

# Desarrollo de técnicas moleculares para la detección y caracterización genómica de patógenos virales transmitidos por sangre.

**Título corto:** Detección de patógenos virales transmitidos por sangre.

Sandra E. Guerra-Palomares<sup>1</sup>, Daniel E. Noyola-Cherpitel<sup>2</sup>, Christian A. García-Sepúlveda<sup>1</sup>

1- Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.

2- Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.

**Dirigir correspondencia a:**

Christian A. García Sepúlveda  
Laboratorio de Genómica Viral y Humana  
Facultad de Medicina - UASLP  
Avenida Venustiano Carranza #2405  
Colonia Filtros las Lomas, CP 78210  
San Luis Potosí, México  
+52 (444) 826-2344 extensión 568  
christian.garcia@uaslp.mx

## Resumen

Los patógenos transmitidos por sangre (BBP) se transmiten directamente por contacto con la sangre. En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias para la detección de BBP virales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), los virus de la hepatitis B y C (HBV y HCV) y el citomegalovirus (CMV). El objetivo de este estudio fue el desarrollar técnicas moleculares de bajo costo y sencillez técnica para el tamizaje y caracterización genómica de BBP virales. El tamizaje mediante NAT para HIV, HBV y CMV se realizó en 600 muestras de donadores clínicamente al igual que en 319 muestras derivadas de individuos HIV positivos, tanto en minipools como en muestras individuales. Nuestra estrategia molecular de tamizaje nos permitió detectar a 2 muestras (0.16%) positivas para HIV, 7 (1.16%) para HBV y 31 (5%) para CMV en donadores clínicamente sanos. Adicionalmente, pudimos demostrar la presencia de 4 (1.25%) muestras positivas para HBV en la cohorte de pacientes infectados por HIV. Nuestra técnica demostró ser igual de sensible para detectar a HBV en minipool que en muestras individuales. No obstante, la sensibilidad técnica para CMV fue menor al emplear la modalidad minipool. Adicionalmente, se desarrolló una estrategia de caracterización genómica que permitió secuenciar aislados clínicos de HBV obviando la necesidad de cultivar el virus, clonar o purificar el producto de PCR. De esta forma pudimos generar 3 secuencias de genoma completo de HBV (3,215 bp) y una secuencia parcial (2,416 bp). La detección de BBP virales mediante técnicas moleculares incrementa la seguridad del abastecimiento terapéutico de derivados sanguíneos y brinda utilidades adicionales para estudios de epidemiología molecular y genómica.

## Palabras clave

Virología, Transfusión, Hepatitis B, HIV, SIDA, NAT

## Introducción

Los patógenos transmitidos por sangre - BBP por las siglas en inglés de “blood borne pathogens” - son aquellos que se transmiten directamente por contacto con la sangre y que no dependen de un vector intermediario de manera necesaria para su transmisión. No obstante, esto no descarta que las enfermedades transmitidas por sangre puedan ser transmitidas por otras vías (sexual, por vectores). Los BBP incluyen tanto a bacterias como a parásitos y virus. Si bien la transmisión sanguínea de bacterias no es de gran importancia clínica dada la efectividad de nuestro sistema inmune frente a ellas, en algunos casos la seriedad de sus infecciones, la resistencia a antibióticos o el riesgo de bioseguridad que representan las hace particularmente importantes como es el caso de *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes, *Yersina enterocolitica* y *Bacillus anthracis* [1, 2]. Por otro lado los principales parásitos transmitidos por sangre incluyen a *Plasmodium spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Babesia microti* [3-6]. Ciertamente uno de los grupos de BBP de mayor relevancia es el de los virus tanto por la seriedad de sus infecciones como por la dificultad para detectarlos por métodos microbiológicos comunes. Entre los BBP virales más destacados se incluye al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (HIV-1 y 2), los virus de la hepatitis B y C (HBV y HCV), el virus del Nilo Oeste (WNV), el citomegalovirus (CMV), el virus linfotrópico humano tipo I y II (HTLV-I y II) y el virus de Epstein-Barr (EBV) [7]. Los BBP incluyen también a otros virus transmitidos principalmente por vectores pero cuyo riesgo para ser transmitidos por contacto sanguíneo o a través de transfusión es bajo debido al cuadro clínico asociado o su baja prevalencia. Algunos ejemplos destacados de virus transmitidos por vectores incluyen a los virus del dengue, el de la fiebre del valle Rift, el de la fiebre del río Ross, el de la encefalitis de Saint Louis, el de la encefalitis japonesa, los de la encefalitis equina del este y del oeste al igual que el de la encefalitis de La Crosse [8-10].

Los BBP representan un riesgo particularmente preocupante para aquellos pacientes que requieren de transfusiones sanguíneas o de derivados sanguíneos como concentrados plaquetarios, plasma fresco y paquetes globulares. Adicionalmente, los BBP constituyen un riesgo ocupacional para toda persona que de manera rutinaria entra en contacto con especímenes sanguíneos (médicos, paramédicos, personal de enfermería, personal de laboratorio e investigadores). El riesgo que representan los BBP virales para la seguridad del suministro de derivados sanguíneos de uso terapéutico quedó en claro tras la descripción en 1983 de que el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) era causado por un virus transmisible por sangre [11, 12]. A lo largo de los

últimos 30 años los esfuerzos de varios grupos de investigación se han enfocado en desarrollar estrategias de detección viral que sean más rápidas, sensibles y económicas [13].

La hepatitis B es la infección grave más común para el ser humano. Alrededor de 2 mil millones de personas - cerca de un tercio de la población mundial - presentan evidencia serológica del contacto con HBV [14]. En nuestro país, para el año 2007 se reportaban 1.7 millones de personas infectadas por este virus de las cuales 107,000 (el 10%) eran portadores crónicos [15]. A nivel nacional la prevalencia en donadores clínicamente sanos de anticuerpos contra HBV es del 0.216% [16]. En relación al HIV, para el año 2008 se consideraba que a nivel mundial existían 33 millones de personas infectadas por el virus, cifra que representa cerca del 0.6% de la población humana. Tan solo en el 2005 el SIDA ocasionó entre 2.4 y 3.3 millones de muertes, de las cuales casi 600,000 se dieron en población infantil [17]. En México, entre los años de 1985 y 2006 se reportaron 31,797 infectados por HIV, de los cuales 3,798 fueron detectados tan solo en el 2006. La prevalencia de donadores de sangre aparentemente sanos con anticuerpos circulantes para HIV en México ha demostrado ser del 0.288% [16]. El CMV constituye un BBP de elevada prevalencia en la población humana y amplia distribución geográfica y socio-económica. Su seroprevalencia es tan elevada que cerca del 60% de los individuos de edad igual o superior a los 6 años han sido infectados por este virus; el número de personas infectadas aumenta paulatinamente con la edad de tal forma que aproximadamente el 90% de los mayores de 80 años presentan evidencia serológica de infección [18, 19]. El CMV también constituye el virus más comúnmente transmitido al feto por la madre y la etiología viral causante de defectos de nacimiento más importante para países desarrollados [20-22]. La infección por CMV ocasiona importante morbi-mortalidad en pacientes inmunocomprometidos como aquellos con HIV/SIDA, pacientes en hemodiálisis, aquellos con cáncer, al igual que aquellos que se encuentran recibiendo tratamiento inmunosupresor con motivo de trasplante o patologías autoinmunes [23]. En estos pacientes el CMV puede ocasionar hepatitis, retinitis, colitis, neumonitis, esofagitis, entre otras alteraciones. [24].

Para reducir el riesgo de la transmisión de BBP's por transfusión de derivados sanguíneos se han implementado diferentes estrategias además de la exclusión de donadores en base a criterios clínicos y conductas de riesgo. El tamizaje de patógenos virales por métodos serológicos ha demostrado ser la estrategia de mayor utilidad epidemiológica y clínica a nivel mundial dada su sensibilidad, rapidez y costo [25]. La descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1983 por Kary Mullis y su ulterior empleo en lo que sería su primer aplicación diagnóstica (detección de DNA de HIV) rápidamente afirmó la relevancia y los alcances del diagnóstico y

tamizaje basado en ácidos nucleicos – NAT por las siglas anglosajonas de *nucleic acid testing* [26, 27]. A pesar de que las estrategias basadas en NAT originalmente se consideraban como un complemento de las serológicas, su especificidad y la cantidad de información adicional que permitían obtener (información de secuencia) establecieron su utilidad clínica [28, 29]. Ciertamente una de las principales ventajas asociadas a estrategias NAT para el tamizaje de patógenos virales tiene que ver con la reducción del período de ventana diagnóstica. Durante el período de ventana diagnóstica una infección reciente no ha tenido el tiempo suficiente para ocasionar una respuesta inmune mensurable por títulos de anticuerpos o ensayos fenotípicos. Unidades de sangre recolectadas de donadores en este período de ventana son potencialmente infecciosas pero pasan desapercibidas para el tamizaje serológico. Los métodos basados en NAT, particularmente aquellos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, al no depender de la respuesta inmune permiten detectar la presencia de patógenos durante este período o en otras circunstancias en las que los métodos serológicos no lo pueden hacer (pacientes inmunosuprimidos, aquellos con bajas cargas virales, y aquellos sufriendo reactivación de infecciones previas, etc.) [30-32].

El tamizaje de unidades sanguíneas por NAT en los EEUU comenzó de manera rutinaria en 1999 por mandato de la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) en virtud del éxito logrado en Europa con el tamizaje para HCV. De acuerdo a las estadísticas norteamericanas reunidas hasta junio del año 2000, cerca de 16.3 millones de unidades sanguíneas habían sido tamizadas para RNA de HCV y casi 13 millones para RNA de HIV. De éstas, 62 unidades (1 de 263,000 tamizadas) resultaron positivas para RNA de HCV y negativas para HCV por métodos serológicos. Asimismo, 4 unidades (1 de cada 3'150,000) fueron NAT positivas para RNA de HIV pero negativas por serología para el mismo patógeno. Cabe destacar que de no haber empleado NAT, el uso terapéutico de los derivados de estas unidades contaminadas podría haber infectado entre 124 y 186 individuos [33]. En EEUU, a principios de la década de los ochenta la incidencia de transmisión por transfusión de HIV y HBV era extremadamente alta (entre 1:100 y 1:1,000 unidades transfundidas). No obstante, tras la introducción de NAT la proporción de unidades contaminadas por éstos patógenos fue inferior a 1:2'000,000 [34].

Si bien no existen estadísticas similares para nuestro país que permitan describir los beneficios de los cambios en las estrategias de tamizaje de BBP, la adopción de estrategias de tamizaje serológico por bancos de sangre en 1988 logró reducir el riesgo de infección transfusional por HBV y HIV a 1:3,185 y 1:2,781 unidades de sangre, respectivamente [34]. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomienda que las unidades sanguíneas sean sometidas por lo menos a pruebas

de detección para HIV, HBV, HCV y *Treponema pallidum* [35]. La Norma Oficial Mexicana (NOM) establece así mismo la necesidad de incluir a importantes patógenos de interés regional como *Plasmodium*, *Brucella* y *Trypanosoma* [36]. No obstante, tanto la WHO como la NOM omiten indicar el método que debiera preferirse para lograr esto (serológico versus NAT) por lo que la adopción de NAT para dicho objetivo permanece discrecional para cada institución.

Al contemplar adoptar una estrategia de tamizaje de unidades sanguíneas basada en NAT, los servicios de salud de un país deben considerar el balance costo-beneficio. Si bien los métodos serológicos en la mayoría de las ocasiones permiten lograr niveles de detección ligeramente inferiores a los de NAT, tanto el costo como el corto tiempo de procesamiento siguen determinando su ubicuidad. Recientemente se han introducido plataformas comerciales basadas en PCR de tiempo real o PCR cuantitativa para el tamizaje de diversos patógenos. No obstante dichas plataformas comerciales tienen un costo operativo elevado y requieren de personal altamente capacitado. En este manuscrito nosotros exponemos nuestra experiencia al desarrollar, optimizar, validar e implementar técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos de bajo costo y técnicamente sencillas para el tamizaje de BBP virales. Adicionalmente ampliamos los alcances de la estrategia NAT propuesta al describir una técnica molecular capaz de caracterizar el genoma completo de HBV a partir de aislados clínicos mexicanos.

## **Materiales y Métodos**

### **Población de estudio**

Muestras de DNA derivadas de concentrados de leucocitos (CL) desechados por el banco de sangre del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” fueron empleadas para este estudio incluyendo a 300 muestras de donadores clínicamente sanos pertenecientes a la Colección Mexicana de DNA Genómico de Referencia (MGDC-REF) al igual que 300 muestras de donadores cuyo resultado de tamizaje serológico era desconocido al momento de inclusión (MGDC-BD). Adicionalmente se incluyeron 319 muestras derivadas de individuos HIV positivos incluidas en la Colección Mexicana de DNA Genómico – cohorte de HIV (MGDC-HIV). Las muestras de DNA incluidas en la MGDC-HIV fueron referidas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Servicios en Salud del Estado de San Luis Potosí. Dichas muestras sanguíneas fueron otorgadas a nuestro laboratorio tras haber sido empleadas para la evaluación trimestral de linfocitos CD4 de la cohorte de pacientes HIV-infectados bajo seguimiento por parte del Centro Ambulatorio de Prevención y Atención en SIDA e

Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) local. Todas las muestras incluidas en este estudio fueron anónimas al ingresar al laboratorio tras haber recibido la aprobación de parte de los comités de ética e investigación institucionales correspondientes (Facultad de Medicina, Laboratorio Estatal y CAPASITS).

### **Extracción de DNA y preparación de minipools**

El DNA de las muestras pertenecientes a la MGDC-REF fue extraído por el método de Drábek en modalidad maxiprep a partir de 15 mL de concentrado de leucocitos de acuerdo al protocolo optimizado previamente publicado [37]. Adicionalmente, 750  $\mu$ L de CL fueron procesados por el método Drábek en modalidad microprep para muestras derivadas de donadores de sangre incluidas en la MGDC-BD. Finalmente, el DNA de las muestras de sangre de pacientes infectados por HIV fue extraído empleando el método Drábek en modalidad microprep (750  $\mu$ L) y miniprep (3 mL). La cantidad y calidad del DNA extraído fue evaluada mediante espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, Delaware, EEUU). La integridad del DNA extraído fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la funcionalidad por PCR para un gen presente en todo ser humano (KIR3DL2). Los minipools empleados para el tamizaje de BBP se prepararon mezclando volúmenes iguales de las soluciones de DNA derivadas de cinco muestras de CL.

### **Detección de BBP virales por PCR anidada**

El tamizaje de BBP's virales se basó en dos modalidades diferentes para detectar a HBV, HIV y CMV; la primera basada en PCR's anidadas individuales para cada patógeno y la segunda basada en PCR múltiplex anidada para los tres patógenos en una sola reacción. El acercamiento anidado consta de una primera PCR que emplea oligonucleótidos externos (FO y RO en la tabla 1) para cada uno de los blancos de amplificación (los tres patógenos y el control interno). Al término de la primer PCR el producto es diluido 1:10 con agua destilada y 1  $\mu$ L de esta dilución empleada como sustrato para una segunda ronda de PCR empleando oligonucleótidos internos (FI y RI en la tabla 1) para cada fragmento génico incluyendo el control interno. Ambas PCR's (las externas e internas) se realizan a un volumen final de 12.5  $\mu$ L. Los componentes de la primer PCR incluyeron 3 mM  $MgCl_2$ , 200 nM dNTP's, 0.3 IU Taq DNA polimerasa (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malasia) y 800 nM de cada oligonucleótido. La segunda PCR empleo las mismas concentraciones de todos los componentes con la excepción de 3 mM  $MgCl_2$ . El programa de termociclaje para ambas PCR's inició con una desnaturalización a 94 °C por 3 minutos seguida de 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 56 °C y 15 segundos a 72 °C culminando con una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Para la primer PCR del tamizaje por PCR anidada múltiple se utilizó 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 nM de oligonucleótidos de HBV y 3DL2 junto con 800 nM de oligonucleótidos de HIV y CMV. El programa de termociclaje para la primer PCR constó de la desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos seguida de 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 30 segundos a 72 °C culminando con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La segunda PCR empleó 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 400 nM de oligonucleótidos de HBV, 800 nM de oligonucleótidos HIV y CMV al igual que 50 nM de oligonucleótidos 3DL2. El segundo programa de termociclaje constó de la desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C y 30 segundos a 72 °C con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los amplicones de la segunda PCR fueron visualizados y documentados tras electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 6 V/cm empleando un fotodocumentador digital (Ultra-Violet Products Limited, Reino Unido).

#### **Evaluación de la extracción de ácidos nucleicos virales y del límite de detección de la PCR**

La evaluación del desempeño del método Drábek para extraer DNA viral se basó en la contaminación de muestras sanguíneas BBP-negativas con una cantidad conocida de partículas de CMV íntegras. Para ello se empleó el sobrenadante de un cultivo de la cepa HCMV-AD169 aportado por el Laboratorio de Virología de la UASLP. La carga viral de dicho sobrenadante había sido previamente determinada por qPCR de tiempo real en el Hospital Infantil de México (Cortesía de la Dra. Briseida Martínez), siendo esta de  $1 \times 10^{10}$  copias/ml. El sobrenadante de cultivo fue mezclado con sangre CMV negativa para generar una serie de muestras con concentraciones finales de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ , 1000, 100 y 50 copias/ml. Las muestras fueron entonces procesadas por tres métodos de extracción de DNA diferentes: Drábek, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI) y el kit comercial Wizard (Promega Corporation, EEUU) y la cantidad y calidad del DNA extraído evaluadas por espectrofotometría. Finalmente las muestras de DNA extraídas fueron sometidas al escrutinio de CMV basado en la técnica de PCR anidada anteriormente mencionada. La evaluación visual de la intensidad de los amplicones generados tras el tamizaje de CMV de cada una de las muestras procesadas por estos tres métodos permitió comparar su desempeño para extraer ácidos nucleicos virales. De manera adicional, diluciones seriadas del DNA extraído por Drábek directamente del sobrenadante fueron empleadas para evaluar el límite de detección de la PCR para CMV. Durante la manipulación del sobrenadante de cultivo viral se adoptó una disciplina de trabajo apropiada para organismos de nivel de bioseguridad 3 con medidas de protección personal primaria y secundaria propias para un nivel de bioseguridad 2 [38].



Finalmente, para evaluar el límite de detección de la PCR para HIV se emplearon muestras de plasma de carga viral conocida para extraer RNA (High Pure Viral RNA kit, Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y realizar el tamizaje con un acercamiento RT-PCR empleando un protocolo estándar de síntesis de primer cadena (1.25  $\mu$ M de oligonucleótidos HIV externos, 10 mM dNTP's, 6  $\mu$ L de RNA y 100 IU de Rnase H- mMULV-RT, Vivantis) seguido de los mismos componentes y condiciones de PCR anteriormente descritos para la PCR de HIV (utilizando 1, 2, 4 y 6  $\mu$ L de cDNA como sustrato). La cuantificación de la carga viral de las muestras fue realizada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí.

### **Secuenciación genómica de HBV**

La amplificación genómica completa de aislados clínicos de HBV se basó en un acercamiento de amplificación por PCR de amplicones anidados para generar un contig por empalme de cinco fragmentos subgenómicos (figura 1). Primero se realizó una PCR genómica completa empleando los oligonucleótidos P1 y P2 (ver tabla 2) a 400 nM, 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 200 nM de dNTP's y 0.5 IU de Taq/Pfu en proporción de 9:1 en un volumen final de reacción de 12.5  $\mu$ L. Las condiciones de termociclaje para la amplificación del fragmento de 3.2 kb de interés constaron de una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1.5 minutos a 58 °C y 3 minutos a 72 °C; seguido de 20 ciclos durante los cuales el tiempo de extensión aumentaba automáticamente 2 minutos cada 10 ciclos, seguido una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Si bien el producto de amplificación de 3.2 kb se detectó en algunos casos, no se documentó su presencia antes de continuar con las PCR subgenómicas.

La amplificación de los cinco fragmentos subgenómicos (FA1, FA2, FA3, FA4 y FA5) se realizó empleando 2  $\mu$ L de una dilución 1:10 del producto de la PCR genómica con 400 nM, 2.5 mM de  $MgCl_2$ , 200 nM de dNTP's y 0.5 IU de Taq/Pfu en proporción de 9:1 en un volumen final de reacción de 12.5  $\mu$ L. El programa de termociclaje constó de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C seguidos de 5 minutos a 72 °C. Aproximadamente 20  $\mu$ L del producto de PCR fue enviado a secuenciar directamente sin purificar ni clonar los fragmentos, sin embargo, se evaluó la presencia del producto de amplificación y la ausencia de productos inespecíficos mediante electroforesis. La secuenciación se realizó en dos direcciones para cada fragmento por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Cinvestav Irapuato (Guanajuato, México).

### **Análisis bioinformático**

Los trazos electroforéticos producidos por el secuenciador de DNA fueron analizados empleando la aplicación 4Peaks ([mekentosj.com/science/4peaks/](http://mekentosj.com/science/4peaks/)). El análisis de homología y similitud de genomas completos se realizó empleando la aplicación en línea de Basic Local Alignment Search Tool ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)). Alineamientos nucleotídicos que incluían nuestras secuencias al igual que las secuencias consenso de cada uno de los genotipos de HBV conocidos (A, B, C, D, E, F, G y H) se generaron con Clustalw2[39] y fueron reformateados para unanimidad empleando una aplicación en línea a la cual gentilmente se nos permitió acceso por James Robinson [40]. Las secuencia consenso fueron generadas con la aplicación Simple Consensus Maker de la base de datos de secuencias de HIV del Laboratorio Nacional de los Alamos [41]. El análisis global y por sitio codónico de la relación dn/ds para cada uno de los marcos de lectura (ORF) codificados por el genoma viral se realizó empleando el algoritmo "Codon-based Z-test of selection" y "Position-wise codon based selection estimation (HyPhy)" del paquete de análisis Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA5 [42]. El análisis de similitud y de eventos recombinatoriales se realizó empleando la aplicación SimPlot versión 3.5.1 [43]. Los archivos electrónicos, alineamientos, secuencias en formato FASTA y demás información generada durante este análisis son del dominio público y puede ser descargada libremente en nuestro sitio web ([www.genomica.uaslp.mx/DB/HBV](http://www.genomica.uaslp.mx/DB/HBV)).

### **Resultados**

En total 919 muestras de DNA fueron extraídas: 600 a partir de CL y 319 a partir de sangre total. De los CL 300 fueron procesados con la modalidad maxiprep-CL (MGDC-REF) y 300 en la modalidad microprep-CL (MGDC-BD). Por otro lado, las 319 muestras de sangre entera fueron procesadas empleando la modalidad microprep-SE; adicionalmente, 304 de ellas también fueron procesadas empleando la modalidad miniprep-SE. Las muestras derivadas de CL incluidas en la MGDC-REF y -BD fueron procesadas a no más de 24 hrs. de haber sido recolectadas mientras que las muestras de SE incluidas en la MGDC-HIV fueron procesadas entre 24 y 48 hrs. tras su recolección. Los parámetros espectrofotométricos de las muestras de DNA extraída para cada colección, fuente y modalidad se resumen en la tabla 3. La cantidad de DNA total extraída a partir de CL por maxiprep fue de  $4,592.4 \pm 2010.0 \mu\text{g}$  (107.9 – 13,499.5), la cantidad de DNA total extraído a partir de SE por microprep fue de  $0.22 \pm 0.13 \mu\text{g}$  (0.1 – 1.42). El rendimiento de extracción de DNA por microprep a partir de CL fue de  $209 \pm 88.6 \mu\text{g}$  (32.6 – 452.5) y para

maxiprep a partir de CL fue de  $309.6 \pm 135.1 \mu\text{g}$  (25.4 – 890) mientras que el de SE fue de  $0.3 \pm 0.18 \mu\text{g}$  (0.1 – 2). El índice  $A^{260/280}$  para todas las muestras fue mayor a 1.8, mientras que el de  $A^{260/230}$  fue superior a 1.9. Estimaciones basadas en el conteo celular nos permitieron establecer que el método de Drábek es capaz de extraer aproximadamente 85% del DNA teóricamente disponible.

La cantidad de DNA total extraída de las muestras de SE contaminadas con CMV a partir por Drábek en microprep fue de  $18.0 \pm 2.5 \mu\text{g}$  (13.0 – 22.2), por PCI fue de  $22.7 \pm 15 \mu\text{g}$  (0.66 – 44.4) y por el kit fue de  $8.31 \pm 2.4 \mu\text{g}$  (2.43 – 13.71). El rendimiento de extracción de DNA por el método de microprep fue de  $24 \pm 3.34 \mu\text{g}$  (17.4 – 29.6), el obtenido por el kit fue de  $13.9 \pm 3.97$  (4.0 – 22.7), mientras que para PCI fue de  $7.57 \pm 5.18 \mu\text{g}$  (0.22 – 14.8). El índice  $A^{260/280}$  para las muestras obtenidas por microprep fue de  $1.87 \pm 0.03$  (1.82 – 1.92), por PCR fue de  $1.78 \pm 0.13$  (1.39 – 1.87) y por el kit fue de  $1.83 \pm 0.04$  (1.68 – 1.87). El de  $A^{260/230}$  fue mayor a 1.9 en todos los métodos.

Los DNA's extraídos con el kit comercial permitieron amplificar títulos 1 Log más bajos de CMV ( $1 \times 10^4$  copias/mL) que los extraídos con los métodos de Drábek y PCI ( $1 \times 10^5$  copias/mL de sangre). Ninguno de los métodos demostró ser capaz de permitir la amplificación de CMV a títulos  $\leq 1000$  copias/mL de sangre (ver figura 2).

El límite de detección de RNA viral de HIV empleando nuestra técnica de PCR precedida por un paso estándar de transcripción inversa resultó ser de 152 copias/mL de sangre. No se intentó optimizar la técnica de RT-PCR para amplificar muestras con títulos de HIV inferiores (ver figura 3).

El tamizaje por métodos serológicos realizado por el banco de sangre sobre las muestras incluidas en la MGDC-REF refirió la presencia de 5 muestras positivas en la anticuerpos contra el antígeno de superficie de HBV (HBsAg) y 5 muestras positivas para HIV. El tamizaje serológico rutinario de CMV no es realizado de manera rutinaria por el banco de sangre referente. El tamizaje por NAT empleando nuestras técnicas de PCR anidada individuales en la MGDC-REF demostró la presencia de 5 muestras positivas para HBV, 2 positivas para HIV y 23 positivas para CMV. Este acercamiento ratificó tres resultados de serología obtenidos para HBV y dos resultados de serología para HIV. De manera agregada, nuestro acercamiento permitió detectar la presencia de 2 muestras HBV-positivas adicionales. Las muestras positivas por serología para HBV y HIV que resultaron negativas por NAT fueron verificadas en más de dos ocasiones con nuestro acercamiento NAT y la

integridad y funcionalidad del DNA corroborado para genes KIR. La MGDC-HIV fue tamizada en busca de coinfecciones de HBV-HIV empleando la técnica de PCR anidada individual revelando la presencia de 4 muestras HBV-positivas.

Las muestras incluidas en la MGDC-BD fueron tamizadas para los tres patógenos empleando nuestro acercamiento PCR múltiplex el cual demostró la presencia de 2 muestras HBV positivas, ninguna muestra HIV-positiva y 8 muestras CMV positivas, sin evidencia de coinfecciones. El tamizaje serológico realizado por el banco de sangre referente reportó la presencia de 2 muestras con títulos elevados para HBV (pero aun por debajo del nivel positivo) al igual que ninguna muestra positiva para HIV. El tamizaje de minipools de cinco muestras (MP-5) realizado con nuestro acercamiento múltiplex al igual que con PCR's individuales demostró una concordancia del 100% en los resultados generados para HBV. No obstante, tan solo 2 muestras resultaron positivas para CMV al tamizar minipools con la PCR individual. Ninguna muestra resultó positiva para CMV al tamizar minipools con el acercamiento PCR múltiplex. En todos los casos las PCR's individuales y en múltiplex generaron amplicones bien definidos, no-ambiguos y de fácil identificación (Ver figura 4).

Se generó información de secuencia de HBV para 4 aislados clínicos diferentes, tres de ellas genómicas completas (3,215 kb) y una de ellas parcial (2,416 kb), ver figura 5. Dos de los DNA's que produjeron dichas secuencias pertenecían a la MGDC-REF (muestras MXSLP00102 y MXSLP00114) mientras que los otros dos pertenecían a la MGDC-HIV (MXHIV00153 y MXHIV00201). Solo una de las muestras permitió la visualización del producto de amplificación del genoma completo al término de la primer PCR (MXHIV00201). Las secuencias anotadas de los 4 aislados clínicos fueron depositadas en GenBank (MXSLP00114 = HM066946, MXHIV00153 = HM117850 y MXHIV00201 = HM117851; Número de acceso pendiente para MXSLP00102). Se obtuvieron trazos de secuenciación de alta calidad de alrededor de 900 bp para ambas direcciones y para todos los fragmentos de los 4 aislados clínicos con la excepción del fragmento 4 y 5 de la muestra MXSLP00102. No se observaron posiciones ambiguas en la superposición de secuencias resultante de la construcción del contig de amplicones.

El análisis de homología de la totalidad del genoma viral basado en BLAST demostró una similitud del 99% con secuencias de HBV de genotipo H serotipo adw aisladas en EEUU y México durante el 2008 (AB059661, AB375162 y AB375164 de GenBank). Esta homología se confirmó al analizar nuestras secuencias contra secuencias consenso de cada uno de los 8 genotipos (A, B, C, D, E, F, G

y H) empleando SimPlot, demostrando una similitud  $> 95\%$  para la mayor parte de la extensión del genoma (Ver imagen 6). Interesantemente descubrimos que las secuencias de genotipo H (incluyendo las nuestras) poseían cuatro regiones genómicas de mayor disimilaridad para con las demás secuencias (región 1, 2, 3 y 4 de la figura 6). La región 1 exhibe una similitud de aproximadamente  $77\%$  para con las secuencias del genotipo H y abarca del nucleótido 741 al 1141. Esta región corresponde a la ubicación aproximada del codón de paro de la proteína S. La región 2 exhibe una similitud de tan solo  $81\%$  con las secuencias del genotipo H y abarca del nucleótido 1500 al 1780 para incluir la ubicación aproximada de los codones de paro de la polimerasa. La región 3 abarca las posiciones 1900 a 2300, posee una similitud de  $72\%$  e incluye la ubicación aproximada del codón de paro de la proteína X. Por último, la región 4 que abarcaba del nucleótido 2420 al 2720 exhibía una similitud del  $75\%$  con genotipos H, correspondiendo a la ubicación aproximada del codón de paro de la proteína core/precore.

El análisis de ventana desplazante empleando una estrategia Bootscan de mayor resolución permitió confirmar nuevamente la homología de nuestras secuencias con el consenso del genotipo H. De manera inusitada, la secuencia derivada de MXHIV00153 demostró evidencia de dos eventos de recombinación francos localizados entre las posiciones 160-180 y 1860-1900. Para la región comprendida entre las posiciones 160 y 180 nuestra secuencia presentaba mayor homología con la secuencia consenso de genotipos D que con los H. Esta región corresponde al inicio de la región codificante para la proteína de superficie (HBsAg). Para la región comprendida entre las posiciones 1860 y 1900 la homología era superior para con las secuencias de genotipos F. Este último evento de recombinación se encuentra localizado al inicio de la región codificante de la proteína core (HbcAg). De manera adicional, el análisis de Bootscan demostró la existencia de otras tres regiones en las cuales nuestras secuencias muestran vestigios de eventos recombinantes relativamente recientes involucrando a secuencias de genotipos D (ver figura 7).

El análisis de la relación de sustituciones no-sinónimas versus sinónimas (dn/ds) para cada uno de los ORF reveló la preponderancia de sustituciones sinónimas con valores estadísticamente significativos en apoyo de selección purificante (p.ej.,  $dN < dS$ , Global Z-test  $p=0.006$  para la región Pre-S1/Pre-S2/S,  $p=0.00007$  para la región de la polimerasa,  $p=0.0007$  para la región Pre-core/core). El análisis del ORF correspondiente a la región codificante de la Proteína X no demostró valores estadísticamente significativos para ninguna de las hipótesis de presión selectiva.

## Discusión

El método de extracción de DNA Drábek demostró ser una alternativa económica, técnicamente sencilla y de aplicabilidad rutinaria para la extracción de DNA de calidad equiparable, tanto en calidad como cantidad, al método estándar representado por el PCI. Nuestros resultados demuestran igualmente la capacidad que tiene este método para aislar ácidos nucleicos virales a partir de muestras sanguíneas, incluso para títulos virales bajos. Si bien el DNA extraído con el kit comercial permitió detectar títulos virales 1 Log menores a los del método Drábek, logra esto a expensas de un costo 32 veces superior y produciendo una cantidad limitada de DNA (aproximadamente 50  $\mu$ L de una solución a 100 ng/ $\mu$ L). Tanto el costo como el bajo impacto ambiental del método Drábek se ponen en evidencia al contemplar que el procesamiento de las más de 900 muestras incluidas en este estudio hubiesen requerido de aproximadamente 15 litros de PCI. El análisis del lapso de tiempo entre la toma de muestra y su procesamiento demostró explicar la disminución del rendimiento de extracción de DNA entre las modalidades maxiprep empleadas para MGDC-REF (lapso <24 hrs.) y la modalidad microprep empleada para la MGDC-HIV (entre 2 y 25 días). La evaluación del costo de cada método para extraer DNA a partir de 3 mL de sangre entera claramente indica la ventaja del método Drábek (\$2.95 MXN + IVA) en comparación al kit comercial (\$83.2 MXN + IVA) y al método de fenol cloroformo (\$108.66 MXN + IVA).

Durante los procedimientos de validación de las técnicas NAT aquí mencionadas se realizaron optimizaciones dirigidas a lograr amplicones de alto rendimiento empleando diluciones seriadas de las muestras que iban demostrando ser positivas. Estas optimizaciones nos llevaron a lograr una elevada sensibilidad de detección tanto para las técnicas individuales como para los múltiplex. Este hecho fue confirmado al emplear nuestra técnica de PCR anidada para HIV en formato RT sin siquiera optimizar las condiciones o componentes de transcripción inversa. Los resultados de dicho experimento permitieron establecer el límite de detección de nuestra técnica en formato RT-PCR en alrededor de 150 copias/mL.

La aplicación de nuestro acercamiento NAT al tamizaje de las 600 muestras derivadas de donadores sanos no demostró lograr mayor sensibilidad de detección para HIV ya que las dos muestras HIV positivas fueron detectadas tanto por serología como por NAT. No obstante, nuestro acercamiento NAT permitió identificar 3 resultados falsos positivos producidos por serología. La seroprevalencia de muestras HIV positivas fue de 0.83% mientras que la prevalencia de HIV por NAT en esta población de donadores demostró ser de tan solo 0.33%. Varios estudios previos han enumerado algunas de las causas que explican la presencia de reacciones cruzadas con los métodos serológicos

entre las cuales destacan: la presencia de enfermedades autoinmunes, hepatitis alcohólica, mieloma múltiple, hemofilia, hiperbilirrubinemia, infecciones por herpes simplex tipo 2, la administración de vacunas recientes y algunas enfermedades infecciosas respiratorias [44-46]

En base a estos resultados es posible indicar que un acercamiento NAT no necesariamente permitiría incrementar el número de detecciones de HIV pero sí representaría una mayor precisión diagnóstica. De cualquier manera, basados en los algoritmos adoptados por otros países ya experimentados en el uso de NAT, los resultados de NAT aun no suplantaron a los de serología para HIV. La prevalencia de HIV en donadores de sangre encontrada con NAT concuerda con los reportados por estudios serológicos previos para el estado de San Luis Potosí (0.31%) [34], resultando ligeramente superior al reportado a nivel nacional (0.28%) [16, 34].

Para HBV y CMV, no obstante, la utilidad del acercamiento NAT es sin duda ventajosa y alentadora en comparación a la serología. Para HBV se tamizaron 919 muestras, 600 de donadores clínicamente sanos y 319 de la colección de HIV. De las 600 muestras derivadas de donadores sanos, el tamizaje serológico realizado por el banco de sangre demostró la presencia de 5 positivos para HBV y dos muestras adicionales con títulos altos pero por debajo del umbral decisivo. Nuestro tamizaje NAT permitió confirmar la presencia de DNA de HBV en 3 muestras seropositivas y detectar 4 muestras adicionales seropositivas (dos de las cuales correspondían a las muestras de títulos elevados pero no diagnósticos). Estos resultados establecen la seroprevalencia de HBV en 0.83% y la prevalencia de HBV por NAT en 1.16%. La prevalencia de HBV tanto por serología como por NAT encontrados por este estudio son superiores a los reportados por estudios análisis previos, en los cuales la prevalencia es de 0.21% a nivel nacional y 0.34% para el estado [34]. Estos resultados dependen en gran medida del número de muestras, por lo cual la prevalencia encontrada pudiera no ser comparable al haber limitado nuestro estudio a tan solo 600 muestras [15, 16, 34].

Al tamizar la MGDC-HIV se detectaron 4 muestras infectadas por HBV (coinfeción con HIV) lo que coloca la prevalencia de este agente en esta población de pacientes en 1.25%. La prevalencia de HBV en pacientes con infección por HIV resultó menor en nuestro estudio en comparación con la reportada en estudios previos, que indican que en México la coinfección de HBV-HIV se presenta en 7.9% de los pacientes HIV-infectados [47-49]. No obstante, estos resultados se obtuvieron a partir de pruebas serológicas, lo que puede explicar la diferencia entre ellos y empujarnos a señalar que nuestros datos pudieran representar una mejor estimación de la cifra real.

En relación al tamizaje de CMV por NAT los resultados apoyan la importancia de implementar dicho tamizaje al uso rutinario por bancos de sangre. El tamizaje de CMV por NAT se realizó en las 600 muestras de la población abierta de las cuales 31 fueron positivas. Estos resultados establecen la prevalencia de detección de DNA de este agente en 5.17% para donadores clínicamente sanos. La frecuencia de la detección DNA de CMV en donadores de sangre es muy variable y depende, entre otros factores, de la seroprevalencia de anticuerpos para CMV en la población de estudio, del momento de la infección, del ensayo y la técnica de extracción de DNA que se utiliza para la detección molecular [7]. El tamizaje de éste agente entre la población de la MGDC-HIV es actualmente motivo de un proyecto paralelo.

La inclusión de un control interno dirigido contra un gen presente en todos los seres humanos (KIR3DL2) representó un valor agregado sumamente útil al permitir reducir la incertidumbre asociada a reacciones negativas y obviar la necesidad de realizar corridas confirmatorias por duplicado o triplicado. El no haber incluido dicho control interno en nuestro acercamiento NAT hubiese obligado a verificar todo resultado negativo con una nueva corrida de tamizaje o por otro acercamiento rápido.

La idea de adoptar un acercamiento minipool al tamizaje de BBP's se deriva de la necesidad de disminuir costos al igual que para facilitar el tiempo de procesamiento asociado a NAT. Nuestros experimentos demostraron que la estrategia de PCR múltiplex en formato minipool posee la misma sensibilidad de detección para HIV y HBV más no para CMV (ver tabla 4). La mejor estrategia de NAT para CMV resultó ser el múltiplex aplicado a muestras individuales posiblemente como consecuencia de la dilución impuesta por la inclusión de 4 DNA's adicionales.

Las estrategias minipool empleadas previamente de manera rutinaria por otros grupos se han basado en la compilación de entre 4 y 96 muestras de suero, plasma o sangre entera. Si bien el tamizaje de HIV y HCV ha empleado minipools grandes de hasta 96, aquellos para HBV suelen trabajar con minipools de menor tamaño entre 4 y 24. Un estudio previo evaluó la sensibilidad de la detección de HBV en muestras individuales y minipools (de 10 a 500 muestras). Dicho estudio reportó que de las 75 muestras positivas de manera individual 8 resultaron negativas al ser tamizadas en minipools de 10 muestras [50]. En nuestro estudio se trabajó con minipools de 5 muestras lo que posiblemente explique la razón por la que no encontramos diferencias en comparación al tamizaje de muestras individuales. Para el caso de infección por HBV oculta, estudios previos han demostrado que el



tamizaje individual es significativamente más sensible que el tamizaje de minipools de 4 muestras [51].

El tamizaje en minipools empleando nuestro acercamiento NAT en múltiplex sobre las 300 muestras de la MGDC-BD demostró la presencia de 2 muestras positivas para HBV, 2 para CMV y ninguna para HIV. Las mismas muestras se tamizaron también en minipool pero con el acercamiento NAT de PCR individual para cada uno de los patógenos obteniendo los mismos resultados excepto para CMV en donde la PCR individual demostró superar al múltiplex en sensibilidad de detección. En el caso de HIV esta comparación no se pudo realizar dada la baja frecuencia de éste patógeno.

La baja prevalencia en nuestro país de los BBP estudiados junto con el tamaño de la muestra sobre la que realizamos este estudio limita las inferencias que pueden realizarse respecto a la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la técnica NAT. No obstante, se contempla continuar con este proyecto hasta lograr una población que nos permita realizar dichas inferencias con significancia estadística.

En resumen, la estrategia de NAT desarrollada por nuestro laboratorio cumple con el objetivo de facilitar la adopción de estrategias basadas en NAT por laboratorios de países en vías de desarrollo al disminuir costos e incrementar la sensibilidad y especificidad de detección de las actuales estrategias serológicas.

La técnica de detección de HBV nos permitió identificar muestras positivas para este virus lo que hizo posible la posterior caracterización genómica de 4 muestras pertenecientes a pacientes mexicanos residentes de San Luis Potosí. La técnica de secuenciación genómica basada en la amplificación de fragmentos subgenómicos permitió generar 18 de los 20 amplicones deseados (90%). Nosotros creemos que los dos amplicones que no pudieron ser generados (fragmentos 4 y 5 de la muestra MXSLP00102) debieron presentar polimorfismos en los sitios de hibridización de los oligonucleótidos debido a que la intensidad de los otros tres fragmentos subgenómicos fue comparable a la de las otras muestras. Cabe resaltar de manera adicional que los títulos de serología de HBV para esta muestra se encontraban por debajo del nivel diagnóstico por lo que las dificultades en amplificar estos dos fragmentos pudieran deberse también al efecto de una baja carga viral. No obstante, esto no explica el éxito obtenido con los primeros tres fragmentos subgenómicos para la misma muestra.

La calidad de los trazos de secuenciación generados es un indicativo de la calidad del DNA extraído con el método Drábek al permitir obtener lecturas de rango extendido (superior a los 900 bp) y la construcción del contig genómico. La estrategia de amplificación de fragmentos subgenómicos representa una alternativa práctica a los acercamientos tradicionales ya que permite obviar la necesidad de expandir al virus por cultivo, clonar y/o purificar los productos de PCR. Si bien este proyecto no tenía como objetivo llevar a cabo un estudio extenso sobre la diversidad genómica de HBV en México, si demuestra las capacidades de las técnicas desarrolladas y los resultados concuerdan con la información producida por estudios previos. Las 4 secuencias generadas concuerdan en más de un 99% con secuencias del genotipo H, lo cual apoya los resultados de artículos previos que describen a este genotipo como el de mayor prevalencia en México [52]. El análisis subgenómico de homología realizado por SimPlot brindó mayor evidencia en apoyo a esto. No obstante, el análisis de Bootscan empleando esta misma aplicación reveló evidencia de un evento de recombinación de HBV no descrita anteriormente para México u otros aislados de HBV del mundo.

El análisis de las substituciones por sitio para cada uno de los marcos de lectura (ORF) codificantes para las proteínas de HBV revela la abundancia de mutaciones sinónimas respecto a las no-sinónimas. Este fenómeno es característico de ácidos nucleicos con un origen relativamente común así como para aquellos que codifican para una proteína que debe mantenerse conservada para llevar a cabo su función. Es decir, es indicativo de la existencia de presión selectiva encaminada a mantener conservadas las estructuras tridimensionales o la función de las proteínas. En el caso de HBV el predominio de substituciones sinónimas parece ser resultado de la enorme presión selectiva impuesta por la existencia de ORF's empalmados lo que disminuye la posibilidad de tolerar mutaciones por drift genético meramente. Esto contrasta con los hallazgos del análisis de substituciones en otros virus como el de HIV e influenza (sobre todo de las glicoproteínas de superficie) en las cuales la presión selectiva ejercida por la respuesta inmune lleva al virus a sufrir un acúmulo de mutaciones generando una mayor variabilidad antigénica. Esto supone que HBV es menos eficiente para cambiar y evadir al sistema inmune por este mecanismo en comparación al HIV y al virus de influenza. Interesantemente, estos hallazgos explican el éxito obtenido con las estrategias de inmunoprofilaxis actualmente en uso para HBV así como la perdurabilidad de la respuesta inmune en contra de este agente.

Los estudios de caracterización genómica de patógenos transmitidos por sangre realizados de manera rutinaria complementan las estrategias de vigilancia epidemiológica y guían las intervenciones diagnósticas y terapéuticas al permitir descubrir mutaciones asociadas a escape diagnóstico o a resistencia a medicamentos [53]. De manera adicional, la caracterización genómica de HBV en particular permite la identificación del genotipo viral circulante así como la existencia de mutaciones de relevancia pronóstica y terapéutica [54, 55]. Estudios ulteriores dedicados a caracterizar la extensión de la diversidad genómica de aislados mexicanos de HBV empleando esta técnica permitirán mejorar esta perspectiva y las inferencias que puedan derivarse de ella.

El riesgo transfusional en México continúa siendo elevado cuando se compara con el de países desarrollados. Las múltiples referencias que fueron revisadas con motivo de este estudio permiten señalar que los servicios de salud de nuestro país sufren un retraso tecnológico de casi 20 años en materia de seguridad biológica de productos sanguíneos de uso terapéutico [56]. Si bien las estrategias de tamizaje de BBP's por NAT han sido adoptadas por varios países desarrollados, la baja aceptación y adopción de dichas estrategias por países en vías de desarrollo obedece a varios factores entre los cuales destacan el costo, la falta de personal capacitado y la dificultad percibida para el uso de las técnicas moleculares.

Nuestro trabajo representa un intento práctico por resolver una demanda sanitaria tangible en relación al diagnóstico, monitoreo y estudio de enfermedades infecciosas empleando métodos moleculares de alta resolución específicamente diseñados para el contexto social, tecnológico y económico de nuestro país.

## **Agradecimientos**

Nuestro agradecimiento al personal del Laboratorio de Genómica Viral y Humana de la UASLP, en especial a la MC Diana L. Alvarado-Hernández, a la QFB Elizabeth E. Godoy-Lozano y al IB Pedro G. Hernández por su valiosa contribución al proyecto. Extendemos nuestro agradecimiento al Dr. Oscar Pérez y a todo el personal del banco de sangre del Hospital Central al igual que al Dr. Uciel Ochoa Pérez y al personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí por su ayuda en la referencia de muestras.

## Referencias

- 1 Wagner SJ: Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang*. 2004;**86**: 157-63.
- 2 Brecher ME, Hay SN: Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev*. 2005;**18**: 195-204.
- 3 Kitchen AD, Chiodini PL: Malaria and blood transfusion. *Vox Sang*. 2006;**90**: 77-84.
- 4 Dodd R, Kurt Roth W, Ashford P, Dax EM, Vyas G: Transfusion medicine and safety. *Biologicals*. 2009;**37**: 62-70.
- 5 Leiby DA: Threats to blood safety posed by emerging protozoan pathogens. *Vox Sang*. 2004;**87 Suppl 2**: 120-2.
- 6 Cardo LJ: Leishmania: risk to the blood supply. *Transfusion*. 2006;**46**: 1641-5.
- 7 Kozireva S, Nemceva G, Danilane I, Pavlova O, Blomberg J, Murovska M: Prevalence of blood-borne viral infections (cytomegalovirus, human herpesvirus-6, human herpesvirus-7, human herpesvirus-8, human T-cell lymphotropic virus-I/II, human retrovirus-5) among blood donors in Latvia. *Ann Hematol*. 2001;**80**: 669-73.
- 8 Gallian P, De Lamballerie X, De Micco P, Andreu G: [West Nile virus (WNV): generalities and implications for blood transfusion]. *Transfus Clin Biol*. 2005;**12**: 11-7.
- 9 Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK: Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2008;**359**: 1526-7.
- 10 Dodd RY: Current risk for transfusion transmitted infections. *Curr Opin Hematol*. 2007;**14**: 671-6.
- 11 Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M: Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;**220**: 865-7.
- 12 Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;**220**: 868-71.
- 13 Borkent-Raven BA, Janssen MP, van der Poel CL, de Wit GA, Bonsel GJ, van Hout BA: Cost-effectiveness of additional hepatitis B virus nucleic acid testing of individual donations or minipools of six donations in the Netherlands. *Transfusion*. 2009;**49**: 311-9.
- 14 Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD: Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleve Clin J Med*. 2008;**75**: 881-9.
- 15 Valdespino JL: Prevalencia en México de la infección y el estado de portador de la hepatitis B en adultos. *Salud Pública de Mex*. 2007;**49**: S404-S11.
- 16 Serrano Machuca JJ, Villarreal Rios E, Galicia Rodriguez L, Vargas Daza ER, Martinez Gonzalez L, Mejia Damian AF: [Detection of antibodies present in blood donors in Mexico]. *Rev Panam Salud Publica*. 2009;**26**: 355-9.
- 17 Loewenson R: Exploring equity and inclusion in the responses to AIDS. *AIDS Care*. 2007;**19 Suppl 1**: S2-11.
- 18 Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ: Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*. 2006;**43**: 1143-51.
- 19 de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA: Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res*. 1998;**39**: 141-62.
- 20 Noyola DE, Jimenez-Capdeville ME, Demmler-Harrison GJ: Central nervous system disorders in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Neurol Res*.**32**: 278-84.
- 21 Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB: Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*.**20**: 202-13.
- 22 Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ: Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol*.
- 23 Taylor GH: Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 2003;**67**: 519-24.
- 24 Crough T, Khanna R: Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009;**22**: 76-98, Table of Contents.
- 25 Chappel RJ, Wilson KM, Dax EM: Immunoassays for the diagnosis of HIV: meeting future needs by enhancing the quality of testing. *Future Microbiol*. 2009;**4**: 963-82.

- 26 Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;**155**: 335-50.
- 27 Kwok S, Mack DH, Mullis KB, Poiesz B, Ehrlich G, Blair D, Friedman-Kien A, Sninsky JJ: Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol.* 1987;**61**: 1690-4.
- 28 Kuhns MC, Busch MP: New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther.* 2006;**10**: 77-91.
- 29 El Ekiaby M, Lelie N, Allain JP: Nucleic acid testing (NAT) in high prevalence-low resource settings. *Biologicals.***38**: 59-64.
- 30 Stolz M, Tinguely C, Graziani M, Fontana S, Gowland P, Buser A, Michel M, Canellini G, Zuger M, Schumacher P, Lelie N, Niederhauser C: Efficacy of individual nucleic acid amplification testing in reducing the risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in Switzerland, a low-endemic region. *Transfusion.*
- 31 Zou S, Dorsey KA, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, Dodd RY, Stramer SL: Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion.***50**: 1495-504.
- 32 Nubling CM, Heiden M, Chudy M, Kress J, Seitz R, Keller-Stanislawski B, Funk MB: Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. *Transfusion.* 2009;**49**: 1850-8.
- 33 Busch MP, Dodd RY: NAT and blood safety: what is the paradigm? *Transfusion.* 2000;**40**: 1157-60.
- 34 Vazquez-Flores J, Valiente-Banuet L, Marín R, Sánchez-Guerrero S: La seguridad de las reservas sanguíneas de la República Mexicana durante los años 1999 a 2003. *Rev Invest Clín.* 2006;**58**: 101-8.
- 35 OMS: Global blood safety and availability; World Health Organization. November 2009, 2009.
- 36 SSA-México: Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. *Diario Oficial de la Federación.* 1993;**NOM-003-SSA2-1993**.
- 37 Garcia-Sepulveda CA, Carrillo-Acuna E, Guerra-Palomares SE, Barriga-Moreno M: Maxiprep genomic DNA extractions for molecular epidemiology studies and biorepositories. *Mol Biol Rep.* 2009;**37**: 1883-90.
- 38 CDC: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 7th edn. Washington: CDC; 2007.
- 39 Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;**23**: 2947-8.
- 40 Robinson: Alignment Reformatting. 2008. [www.alleles.org/internal/common/reformat.html](http://www.alleles.org/internal/common/reformat.html) (Last accessed June 20 2010).
- 41 HIV-Database: Simple Consensus Maker. April 9, 2009 2009. [www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/SimpCon.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/SimpCon.html) (Last accessed June 20 2010).
- 42 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;**24**: 1596-9.
- 43 Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC: Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999;**73**: 152-60.
- 44 Bylund DJ, Ziegner UH, Hooper DG: Review of testing for human immunodeficiency virus. *Clin Lab Med.* 1992;**12**: 305-33.
- 45 Guinn D: HIV screening and false-positive results. *JAMA.* 2007;**297**: 947; author reply 8.
- 46 Challakere K, Rapaport MH: False-positive human immunodeficiency virus type I ELISA results in low-risk subjects. *West J Med.* 1993;**159**: 214-5.
- 47 Dieterich DT: HIV and hepatitis B virus: options for managing coinfection. *Top HIV Med.* 2003;**11**: 16-9.
- 48 Rustgi VK, Hoofnagle JH, Gerin JL, Gelmann EP, Reichert CM, Cooper JN, Macher AM: Hepatitis B virus infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1984;**101**: 795-7.
- 49 Juarez-Figueroa LA, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Hernandez-Avila M, Hernandez-Navarez P, Uribe-Zuniga P, del Rio-Chiriboga C: Hepatitis B markers in men seeking human immunodeficiency virus antibody testing in Mexico City. *Sex Transm Dis.* 1997;**24**: 211-7.

- 50 Sato S, Ohhashi W, Ihara H, Sakaya S, Kato T, Ikeda H: Comparison of the sensitivity of NAT using  
pooled donor samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay. *Transfusion*. 2001;**41**: 1107-13.
- 51 Yang MH, Li L, Hung YS, Hung CS, Allain JP, Lin KS, Tsai SJ: The efficacy of individual-donation  
and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. *Transfusion*. 2010;**50**: 65-  
74.
- 52 Alvarado-Esquivel C, Sablon E, Conde-Gonzalez CJ, Juarez-Figueroa L, Ruiz-Maya L, Aguilar-  
Benavides S: Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: predominant circulation of  
hepatitis B virus genotype H. *World J Gastroenterol*. 2006;**12**: 6540-5.
- 53 Weber B: Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin  
Virol*. 2005;**32**: 102-12.
- 54 Kramvis A, Kew M, Francois G: Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;**23**: 2409-23.
- 55 Locarnini SA: Clinical relevance of viral dynamics and genotypes in hepatitis B virus. *J  
Gastroenterol Hepatol*. 2002;**17 Suppl 3**: S322-8.
- 56 Goodnough LT, Shander A, Brecher ME: Transfusion medicine: looking to the future. *Lancet*.  
2003;**361**: 161-9.
- 57 Albert J, Fenyo 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**:  
1560-4.
- 58 Aslam MA, Awan FR, Tauseef I, Ali S, Ahmad N, Malik NA, Riaz MN, Qureshi JA: Identification  
of hepatitis B virus core mutants by PCR-RFLP in chronic hepatitis B patients from Punjab,  
Pakistan. *Arch Virol*. 2008;**153**: 163-70.
- 59 Guerra-Palomares SE, García-Sepúlveda CA: 2009.
- 60 Chou SW, Dennison KM: Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B  
sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis*. 1991;**163**: 1229-34.
- 61 Gracia-Sepúlveda CA: 2010.
- 62 Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H: A novel method for efficient  
amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals  
deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*. 1995;**69**: 5437-44.
- 63 Zhang Q, Wu G, Richards E, Jia S, Zeng C: Universal primers for HBV genome DNA amplification  
across subtypes: a case study for designing more effective viral primers. *Virol J*. 2007;**4**: 92.

## Tablas

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para NAT por PCR anidada.** La tabla indica las secuencias y posiciones de hibridización de los oligonucleótidos empleados para la detección de HIV, HBV y CMV al igual que las del control interno. Se indica además el tamaño del producto de amplificación generado y el autor responsable del diseño del oligonucleótido.

Nombre <sup>a</sup>	Secuencia (5' → 3')	Posición	Producto de amplificación (bp)	Ref
HIV-FO	TAC-AGG-AGC-AGA-TGA-TAC-AG	141-161	294	[57]
HIV-RO	CCT-GGC-TTT-AAT-TTT-ACT-GG	418-438		
HIV-FI	GGA-AAC-CAA-AAA-TGA-TAG-GG	221-241	130	
HIV-RI	ATT-ATG-TTG-ACA-GGT-GTA-GG	331-351		
HBV-FO	CAC-CAT-GCA-ACT-TTT-TCA-CCT-CTG-C	1810-1835	561	[58]
HBV-RO	TCT-GCG-AGG-CGA-GGG-AGT-TCT	2375-2396		
HBV-FI	AAG-CCT-CCA-AGC-TGT-GCC-TTG-G	1866-1887	426	[59]
HBV-RI	GCA-GGA-GGA-GTG-CGA-ATC-CAC-AC	2266-2289		
CMV-FO2	GAA-TTC-GCG-CAT-GAT-CTC	912-929	815	[60]
CMV-RO2	GGA-AAC-GTG-TCC-GTC-TT	1711-1727		
CMV-FI2	GCG-AGT-AAA-GTT-CCA-GTA	968-985	719	[59]
CMV-RI2	GTT-CTG-GCA-AGG-YA	1675-1687		
F3DL2	TCA-TGC-TGT-ACA-AAG-AAG-ACA-GAA-G	E3 (15)	1713	[61]
R3DL2	ATG-ACT-GTC-TCT-CCT-GAT-TTC-AG	E4 (113)		
3DL2-FI	TAC-AGA-TGT-CGG-GGT-TCA-CG	E3 (35)	1500	
3DL2-RI	GGA-GGG-AAG-GTT-TTC-TGT-GGT-TTC	E4 (100)		

<sup>a</sup>Las secuencias de los oligonucleótidos reversa mostradas en esta tabla representan el complemento reversa de la secuencia presente en los alineamientos.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la amplificación genómica de HBV.** La tabla ilustra las secuencias y posiciones de hibridización de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del genoma de HBV. Se indica el tamaño del producto de amplificación generado y el autor correspondiente.

Nombre <sup>a</sup>	Secuencia (5' → 3')	Posición	Producto de amplificación (bp)	Ref.
P1	TTT-TTC-ACC-TCT-GCC-TAA-TCA	1821-1841	3215	[62]
P2	AAA-AAG-TTG-CAT-GGT-GCT-GG	1806-1825		
FA1-L	TTT-CAC-CTC-TGC-CTA-RTC-ATC-TC	1824-1845	1014	
FA1-R	TCT-TGT-TCC-CAA-GAA-TAW-GGT-G	2818-2839		
FA2-L	GCG-TCG-CAG-AAG-ATC-TCA-AT	2413-2432	1074	[63]
FA2-R	TTG-AGA-GAA-GTC-CAC-CAC-GAG	253-273		
FA3-L	CTG-CTG-GTG-GCT-CCA-GTT	55-75	1059	
FA3-R	GCC-TTG-TAA-GTT-GGY-GAR-AA	1095-115		
FA4-L	GTA-TTG-GGG-GCC-AAR-TCT-GT	751-770	1048	
FA4-R2	AAT-TTA-TGC-CTA-CAG-CCT-CC	1776-1795		
FA5-FO	GGG-CGC-ACC-TCT-CTT-TAC-GC	1525-1541	807	[59]
FA5-RO	CGG-AAG-TGT-TGA-TAA-GAT-AGG-G	2310-2332		
FA5-FI	TAA-AAG-GAC-TCT-TGG-ACT	1655-1672	285	
FA5-RI	CCA-CAG-AAG-CTC-CAA-ATT-CT	1921-1940		

<sup>a</sup> Las secuencias de los oligonucleótidos reversa mostradas en esta tabla representan el complemento reversa de la secuencia presente en los alineamientos.



**Tabla 3. Parámetros espectrofotométricos del DNA extraído.** Las muestras fueron extraídas a partir de concentrados de leucocitos (CL) o sangre entera (SE). Todos los parámetros se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (rango).

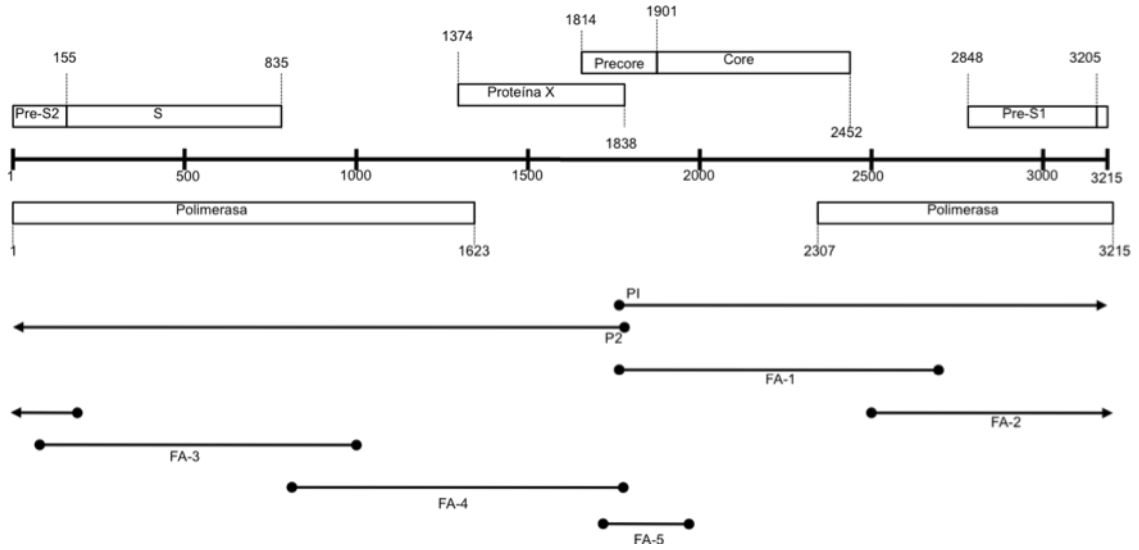
Colección	Fuente	Rendimiento ( $\mu\text{g}$ de DNA/ml de fuente)	Índice $A^{260/280}$	Índice $A^{260/230}$
MGDC-BD	CL	$209 \pm 88.6$ (32.6 – 452.5)	$1.8 \pm 0.04$ (1.60 – 1.88)	$1.92 \pm 0.19$ (0.97-2.5)
MGDC-HIV	SE	$47.02 \pm 19.3$ (22.92–74.76)	$1.89 \pm 0.07$ (1.82–2.04)	$2.07 \pm 0.12$ (1.88–2.29)
MGDC-REF	CL	$309.58 \pm 132.15$ (25.4 – 890)	$1.8 \pm 0.03$ (1.74 - 1.92)	$1.98 \pm 0.12$ (1.6 – 2.36)

**Tabla 4. Tamizaje de BBP por NAT y serología.** Número y porcentaje de muestras positivas por PCR anidada (aislada y en múltiplex) tanto en minipool como para muestras individuales de la colección MGDC-BD (n=300). NR = No realizado.

Virus	Minipool's (MP-5)		Muestras individuales	
	PCR múltiplex	PCR aislada	PCR múltiplex	Serología
HIV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
HBV	2 (0.7%)	2 (0.7%)	2 (0.7%)	0 (0%)
CMV	0 (0%)	2 (0.7%)	8 (2.7%)	NR

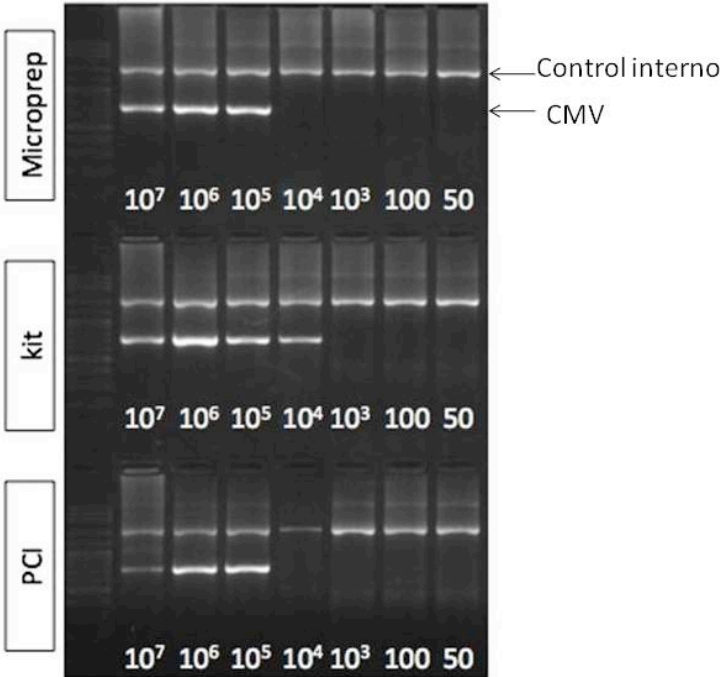
## Figuras

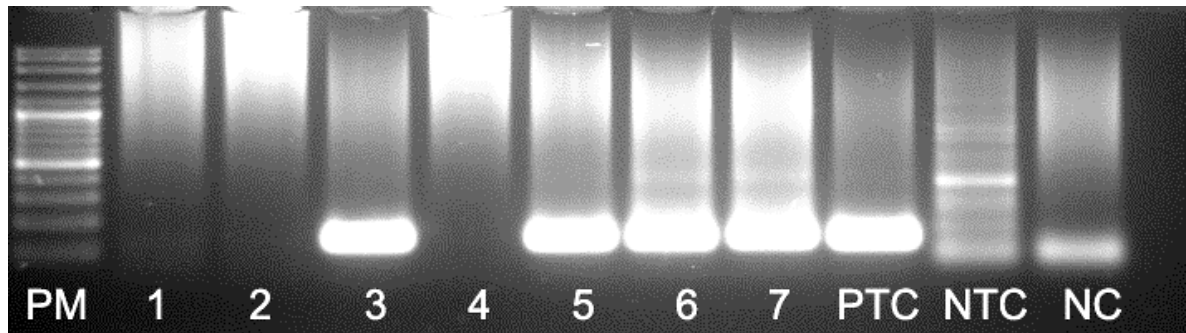
Figura 1



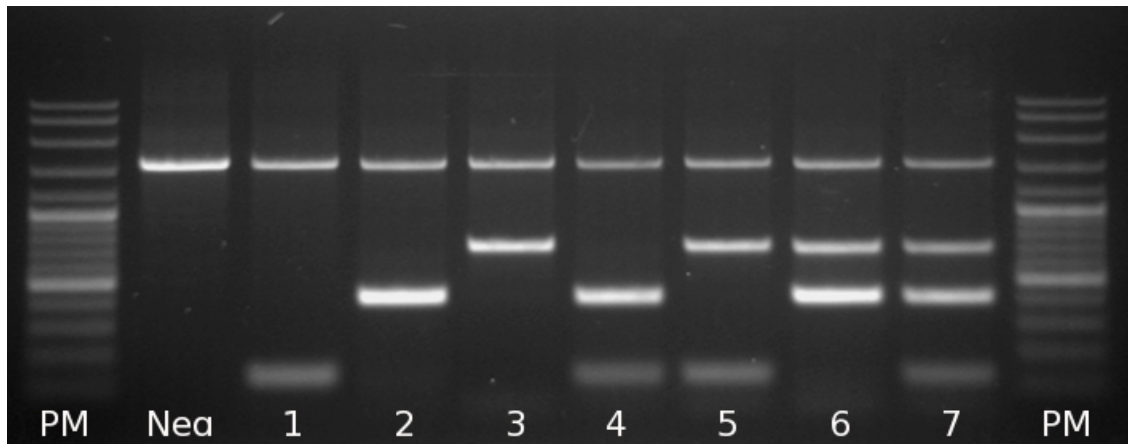
NOTA = Debido a que el genoma de HBV adopta una topología circular la posición 3215 indicada a la derecha del mapa se continua con la posición 1 a la izquierda del mapa de tal manera en que P1+P2 (y los oligonucleótidos para FA-1) generan un producto de amplificación lineal continuo.

Figura 2



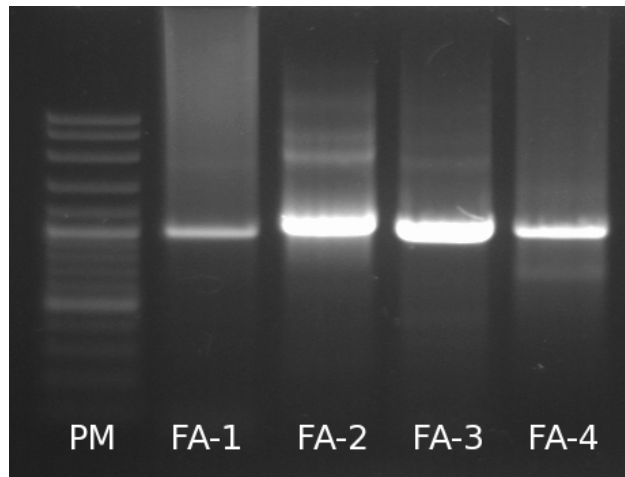
**Figura 3**

**Figura 4**

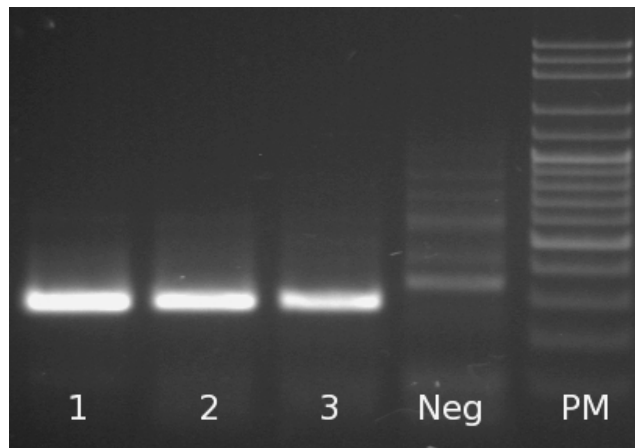


**Figura 5**

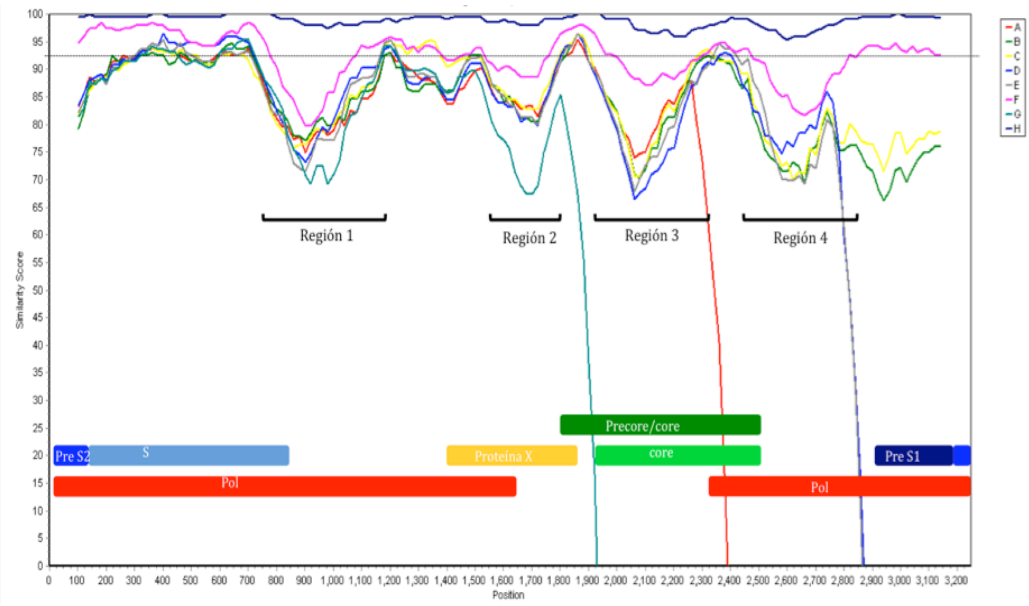
a)



b)

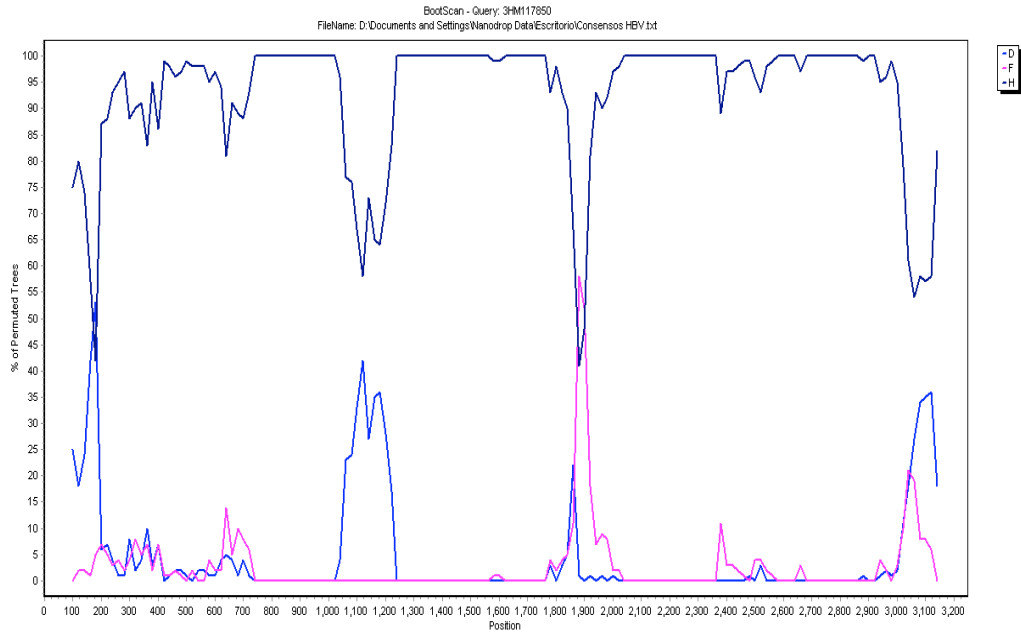


**Figura 6**





**Figura 7**



## Pie de figura

**Figura 1. Mapa genómico de HBV.** Ilustración gráfica de la localización de los diferentes marcos de lectura a lo largo del genoma de HBV así como de los oligonucleótidos empleados en la estrategia de secuenciación de fragmentos subgenómicos.

**Figura 2. Límite de detección para la PCR de CMV.** Resultado de la PCR anidada para CMV empleando diluciones seriadas para lograr concentraciones desde  $1 \times 10^7$  copias/ml hasta 50 copias/mL empleando tres métodos de extracción de DNA diferentes.

**Figura 3. Límite de detección para la PCR de HIV.** Resultado de la RT-PCR anidada para HIV empleando muestras previamente cuantificadas por qRT-PCR representativas de títulos indetectables (muestra 1), 55, 152, 3100, 13900, 28800 y 54900 copias/ml (2-7, respectivamente) al igual que un control positivo (PTC), un control de RNA negativo (NTC) y un control negativo sin RNA (NC). PM corresponde al marcador de peso molecular de 100 bp con bandas intensas a 500 y 1000 bp.

**Figura 4. Tamizaje de BBP por PCR anidada múltiplex.** Imagen representativa de los resultados obtenidos en el tamizaje de BBP por PCR anidada múltiplex. El carril marcado con Neg corresponde a una muestra de DNA negativa para los 3 virus. El carril 1 corresponde a una muestra HIV-positiva (130 bp), el 2 a una muestra HBV-positiva (420 bp) y el 3 a una muestra CMV-positiva (719 bp). El carril 4 corresponde a una coinfección HIV + HBV. El carril 5 a una coinfección por HIV + CMV y el carril 6 a una coinfección HBV + CMV. Finalmente el carril 7 corresponde a los productos de amplificación generados con DNA's positivos para los tres patógenos. El producto de amplificación de mayor tamaño, presente en todos los carriles, corresponde al control interno KIR3DL2 (1500 bp). PM corresponde al marcador de peso molecular de 100 bp con bandas intensas a 500 y 1000 bp.

**Figura 5. Amplificación subgenómica de HBV.** a) Imagen de los amplicones generados por PCR para los cuatro fragmentos subgenómicos (FA-1 a FA-4) para una muestra representativa. El fragmento FA-1 posee un tamaño de 1014 bp, el FA-2 de 1074 bp, el FA-3 de 1059 bp y el FA-4 de 1048 bp. b) Imagen del gel correspondiente a los generados para el fragmento 5 (FA-5 = 285bp) para 3 de las cuatro muestras secuenciadas; 1 (MXSLP00114), 2 (MXHIV00153) y 3 (MXHIV00201). PM corresponde al marcador de peso molecular de 100 bp con bandas intensas a 500 y 1000 bp.

**Figura 6. Análisis de homología regional para HBV.** La gráfica denota la similitud porcentual (en el eje de las ordenadas) para cada posición codónica (eje de las abscisas) del genoma completo de HBV. Las secuencias genómicas locales exhiben una semejanza >95% para con las del genotipo H (Azul oscuro). Las cuatro regiones marcadas 1-4 indican zonas de mayor disimilaridad de nuestras secuencias para con las secuencias consenso de los demás genotipos de HBV (excepto H). Se indican además las posiciones aproximadas de cada uno de los ORF de HBV.

**Figura 7. Análisis recombinatorial para HBV.** La gráfica denota el número de árboles filogenéticos permutados (que apoyan la homología regional) en el eje de las ordenadas respecto a cada posición codónica (eje de las abscisas) del genoma completo de HBV. El entrecruzamiento de las líneas correspondiente al genotipo H y D en la posición 170 y entre las correspondientes a H y F en la posición 1900 indican la presencia de pequeños eventos recombinatoriales.