

# Validación de cebadores específicos para la detección de los genes *env* y *gag* mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada en pacientes pediátricos con infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 y su confirmación por secuenciación

Drs. Alberto A Frango<sup>1a</sup>, Agniellys Ramírez<sup>2a</sup>, María A Duarte<sup>3a</sup>, Migdelys A Alejos<sup>2a</sup>, Scarlet N Valladares<sup>4a</sup>, Mariana C Eleizalde<sup>5b</sup>, Hector R Rangel<sup>6c</sup>, Ana F Convit<sup>7a\*</sup>

## RESUMEN

A nivel mundial más de 1.8 millones de niños están infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). La determinación mediante técnicas moleculares de los genes principales del VIH tipo 1 (VIH-1), principal causante de la pandemia del SIDA, aporta información de valor diagnóstico en pacientes pediátricos, primordialmente los nacidos de madres seropositivas. A través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada, una técnica de biología molecular altamente sensible y específica, la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) detecta dos de los genes principales del VIH-1: *env* y *gag*. La especificidad y eficacia de la PCR anidada depende en gran medida de los cebadores utilizados en la reacción y para ello la validación de estos es necesaria. Esta permite verificar la eficiencia y posible uso de los cebadores para el diagnóstico. La UDM-FJC se propuso validar los cebadores específicos para la detección de *env* y *gag* en pacientes pediátricos con sospecha de la enfermedad. Los productos amplificados de los genes fueron secuenciados mediante el método de Sanger y analizados a través de las herramientas bioinformáticas PCR virtual, MultiAlin y BLASTN, observando altos porcentajes de similitud y

cobertura. Adicionalmente, las secuencias obtenidas fueron publicadas en GenBank. Esta validación demuestra que los cebadores empleados en la Unidad son adecuados para el diagnóstico molecular del VIH-1 en pacientes pediátricos y pueden ser referencia adicional para otros laboratorios, debido a su buena especificidad y eficiencia para detectar los principales genes del virus.

**Palabras clave:** VIH, *env*, *gag*, cebadores, validación, método de Sanger.

## SUMMARY

Globally more than 1.8 million children are infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV). The determination through molecular techniques of the main genes of HIV type 1 (HIV-1) — Main cause of the AIDS pandemic — provides diagnostic information for pediatric patients, primarily those born to seropositive mothers. Through nested Polymerase Chain Reaction (PCR), a highly sensitive and specific molecular biology technique, the Unidad de Diagnóstico Molecular of Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) detects two of

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2020.128.4.8>

<sup>1</sup>Licenciado en Bioanálisis, <sup>2</sup>Licenciada en Biología, <sup>3</sup>PhD en Ciencias, Mención Inmunología, <sup>4</sup>Magíster en Ciencias,

**Recibido:** 30 de julio de 2020

**Aceptado:** 17 de septiembre de 2020

Mención Microbiología, <sup>5</sup>PhD en Ciencias Biológicas, <sup>6</sup>PhD en Biología Celular, <sup>7</sup>Magíster en Gerencia Pública.

<sup>a</sup>Unidad de Diagnóstico Molecular, Fundación Jacinto Convit, Caracas, Venezuela. <sup>b</sup>Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos, Caracas, Venezuela. <sup>c</sup>Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela. <sup>\*</sup>publicaciones@jacintoconvit.org

*the main genes of HIV-1: env and gag. The specificity and efficacy of nested PCR largely depend on the primers used in the reaction; therefore a validation of these is necessary. It allows to verify the efficiency and possible use of the primers for diagnostics. The UDM-FJC set out to validate specific primers for the detection of env and gag genes in pediatric patients with the suspected disease. The gene products were sequenced using the Sanger method and analyzed using the virtual PCR, MultiAlin, and BLASTN bioinformatics tools, observing in high percentages of similarity and coverage. Additionally, the sequences obtained were published in GenBank. The validation carried out shows that the primers used in UDM-FJC are suitable for the molecular diagnosis of pediatric patients with HIV-1 and can be an additional reference for other laboratories, due to their adequate specificity and efficiency in detecting the main genes of the virus.*

**Key words:** *HIV, env, gag, primers, validation, Sanger method.*

## INTRODUCCIÓN

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus que se disemina por fluidos corporales y ataca el sistema inmunitario del cuerpo, específicamente las células T CD4+. El VIH debilita progresivamente las defensas del paciente ante infecciones y produce el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1,2). Para el 2019 habían 1.8 millones de niños (<15 años de edad) a nivel mundial infectados con esta enfermedad (3).

En muchos países con epidemias generalizadas de VIH, las mujeres seropositivas pueden decidir tener descendencia o las mujeres sanas que adquieren la enfermedad durante el embarazo o en la etapa de amamantamiento, resultan en un riesgo de transmisión vertical al hijo (4,5). El porcentaje de transmisión materno-infantil del VIH sin tratamiento profiláctico en países de bajos recursos es de hasta el 40 % en infantes que son amamantados por sus madres, y del 30 % para los bebés nacidos de madres que se infectan durante la gestación y el parto (6-8). Este porcentaje de transmisión materno-infantil puede reducirse a menos de 1 % con tratamiento profiláctico (9).

En pacientes pediátricos la infección por VIH presenta dos tipos de manifestaciones clínicas: La primera representa hasta el 80 % de los

casos, y se caracteriza por una lenta y progresiva replicación del virus que culmina en la etapa de SIDA. La segunda comprende hasta el 20 % de las manifestaciones clínicas en los pacientes pediátricos infectados con el virus, y se presenta de forma precoz y severa en los primeros meses de vida, con un alto riesgo de muerte debido al SIDA en los primeros 2 años (10).

En Venezuela para el año 2019 se estimaron hasta 110 000 casos de VIH en la población general, de los cuales 3 900 son niños menores de 15 años de edad (11).

El VIH es un retrovirus perteneciente a la subfamilia de los lentivirus y se clasifica en dos tipos: VIH tipo 1 (VIH-1) y VIH tipo 2 (VIH-2). El VIH-1 es el causante de la pandemia del SIDA mientras que el VIH-2, aunque también puede producir SIDA, se encuentra confinado principalmente a zonas del África occidental y se considera menos patogénico y transmisible (12).

El VIH-1 presenta gran variabilidad genética y se ha distribuido en 3 grupos distintos en todo el mundo: M, O y N. Dentro del grupo M que representa más del 90 % de todos los casos de VIH-1 en general, la diversidad genética viral es tan grande que existen nueve subtipos principales tales como A, B, C, D, F, G, H, J y K, así como varias formas recombinantes circulantes (13-15).

De los subtipos de VIH-1, se ha diseminado en mayor proporción el subtipo B, representando hasta el 11 % de todos los casos de VIH-1 a nivel mundial y estableciéndose principalmente en Sur América (15). En Venezuela los estudios de epidemiología molecular, incluyendo los más recientes, demuestran que el fenotipo que predomina ampliamente en el país es el subtipo B (16).

A nivel estructural el genoma del VIH-1 está constituido por dos copias de moléculas de ARN de cadena sencilla codificante (ARNss). Cada una de estas copias da lugar, mediante la transcriptasa reversa, a un ADN viral de doble cadena que se integra en el genoma de la célula huésped (ADN proviral). Múltiples estudios recomiendan la detección de ADN proviral del VIH-1 en neonatos hijos de madres seropositivas, mediante técnicas moleculares (17,18).

El genoma del VIH-1 contiene tres genes principales: *gag*, que codifica proteínas

estructurales (matriz, cápside, nucleocápside y p6); *env*, que codifica proteínas de la envoltura (gp120 y gp41) y *pol*, que codifica enzimas virales (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa) (19). Dichos genes se han usado como diana para el diagnóstico del VIH-1 (20-23).

El uso de una técnica molecular sensible y específica como la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), es capaz de detectar de manera eficaz y rápida los genes principales del VIH-1. La determinación de estos genes aporta información esencial de valor clínico diagnóstico en pacientes pediátricos, principalmente para los neonatos nacidos de madres seropositivas con sospecha de transmisión vertical (17,18). De acuerdo a guías internacionales, con el análisis de dos de los tres genes principales del VIH-1 se puede detectar la infección (24-28).

La especificidad y eficacia de la PCR anidada depende en gran medida de los cebadores utilizados. Estos pueden generar productos inespecíficos y formar estructuras secundarias o dímeros que disminuyen la eficiencia de la reacción (29), lo que puede afectar el resultado del diagnóstico de un paciente. Los cebadores deben ser lo suficientemente sensibles para detectar la región diana esperada y a su vez muy específicos para excluir cualquier región no deseada (30). Por ende, la sensibilidad y especificidad analítica de una PCR se puede ver afectada por los cebadores seleccionados.

Para garantizar un resultado fiable es necesario validar los cebadores que se utilizan en la prueba. La validación de los cebadores se puede realizar a través de herramientas bioinformáticas y la evaluación experimental en el laboratorio a partir de la verificación de los productos obtenidos mediante la PCR anidada (31,32).

La secuencia de nucleótidos del producto obtenido mediante la PCR anidada se puede determinar en el laboratorio por el método de Sanger, que es la prueba de oro para la secuenciación de ácidos nucleicos (33). Su resultado puede compararse con otras secuencias publicadas mediante herramientas bioinformáticas (31), con el fin de evaluar el porcentaje de identidad, cobertura, entre otros parámetros, que permitan la identificación de genes y variantes (34).

Debido a lo expuesto, la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) —que brinda un servicio de diagnóstico molecular gratuito a la población pediátrica más vulnerable que acude a hospitales públicos del territorio nacional— se propuso validar los cebadores específicos previamente reportados en la literatura y que se utilizan en la detección de dos genes principales del VIH-1, *env* y *gag*, mediante PCR anidada en pacientes pediátricos con la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestras

#### 1.1 Muestras biológicas

Se utilizó ADN extraído de un paciente considerado positivo para VIH-1 por PCR anidada, el cual fue usado como control positivo en el presente estudio. Esta muestra se procesó en la UDM-FJC, procedente del Servicio de Infectología del Hospital de Niños “J.M. de los Ríos”, previo consentimiento informado firmado por el representante del paciente. Dicho documento, bajo aval del Comité de Bioética de este Hospital, autoriza la realización del diagnóstico y estudios a partir de la muestra del paciente. Adicionalmente, se empleó ADN de los virus Hepatitis B y Hepatitis C, procedentes del Laboratorio de Virología Molecular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), para el cual se cuenta con el consentimiento informado de los pacientes correspondientes.

#### 1.2 Líneas celulares

Se empleó ADN extraído de la línea celular 8E5/LAV (8E5) que posee 1 genoma proviral defectivo del VIH-1 por célula, procedente del Laboratorio de Virología Molecular del IVIC. Adicionalmente, se utilizó ADN proveniente de líneas celulares humanas positivas para translocaciones genéticas detectadas en leucemia, tales como RS4 y K562, donadas por el St. Jude Children’s Research Hospital de Estados Unidos.

## 2. PCR virtual

Las secuencias de los cebadores empleados en la UDM-FJC se describen en el Cuadro 1 y están reportados en la literatura (17). El sitio de hibridación de estos cebadores fue evaluado *in silico* mediante una PCR virtual con el software Sequence Extractor (35), usando secuencias de referencia como molde (Cuadro 2).

## 3. Reacción en cadena de la polimerasa y visualización de productos

La PCR anidada para detectar ADN proviral del VIH-1 se realizó por separado para cada gen analizado en este estudio, con los cebadores descritos en el Cuadro 1. La calidad del ADN<sub>g</sub> se confirmó amplificando por PCR el gen constitutivo *GAPDH* con los cebadores GAPDH

Up/Down (36) (Cuadro 1). La reacción se realizó en un termociclador (BIOER) para los genes *env* y *gag*. La primera ronda fue programada con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C para el gen *env* y 1 minuto a 50 °C para el gen *gag*. Luego para ambos genes se utilizó la temperatura de 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C, durante 7 minutos. Para la segunda ronda se utilizaron las mismas condiciones de reacción para cada gen. Se incorporaron en la PCR anidada controles positivos (pacientes VIH-1 positivo), sanos (pacientes VIH-1 negativo) y negativos (sin templado). Los productos fueron evaluados a través de electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % teñidos con bromuro de etidio (BrEt), visualizados con el equipo Axygen<sup>®</sup> Gel Documentation System y foto documentados con Axygen Imaging.

Cuadro 1  
Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR

| Gen*            | Ronda      | Cebador                        | Secuencia<br>5'→3'                                     |
|-----------------|------------|--------------------------------|--|
| GAPDH           |            | GAPDH-HUM-Up<br>GAPDH-HUM-Down | CATCAAGAAGGTGGTGAA<br>GGGTCTTACTCCTTGAG                |
| <i>env</i> (17) | 1era Ronda | E80 Up<br>E105 Down            | CCAATTCCCATACATTATTGTG<br>GCTTTTCCTACTTCCTGCCAC        |
|                 | 2da Ronda  | E110 Up<br>E125 Down           | CTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAA<br>CAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGGG |
| <i>gag</i> (17) | 1era Ronda | HIG 202<br>HIG 777             | CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT<br>TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG |
|                 | 2da Ronda  | HIG 822<br>HIG 1317            | GCTTTCAGCCCAGAAGTAATACC<br>CCAAATTCTCCCTAAAAAATTAGCCT  |

\* En superíndice la referencia bibliográfica de cada gen.

Cuadro 2

Secuencias empleadas como molde para la PCR virtual

| Gen        | Número de acceso GenBank |
|------------|--------------------------|
| <i>env</i> | D86069.1                 |
| <i>gag</i> | D86069.1                 |

## 4. Purificación de productos y secuenciación automatizada

Los productos de la PCR anidada obtenidos por separado para cada gen analizado en este estudio fueron purificados, empleando el Kit comercial FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp). Los productos purificados fueron visualizados con electroforesis

en geles de agarosa y posteriormente secuenciados en el Laboratorio de Genética Molecular Genmolab, C.A. (Miranda-Venezuela) con el empleo de cebadores sentido y antisentido de la segunda ronda listados en el Cuadro 1.

### 5. Análisis *in silico* de secuencias

Las secuencias obtenidas del laboratorio externo de secuenciación (Genmolab) fueron visualizadas empleando el software FinchTV Chromatogram Viewer. Posteriormente se realizó la secuencia consenso a partir de la obtenida con cada cebador para los genes en estudio, empleando la herramienta Multiple Sequence Alignment (MultAlin) (37). Seguidamente fueron comparadas con secuencias reportadas por otros autores y almacenadas en el banco de secuencias GenBank del National Center for Biotechnology Information de Estados Unidos, por medio del programa Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (38); con el fin de evaluar el porcentaje de identidad, cobertura, entre otros parámetros. Adicionalmente a fin de identificar posibles cambios en la secuencia nucleotídica, se compararon las secuencias consenso obtenidas con las secuencias reportadas por otros autores, empleando el software MultAlin.

### 6. Determinación de la sensibilidad y especificidad analítica de los genes *env* y *gag*

La sensibilidad analítica de la PCR anidada se determinó haciendo curvas con diferentes cantidades del genoma de la línea celular 8E5, con el fin de establecer la mínima cantidad de ADN<sub>g</sub> necesario para lograr la amplificación. Se realizaron diluciones 1/10, 1/100, 1/1 000, 1/10 000, 1/100 000 del ADN<sub>g</sub> extraído a partir de una muestra de la línea celular 8E5/LAV con una concentración de  $1 \times 10^5$  células/mm<sup>3</sup>.

La especificidad analítica se determinó utilizando ADN de los virus Hepatitis B y Hepatitis C. Además se empleó ADN<sub>g</sub> proveniente de líneas celulares humanas positivas para translocaciones genéticas detectadas en leucemia, tales como RS4 y K562. Asimismo se incluyó ADN<sub>g</sub> extraído a partir de una muestra de sangre periférica de un paciente sano (sin infección por VIH).

## RESULTADOS

### Gen *env*

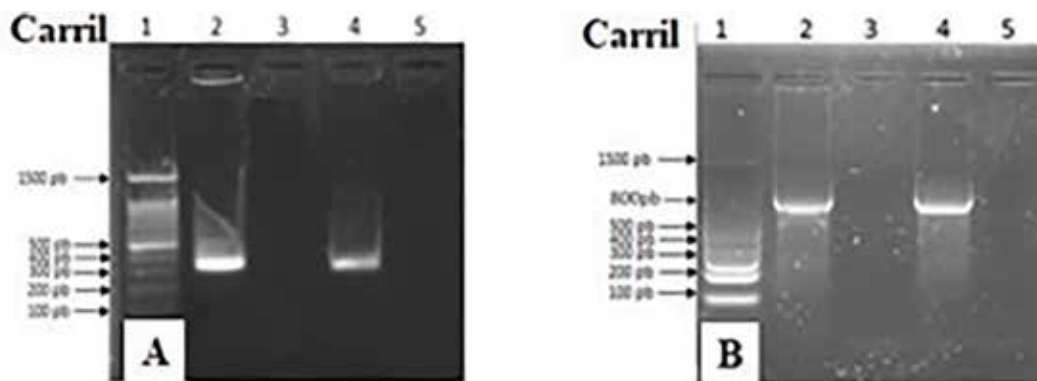
La amplificación por PCR anidada del gen *env* reveló la presencia de una banda de 300 pb (pares de bases) aproximadamente (Carril 4, Figura 1a) que coincidió con el tamaño de 337 pb del amplicón, obtenido mediante PCR virtual. Para este análisis se empleó la secuencia de referencia del gen *env* (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenido con MultAlin (Figura 2) se denominó FJC-ENV-VIH y publicó en GenBank bajo el número de acceso MH750307.1. A esta última se le realizó un BLASTN para verificar que el fragmento obtenido correspondiera al VIH-1 y los resultados indicaron coincidencia con múltiples aislados de diferentes partes del mundo (D86069.1, M14100.1, AF321147.1), específicamente en relación con el gen *env*. Adicionalmente con el empleo de MultiAlin, se comparó la secuencia consenso FJC-ENV-VIH con las secuencias de referencia ya mencionadas del gen *env*, lo que evidenció que coinciden en su totalidad (Figura 4). Esto indica que los cebadores de la UDM-FJC son específicos para detectar el gen *env* del VIH-1.

Como se observa en la Figura 5a, se obtuvo una sensibilidad analítica para la detección de hasta 10 cels/mm<sup>3</sup>, donde cada célula equivale a un genoma proviral defectivo. La especificidad analítica fue del 100 %, ya que solo se observó amplificación para la muestra de ADN<sub>g</sub> extraído a partir de la línea celular 8E5 (positiva para VIH-1) (Figura 5b).

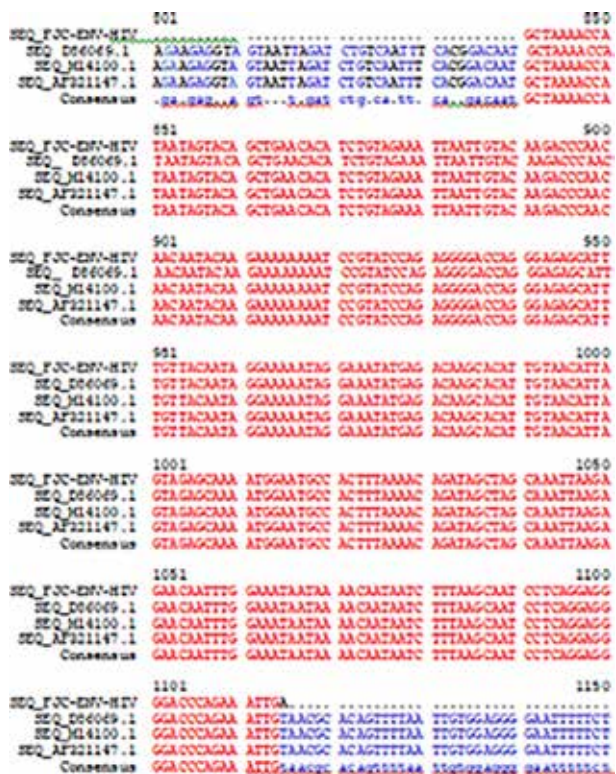
### Gen *gag*

La amplificación por PCR anidada del gen *gag* reveló la presencia de una banda de 800 pb aproximadamente (Carril 4, Figura 1b) que coincidió con el tamaño de 828 pb del amplicón, obtenido mediante la PCR virtual. Para este análisis se empleó la secuencia de referencia del gen *gag* (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenido con MultAlin (Figura 3) se denominó FJC-GAG-VIH y publicó en GenBank bajo el número de acceso MH750308.1. A esta última se le realizó un BLASTN para verificar que el fragmento obtenido correspondiera al VIH-1

VALIDACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES *ENV* Y *GAG*



**Figura 1.** A) Amplificación del gen *env* mediante PCR anidada. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Control positivo (C+). 3. Paciente sano. 4. Paciente VIH-1 positivo. 5. Control sin templado (NTC). B) Amplificación del gen *gag* mediante PCR anidada. Carriles: 1. MPM 100 pb (Invitrogen). 2. C+. 3. Paciente sano. 4. Paciente VIH-1 positivo. 5. NTC.



**Figura 2.** Alineamiento de la secuencia consenso FJC-ENV-VIH con las secuencias D86069.1, AF321147.1 y M14100.1 reportadas para el gen *env* del VIH por otros autores. Las letras de color rojo corresponden a las zonas donde la secuencia consenso se comparó con las otras secuencias publicadas.



```

321                                     361
SEQ_FJC_GAG-VIH...AGCCACC CCACAGATT TAACACCAT GCTAACACA
SEQ_HQ1980 CATTATCAGA AGGAGGCCAC CCACAGATT TAACACCAT GCTAACACA
SEQ_GQ4306 CATTATCAGA AGGAGGCCAC CCACAGATT TAACACCAT GCTAACACA
SEQ_KY7786 CATTATCAGA AGGAGGCCAC CCACAGATT TAACACCAT GCTAACACA
GAAAGCAa6

371                                     411
SEQ_FJC_GAG-VIHCTGGGGGAC ATCAAGCACG CATGCAATG TTAAGACA CCATCAATGA
SEQ_HQ1980 CTGGGGGAC ATCAAGCACG CATGCAATG TTAAGACA CCATCAATGA
SEQ_GQ4306 CTGGGGGAC ATCAAGCACG CATGCAATG TTAAGACA CCATCAATGA
SEQ_KY7786 CTGGGGGAC ATCAAGCACG CATGCAATG TTAAGACA CCATCAATGA
GAAAGCAa6

421                                     461
SEQ_FJC_GAG-VIHGGAAGCTGCA GAATGGGATA GATTGCATCC ATGCAATGCA GGGGCTATTG
SEQ_HQ1980 GGAAGCTGCA GAATGGGATA GATTGCATCC ATGCAATGCA GGGGCTATTG
SEQ_GQ4306 GGAAGCTGCA GAATGGGATA GATTGCATCC ATGCAATGCA GGGGCTATTG
SEQ_KY7786 GGAAGCTGCA GAATGGGATA GATTGCATCC ATGCAATGCA GGGGCTATTG
GAAAGCAa6

471                                     511
SEQ_FJC_GAG-VIHCCACAGGCCA GATGAGAGAA CCAAGGGGAA GTGCATATG AGGAAGTACT
SEQ_HQ1980 CCACAGGCCA GATGAGAGAA CCAAGGGGAA GTGCATATG AGGAAGTACT
SEQ_GQ4306 CCACAGGCCA GATGAGAGAA CCAAGGGGAA GTGCATATG AGGAAGTACT
SEQ_KY7786 CCACAGGCCA GATGAGAGAA CCAAGGGGAA GTGCATATG AGGAAGTACT
GAAAGCAa6

721                                     761
SEQ_FJC_GAG-VIHAGTACCCCTC AGGAACAAAT AGGATGGATG ACAAAATATC CACCTATGCC
SEQ_HQ1980 AGTACCCCTC AGGAACAAAT AGGATGGATG ACAAAATATC CACCTATGCC
SEQ_GQ4306 AGTACCCCTC AGGAACAAAT AGGATGGATG ACAAAATATC CACCTATGCC
SEQ_KY7786 AGTACCCCTC AGGAACAAAT AGGATGGATG ACAAAATATC CACCTATGCC
GAAAGCAa6

771                                     811
SEQ_FJC_GAG-VIHAGTAGGAGAA ATTTATAGAA CATGCAATG CTGGGATTA AATAGAGTAG
SEQ_HQ1980 AGTAGGAGAA ATTTATAGAA CATGCAATG CTGGGATTA AATAGAGTAG
SEQ_GQ4306 AGTAGGAGAA ATTTATAGAA CATGCAATG CTGGGATTA AATAGAGTAG
SEQ_KY7786 AGTAGGAGAA ATTTATAGAA CATGCAATG CTGGGATTA AATAGAGTAG
GAAAGCAa6

821                                     861
SEQ_FJC_GAG-VIHTRAGATGTA TAGCCCTACC AGCATTCTGG ACATAGACA AGGCCAATA
SEQ_HQ1980 TRAGATGTA TAGCCCTACC AGCATTCTGG ACATAGACA AGGCCAATA
SEQ_GQ4306 TRAGATGTA TAGCCCTACC AGCATTCTGG ACATAGACA AGGCCAATA
SEQ_KY7786 TRAGATGTA TAGCCCTACC AGCATTCTGG ACATAGACA AGGCCAATA
GAAAGCAa6

871                                     911
SEQ_FJC_GAG-VIHGACCCCTTA GAGACTATGT AGACCCGCTC TATAAACTC TAAGAGCCGA
SEQ_HQ1980 GACCCCTTA GAGACTATGT AGACCCGCTC TATAAACTC TAAGAGCCGA
SEQ_GQ4306 GACCCCTTA GAGACTATGT AGACCCGCTC TATAAACTC TAAGAGCCGA
SEQ_KY7786 GACCCCTTA GAGACTATGT AGACCCGCTC TATAAACTC TAAGAGCCGA
GAAAGCAa6

F44                                     F44
SEQ_FJC_GAG-VIHGCCAGCTTCA CCGGAGTAA AAAATTGGAT CACGAAACC TTGTTGGTCC
SEQ_HQ1980 GCCAGCTTCA CCGGAGTAA AAAATTGGAT CACGAAACC TTGTTGGTCC
SEQ_GQ4306 GCCAGCTTCA CCGGAGTAA AAAATTGGAT CACGAAACC TTGTTGGTCC
SEQ_KY7786 GCCAGCTTCA CCGGAGTAA AAAATTGGAT CACGAAACC TTGTTGGTCC
GAAAGCAa6

971                                     1011
SEQ_FJC_GAG-VIHAAAATGCCAA OCCAGATTGT AAGACTATTT TAAAAGCATT GGCCACAGCA
SEQ_HQ1980 AAAATGCCAA OCCAGATTGT AAGACTATTT TAAAAGCATT GGCCACAGCA
SEQ_GQ4306 AAAATGCCAA OCCAGATTGT AAGACTATTT TAAAAGCATT GGCCACAGCA
SEQ_KY7786 AAAATGCCAA OCCAGATTGT AAGACTATTT TAAAAGCATT GGCCACAGCA
GAAAGCAa6

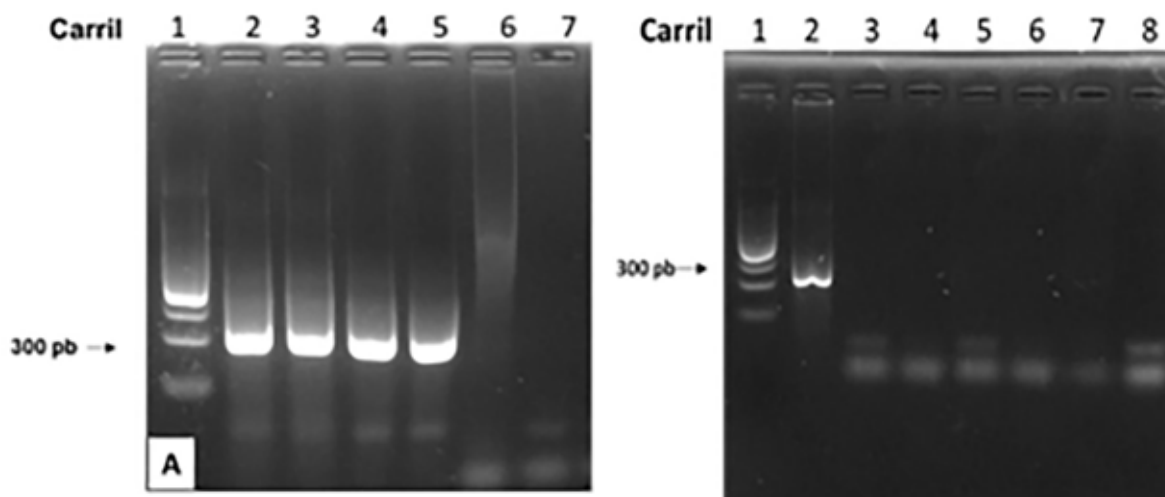
1021                                     1061
SEQ_FJC_GAG-VIHGTTACCTAG AGGAAATGAT GACAGCATGT CAGGAAATGG GAGGACCCGG
SEQ_HQ1980 GTTACCTAG AGGAAATGAT GACAGCATGT CAGGAAATGG GAGGACCCGG
SEQ_GQ4306 GTTACCTAG AGGAAATGAT GACAGCATGT CAGGAAATGG GAGGACCCGG
SEQ_KY7786 GTTACCTAG AGGAAATGAT GACAGCATGT CAGGAAATGG GAGGACCCGG
GAAAGCAa6

1071                                     1111
SEQ_FJC_GAG-VIHCCATAGGCA AGATTTTGG CTGAGCAAT GAGCCAGTA ACAAAATGAG
SEQ_HQ1980 CCATAGGCA AGATTTTGG CTGAGCAAT GAGCCAGTA ACAAAATGAG
SEQ_GQ4306 CCATAGGCA AGATTTTGG CTGAGCAAT GAGCCAGTA ACAAAATGAG
SEQ_KY7786 CCATAGGCA AGATTTTGG CTGAGCAAT GAGCCAGTA ACAAAATGAG
GAAAGCAa6

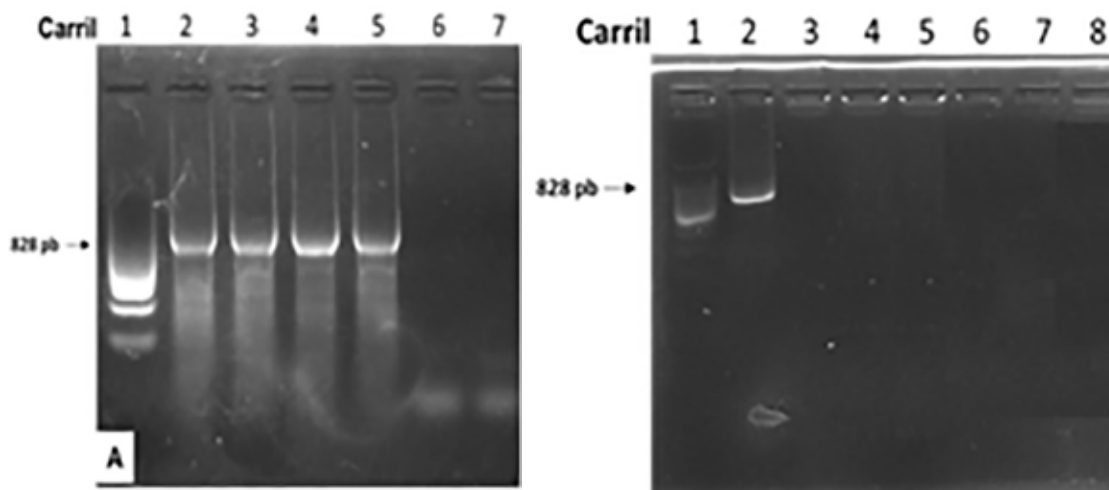
1121                                     1161
SEQ_FJC_GAG-VIHGAGG.....
SEQ_HQ1980GAGG.....CATGCAAGCA GGCAATTTTA GGACCAAGG AAAAATGTTT
SEQ_GQ4306GAGG.....CATGCAAGCA GGCAATTTTA GGACCAAGG AAAAATGTTT
SEQ_KY7786CTACCAAT CATGCAAGCA GGCAATTTTA GGACCAAGG AAAAATGTTT
GAAAGCAa6GAGG.....CATGCAAGCA GGCAATTTTA GGACCAAGG AAAAATGTTT

```

**Figura 3.** Alineamiento de la secuencia consenso FJC-GAG-VIH con las secuencias HQ198036.1, GQ430663.1 y KY778694.1 reportadas para el gen *gag* del VIH por otros autores. Las letras de color rojo corresponden a las zonas donde la secuencia consenso se comparó con las otras secuencias publicadas. Las letras en azul corresponden a los nucleótidos donde se observan cambios entre las secuencias.



**Figura 4.** A) Determinación de la sensibilidad analítica de la PCR anidada para la detección del gen *env*. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Línea celular 8E5 dilución 1/10. 3. Línea celular 8E5 dilución 1/100. 4. Línea celular 8E5 dilución 1/1000. 5. Línea celular 8E5 dilución 1/10000. 6. Línea celular 8E5 dilución 1/100000. 7. Control sin templado (NTC). B) Determinación de la especificidad analítica de la PCR anidada para la detección del gen *env*. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Línea celular 8e5. 3. Hepatitis B. 4. Hepatitis C. 5. Línea celular RS4; 6. Línea celular K562. 7. ADNg de paciente sano (sin infección por VIH). 8. Control sin templado (NTC).



**Figura 5.** A) Determinación de la sensibilidad analítica de la PCR anidada para la detección del gen *gag*. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Línea celular 8E5 dilución 1/10. 3. Línea celular 8E5 dilución 1/100. 4. Línea celular 8E5 dilución 1/1000. 5. Línea celular 8E5 dilución 1/10000. 6. Línea celular 8E5 dilución 1/100000. 7. Control sin templado (NTC). B) Determinación de la especificidad analítica de la PCR anidada para la detección del gen *gag*. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Línea celular 8e5. 3. Hepatitis B. 4. Hepatitis C. 5. Línea celular RS4; 6. Línea celular K562. 7. ADNg de paciente sano (sin infección por VIH). 8. Control sin templado (NTC).



y los resultados indicaron coincidencia con múltiples aislados de diferentes partes del mundo (HQ198036.1, GQ430663.1 y KY778694.1), específicamente en relación al gen *gag*. Adicionalmente, con el empleo de MultiAlin, se comparó la secuencia consenso FJC-GAG-VIH con las secuencias de referencia ya mencionadas del gen *gag*, lo que evidenció que FJC-GAG-VIH presenta solo 5 sustituciones de nucleótidos dispersos. Esto indica que los cebadores de la UDM-FJC son específicos para detectar el gen *gag* del VIH-1.

Como se observa en la Figura 5a, se obtuvo una sensibilidad analítica para la detección de hasta 10 cels/mm<sup>3</sup>, donde cada célula equivale a un genoma proviral defectivo. La especificidad analítica fue del 100 %, ya que solo se observó amplificación para la muestra de ADN extraído a partir de la línea celular 8E5 (positiva para VIH-1) (Figura 5b).

## DISCUSIÓN

A nivel mundial la transmisión materno-infantil representa más del 90 % de las infecciones por VIH-1 en pacientes pediátricos menores de 15 años (8,39). Estas infecciones ocurren hasta en un 80 % durante el parto, y se ha determinado que en países de bajos recursos las infecciones intrauterinas y en la etapa de amamantamiento ocurren en un 30 % y 40 %, respectivamente (8). Los neonatos nacidos de madres seropositivas reciben por vía transplacentaria anticuerpos maternos, por lo que las pruebas serológicas tradicionales no resultan útiles para determinar el estatus de la infección (40). Contar con una técnica de alta sensibilidad y especificidad como la PCR anidada, capaz de detectar de manera eficaz y rápida los genes principales del VIH-1 en pacientes pediátricos con sospecha de transmisión vertical, es de gran importancia. Estudios recientes demuestran que la PCR anidada es una técnica de biología molecular que se continúa empleando para la detección del VIH-1 en pacientes con la enfermedad (41-43).

La eficiencia y especificidad de la PCR anidada depende en gran parte de la validación de los cebadores utilizados (24). Múltiples estudios internacionales han reportado la importancia de

la validación de los cebadores para su uso en PCR (26,43-46).

Para la validación, una de las técnicas de laboratorio empleada es la secuenciación, la cual permite la identificación de genes y variantes (29). La secuenciación por el método de Sanger es la técnica estándar de oro que proporciona la información definitiva para confirmar las variantes virales mediante programas bioinformáticos (29,48).

Con base a lo anterior, la UDM-FJC validó los cebadores que se emplean en la detección de los genes *env* y *gag* del VIH-1 en pacientes pediátricos con sospecha de transmisión vertical, a través de la secuenciación por el método de Sanger de los productos de PCR anidada de dichos genes y el empleo de programas bioinformáticos. En concordancia con nuestros hallazgos, múltiples estudios reportan el uso de los genes *env* y *gag* para el diagnóstico de VIH-1 a nivel mundial (17,23,49,50).

En el caso de ambos genes, los resultados de esta validación apoyan el uso de los cebadores seleccionados y son consistentes con lo reportado por D'Angelo y col. (17), quienes emplearon los mismos cebadores para la detección del VIH-1 en ADN proviral. En este estudio los autores verificaron la infección en los pacientes por VIH-1 con técnicas como la de ADN ramificado; mientras que en el presente trabajo se confirma que los productos de la PCR anidada corresponden a secuencias de los genes *env* y *gag* mediante la secuenciación y herramientas bioinformáticas, demostrando que los cebadores amplifican la región deseada. Es importante resaltar que la secuencia consenso FJC-GAG-VIH presentó 5 sustituciones de nucleótidos dispersos que son diferentes en relación con las secuencias del gen *gag* publicadas por otros autores en GenBank. Esto puede deberse a la alta tasa de mutación y gran heterogeneidad genética del VIH-1 (51).

Con el empleo de los cebadores seleccionados en la PCR anidada para la detección de los genes *env* y *gag*, se obtuvo para ambos una sensibilidad analítica de hasta 10 copias del virus por muestra, lo que coincide con otros estudios (50). Asimismo se obtuvo una especificidad del 100 %, lo que confirma que los cebadores son específicos para la detección de estos genes del VIH-1.

Otros laboratorios en Venezuela han reportado diversas secuencias de los genes *env* y *gag* del VIH-1 en GenBank (FJ659409.1, FJ659408.1, FJ659407.1, AY017010.1, FJ659674.1). Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron también publicadas en dicha base de datos, lo que constituye un aporte adicional de información valiosa para el avance de la investigación científica a nivel mundial.

En resumen, los cebadores previamente reportados en la literatura y utilizados en la UDM-FJC para la detección de los genes *env* y *gag* del VIH-1, presentan una buena especificidad y eficiencia; y pueden ser utilizados en la estandarización de pruebas de PCR anidada para el diagnóstico de los genes principales de VIH-1 en pacientes pediátricos con sospecha de transmisión vertical.

### CONCLUSIÓN

Mediante la secuenciación por el método de Sanger de los productos de PCR anidada y el empleo de herramientas bioinformáticas, la UDM-FJC confirmó y validó los cebadores empleados para la detección de los genes *env* y *gag* del VIH-1, en los casos de pacientes pediátricos con la enfermedad referidos a nuestro centro de diagnóstico molecular. Se pudo comprobar que la técnica tiene un límite de detección adecuado, ya que se detectó positividad a partir de 10 copias de VIH-1 proviral por muestra. La determinación de dichos genes se emplea para el diagnóstico de VIH-1 en la población pediátrica con sospecha de transmisión vertical, incidiendo de manera importante en sus niveles de sobrevivencia.

Este estudio puede servir como referencia adicional para los laboratorios de diagnóstico molecular en el país, debido a que confirma que los cebadores previamente reportados en la literatura y validados por la UDM-FJC, presentan buena especificidad y eficiencia en la detección de los genes *env* y *gag* del VIH-1.

Cabe destacar que las secuencias obtenidas y publicadas en GenBank por la UDM-FJC son una referencia de las infecciones por VIH-1 en pacientes pediátricos de Venezuela. La proporción de las variables genéticas del VIH que prevalecen en un país permite hacer comparaciones con

otros países del mundo, en comportamiento y desenlace, lo que proporciona información útil de esta patología.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Virología Molecular del IVIC por la donación de la línea celular 8E5/LAV (8E5) y las muestras de ADN de los virus de Hepatitis B y C. Asimismo, al St. Jude Children's Research Hospital de Estados Unidos de América, por la donación de las líneas celulares RS4 y K562. Adicionalmente reconoce al equipo de investigación de la Fundación Jacinto Convit por apoyar en diversas tareas. El financiamiento de este trabajo fue realizado por la Fundación Jacinto Convit y Jacinto Convit World Organization, Inc.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### REFERENCIAS

1. HIV/AIDS. Disponible en: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/hiv-aids>
2. About HIV/AIDS | HIV Basics | HIV/AIDS | CDC. 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/statistics.html> <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html> <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>
3. Global HIV & AIDS statistics — 2020 fact sheet. Disponible en: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
4. Nielsen-Saines K, Melo M, Varella I, Fonseca R, Lira R, Turella ML, et al. Primary HIV-1 infection during pregnancy: high rate of HIV-1 MTCT in a cohort of patients in southern Brazil. *Retrovirology*. 2008;5(S1):O1.
5. Drake AL, Wagner A, Richardson B, John-Stewart G. Incident HIV during pregnancy and postpartum and risk of mother-to-child HIV transmission: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2014;11(2).
6. Rubio EV, Candia P, Lattes K. Transmisión vertical de VIH y sida: realidad epidemiológica del Cono Sur. *Prog Obstet Ginecol*. 2009;52(9):511-9.
7. Organization WHO. PMTCT strategic vision 2010-

- 2015: Preventing mother-to-child transmission of HIV to reach the UNGASS and Millennium Development Goals: Moving towards the elimination of pediatric HIV, December 2009. 2010.
8. Yitayew YA, Bekele DM, Demissie BW, Menji ZA. Mother to child transmission of HIV and associated factors among HIV exposed infants at Public Health Facilities, Dessie Town, Ethiopia. *HIV/AIDS Auckl NZ*. 2019;11:343-350.
  9. Selph SS, Bougatsos C, Dana T, Grusing S, Chou R. Screening for HIV Infection in Pregnant Women: Updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA*. 2019;321(23):2349.
  10. Chávez PA. Infección por VIH en pediatría. *Rev Chil Pediatría*. 2000;71(2):89-97.
  11. AIDS info | UNAIDS. Disponible en: <http://aidsinfo.unaids.org/>
  12. Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enf Infec Microbiol Clín*. 2011;29(1):58-65.
  13. Simon F, Mauclère P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998;4(9):1032-1037.
  14. Renjifo B, Essex M. HIV-1 subtypes and recombinants. En: *AIDS in Africa*. Springer; 2002.p.263-281.
  15. Junqueira DM, Almeida SE de M. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology*. 2016;495:173-184.
  16. Rangel HR, Garzaro D, Pujol FH. Diversidad genética del virus de inmunodeficiencia humana en las américas, con énfasis en la epidemia venezolana. *Interciencia*. 2009;34(3):163-169.
  17. D'Angelo P, Ameli G, Gutiérrez C. Detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante la PCR, en neonatos de madres seropositivas. *Rev Soc Venez Microbiol*. 2007;27(2):79-84.
  18. Boyle DS, Lehman DA, Lillis L, Peterson D, Singhal M, Armes N, et al. Rapid Detection of HIV-1 Proviral DNA for Early Infant Diagnosis Using Recombinase Polymerase Amplification. Nabel GJ, editor. *mBio*. 2013;4(2):e00135-13.
  19. Li G, De Clercq E. HIV Genome-Wide Protein Associations: A Review of 30 years of research. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2016;80(3):679-731.
  20. Albert J, Fenyö EM. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol*. 1990;28(7):1560-1564.
  21. Locateli D, Stoco PH, Zanetti CR, Pinto AR, Grisard EC. 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. *J Clin Lab Anal*. 2008;22(2):106-113.
  22. Ntambwe EK, Mayemba C, Mbikayi S, Ndarabu A, Lunganza RK, Lelo GM, et al. Implementation of a classic nested PCR DNA for HIV diagnosis in Kinshasa. *Int J Collab Res Intern Med Public Health*. 2014;6(6):0-0.
  23. Marcozzia GIA, García C del RG, D'Angelo P, Rangel H. Optimización de la técnica de PCR reversa para la detección del VIH en plasma de pacientes infectados. *Rev Soc Venez Microbiol*. 2013;33(2):157-161.
  24. What's New in the Guidelines Pediatric ARV. Disponible en: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/2/pediatric-arv/45/whats-new-in-the-guidelines>.
  25. WHO | Diagnosis of HIV infection in infants and children. Disponible en: <https://www.who.int/hiv/pub/paediatric/diagnosis/en/>.
  26. Welcome to CDC stacks. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447>.
  27. Havens PL, Mofenson LM. Evaluation and management of the infant exposed to HIV-1 in the United States. *Pediatrics*. 2009;123(1):175-187.
  28. Feucht UD, Forsyth B, Kruger M. False-positive HIV DNAPCR testing of infants: Implications in a changing epidemic. *S Afr Med J*. 2012;102(3):149-152.
  29. Kumar A, Chordia N. *In silico* PCR primer designing and validation. En: *PCR Primer Design*. Springer; 2015.p.143-151.
  30. Bell JR. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *Biotechniques*. 2008;44(6):834.
  31. Lemmon GH, Gardner SN. Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Annals Clin Microbiol Antimicrobiol*. 2008;7(1):18.
  32. Orozco-Ugarriza M, Anaya P, Martínez Y. Validación *in silico* de oligonucleótidos-primers para la detección específica de *salmonella spp.* mediante reacción en cadena de la polimerasa. *RIADS Rev Investig Agropecu Desarro Sosten*. 2016;1(1):42-50
  33. Totomoch-Serra A, Marquez MF, Cervantes-Barragán DE. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000 Research*. 2017;6.
  34. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre-y postnatal. *Diag Prenat*. 2012;23(2):56-66.
  35. Sequence Extractor. Disponible en: <http://www.bioinformatics.org/seqext/>
  36. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene

- deletions. *BMC Biotechnol.* 2003;3(1):18.
37. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(22):10881-10890.
  38. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410.
  39. Chukwuemeka IK, Fatima MI, Ovavi ZK, Olukayode O. The impact of a HIV prevention of mother to child transmission program in a Nigerian early infant diagnosis centre. *Niger Med J Niger Med Assoc.* 2014;55(3):204-208.
  40. Donovan M, Palumbo P. Diagnosis of HIV: Challenges and strategies for HIV prevention and detection among pregnant women and their infants. *Clin Perinatol.* 2010;37(4):75.
  41. Zhao F, Wang Z, Li W. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes prevalence in central China. *Yonsei Med J.* 2009;50(5):644-649.
  42. Guano Gallardo DM. Aplicación de un método “in house” de PCR anidada para detección de VIH proviral. 2016.
  43. Márquez P, Sánchez M, Bedoya C, Espinosa M, Caicedo I, Nacipucha C, et al. Detección del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en menores de 18 meses provenientes de madres seropositivas. *Cent Biotecnol.* 2017;6.
  44. Apte A, Daniel S. PCR primer design. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;2009(3):pdb- ip65.
  45. Giloteaux L, Goni-Urriza M, Duran R. Nested PCR and new primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. *Appl Env Microbiol.* 2010;76(9):2856-2865.
  46. Koehler AV, Korhonen PK, Hall RS, Young ND, Wang T, Haydon SR, et al. Use of a bioinformatic-assisted primer design strategy to establish a new nested PCR-based method for *Cryptosporidium*. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):509.
  47. Medrano MDC, Melchor OYL. Diseño, validación y aplicación de un set de primers para la detección de Hepatitis viral A. *Av Investig En Inocuidad Aliment.* 2018;1(1).
  48. Mu W, Lu H-M, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing. *J Mol Diagn.* 2016;18(6):923-932.
  49. De Crignis E, Re MC, Cimatti L, Zecchi L, Gibellini D. HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2010;165(1):51-56.
  50. Kairiyama C. Detección de VIH proviral por nested-PCR utilizando metodología casera (in house). *Bioquímica Patol Clín.* 2007;71(1):49-53.1.
  51. Vallejo FG, Domínguez MC. La genotipificación y fenotipificación de la resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a los fármacos antirretrovirales. *Colombia Médica.* 2003;34(3):143-154.