y PCR como primeras opciones en el diagnóstico de infección perinatal por el VIH-1. *Salud pública Méx.* 46(1): 49-55. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342004000100007.

(Consultado 1 de diciembre de 2018)

Bolívar, A., Rojas, A., García, P. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina.* **3(1):** 25-33. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>. (Consultado 1 de mayo de 2018)

Bremer JW, Lew JF, Cooper E, et al. 1996. Diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 by a DNA polymerase chain reaction assay among infants enrolled in the Women and Infants Transmission Study. *J Pediatr.* **129:198–** 207. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8765616> (consultado 11 de julio de 2019)

Cappy P., De Oliveira F., Gueudin M., Alessandri-Gradt E., Plantier JC. 2016. A Múltiple PCR Approach for Detecting Dual Infections and Recombinants Involving Major HIV Variants. *Journal of Clinical Microbiology.* **54 (5)** 1282-128. <http://jcm.asm.org/content/54/5/1282.long> (consultado 1 de mayo de 2018)

Castro, G., Sosa M., Gallego S., Sicilia P, Marin Á., Altamirano N., Kademian S., y otros. 2015. Implementación del ensayo de carga viral COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0 para el diagnóstico de la infección congénita por HIV-1. *Revista Argentina de Microbiología;* **47(1):**57-61. <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-implementacion-del-ensayo-carga-viral-S0325754115000024> (consultado 3 de mayo de 2018)

Chávez, E., Castillo, R. 2013. Revisión bibliográfica sobre VIH/sida. *Multimed;* **17(4):** 1-25. <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53868>. (Consultado 3 de mayo de 2018)

Codina, C; Martin M; Ibarra O. 2002. Cap. 21: la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Farmacía Hospitalaria.* **2,** 1493. http://www.sld.cu/galerias/pdf/servicios/sida/tomo2_cap21.pdf (consultado 1 de mayo de 2018)

Cordeiro, R., Taroco, H., 2006. Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la república, facultad de medicina, instituto de higiene. Oficina del libro FEFMUR, Uruguay. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/cefaed2006.html>. (Consultado 3 de mayo de 2018)

Cortés V., Pérez J., Ferrer L., Cianelli, R., & Cabieses, B. 2006. Lactancia Materna y VIH/SIDA [HIV/AIDS and Breastfeeding]. *Revista chilena de nutrición: órgano oficial de la Sociedad Chilena*

de Nutrición, Bromatología y Toxicología. **33 (2):** 334–341.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2799936/> (consultado 11 de Agosto de 2019)

Coutlée F., He Y., Saint-Antoine P., Clément O., Kessous A. 1995. Coamplification of HIV Type 1 and β -Globin, Kessousequences in a Nonisotopic Polymerase Chain Reaction Assay to Control for Amplification Efficiency. *Aids research and human retroviruses*, 11 (3): 363- 371.
<https://doi.org/10.1089/aid.1995.11.363> (consultado 3 de mayo de 2018)

Cunningham C., Charbonneau T., Song K., et al. 1999. Comparison of human immunodeficiency virus 1 DNA polymerase chain reaction and qualitative and quantitative RNA polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus 1-exposed infants. *Pediatr Infect Dis J.* **18**:30– 35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951977> (consultado 1 de Agosto de 2019)

D Angelo, P., Ameli, G., Gutiérrez, C. (2007). Detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante la PCR, en neonatos de madres seropositivas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **27(2)** 79-84.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000200005&lng=es&tlng=es. (Consultado 28 de abril de 2018)

Delgado R. 2010. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **29**:58-65.
<http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-caracteristicas-viologicas-del-vih-S0213005X10004040> (consultado 28 de abril de 2018)

Donis, J. 2012. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avances en Biomedicina*, **2 (1)**. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331328015005>. (Consultado 28 de abril de 2018)

Dybul M., Fauci A., Bartlett J., Kaplan J., Pau A. 2002. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. *Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV. Ann Intern Med.* **137(5 Pt 2)**:381-433.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12617573?dopt=Abstract>. (Consultado 4 de mayo de 2018)

Elnifro, E., Ashshi, A., Cooper, R., Klapper, P. 2000. Múltiple PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* **13(4)**:559-70
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023957>. (Consultado 4 de mayo de 2018)

Fearon, M. 2005. The laboratory diagnosis of HIV infections. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, **16(1)**, 26–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095005/> (consultado 4 de mayo de 2018)

García F., Álvarez M., Bernal C., Chueca N., Guillot V. (2010) Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **29**:297-307. <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-diagnostico-laboratorio-infeccion-por-el-S0213005X10004994>. (Consultado 27 de Abril de 2018)

Gopinath K. y Singh S. 2008. Múltiple PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium complexes and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. *Journal of Applied Microbiology*. **107(2)**:425-435. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.2009.04218.x> (consultado 27 de Abril de 2018)

González M; Navarro M; Noguera A; Ramos J; Polo R; Holguín A. 2015. Recomendaciones para el cribado de la infección VIH del niño hijo de madre infectada con posibilidad de adopción. *Sociedad española de infectología pediátrica*. https://www.msbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/publicaciones/profSanitarios/DocAdopcionSEIP_SPNS.pdf.

Gueudin M, Leoz M, Lemée V, De Oliveira F, Vessièrre A, Kfutwah A, Plantier JC. 2011. A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar; **50(3)**:831-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170927> (consultado 8 enero de 2019)

Guía de tratamiento antirretroviral para pacientes con VIH y SIDA en Venezuela. Quita edición. Programa nacional de Sida, Ministerio del poder popular para la salud. 2014-2016

Hernández M. 2011. Virus de Inmunodeficiencia Humana. *BOTICA*. **8**. <http://botica.com.ve/PDF/botica8.pdf> (consultado 27 de abril de 2018)

Heyndrickx L, Janssen W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G et al. 2000. Simplified strategy for detection of recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Isolates by *gag/env* Heteroduplex Mobility Assay. *J Virol*; **74**: 363-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590125> (consultado 3 de mayo de 2018)

Kairiyama, C., Benhaim, M., Buresti, P., Citatti, S., Pengue, C; Perroni, N., Pittaluga, S., Tonelli, M. (2007). Detección de VIH proviral por nested-PCR utilizando metodología casera (in house). *Bioquímica y Patología Clínica*. **71** (1) 49-53. http://www.academia.edu/29178887/Redalyc_Sistema_de_Informaci%C3%B3n_Cient%C3%ADfica. (Consultado 4 de mayo de 2018)

Kline, W., Lewis, E., Hollinger, B., Reuben, M., Hanson, C., Kozinetz, A., Shearer, T. 1994. A comparative study of human immunodeficiency virus culture, polymerase chain reaction and anti-human immunodeficiency virus immunoglobulin an antibody detection in the diagnosis during early infancy of vertically acquired human immunodeficiency virus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. **13(2)**: 90–93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8190557> (Consultado 11 de Agosto de 2019)

Lambert JS, Harris DR, Stiehm ER, et al. 2003. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Snyder*. **34**: 512– 519. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657763> (consultado 11 de julio de 2019)

Llano A. 2004. Factores del huésped que afecta la progresión del VIH. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. Barcelona, España. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3756/alm1de1.pdf> (consultado 27 de abril de 2018)

Locateli, D., Stoco, P., Zanetti, C., Pinto, A., & Grisard, E. 2008. An optimized nested polymerase chain reaction (PCR) approach allows detection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env and gag genes from clinical samples. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **22(2)**: 106–113. <https://scihub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348315>. (Consultado 11 de Agosto de 2019)

Lorenzana I. y Murillo W. 2003 Aplicación del PCR-ADN en el diagnóstico de la infección por VIH-1 en infantes. *RevMed Hondur*; **71(3)**: 123-130. <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2003/pdf/Vol71-3-2003-3.pdf>. (Consultado 1 de mayo de 2018)

Lorenzana I., y Murillo W. 2003. Aplicación del PCR-ADN en el diagnóstico de la infección por VIH-1 en infantes. *Rev. Med Hond.* **71**:123-130. <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2003/pdf/Vol71-3-2003-3.pdf> (consultado 11 de Agosto de 2019)

Marcos, P., Huaranga, M., Rojas, N., Gutierrez, V., Ruiton, S., Gallardo, E., Achata, J., Galarza, M. (2017). Detección de virus influenza A, B y subtipos A (H1N1) pdm09, A (H3N2) por múltiple RT-PCR en muestras clínicas. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, **34(2)**: 192-200. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2054>. (Consultado 27 de abril de 2018)

Más, M et al. 2013. Transmisión vertical del virus de la inmunodeficiencia humana: seguimiento de los hijos de mujeres con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en una institución de asistencia médica colectiva; Uruguay (2008-2011). *Revista Médica del Uruguay*. **29(4)**: 232-236. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902013000400005&lng=en&tlng=es. (Consultado 27 de septiembre de 2019)

Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany M. 2002. Múltiple Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **16**:47-51. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcla.2058>. (Consultado 25 de abril de 2018)

Maroto C., Bernal C., García F. 2000, Diagnóstico y tratamiento de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Clínico San Cecilio. Granada. España. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/Vih-2.pdf> (consultado 3 de mayo de 2018)

Martin, F., Palladino, C., Mateus, R., Bolzan, A., Gomes, P., Brito, J., Taveira, N. 2017. Early infant diagnosis of HIV-1 infection in Luanda, Angola, using a new DNA PCR assay and dried blood spots. *PloS one*: 12(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513534/>. (Consultado 25 de agosto de 2019)

McPherson M.J.; Quirke, P.; Taylor G.R. 1991. PCR: A practical approach. Oxford University Press, Estados Unidos. <https://www.researchgate.net/publication/11524425> Múltiple polymerase chain reaction A practical approach. (Consultado 3 de mayo de 2018)

Méndez S., Pérez E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, **22(3)** 183-192. <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-PCR-múltiple-microbiologia-clinica-13058027>. (Consultado 25 de abril de 2018)

Menéndez M. 1995. Infección por VIH historia natural y marcadores de progresión. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España. <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/0/AD0049101.pdf> (consultado 1 de mayo de 2018)

Mercado, J., Del Rosario, M. 2014. La carga viral como determinante en la primo infección por VIH, presentación de un caso. *Gac Med Bol*, **37(2)**: 87-89. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662014000200009. (Consultado 25 de abril de 2018)

Miró J., Sued O., Plana M., Pumarola T., Gallart T. 2004. Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección aguda por el VIH-1. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**:643-59. <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-avances-el-diagnostico-tratamiento-infeccion-S0213005X0473164X>. (Consultado 22 de abril de 2018)

Moreno N., Agudelo P. 2010. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. En Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. **27(4)**:548-556. <https://www.scielosp.org/article/rpmesp/2010.v27n4/548-556/#ModalArticles> (consultado 1 de mayo de 2018)

Muñoz M A. 1998. Biología Molecular en Medicina: Cap7, El síndrome de inmunodeficiencia Adquirida. Editorial Limusa. México. **95-105**. <https://books.google.co.ve/books?id=CEggYSJT8h0C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>. (Consultado 22 de abril de 2018)

Newell ML. 2004. HIV Transmission Through Breastfeeding: A Review of Available Evidence. World Health Organization. https://www.who.int/nutrition/publications/HIV_IF_Transmission.pdf. (Consultado 22 de abril de 2019)

Orozco M. Franco P, Olivo Y. 2016. Validación in silico de oligonucleótidos-primers para la detección específica de salmonella spp. Mediante reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Investi Agropecu Desarro Sosten*. **1 (1)**: 42 - 50. [Http://oaji.net/articles/2017/5223-1499299728.pdf](http://oaji.net/articles/2017/5223-1499299728.pdf). (Consultado 22 de enero de 2019)

Ortiz, R., Eiros. J. 2000. Pruebas de diagnóstico serológico de la infección por VIH. Departamento de Microbiología e Inmunología. Hospital Universitario de Valladolid. España.

<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/vihrev.pdf> (consultado 22 de abril de 2018)

Ospina S. 2006. Diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Infect.* 10 (4). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922006000400010. (Consultado 22 de abril de 2018)

Pacheco M, Monzón A. 2001. Diagnóstico, pronóstico e interpretación de los resultados de laboratorio en la infección por VIH. *Act Client Soc Venez Bioanal.* 7:24-36. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v10n4/v10n4a10.pdf>. (Consultado 22 de abril de 2018)

Pool M, Huaranga M., Rojas N., Gutiérrez V., Ruiton S., Gallardo E., Achata J., Galarza M. 2017. Detección de virus influenza A, B y subtipos A (H1N1) pdm09, A (H3N2) por múltiple RT-PCR en muestras clínicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(2), 192-200. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2054> (consultado 11 de mayo de 2018)

Ramos, F., García-Fructuoso, M.T., Almeda, J., Casabona, J., Coll, O., & Fortuny, C. 2003. Determinantes de la transmisión vertical del VIH en Cataluña (1997-2001): ¿es posible su eliminación? *Gaceta Sanitaria.* 17(4): 275-282. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112003000400004&lng=es&tlng=es. (Consultado 29 septiembre de 2019)

Read J. 2007. Diagnóstico de infección por VIH-1 en niños menores de 18 meses en los Estados Unidos. *Pediatrics.* 120(6): 1547-1562. <https://pediatrics.aappublications.org/content/120/6/e1547>. (Consultado 10 septiembre de 2019)

Reyes C., D'Angelo P., Ameli G, Ramírez J., Gudiño E. 2018. Uso de la carga viral del Virus de Inmunodeficiencia Humana para la detección de la transmisión vertical en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 38:76-81 (consultado 10 septiembre de 2019)

Reyes J., Viettri, M., Rivas, A., Lares, M., Herrera, L., Aguilar, C., Ferrer, E. 2015. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de *Leishmania sp.* En muestras de sangre de caninos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias.* 56: 67-74. <https://www.researchgate.net/publication/287195685> Estandarizacion de la tecnica de PCR p

ara la detección de ADN de Leishmania sp en muestras de sangre de caninos. (Consultado 16 de mayo de 2018)

Rivera I y Murillo W. 2003. Aplicación del PCR-ADN en el diagnóstico de la infección por VIH-1 en infantes. *Rev Med Hond*; 71:123-130. <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2003/pdf/Vol71-3-2003-3.pdf>. (Consultado 15 enero de 2019)

Rubio J., Tammam M., Ta-Tang T. 2011. Uso de PCR múltiple en el diagnóstico simultáneo de parasitosis. *Biomédica*, **31(3)**:3-315. <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/562/692> . (Consultado 15 de abril de 2018)

Salech, F., Mery, V., Larrondo, F., Rada, G. 2008. Estudios que evalúan un test diagnóstico: interpretando sus resultados. *Revista médica de Chile*, 136(9), **1208**. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872008000900018> (consultado 11 de mayo de 2018)

Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf> (consultado 9 de mayo de 2018)

Sanders-Buell, E., Salminen M., McCutchan F. 1995. Sequencing primers for HIV-1, p. 15- <https://www.researchgate.net/publication/253850636> Sequencing primers for HIV-1. (Consultado 11 de mayo de 2018)

Smith, J., Daniel, R. 2006. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS ChemBiol*, **1 (4)**: 217-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163676>. (Consultado 15 de abril de 2018)

Sociedad Peruana de Dermatología. 1999. *Dermatología peruana: Técnicas de biología molecular II. Volumen 9.* UNMSM. Lima, Peru. http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v09_sup1/tecnicas_2.html (consultado 1 de mayo de 2018).

Sopera S. 1997. TRANSMISION VERTICAL DEL VIH-I Cuadernos de Bioética 1997/2. <http://aebioetica.org/revistas/1997/2/30/831.pdf>. (Consultado 10 agosto de 2019)

Soto, I., Villalobos, M., Villalobos, R. 2010. Efecto de la terapia antirretroviral sobre el perfil lipídico de pacientes con Sida en Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. *Kasmera*, **38(2)**, 157-167. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000200008&lng=es&tlng=es. (Consultado 1 de mayo de 2018)

Torres, V., Wachira, M., Bedell, R., Mwangi, J., Dalmau, D., Kochola, L., Moreno, S., Muthee, G., Riara, G., & Ngaruro, R. 2010. Sustitución segura de la lactancia materna para prevenir la transmisión vertical del VIH en la Provincia Central de Kenia. *Pediatría Atención Primaria*. **12(48)**: 595-614. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322010000600004&lng=es&tlng=es. (Consultado 11 de Agosto de 2019)

Torrez A, Baca B. 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*. **3(23)**:16-21. <https://elementos.buap.mx/num23/pdf/16.pdf> (consultado 12 de enero de 2019)

Vázquez J y otros. 2004, Infección por virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en pacientes pediátricos de México. *Revista de investigación clínica*, **56(2)**, 153-168. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000200006&lng=es&tlng=es.) (Consultado 11 de diciembre de 2018)

Zazzi M, Romano L, Brasini A, Valenci P. 1992, "Simultaneous Amplification of Múltiple HIV-1 DNA Sequences from Clinical Specimens by Using Nested-Primer Polymerase". *Aids research and human retroviruses*. **9(4)**: 315-321. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8512746> (Consultado 11 de diciembre de 2018)

Páginas web:

Medicina fetal Barcelona. 2017. Infección por VIH y gestación <https://medicinafetalbarcelona.org/protocolos/es/patologia-materna-obstetrica/vih%20y%20gestaci%C3%B3n.pdf>. (Consultado 16 de Agosto de 2019)

The European collaborative study. 1988. Mother-to-child transmission of HIV infection. *The Lancet*. **332(8619)**: 1039–1043. [https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90063-](https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90063-). (Consultado 15 de agosto de 2019)

The European collaborative study. 2005. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. **40**:458-465. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668871>

Organización Mundial de la Salud. 2015. Panorama de la tecnología de diagnóstico del VIH / SIDA de UNITAID. http://www.unaids.org/assets/UNITAID_HIV_Nov_2015_Dx_Landscape-1.pdf. (Consultado 15 de agosto de 2019)

UNAIDS. 2016. Venezuela. <http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/venezuela>. (Consultado 1 de mayo de 2018)

UNICEF. 2016. Venezuela: VIH Y Sida- https://www.unicef.org/venezuela/spanish/hiv_aids_4247.html. (Consultado 1 de mayo de 2018)

Organización Mundial de la Salud. 2018. Fact sheets HIV. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. (Consultado 1 de mayo de 2018)

INFOSIDA. 2018. Fact sheets HIV. <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/51/>. (Consultado 25 de abril de 2018)

PROJECT INFORM. Estructura y función del VIH. <https://www.projectinform.org/es/glosario/estructura-y-funcion-del-vih/> (Consultado 2 de mayo de 2018).