

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES POR PCR
CONVENCIONAL Y PCR EN TIEMPO REAL PARA EL
DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA EN EL INS

TESIS

Presentada por:

Bach. PRISCILA NAYU LOPE PARI

Para optar el Título Profesional de:

Biólogo Microbiólogo

Tacna – Perú

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE GROHMANN"

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología

Tesis N° 219 Título profesional de Biólogo Microbiólogo

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por resolución de Facultad N° 7842-2014, el consejo de facultad designó como jurado para la sustentación de tesis: **ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES POR PCR CONVENCIONAL Y PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA EN EL INS.**

El mismo que estuvo conformado por:

Presidente: Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

Secretario: Mgr. Daladier Castillo Cotrina

Vocal: Dr. Cesar Cevallos Columbus

Para examinar y calificar la sustentación del informe de tesis en acto público, en el auditorio de la Facultad de Ciencias de la UNJBG, el día 5 de Agosto del 2014 a las 10:20 horas. Presentada por la **Bachiller Priscila Nayu Lope Pari**, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual se pronunció acerca de su calificativo sobre el informe expuesto y procedió a emitir el siguiente veredicto. **APROBADO** por **UNANIMIDAD** y con el calificativo de **SOBRESALIENTE** con nota (18).

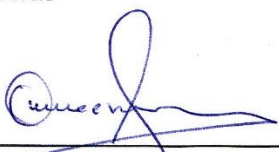
Para ratificar lo detallado firman:



Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente



Mgr. Daladier Castillo Cotrina
Secretario



Dr. Cesar Cevallos Columbus
Vocal

DEDICATORIA

A Oswaldo Lope Apaza y Adela Pari Quispe por ser los mejores padres que me pudo haber tocado en esta vida, por todos los sacrificios que tuvieron que hacer para darme la oportunidad de seguir estudiando y por estar siempre pendiente de mí a pesar de los kilómetros de distancia. Por apoyarme en los momentos más difíciles que pasé durante la carrera. Los amo y son mi impulso para seguir superándome y continuar luchando.

A mi hermano Jhorch porque a pesar de la convivencia mucha o poca que he tenido contigo, eres parte de mi vida y te amo.

A mis tías Lucila y Bertha, por cuidar de mí en estos años y por darme su apoyo, cariño y dedicación incondicionalmente, porque con ello me impulsan a ser mejor.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la fortaleza de no dejarme rendir a pesar de todas las adversidades que se me presentaron en el camino. Por darme el más grande de todos los pilares, mi FAMILIA.

A mi casa de estudios, Facultad de Ciencias, de la Universidad Jorge Basadre Grohmann, por formarme como profesional y permitirme ser parte de ella.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos y formaron parte de este desarrollo, por el apoyo y amistad sincera brindada por algunos de ellos.

Al Laboratorio de Sarampión y Rubéola del Instituto Nacional de Salud (INS), por permitir ampliar mis conocimientos en ésta área, por todo el apoyo obtenido que he recibido, a todos y cada uno de los investigadores así como al personal que labora en esta institución.

Al Mgr. Fredy James Condori Yujra, por darme la oportunidad de trabajar con él, por su amistad y por formar parte en este proyecto al asesorarme.

Al Coordinador del Laboratorio de Sarampión y Rubéola-INS el Mgr. Edwin Cabezudo Phillpe, por haberme permitido ampliar mis conocimientos en ésta área, por todo su apoyo brindado.

Al Mgr. Roberto Castellanos Cabrera, por su apoyo incondicional, por los consejos y la confianza que me expresó.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	xiv
GLOSARIO	xvi
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	7
1.2 Hipótesis	9
1.3 Justificación	9
1.4 Objetivos	16
1.4.1 Objetivo general	16
1.4.2 Objetivos específicos	16
1.5 Marco teórico y revisión de literatura	17
1.5.1 Agente etiológico	17
1.5.2 Aspectos clínicos epidemiológicos	20
1.5.3 PCR convencional	36
1.5.4 PCR en tiempo real	44
II. MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	53
2.1.1 Población de estudio	53

2.1.2 Marco muestral	54
2.1.3 Diseño muestral y selección de muestra	55
2.1.4 Muestra	55
2.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	56
2.2.1 Materiales biológicos	56
2.2.2 Materiales de plástico	56
2.2.3 Reactivos y kits	57
2.2.4 Materiales de seguridad	58
2.2.5 Equipos	58
2.3 MÉTODOS	59
2.3.1 Cultivo del virus de rubéola	59
2.3.2 Extracción de ARN	60
2.3.3 PCR convencional	62
2.3.4 PCR en tiempo real	65
2.3.5 Especificidad de la RT-PCR para el virus de rubéola	72
2.3.6 Sensibilidad de la RT-PCR para el virus de rubéola	75
2.3.7 Análisis estadístico de los datos	77

III. RESULTADOS	78
3.1 Aislamiento viral	78
3.2 Extracción de ácido ribonucleico	81
3.3 PCR convencional	82
3.4 PCR en tiempo real	86
3.5 Capacidad diagnóstica para la detección del virus de rubéola	95
3.6 Comparación entre PCR en tiempo real y PCR convencional	97
IV. DISCUSIÓN	99
4.1 Aislamiento viral	101
4.2 Extracción de ácido ribonucleico	101
4.3 Reacción en cadena de la polimerasa	104
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	108
4.5 Capacidad diagnóstica para la detección del virus de rubéola	113
4.6 Comparación entre PCR en tiempo real y PCR convencional	115
V. CONCLUSIONES	119
VI. RECOMENDACIONES	121
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
VIII ANEXOS	139

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola.	23
Tabla 2.-	Diagnóstico diferencial de las principales enfermedades febriles eruptivas.	32
Tabla 3.-	Cepas de referencia en el análisis genético de los virus de la rubéola de tipo salvaje.	34
Tabla 4.-	Fórmula de los componentes para PCR convencional	63
Tabla 5.-	Fórmula de los componentes para PCR en tiempo real	67
Tabla 6.-	Fórmula de los componentes para PCR en tiempo real del ARNsa P humano	68
Tabla 7.-	Valores de ciclo de umbral (CT) y concentración (copias/μl) de los controles de la CDC	71
Tabla 8.-	Interpretación de los valores del ciclo de umbral	72
Tabla 9.-	Características del set de cebadores utilizados en la estandarización de RT-PCR convencional y en tiempo real para la Rubéola.	74
Tabla 10.-	Cálculos de capacidad diagnóstica mediante una	78

tabla de 2x2 que asocia el estado del Patrón referencial por IFD con los resultados de la prueba de PCR.

Tabla 11.- Valoración del Índice Kappa	79
Tabla 12.- Resultados obtenidos de la extracción de ARN para cultivos celulares infectados con la muestra control positiva del virus de rubéola.	81
Tabla 13.- Concentración de ARN y número de copias en dilución	91
Tabla 14.- Capacidad diagnóstica mediante una tabla de 2 x 2 que asocia el estado del patrón referencial con los resultados de la prueba de PCR convencional.	96
Tabla 15.- Capacidad diagnóstica mediante una tabla de 2 x 2 que asocia el estado del Patrón referencial con los resultados de la prueba de PCR en tiempo real.	96
Tabla 16.- Tabla de contingencia PCR convencional y PCR en tiempo real	97
Tabla 17.- Medidas simétricas-INDICE KAPPA de la tabla de contingencia entre las pruebas de PCR convencional y PCR en tiempo real	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de la partícula del virus de la rubéola correlacionado con el mapa genético.	18
Figura 2.	Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola.	25
Figura 3.	Respuesta inmunitaria en un caso típico de infección por el virus de la Rubéola.	27
Figura 4.	Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción.	41
Figura 5.	Sondas TaqMan	49
Figura 6.	Protocolo del termociclador convencional para la amplificación de la ARN del Virus de la Rubéola.	50
Figura 7.	Protocolo del termociclador convencional para la amplificación de ARN del Virus de la rubéola.	64
Figura 8.	Protocolo del termociclador en tiempo real para la amplificación de ARN del Virus de la rubéola.	70
Figura 9.	Diluciones seriadas para el límite de detección del VR	76
Figura 10.	Efecto citopático en células Vero del virus de rubéola y sarampión.	80
Figura 11.	Diagnóstico del VR a partir de aislamiento celular	82

Figura 12.	Especificidad de cebadores-PCR convencional	84
Figura 13.	Límite de detección del VR por PCR convencional.	85
Figura 14.	Diagnóstico de aislamientos virales positivos y negativos al VR por PCR en tiempo real.	87
Figura 15.	Especificidad de cebadores en PCR-Tiempo Real.	89
Figura 16.	Curva de calibración con estándares del VR	92
Figura 17.	Curva de amplificación del VR en copias/ μ l	94

ÍNDICE DE ANEXOS

8.1	Protocolo de extracción	139
8.2	Esquema de trabajo propuesto por OIE (2008)	144
8.3	Flujo de trabajo	145
8.4	Especificidad de cebadores del VR-PCR tiempo real	146
8.5	Tabla de resultados del PCR convencional y PCR en tiempo real con la prueba referencial (IFD)	147
8.6	Mapa del cebador E1	151
8.7	Células Vero en incubación a 37 °C	152
8.8	Kit de extracción de ácidos nucleídos	152
8.9	Extracción de ARN- cabina de bioseguridad nivel II	153
8.10	Área limpia-preparación de mezcla de reacción	153
8.11	Área sucia-suspensión de ARN	153
8.12	Área de amplificación- termociclador convencional	154
8.13	Área de amplificación y recolección de datos- termociclador en tiempo real	154
8.14	Rotores y coronas del termociclador en tiempo real	155
8.15	Gel de electroforesis	155
8.16	Potenciómetro-corrída electroforética	156
8.17	Espectrofotómetro-NANODROP	156
8.18	Constancia de realización de tesis	157

ABREVIATURAS

ADNc	:	Ácido Desoxirribonucleico Complementaria
ARN	:	Ácido Ribonucleico
ARNm	:	Ácido Ribonucleico Mensajero
BHQ	:	(Black-Hole Quencher)
Célula VERO	:	Células de riñón de mono verde africano
CP	:	Control Positivo
Ct	:	(Cycle Threshold). Ciclo de Umbral
FAM	:	6-Carboxy Fluoresceína
FRET	:	Transferencia de energía de resonancia de Forster
GCAT	:	Guanidina, Citocina, Adenina, Timina
HN	:	Hisopado nasofaríngeo-Negativo a IFD
HP	:	Hisopado nasofaríngeo-Positivo a IFD
IFD	:	Inmunofluorescencia Directa
INS	:	Instituto Nacional de Salud
MOI	:	Multiplicidad de Infección
MP	:	Peso Molecular
MTV	:	Medio de Transporte Viral
NTC	:	(No Template Control) Control de sistema

OMS	:	Organización Mundial de La Salud
ON	:	Orina-Negativa a IFD
OP	:	Orina-Positivo a IFD
OPS	:	Organización Panamericana de La Salud
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Primer Dt	:	Secuencia corta de Nucleótidos Desoxy-Timina
RT-PCR	:	Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SE	:	Semana Epidemiológica
SRC	:	Síndrome de Rubéola Congénita
TAMRA	:	6-carboxi-tetrametil-rodamina
Taq	:	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tf	:	Temperatura de fusión
VR	:	Virus de la Rubéola

GLOSARIO

AMPLICÓN: Conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa. Esencialmente, se trata de un clon molecular.

ÁREA LIMPIA: Espacio físico libre de amplicones, templados de ADN y de muestras biológicas que pudieran contaminar futuras PCR. Corresponde al área de preparación de reactivos, también llamada Pre-PCR.

ÁREA SUCIA: Espacio físico donde existe presencia y manipulación de amplicones, ADN/ARN y/o muestras biológicas. Comprende las áreas de extracción del templado, área de carga o dispensación del templado, área de amplificación (donde están los termocicladores) y, para el caso de punto final, el área de electroforesis.

CEBADOR: Oligonucleótido de 5-20 nucleótidos de longitud que sirve como punto de partida para la replicación de ADN. Se requieren porque la ADN polimerasa, solamente puede agregar nuevos nucleótidos a una molécula ADN ya existente.

ESPECIFICIDAD: (E) indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos (no enfermos) a los que efectivamente lo son,

es decir, la especificidad es la probabilidad de que la prueba identifique como no enfermo a aquél que efectivamente no lo está.

LÍMITE DE DETECCIÓN: Se define como la cantidad más pequeña de copias de genomas de agentes infecciosos que puede detectarse y distinguirse a partir de un resultado cero. Para determinar la sensibilidad analítica se utiliza una dilución de punto final hasta que el ensayo ya no pueda detectar la diana en cuestión en más del 5% de las réplicas.

PCR convencional: También conocida como PCR de punto final, permite visualizar, mediante una electroforesis, la acumulación de amplicones generados al final de un número predeterminado de ciclos.

PCR en tiempo real: Permite detectar la cinética de la acumulación de amplicones durante cada ciclo inmediatamente sin necesidad de una electroforesis posterior.

RT-PCR: La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es ADN complementario (ADNc) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.

SENSIBILIDAD:(S) indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo, es decir, expresa cuan "sensible" es la prueba a la

presencia de la enfermedad. La sensibilidad es la probabilidad que la prueba identifique como enfermo a aquél que efectivamente lo está.

TEMPLADO: Ácido nucleico (ADN o ARN) utilizado como molde para la PCR, es decir, a partir de aquella molécula serán sintetizadas las copias idénticas conocidas como amplicones.

TERMOCICLADOR: Equipo que permite realizar de forma automática los ciclos de temperatura necesarios para una PCR. El termociclador es diferente si se realiza una PCR de punto final o una PCR de tiempo real.

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: Es la probabilidad condicional que los individuos con una prueba negativa no tengan realmente la enfermedad.

VALOR PREDICTIVO POSITIVO: Equivale a la probabilidad condicional que los individuos con una prueba positiva tengan realmente la enfermedad.

RESUMEN

Se estandarizó la técnica TR-PCR en tiempo real y convencional. Se utilizó patrones positivos (n=150) y negativos (n=150) al VR mediante IFD. La extracción de ARN, síntesis de ADNc, PCR convencional y tiempo real se realizaron utilizando kits comerciales. Se utilizaron tres cebadores para amplificar una región codificante del gen E1 del VR frente a patrones positivos, vacuna combina (Wistar RA 27/3-Edmoston Zagreb) como controles positivos, y patrones positivos de sarampión, VHS1, VHS2, PVB19 y *Mycoplasma*, como controles negativos. Los resultados se determinaron mediante el análisis de bandas en gel de agarosa y curvas de amplificación. La PCR convencional detectó $4,47 \times 10^{-2}$ ng/ μ l de ARN con un 98 % sensibilidad, 100 % especificidad, 100 % VPP y 98 % VPN y la PCR en tiempo real detectó $4,36 \times 10^{-5}$ ng/ μ l de ARN, con un 98,6 % sensibilidad, 100 % especificidad, 100 % VPP y 98,6 %VPN, teniendo una correlación muy buena. Las técnicas resultaron una herramienta diagnóstica con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del VR, siendo la más sensible la PCR en tiempo real.

Palabras clave: Virus de la Rubéola/diagnóstico; sensibilidad, especificidad, capacidad diagnóstica, límite de detección, PCR convencional, PCR tiempo real.

ABSTRACT

The technique was standardized in real time and conventional by RT-PCR. Positive (n=150) and negative (n=150) to RV patterns was used by DIF. The extraction of RNA, synthesis of cDNA, conventional and real time of the PCR they were realized using commercial kits. Three primers were used to amplify a codificante region of the gene E1, of the positive patterns of the RV, combined vaccine (Wistar RA 27/3-Edmoston Zagreb) as positive controls and positive patterns of measles, HSV1, HSV2, PVB19, *Mycoplasma*, as negative controls. The results determined by analysis of bands in gel of agarose and curves of amplification. The conventional PCR detected $4,47 \times 10^{-2}$ ng/ μ l of the RNA with 98% sensibility, 100% specificity, 100% PPV and 98% PNV; and the real time PCR detected $4,36 \times 10^{-5}$ ng/ μ l of RNA with 98,6% to sensibility, 100% specificity, 100% PPV, 98,6% PNV, having a very good correlation. The techniques proved a diagnostic tool with high sensibility and specificity for the diagnostic of the RV, being the more sensitive the real time of PCR.

Key words: Rubella virus/diagnostic; sensibility, specificity, capacity diagnostic, limit of detection, conventional PCR, real time PCR

I. INTRODUCCIÓN

La rubéola es una enfermedad infectocontagiosa de relevancia en salud pública por su carácter de vigilancia a nivel mundial; la erradicación de esta enfermedad es una prioridad política sanitaria, en este contexto se desarrollan intensas actividades de vacunación y de vigilancia epidemiológica con miras a consolidar este proceso y lograr una certificación internacional.

La rubéola se describió por primera vez en el siglo XVIII y se aceptó como una infección diferente al sarampión y a la fiebre escarlatina en 1881. El primero en identificar a la rubéola como una entidad nosológica independiente, fue George Maton en 1814, quien describió sus características clínicas y el período de incubación de la enfermedad. En 1866 Henry Veal propuso el término rubella en el idioma inglés, que ha pasado como “rubéola” al español (Venegas et al., 2008). En 1945 Norman McAllister Gregg descubre el efecto teratogénico del virus de la rubéola, al identificar cataratas congénitas y otras malformaciones en niños cuyas madres sufrieron la enfermedad durante el embarazo, lo que convirtió a esta enfermedad

presumiblemente benigna en un terrible azote bajo determinadas circunstancias (Bellini e Icenogle, 2003).

El virus de la rubéola (VR) es el único miembro del género Rubivirus de la familia Togaviridae. Es un virus casi esférico con un diámetro de 60 a 70 nm, envuelto, con pequeñas espículas. Su genoma es de ARN monocatenario de polaridad positiva, tiene un peso molecular de $3,8 \times 10^6$ Da y una longitud de 10kb, tiene un contenido G-C de 69%.

La rubéola es una enfermedad sumamente contagiosa que se propaga por medio de las secreciones nasales de persona a persona (Lee y Bowden, 2000). A diferencia del sarampión o la varicela, la infección por la rubéola suele ser inaparente, favoreciendo la diseminación vírica (Mori et al, 2006).

La erupción o exantema aparece entre el día 14 y 18 después de la infección (MINSAlNS, 2007). Aparece primero en la cara, se produce viremia y la diseminación del virus se generaliza en todo el cuerpo, incluida la placenta durante el embarazo (Lee y Bowden, 2000). El virus se multiplica en muchos órganos, pero pocos signos

son manifiestos, a excepción de artralgias y artritis transitoria que son poco frecuentes en los niños, pero ocurren con frecuencia en adultos, especialmente mujeres (MINS/INS, 2007).

Se han comunicado casos raros de reinfección, confirmados serológicamente después de una infección previa (o vacunación). También se han presentado casos de Síndrome de Rubéola Congénita (SRC) después de una reinfección en mujeres embarazadas con inmunidad natural o generada por la vacuna, pero son extremadamente raros. Los anticuerpos maternos contra la rubéola protegen al recién nacido durante los primeros meses de vida y pueden modificar la respuesta inmunitaria si se vacuna a una edad temprana (MINS/INS, 2007).

El SRC es la consecuencia más grave de la rubéola (WHO, 2011). El riesgo más alto de SRC se observa en los países donde las mujeres en edad fértil presentan altas tasas de susceptibilidad. (Clements, 1992). Aparece como consecuencia de la infección del feto por el virus de la rubéola durante el primer trimestre del embarazo y puede ser causa de aborto espontáneo o inducido, con múltiples anomalías congénitas; pueden estar afectados prácticamente todos

los órganos. La sordera es la manifestación más frecuente y a menudo la única del SRC (OMS, 2006), aunque también pueden ir acompañados de defectos al corazón y cataratas. La especificidad del órgano está dada en general por el momento de la infección intrauterina; sin embargo, la relación entre las anomalías fetales y el tiempo de la infección no siempre es clara (Feigin, 1997; Murray, 1998; Chapter, 2004).

El diagnóstico serológico del VR puede confirmarse mediante la inoculación de materiales infectados como secreciones nasofaríngeas y orina en cultivos celulares; inmunofluorescencia o hemadsorción mediante titulaciones de inhibición de la hemaglutinación (Plotkin y Reef, 2004). Los inmunoensayos en fase sólida como ELISA se utilizan con fines diagnósticos por su facilidad de ejecución y rapidez (Bellini e Icenogle, 2003). En los laboratorios la confirmación de los casos de rubéola es por medio de la detección de IgM específica para rubéola en suero de los pacientes con sospecha de tener la infección. Sin embargo el virus está presente normalmente en garganta o nasofaringe desde unos pocos días antes hasta 5 días después de la aparición exantema por lo que lo hace una muestra adecuada para la detección del virus por PCR (Zhu et al., 2007).

En la práctica es frecuente la incorporación de procedimientos diagnósticos, sin que se abandonen los métodos anteriores en uso. La simultaneidad de exámenes para la misma finalidad, habitualmente arroja resultados confusos o contradictorios (Fescina et al., 1985); por lo que es importante evaluar el rendimiento de diferentes diagnósticos de infección para el virus de la rubéola (Mosquera et al., 2006).

La prevención y vigilancia epidemiológica activa de SRC y rubéola es muy importante ya que tiene como principal objetivo la erradicación de la rubéola del país (RM N°800). Por lo que es necesario el diseño y ejecución de técnicas con una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico oportuno de esta enfermedad. En este contexto, el propósito de este trabajo es estandarizar una metodología de PCR convencional y PCR en tiempo real basado en sondas TaqMan para detectar el gen E1 en aislamientos del VR, como alternativa o complemento de los métodos serológicos de diagnóstico utilizados en el Perú actualmente.

El diagnóstico a tiempo es de suma importancia; por la naturaleza de la enfermedad; se requiere que las pruebas de laboratorio sean rápidas, sensibles, específicas y sobre todo

confiables. En dependencia de la técnica empleada, un laboratorio de diagnóstico puede determinar si una muestra es positiva o no al VR en algunas horas. Por tal motivo, con la implementación de la biología molecular como metodología diagnóstica, la PCR se considera como una alternativa para detectar al genoma viral, aun cuando existan muestras que contengan cantidades pequeñas del mismo. A nivel internacional, existen diversos estudios que demuestran la alta sensibilidad y especificidad de las pruebas de PCR en la detección de virus. Además, de mostrar una superioridad en relación con otras pruebas diagnósticas (Williams et al., 1999; Bowers et al., 2008).

1.1 Planteamiento del problema

La rubéola en la Región de las Américas sigue estando expuesta a un elevado riesgo de importación de virus, dada la circulación continúa del virus de la rubéola en otras regiones del mundo. En el 2006 el Perú reporto, el último caso de rubéola autóctono; y el siguiente año, 2007, los dos últimos casos de SRC (MINSA, 2012).

En el Instituto Nacional de Salud (INS), dentro del Centro Nacional de Salud Pública en el Laboratorio de Sarampión y Rubéola, se realiza la vigilancia de sarampión y rubéola cuyo objetivo es detectar oportunamente un caso primario de sarampión y rubéola, de cualquier procedencia (autóctono o importado), con la finalidad de interrumpir la cadena de transmisión y Evaluar el impacto de la inmunización contra sarampión y rubéola en el país.

Dicha vigilancia en el Laboratorio de Sarampión y Rubéola se realiza por el ensayo inmunoenzimática (ELISA), una técnica que por su sensibilidad y especificidad requiere de otras pruebas

con mayor sensibilidad y especificidad como las pruebas moleculares, sobretodo en tiempos donde el Perú está encaminado a la eliminación de la Rubéola enmarcados en la vigilancia.

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del diagnóstico de rubéola, se han adoptado técnicas de diagnóstico molecular, que más de presencia o ausencia del virus, permiten la diferenciación entre tipos de variantes del virus y controlar los posibles casos post vacunales.

En el país la rubéola está eliminado; pero no se descarta un posible caso de importación; es por ello que el diagnóstico molecular brindaría un seguimiento eficaz del caso. Actualmente la técnica de PCR está siendo implementada para la detección del virus de rubéola. Por lo tanto, en el presente trabajo se estandarizó las técnicas de PCR convencional y en tiempo real para la identificación del virus de rubéola como una herramienta diagnóstica alternativa o confirmatoria. Es así que el presente trabajo se basa en la capacidad diagnostica del PCR.

1.1.1. Formulación del problema:

¿La estandarización de técnicas moleculares por PCR convencional y PCR en tiempo real permitirá la detección del virus de la rubéola en el Instituto Nacional de Salud?

1.2 Hipótesis

La estandarización de técnicas moleculares por PCR convencional y PCR en tiempo real detecta el virus de la rubéola en el Instituto Nacional de Salud.

1.3 Justificación

La rubéola es una enfermedad leve que se presenta con fiebre y exantema. Esta adquiere relevancia en la salud pública por el potencial teratogénico del virus, cuando se adquiere la infección en etapas tempranas del embarazo presentando lo que se conoce como Síndrome de Rubéola Congénita (WHO, 2011). La infección del feto por el virus de la rubéola puede dar lugar a

aborto espontáneo, muerte fetal o a malformaciones congénitas graves en el recién nacido. El síndrome de rubéola congénita (SRC) es una causa frecuente de ceguera, sordera, cardiopatía congénita y retraso mental.

La rubéola es una enfermedad que viene siendo parte del plan de vigilancia para su eliminación. Los ministros de salud de las Américas aprobaron la meta de erradicar la Rubéola y el Síndrome de Rubéola Congénita (SRC) desde 2003, a través de resoluciones del Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2009). La rubéola ha mostrado actividad permanente desde 1997. Entre los años 2000 – 2001 y 2004 - 2006, se presentó epidemias en todo el país (MINS/INS, 2007).

La vigilancia conjunta del sarampión y rubéola, que se realiza desde el año 2000, ha permitido conocer mejor el comportamiento de esta enfermedad, la introducción de la vacuna trivírica (SPR) y el compromiso de eliminar la rubéola y el Síndrome de la Rubéola Congénita (MINS/INS, 2012). Según la resolución ministerial del 9 de octubre del 2012 N°800/MINS/INS,

considera que siendo un serio problema de salud pública, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha recomendado la implementación de planes y acciones para fortalecer la eliminación de estas enfermedades (RM. N°800-2012).

En la actualidad la OMS recomienda la aplicación sistemática de la vacuna contra la rubéola; por lo general en combinación con la del sarampión. Aunque la vacuna ha venido actuando con gran eficacia en América, existe aún la enfermedad y reportes de casos en Europa, Asia, y África, por lo que no se descartaría un posible brote debido a los constantes movimientos de personas.

En el Perú el sarampión y la rubéola, según el boletín epidemiológico del ministerio de salud 2014, Vol. 23 SE N°7: En el año 2013 se notificaron 453 casos sospechosos de sarampión y rubéola, siendo descartados el 100 %. Hasta la SE 07-2014 se notificaron 52 casos de enfermedades febriles eruptivas; de los cuales, 50 se notificaron como casos sospechosos de rubéola y el 2 sospechosos a sarampión. Del total de casos notificados, 37 fueron descartados y 16 casos están pendientes de clasificación.

Según la OEI/MINSA entre la población programada y la población vacunada según grupo de edades para el 2011 existe un déficit de un 20-30% de población no vacunada obteniendo una cobertura desde 77-83% y según la cobertura y monitoreo rápido (MRC) del barrido APO/SPR Perú 2011 indicado por departamentos la cifra aumenta a un 97,7% (MINSA, 2012).

La Región de las Américas sigue estando expuesta a un elevado riesgo de importación de virus, dada la circulación continua de los virus del sarampión y de la rubéola en otras regiones del mundo. Además, algunos países han notificado debilidades y fallas en sus sistemas nacionales de vigilancia y programas de vacunación de rutina, lo que los hace particularmente vulnerables al riesgo de reintroducción de virus que pueden causar brotes (OPS, 2012).

En el período 1998-2006, los casos confirmados de rubéola en las Américas disminuyeron en 98%, al pasar de 135,947 a 3,005. Sin embargo, en el 2007, las Américas experimentaron un resurgimiento de los casos de rubéola debidos a las importaciones del virus de la rubéola a los países que

inicialmente habían dirigido las campañas de vacunación masiva solamente a las mujeres. Los casos confirmados de rubéola aumentaron de 3,005 en el 2006 a 13,187 en el 2007, como resultado de los brotes ocurridos en tres países. En el 2008, en la Región se notificó un total de 4,536 casos confirmados de rubéola; y los casos ocurridos en dos países representaban 98% de ellos. Como una consecuencia lamentable de los brotes de rubéola del período 2008-2009, se notificó un total de 27 casos del SRC en estos dos países. El último caso confirmado del SRC fue un niño nacido el 26 de agosto del 2009 en Brasil. En respuesta a estos brotes, los países intensificaron las actividades de vigilancia y las intervenciones de vacunación por medio de actividades complementarias de vacunación de adolescentes y adultos. Los países que culminaron las campañas para adolescentes y adultos, hombres y mujeres, no han notificado casos de rubéola endémica. El último caso confirmado de rubéola endémica se notificó en febrero del 2009. En el 2009, dos países notificaron 7 casos de rubéola asociados con la importación; en el 2010, el total regional fue de 15 casos de rubéola asociados con la importación; y en el 2011, fue nuevamente de 7 casos de rubéola asociados con la importación

(datos provisionales hasta abril del 2012). En el 2010 y el 2011 no se notificaron casos endémicos del SRC (OPS, 2012).

Durante el análisis de los datos de la eliminación del sarampión, la rubéola y el SRC, Colombia identificó varios casos de rubéola confirmada clínicamente y por laboratorio en 2008, 2009 y 2011. El primer caso detectado fue un caso de rubéola confirmado por laboratorio ocurrido en el 2011, sin información sobre el genotipo. Las investigaciones retrospectivas en el mismo departamento de Colombia revelaron 8 casos más de rubéola con confirmación de laboratorio o clínica entre el 2008 y el 2009. La mayoría de las personas afectadas no tenían antecedentes de vacunación (OPS, 2012).

Dada ésta presencia de circulación del virus de rubéola en los países de la región debidos a la importación, especialmente Colombia que comparte frontera con las regiones del Perú, y habiéndose evidenciado la heterogeneidad de las coberturas de la vacunación de rutina al interior del país, así como identificado los grupos de edad no vacunados en las campañas masivas del 2006 y 2011, el incumplimiento en el ámbito nacional y regional

de algunos indicadores epidemiológicos, así como debilidades importantes en la investigación epidemiológica y clasificación de casos, ponen al país en riesgo ante una importación de los virus de rubéola, con la aparición de casos secundarios (MINSA, 2012).

Los Estados Miembros han tomado otras costosas medidas para reducir el riesgo de que ocurran nuevos brotes causados por la propagación internacional de los virus del sarampión y la rubéola. Estas medidas incluyen actividades rutinarias y suplementarias de inmunización para cerrar las brechas de inmunidad en la población, monitoreo rápido de las coberturas, vacunación de las poblaciones vulnerables e investigaciones oportunas de cada caso importado (OPS, 2012).

Por lo cual se justifica la realización de este trabajo que facilitará los resultados confiables y oportunos en la detección de los virus de rubéola permitiendo una vigilancia eficiente.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Estandarizar las técnicas moleculares por PCR convencional y PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del Virus de la Rubéola.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el Límite de detección del PCR convencional y PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular del Virus de la Rubéola.
- Evaluar la capacidad diagnóstica del PCR convencional y en tiempo real para el diagnóstico molecular del Virus de la Rubéola.
- Evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos por PCR convencional y PCR en tiempo real.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Agente etiológico

CARACTERÍSTICAS GENERALES.- El nombre de rubéola se deriva del latín que significa “rojizo”. Se consideró inicialmente como una variante del sarampión o de la escarlatina por lo cual se denominó “tercera enfermedad”. La rubéola tiene una distribución mundial, con excepción de los países, en los cuales la enfermedad se ha eliminado.

AGENTE ETIOLOGICO.- El virus de la rubéola pertenece a la familia *Togaviridae*, género *Rubivirus*. (RM. N°800-2012). Este virus es casi esférico con un diámetro de 60 a 70 nm. Está compuesto por una nucleocápside icosaédrica que contiene un genoma monocatenario de ARN de polaridad positiva; el núcleo está rodeado por una cubierta lipídica compleja (*toga* = cubierta).

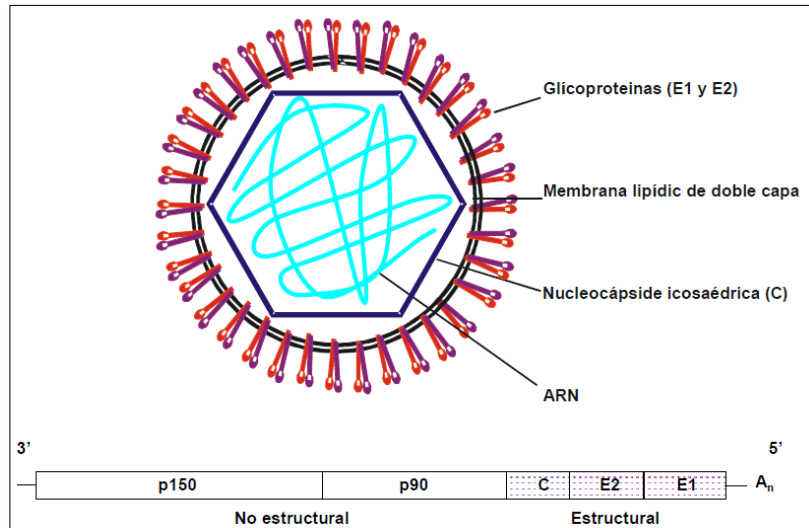


Figura 1. Diagrama de la partícula del virus de la rubéola correlacionado con el mapa genético.

Fuente: Murray, 1998; Wolinsky, 1996

El virus contiene tres proteínas estructurales, dos en la envoltura (E1 y E2) y una en el núcleo (cápside o proteína C) alrededor del ARN (Figura 1). Las proteínas de la envoltura, E1 y E2, son glicoproteínas que existen como heterodímeros y se proyectan en forma de seis a ocho espículas de 8 nm en la superficie. E1 parece ser la molécula dominante de la superficie y se asocia con los epítopes neutralizantes y hemaglutinantes (Wolinsky, 1996). Sólo se conoce un serotipo del virus, pero los análisis del árbol

filogénico, principalmente de la región que codifica E1, indican la existencia de por lo menos siete genotipos diferentes representados en dos clases (OMS, 2006). No existe reacción cruzada con otros togavirus.

El virus contiene un ARN de 9,762 nucleótidos. El extremo 5' del genoma posee una cofia y el extremo 3' una cola de poli (A). La síntesis y el procesamiento de las proteínas del virus de la rubéola tienen lugar a partir de precursores poliproteicos de alto peso molecular (Wolinsky, 1996). Ejemplos con información sobre la secuencia nucleotídica del virus de la rubéola se han depositado en el banco de datos EMBL/GenBank con los siguientes números de acceso: M15240, M18901, y M32735 (OMS, 2006).

Es un virus ARN relativamente inestable y es inactivado por solventes grasos, tripsina, formalina y luz ultravioleta, calor y pH extremos, y amantadina. (MINSa, 2007); es relativamente termolábil; se inactiva después de 30 minutos a 56°C, de 4 minutos a 70°C y de 2 minutos a 100°C. El virus se degrada rápidamente con la congelación convencional a

-20°C, pero es estable a -60°C. Los solventes lipídicos, los ácidos y álcalis débiles y la luz ultravioleta inactivan el virus de la rubéola. Es también sensible a una amplia gama de desinfectantes y se inactiva en hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70% y formaldehído (Chapter, 2004; Wolinsky, 1996).

1.5.2 Aspectos clínicos epidemiológicos

Reservorio.- El único conocido es el ser humano (MINSA/INS, 2007).

Distribución.- Se ha modificado notablemente en los países que consideran la vacuna antirubeólica en su calendario de vacunación y en aquellos que han iniciado campañas de erradicación del Síndrome de Rubéola Congénita. En nuestro país, la rubéola es endemo epidémica, con una tasa de incidencia que varía entre 5^{-20} x 100,000 habitantes (MINSA/INS, 2007).

Modo de transmisión.- El virus se transmite de persona a persona por contacto directo a través de gotitas eliminadas en secreciones respiratorias. En poblaciones cautivas (cerradas) como escuelas, centros militares, etc., pueden infectarse todas las personas susceptibles expuestas. Los lactantes con SRC expulsan grandes cantidades de virus por secreciones faríngeas y en la orina que es la fuente de infección para sus contactos (MINSA/INS, 2007).

Periodo de incubación.- Varía entre 14 y 17 días (MINSA/INS, 2007).

Periodo de transmisibilidad.- La máxima contagiosidad es desde 7 días antes y hasta 4 días después de la aparición del exantema (MINSA/INS, 2007).

Susceptibilidad.- Toda persona que no ha padecido la enfermedad o que no ha sido vacunado adecuadamente (MINSA/INS, 2007).

Inmunidad.- Parece ser de por vida después que una persona tuvo la enfermedad o fue vacunado. Los lactantes hijos de mujeres inmunes suelen estar protegidos por 6 a 9 meses según la cantidad de anticuerpos maternos transferidos a través de la placenta (MINSA/INS, 2007).

Cuadro clínico.- Es una infección aguda exantemática de niños y adultos, generalmente de poca intensidad. Clínicamente se distinguen dos formas:

Rubéola Adquirida o Postnatal.- Muchos casos son subclínicos. Los niños no experimentan la fase prodrómica pero los adultos pueden presentar malestar, fiebre y anorexia por algunos días. La manifestación principal es rash y adenopatías retroauriculares, cervicales posteriores, y cadena suboccipital, estas duran algunas semanas; ocasionalmente ocurre esplenomegalia. El rash se inicia en cara y se desplaza hacia abajo, es maculo-papular pero no confluyente, puede acompañarse de coriza leve y conjuntivitis, usualmente dura entre 3 y 5 días. La fiebre, si está presente. En la fase de convalecencia se puede presentar descamación. Se describe

un enantema consistente en lesiones petequiales en el paladar blando (manchas de Forstner) pero este no tiene valor diagnóstico (MINSAIN, 2007).

Tabla 1. Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola.

Día	Evento
0	El virus de la rubéola de las secreciones respiratorias de una persona infectada entra en contacto con la superficie epitelial de la nasofaringe de una persona susceptible. Se establece la infección localizada en el epitelio respiratorio y el virus se disemina a los ganglios linfáticos regionales.
1 a 22	Replicación viral en la nasofaringe y en los ganglios regionales.
3 a 8	Primeras pruebas de excreción nasofaríngea de los virus.
6 a 20	Viremia
8 a 14	Infección establecida en la piel y otros focos.
10 a 17	Máxima viremia y viruria.
10 a 24	Máxima excreción nasofaríngea de virus (cerca de 3 días antes hasta 7 días después de la aparición del exantema).
17 a 19	La viremia disminuye y luego desaparece.

Fuente: Feigin, 1997; Chapter, 2004.

La rubéola es moderadamente contagiosa, sobre todo en el período de aparición del exantema, pero es transmisible desde una semana antes, hasta 5 a 7 días o más después de iniciado el exantema (tabla 1). Los lactantes con SRC pueden excretar virus hasta un año después del nacimiento (OMS, 2006).

La rubéola afecta principalmente a los niños, a los adolescentes y a los adultos jóvenes. Los principales síntomas comprenden aumento del volumen de los ganglios linfáticos (linfadenopatía) y exantema máculopapular, que pueden estar precedidos de síntomas leves de resfriado común. Las linfadenopatías pueden aparecer entre 5 y 7 días antes del comienzo del exantema y hasta 2 días después. Si bien estos síntomas no son específicos de la rubéola, la linfadenopatía puede ser más pronunciada y durar más tiempo (varias semanas) en la rubéola que en otras enfermedades exantemáticas, como el sarampión (Chapter, 2004).

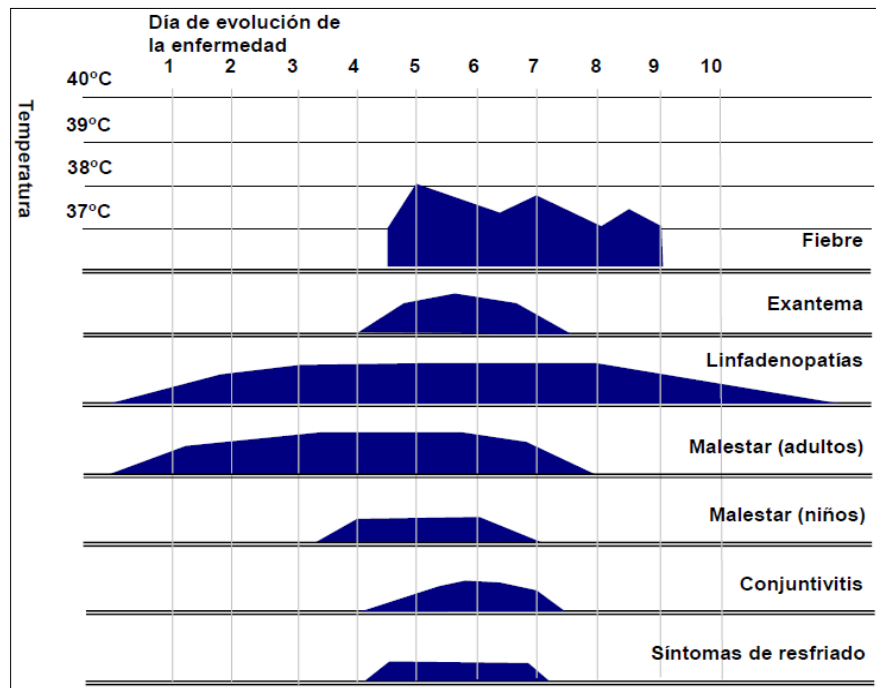


Figura 2. Características clínicas de una infección típica por el virus de la rubéola.

Fuente: Feigin 1997, Chapter 2004.

En los niños, la erupción cutánea suele ser la primera manifestación. Los pródromos incluyen fiebre baja, cefalea, malestar general, anorexia, conjuntivitis leve, rinitis, dolor de garganta, tos y linfadenopatías de los ganglios suboccipitales, posarticulares y cervicales (Figura 2). Entre 14 y 18 días después de la infección, aparece un exantema máculopapular (erupción cutánea rosada con manchas discretas). El exantema, que puede ser difícil de ver, comienza en la cara y

el cuello y se disemina rápidamente hacia abajo al tronco y las extremidades. El exantema se desvanece después de 1 a 3 días y en ocasiones es pruriginoso. El dolor de las articulaciones y la artritis transitoria son poco frecuentes en los niños, pero ocurren con frecuencia en los adultos, especialmente en las mujeres.

Tras la infección por el virus de la rubéola se adquiere inmunidad humoral e inmunidad mediada por células. Los anticuerpos de tipo IgG e IgM se detectan entre 14 y 18 días después de la infección por el virus de la rubéola, alrededor del momento en que aparece el exantema (Figura 3).

Los anticuerpos IgM contra la rubéola disminuyen rápidamente y en general no se pueden detectar después de 2 meses, mientras que los anticuerpos IgG persisten. La respuesta linfocítica mediada por células, específica de la rubéola, comienza una semana después de la respuesta humoral y persiste durante toda la vida.

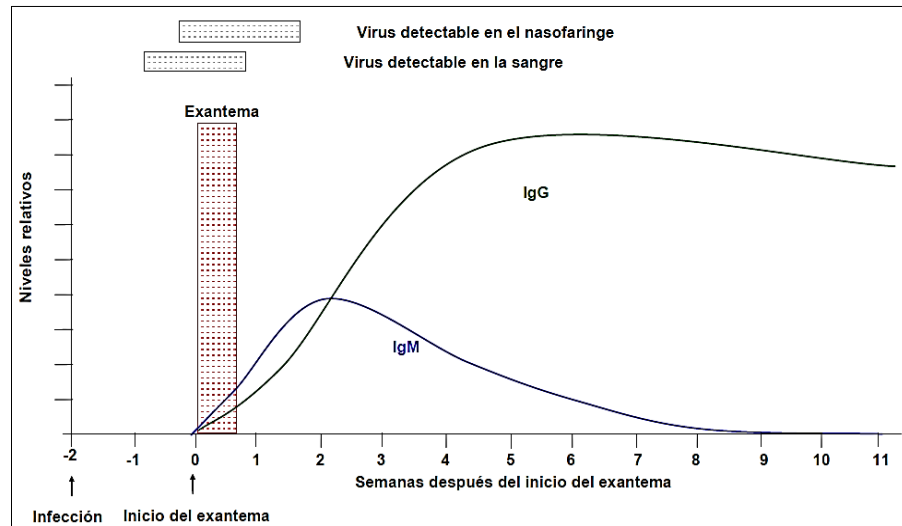


Figura 3. Respuesta inmunitaria en un caso típico de infección por el Virus de la Rubéola.

Fuente: Feigin 1997, Murray 1998.

Se han comunicado casos raros de reinfección, confirmados serológicamente después de una infección previa (o vacunación). También se han presentado casos de SRC después de una reinfección en mujeres embarazadas con inmunidad natural o generada por la vacuna, pero son extremadamente raros. Los anticuerpos maternos contra la rubéola protegen al recién nacido durante los primeros meses de vida y pueden modificar la respuesta inmunitaria si se vacuna a una edad temprana.

Síndrome de Rubéola Congénita (SRC).- El SRC es la consecuencia más grave de la rubéola. Aparece como consecuencia de la infección del feto por el virus de la rubéola durante el primer trimestre del embarazo y puede ser causa de aborto espontáneo o inducido, mortinato o múltiples anomalías congénitas; pueden estar afectados prácticamente todos los órganos. La sordera es la manifestación más frecuente y a menudo la única del SRC (OMS, 2006).

El riesgo de anomalías congénitas tras la infección materna por el virus de la rubéola varía del 10 al 90%. La gravedad y el tipo de anomalía dependen de la edad gestacional del feto en el momento de la infección. El período más peligroso son las 12 primeras semanas de gestación; las anomalías congénitas son raras como consecuencia de infecciones posteriores a las 20 semanas. La especificidad del órgano está dada en general por el momento de la infección intrauterina; sin embargo, la relación entre las anomalías fetales y el tiempo de la infección no siempre es clara (Feigin, 1997; Murray, 1998; Chapter 2004).

La rubéola puede ocasionar defectos congénitos durante la gestación temprana, y cuya aparición puede tardar entre 2 y 4 años o producir hasta la muerte fetal. Las deficiencias congénitas ocasionan sordera, cataratas, glaucoma, retinopatía, microftalmia, ductus arterioso persistente, defectos del septum ventricular, estenosis pulmonar y coartación de aorta. En el sistema nervioso ocasiona retardo mental, microcefalia. Otras anomalías son lesiones óseas, esplenomegalia, hepatitis y trombocitopenia con púrpura y diabetes mellitus que aparece con frecuencia en la niñez tardía (MINSA, 2007). Las anomalías oftálmicas y cardíacas se suelen presentar con una infección ocurrida durante las 8 primeras semanas del embarazo, mientras que el daño cerebral y la sordera cuando la infección ocurre en las 18 primeras semanas del embarazo (Feigin, 1997; Chapter, 2004).

Aunque la vacunación antirubeólica está contraindicada durante el embarazo, no se han notificado casos de SRC en más de 1 000 embarazadas susceptibles, que recibieron de forma inadvertida la vacuna al comienzo del embarazo. En

una investigación de casi 19,000 embarazadas inadvertidamente vacunadas contra la rubéola en una gran campaña masiva, tampoco se encontraron pruebas de casos de SRC (datos no publicados). Por lo tanto, la vacunación inadvertida contra la rubéola durante embarazo no constituye una indicación de aborto (Plotkin, 1999).

Vacunación.- La vacuna contra la rubéola contiene una cepa de virus vivo atenuado que se ha utilizado durante más de 40 años. Una sola dosis de vacuna confiere un nivel de inmunidad a largo plazo superior al 95%, que es similar al que genera la infección natural. Las vacunas contra la rubéola están disponibles en preparaciones monovalentes (vacuna dirigida solo a un patógeno) o, más frecuentemente, en combinación con otras vacunas, como las vacunas combinadas contra el sarampión, la rubéola, y la parotiditis. Las reacciones adversas a la vacuna por lo general son leves. Pueden consistir en dolor y enrojecimiento en el sitio de la inyección, fiebre leve, exantema y dolores musculares. En las campañas masivas de vacunación en la Región de las Américas, que abarcaron a más de 250 millones de

adolescentes y adultos, no se detectaron reacciones adversas graves asociadas con la vacuna (OMS, 2013).

Diagnóstico diferencial de rubéola posnatal.- Se debe diferenciar de sarampión, escarlatina, parvovirus B19, exantema súbito, roséola infantil, coxsackie y echovirus y ciertas infecciones por *Toxoplasma gondii* o enterovirus (Tabla 2) y dengue (MINSA, 2007).

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de las principales enfermedades febriles eruptivas.

Enfermedad febril	Características de la erupción	Agente Etiológico	Periodo de Incubación (Días)
Eritema infeccioso	Generalmente sin fiebre. Erupción intensa en mejillas, puede reaparecer entre 1 y 3 semanas después de la exposición al sol o agua caliente.	Parvovirus Humano B9	4 a 20
Exantema súbito	Frecuentemente en menores de 4 años. Después de desaparecer la fiebre, la erupción aparece en tronco, y luego en todo el cuerpo, ésta palidece y desaparece pronto.	Herpes Virus Humano 6 (VHH-6)	5 a 15
Escarlatina	Eritema fino, punteado, palidece al tacto, la piel tiene consistencia parecida a papel lija. Hay enrojecimiento de las mejillas y palidez peribucal.	<i>Streptococcus pyogenes</i> Grupo A	1 a 3

Fuente: MINSA, 2007

Epidemiología molecular y genotipificación.- La vigilancia del virus de la rubéola constituye en obtener una secuencia viral de las muestras representativas de cada brote epidémico durante la fase de control o de cada cadena de transmisión durante la fase de eliminación. La red mundial de laboratorios de sarampión y rubéola de la OMS apoya las iniciativas destinadas a obtener aislados de los virus salvajes de la rubéola circulantes y facilita su remisión a los laboratorios designados, donde se realizará el análisis genético.

Tabla 3. Cepas de referencia en el análisis genético de los virus de la rubéola de tipo salvaje.

Genotipo	Cepas de referencia a	Nombre actual ^b	Numero de acceso
1 ^a	RVi/BEL63	Cendehill BEN 63 ^c	AF188704
	RVi/Con. USA/61	HPV77 US 61c	M30776
	RVi/Toyama.JPN/67	TO-336 WT JP 67	AB047330
1B	RVi/ISR/75[1B]	I-9 IS 75	AY968207
	RVi/ISR/88[1B]	I-34 IS 88	AY968209
	RVi/ISR/79[1B]	I-13 IS 79	AY968208
1C	RVi/Cal.USA/91[1C]	BUR US 91	AY968212
	RVi/SLV/02[1C]	QUI ELS 02	AY968211
	RVi/PAN/99[1C]	P-31 PAN 99	AY968217

1D	RVi/Cal USA/97[1D]CRS	SAL-CA US 97	AY968206
	RVi/Tokyo.JPN/90[1D]CRS	NC JP 90	AY968214
	RVi/Saitama.JPN/94[1D]	SAI-1 JP 94	AY968216
1E	RVi/Shandong.CHN/02[1E]	T14 CH 02	AY968210
	RVi/MYS/01[1E]	M-1 MAL 01	AY968221
1F	RVi/Shandong.CHN/00[1F]	TS 10 CH 00	AY968213
	RVi/Anhui. CHN/00[1F]	TS 38 CH 00	AY968215
2A	RVi/Beijing.CHN/79[2A]	BRD1 CH 79	AY258322
	RVi/ Beijing.CHN/80[2A]	BRD2 CH 80 ^c	AY258323
2B	RVi/TelAviv.ISR/68[2B]	I-11 IS 68	AY968219
	RVi/Wash.USA/16.00[2B]	TAN IND 00	AY968220
	RVi/Anhui.CHN/00/2[2B]	TS34 CH 00	AY968218
Vacuna ^d	RVi/USA/64	RA 27/3 US 64 ^c	L78917

Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2006

- a. Cepas denominadas usando la nueva convención recomendada por la OMS. No se cuenta con la información completa de algunas cepas.
- b. Cepas denominadas usando los identificadores antiguos o publicados anteriormente.
- c. Virus vacunal atenuado cuyo virus salvaje original se ha perdido.
- d. Se considera que el genotipo de este virus es 1a.

La mayoría de los estudios genéticos de los virus salvajes de la rubéola se ha conducido mediante secuenciación completa o de porciones de la región que codifica la proteína E1 de la envoltura. En la actualidad, se utilizan en la caracterización genética diferentes porciones (ventanas) de la región que codifica E1, pero la OMS recomienda en los estudios de rutina de epidemiología molecular una ventana de 739 nucleótidos, entre los nucleótidos 8731 y 9469 (OMS, 2006).

Los principales grupos filogénicos del virus de la rubéola, que difieren en 8 a 10% de la secuencia nucleotídica, se pueden separar en dos clases. En el tabla 3 se enumeran los virus de referencia de siete grupos inter clases, denominados genotipos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2A y 2B), con un genotipo común provisional (1a) (WHO, 2005). Se ha observado que los genotipos 1B, 1C, 1D y 1F tienen una distribución limitada: 1B se encontró en Europa y a lo largo de la costa oriental de América del Sur, 1C en Centroamérica y a lo largo de la costa occidental de América del Sur; 1D en

países asiáticos y se encontró un virus del genotipo 1D en Etiopía; el genotipo 1F se encontró en China.

1.5.3 PCR convencional

La reacción en cadena de polimerasa, llamada también PCR en punto final, es una prueba diagnóstica sensible y específica capaz de detectar el genoma de patógenos presentes en tejidos, inclusive hasta en tejido descompuesto. Se emplea como apoyo en aquellos casos donde el resultado del diagnóstico ha sido dudoso por otras técnicas. Se usa para ampliar una secuencia de ADN, con esta se consigue copiar millones de veces en un par de horas una secuencia predeterminada dentro de una mezcla de ADN (Rojas *et al.*, 2006). Esencialmente la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conociendo las secuencias que lo flanquean (Salto, 2006).

El conocimiento de los pasos esenciales de la división celular marcó la pauta para implementar la técnica, ya que la PCR consiste en efectuar una replicación repetitiva *in vitro* de una secuencia específica de ADN, aumenta en forma

proporcional la sensibilidad de la misma, a tal nivel que si el producto amplificado o producto de PCR se detecta visualmente al iluminar el gel con luz ultravioleta (Panduro y col., 2000).

La reacción en cadena de la polimerasa es una poderosa técnica usada para amplifica regiones específicas del ADN (PCR) o ARN (RT-PCR) a niveles fácilmente detectables en geles de agarosa o con sondas de ácido nucleico. Esta técnica utiliza dos oligonucleótidos cortos de secuencia específica en la reacción para actuar como cebadores que extienden la secuencia de ácido nucleico de interés y una enzima polimerasa termoestable para aumentar exponencialmente la cantidad de ácido nucleico a través de repetidos ciclos de síntesis (Valasek y Repa, 2005).

Los componentes de la PCR son: ADN molde (muestra), Enzima *Taq* polimerasa que proviene de la bacteria (*Thermus aquaticus*), cationes divalentes (MgCl), cebadores o “primers”, nucleótidos libres (dNTPs) y una solución buffer

(Vinueza, 2009). La PCR se desarrolla básicamente en tres etapas (Figura 4):

Desnaturalización del ADN

La primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, 97°C por 15 segundos o a una temperatura promedio de 95°C en 45 segundos (Crespo, 2000); sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de ADN y por lo tanto se reduce el rendimiento el producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima (Salto, 2006).

Alineación de iniciadores

La segunda reacción consiste en la hibridación de los cebadores. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los cebadores a las cadenas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los cebadores dependen de la composición, tamaño y concentración de los cebadores amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_f de los cebadores. Debido a que las ADN polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los cebadores puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados (Salto, 2006). A ésta temperatura se forman y se rompen los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables durarán un mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos alineados, formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño segmento de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se

forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso (Crespo, 2000).

Extensión o polimerización

Sucede a 72°C durante 2 minutos, la *Taq* polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de los cebadores incorporando los nucleótidos (Crespo, 2000). El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del cebador se realiza tradicionalmente a 72°C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima (Salto, 2006).

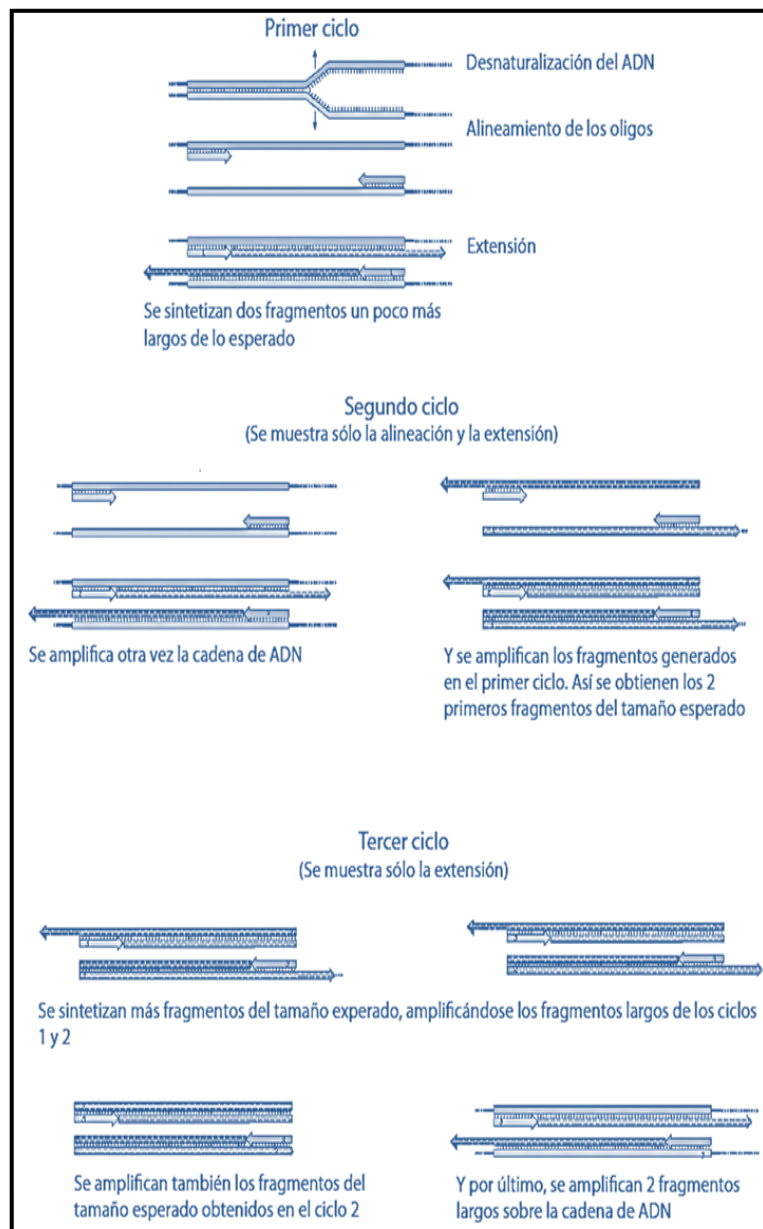


Figura 4. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción (Modificada de Parkes, 2003).

Fuente: Asuar, 2013.

Esta técnica también puede ser usada en apoyo a la epidemiología o epizootiología de la enfermedad si el producto de ADNc obtenido se secuencía (Loza *et al.*, 1999; Loza *et al.*, 2005).

Debido a que la RT-PCR utiliza como molde inicial el ARN, se requiere desarrollar un paso extra para poder realizar las tres etapas descritas anteriormente. Como el ARN no puede servir como templado para el PCR, el primer paso es una transcripción reversa para producir un ADNc a partir de un molde de ARN, seguido de un segundo paso para la amplificación exponencial del ADN en una reacción PCR (Bustin, 2000).

Procedimiento. El ARNm es copiado a ADNc por la transcriptasa reversa usando un cebador dT (los cebadores al azar se pueden también utilizar). En PCR en tiempo real, se utiliza generalmente una transcriptasa reversa que tenga una actividad endo H. Esto elimina el ARNm permitiendo que la segunda hebra de ADN sea formada. Se adiciona una mezcla de PCR que incluya una polimerasa termoestable (tal como la

Taq polimerasa), los cebadores específicos para el gen de interés, los exonucleótidos y un buffer conveniente. El ADNc se desnaturaliza a más de 90°C (~94°C), las dos hebras se separan. A 50°C o 60°C los cebadores específicos se alinean con el sitio complementario en cada cadena. Los sitios de unión a los cebadores deben estar separados 400 bases, pero generalmente se encuentran a 100 bases de distancia especialmente cuando se usa el PCR en tiempo real. A 72°C la polimerasa extiende el ADN desde los cebadores. Se obtienen 4 cadenas de ADNc. Después de 30 o 40 ciclos de síntesis de ADNc, los productos de reacción son analizados usualmente por electroforesis en gel de agarosa. El gel se tiñe con bromuro de etidio. Los geles de agarosa para analizar los productos de ADNc de la RT-PCR no nos permiten la cuantificación ya que el bromuro de etidio es muy insensible y cuando una banda es perceptible sobrepasa la etapa logarítmica de amplificación. El bromuro de etidio es un colorante que se une a la doble cadena de ADN intercalándose entre los pares de bases. Emite luz fluorescente cuando se irradia en la parte UV del espectro. Sin embargo, la fluorescencia no es muy brillante. Otros

colorantes, como el SYBR green, que son mucho más fluorescentes que el bromuro de etidio, se utilizan en el PCR en tiempo real (Bustin, 2000).

1.5.4 PCR en tiempo real

Actualmente existen técnicas disponibles basadas en emisión de fluorescencia que detectan los productos amplificados con similar sensibilidad (Wittwer *et al.*, 1997). Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. La rapidez con la que la señal fluorescente supera un nivel umbral se correlaciona con la cantidad de secuencia blanco original, lo que permite la cuantificación (Valasek y Repa, 2005).

Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral, se correlaciona con la cantidad inicial de ADN blanco, permitiendo de esta manera

poder cuantificarlo. El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel de umbral, se conoce como ciclo de umbral (C_t) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación.

El valor de C_t representa el ciclo en el cual la emisión de fluorescencia supera el umbral por encima del ruido de fondo (Bustin, 2005). Además, el producto final puede ser caracterizado sometiéndolo al aumento de temperatura para determinar a qué temperatura se disocia la doble cadena del producto, determinando así la temperatura de fusión (T_f). Este punto de fusión es una propiedad única dependiente de la longitud del producto y la composición de los nucleótidos (Valasek y Repa, 2005). Para el diseño de cebadores debe tenerse en cuenta diversos aspectos. La longitud óptima de los cebadores debe ser alrededor de 15-30 bases, y el contenido de GC (guanina y citocina) debe ser entre 30% y 80% (Dorak, 2006). La temperatura de fusión (T_f) de los cebadores no debe diferir en más de 1-2 °C entre ambos. Los cebadores que se seleccionen sólo deben contener uno o dos Gs o Cs en los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3'

(Bustin, 2000). La longitud máxima del amplicón no debe exceder las 400 pb, sin embargo lo ideal es elegir amplicones de longitud entre 50 y 200 bp, ya que permiten obtener resultados más consistentes al ser más tolerantes a las condiciones de la reacción (Dorak, 2006).

La detección de productos específicos suele encontrarse entre los ciclos 25 y 35, y a mayor número de ciclos, aumenta la acumulación de productos inespecíficos (Bustin, 2005). Un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay softwares que pueden determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de amplificación pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Dorak, 2006).

Existen varias sondas de ADN específicas utilizadas en la RT-PCR: Las Sondas TaqMan®, actualmente son las más utilizadas. En adición a los cebadores externos, esta metodología utiliza un tercer oligonucleótido interno conocido

como sonda. El colorante fluorescente dador, típicamente FAMTM, se encuentra unido al extremo 5' de la sonda y el aceptor, generalmente TAMRATM está unido al extremo 3'. Actualmente, TAMRATM está siendo reemplazado por los dadores de tipo BHQ porque proveen una menor fluorescencia de fondo. En tanto que las moléculas dadoras y aceptoras se encuentren estrechamente cercanas (alrededor de 100 Å) (Aliverti, 2012).

La sonda está diseñada para tener una T_m mayor a la de los cebadores, y durante la fase de extensión, la sonda deberá ser 100 % complementaria para que el ensayo sea exitoso (Grove, 1999). El ensayo TaqMan aprovecha la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa *Taq* para dividir una sonda de degradación durante la PCR (Lie y Petropoulos, 1998).

La sonda de degradación, o TaqMan, suele ser un oligonucleótido de 20-30 bases de longitud (usualmente con una T_f 10 °C superior a la T_f de los cebadores) que contiene un colorante delator fluorescente en el extremo 5' y un

colorante inhibidor en el 3' (Figura 5). Al estar bloqueado el extremo 3', la sonda no puede extenderse como un cebador. Durante la PCR, en presencia de una diana, la sonda se hibrida específicamente entre los sitios de los cebadores directo e inverso. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante delator al colorante inhibidor produce la supresión de la fluorescencia delatora principalmente por transferencia de energía de tipo Forster (Forster, 1948; Lakowicz, 1983).

Durante la reacción, la actividad exonucleásica 5'-3' de la ADN polimerasa *Taq* degrada la sonda entre los colorantes delator e inhibidor solamente si la sonda se hibrida con la diana. De esta manera, la fluorescencia aumenta a medida que progresa la amplificación. La acumulación de producto de la PCR se detecta monitorizando el incremento de la fluorescencia del colorante delator.

Este proceso tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto. Las sondas de degradación, a diferencia de las FRET, liberan fluorocromos

en cada ciclo, añadiendo más colorante al previamente liberado. En consecuencia, la señal fluorescente se potencia considerablemente en cada ciclo. El ensayo TaqMan utiliza unos parámetros de los ciclos térmicos y unas condiciones de la PCR que son universales. Las sondas fluorogénicas exigen, que no haya G en el extremo 5'. Una G adyacente al colorante delator inhibe la fluorescencia incluso tras la división (Weighardt, 2014).

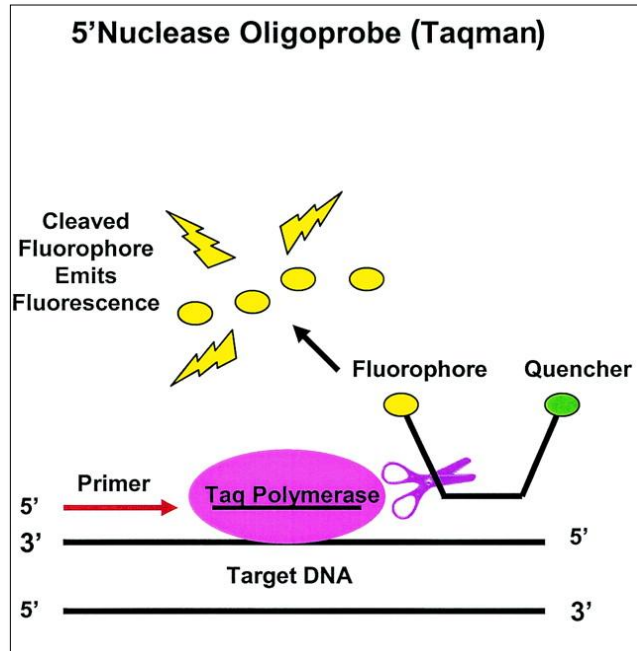


Figura 5: Sondas TaqMan

Fuente: Contreras, 2012

Evaluación de la PCR en Tiempo Real

Para esto se necesitan dos condiciones experimentales: tener productos de amplificación con un tamaño menor a 150 pb y emplear iniciadores con una temperatura de fusión cercana a 60 °C. De aquí en adelante el proceso de amplificación se divide en 3 fases: Fase geométrica, Fase lineal y Fase estacionaria.

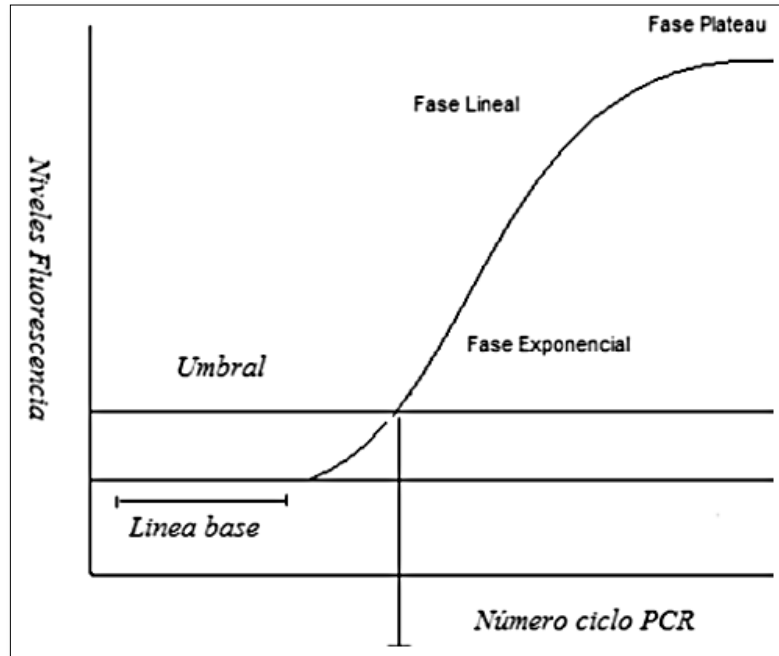


Figura 6. Cinética de la RT-PCR

Fuente: Pinilla, 2008

Fase Geométrica. También llamada fase exponencial es donde todos los elementos químicos de la reacción se encuentran en abundancia y los productos de amplificación de diferentes blancos, la eficiencia de amplificación es constante e idéntica. Es aquí donde la concentración inicial de muestra es directamente proporcional al número de ciclos para una concentración final de muestras constantes

Fase lineal. Los oligonucleótidos comienzan a ser factores limitantes de la amplificación, la eficiencia entonces disminuye de manera constante por lo que no es posible llevar en esta parte un ensayo cuantitativo.

Fase estacionaria. La cantidad de productos obtenidos se mantiene constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción de amplificación, inclusive estos productos por la ausencia de oligonucleótidos en la reacción pueden ser parcialmente degradados por la polimerasa (Sevin, 2003).

Cuantificación del ADN blanco en la muestra

Se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) añadiendo unos controles internos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN blanco (curva patrón o estándar). En el PCR de tiempo real el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia en cada ciclo (proporcional al aumento de ADN) el cual se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles.

El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia del ciclo umbral es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN blanco presente en la muestra. Por lo tanto, con la curva patrón, al interpolar los valores de Ct de cada muestra problema se puede inferir la concentración inicial de ADN.

La eficiencia de la reacción es calculada en base a la siguiente fórmula: $EF=10^{(-1/pendiente)}$

La eficiencia deberá ser del 90-100 %

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 Población de estudio

El presente estudio fue descriptivo retrospectivo. Las muestras para la evaluación fueron conformadas por cepas de patrones referenciales de aislamientos de los virus de sarampión y rubéola, muestras directas de hisopado nasofaríngeo y orina; así como muestras de suero positivas a *Mycoplasma*, Parvovirus B19, Herpes 1 y Herpes 2; que se encontraron crioconservadas en el laboratorio del INS. Las pruebas de capacidad diagnóstica estuvieron formadas por muestras de aislamientos virales positivos y negativos a rubéola. Las muestras fueron propagadas a partir de aislamiento viral, la positividad o negatividad de estas muestras fueron confirmadas mediante un diagnóstico clínico e

inmunológico por anticuerpos monoclonales (IFD), lo cual confirman como patrones referenciales.

2.1.2 Marco muestral

El universo estaba constituido por todas las muestras clínicas recepcionadas por el Laboratorio de Sarampión y Rubéola del Instituto Nacional de Salud (INS) como parte de la vigilancia para el diagnóstico del virus de sarampión y rubéola, procedentes de todas las regiones del país. El marco muestral comprendió 150 muestras de referenciales positivos al virus de la rubéola y 150 muestras referenciales negativas como control; también se utilizó la vacuna combinada del virus vivo atenuado de Sarampión (Edmoston-Zagreb) y de Rubéola (Wistar RA 27/3) como controles de referencia.

2.1.3 Diseño muestral y selección de muestra

El presente trabajo tiene como técnica de muestreo por conveniencia que pretende seleccionar unidades de análisis que cumplen los requisitos de la población objeto de estudio, donde se utilizará muestras positivas y negativas al virus de la rubéola como controles.

2.1.4 Muestra

De una población compuesta por muestras de hisopado nasofaríngeo y orina de pacientes con diferentes sintomatologías, se seleccionó a la subpoblación de muestras de pacientes, que ingresaron al laboratorio de Sarampión y Rubéola procedentes de diferentes puntos del país durante el periodo 2008-2013. Esta selección se efectuó mediante la identificación de las fichas epidemiológicas, que consignen sintomatología clásica de las etiologías en estudio, así como los resultados obtenidos por IFD.

2.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

2.2.1 Materiales biológicos

Células Vero de American Type Culture Colección

Cepa vacuna combinada (Wistar RA 27/3, Edmoston-Zagreb)

Cepas virales aisladas de casos clínicos

Set de cebadores para rubéola

Set de cebadores para ribonucleasa P humana

Sondas para rubéola y ribonucleasa P humana

2.2.2 Materiales de plástico

Micropipetas de volúmenes necesarios

Tubos Falcon de 15 ml

Tubos de 1,8ml, tubos de 0,2ml y 0.1ml

Racks de 96 pocitos

Puntas con filtro de 10 µl, 200 µl y 1000 µl

Frascos de cultivo de 25 cm²

2.2.3 Reactivos y kits

Mini Qiagen QIAamp Viral

Alcohol absoluto

Alcohol de 70°

Agarosa

Agua libre de nucleasas

Agua desionizada

Buffer de corrida (Azul de bromofenol)

Buffer TAE 50%

Hipoclorito de sodio 5%

Bromuro de etidio

Gentamicina

TAE

Glicerol 60%

Azul de bromofenol

Marcador de peso molecular se utilizó (Ladder, 100 bp Plus

DNA)

EDTA

2.2.4 Materiales de seguridad

Guantes de nitrilo

Mascarilla

Algodón hidrofílico

Gasa

2.2.5 Equipos

Cabina de Bioseguridad Nivel II

Centrifuga

Incubadora de CO₂ a 37°C

Cabinas de PCR

Potenciómetro

Agitador de tubos

Cámara de Electroforesis

Termociclador convencional: Applied Biosystems 9700-Gene

Amp

Termociclador en tiempo real: Rotor-Gene® Q MDx

Espectrofotómetro

Microscopio invertido

Vórtex

NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

UV-transluminador (modelo 2000, BioRad, Hercules, California, USA)

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Cultivo del Virus de Rubéola

Los aislamientos del Virus de Rubéola se realizaron en Células Vero, obtenidos a partir de la American Type Culture Colección, se mantuvieron a 37 ° C bajo 5 % de CO₂ medio esencial mínimo de Dilbecco (DMEM) (Gibco-BRL) suplementado con suero bovino fetal al 5 %, 10 % de triptosa fosfato, y gentamicina (20 µg/ml). Se cultivó la cepa vacuna combinada (Wistar RA 27/3, Edmoston-Zagreb) y cepas virales aislados de casos clínicos.

La propagación del virus de rubéola se observó mediante un microscopio invertido, se observó que las botellas tengan una monocapa celular confluyente 100 %. Se

inoculó la botella, usando un volumen de 500 µl de suspensión viral, para obtener una multiplicidad de infección (MOI) alta; estas fueron subcultivadas rutinariamente en células Vero cada 7 días; hasta completar el tercer pasaje.

2.3.2 Extracción de ARN

El ARN viral se extrajo manualmente usando el sistema RNeasy Mini Qiagen QIAamp Viral (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EEUU), basado en la extracción mediante el uso de minicolumnas; siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos fueron almacenados a -70 °C hasta su utilización.

Procesamiento previo. La muestra se obtuvo de aislamientos en líneas celulares Vero, provenientes de todo el país, estas muestras correspondieron a hisopados nasofaríngeos y orinas que fueron transportadas en medio de transporte viral (MTV) a 4 °C, tal como lo indica en el Protocolo de vigilancia basada en Laboratorio de Sarampión y

Rubéola. (MINSA, 2007). La pureza y cantidad de ARN fue determinada por espectrofotometría con luz ultravioleta.

Lisis celular. Se tomaron 140 μ l de muestra de cultivo celular, a los cuales se agregaron 560 μ l de Buffer de lisis AVL (Tiocianato de guanidina) (ver Anexo 8.1), se homogenizó completamente usando un mezclador automático (Vórtex)

Fase de precipitación. Se agregó 560 μ l de etanol absoluto grado analítico a la muestra. Posteriormente se mezclaron completamente usando un vórtex por 15 segundos, y se centrifugó brevemente.

Fase de purificación. Se añadió 630 μ l de la solución a la columna de purificación. Posteriormente se centrifugó la minicolumna a 8000 r.p.m. por espacio de un minuto y a temperatura ambiente. El proceso se realizó 2 veces. En cada caso se eliminó la solución filtrada. Posteriormente se realizaron 2 lavados; en el primero se añadieron a cada columna 500 μ l del Buffer AW1 preparado y se centrifugó a

8000 r.p.m. por un minuto. Luego se añadieron 500 µl de buffer AW2 preparado y se centrifugó a 14000 r.p.m. por 3 minutos.

Fase de elusión. Se colocó la columna de purificación en un vial de 1,5 ml estéril. Se añadieron a la columna 40 µl de buffer AVE, y centrifugando a 8000 r.p.m. por 1 minuto; el proceso de elusión se realizó dos veces con 40 µl de buffer AVE. La pureza y cantidad de ARN fue determinada por espectrofotometría con un NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

2.3.3 PCR convencional

Para este procedimiento se requirió del termociclador convencional (Applied Biosystems 9700-Gene Amp). El genoma viral fue amplificado por el método PCR convencional en un solo paso utilizando los oligonucleótidos específicos. (CDC, Cat. # KT0104)

Cebador RV11: 5'CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3'

Cebador RV12: 5'CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA 3'

Cebador RV12-2: 5'CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG 3'

El ensayo de PCR convencional, se llevó a cabo empleando el protocolo de amplificación de Qiagen. La reacción se llevó a cabo de acuerdo al protocolo 1.

Protocolo 1: (Qiagen)

Tabla 4.-Fórmula de los componentes para PCR convencional

Componente	µL/reacción
Agua libre de nucleasas (Invitrogen)	8,4
Buffer PCR 2X (Invitrogen)	10,0
CebadorRV11 (Operon)	0,4
CebadorRV12 (Operon)	0,4
CebadorRV12-2 (Operon)	0,4
SuperScript® III RT/Platinum® One Step qRT-PCR system(Invitrogen)	0,4
Volumen Total	20,0

Fuente: Elaboración propia.

Se distribuyó 20 µl a cada uno de los tubos de PCR. Se trasladó al área de procesamiento donde se añadió 5 µl de ARN. Los parámetros de ciclaje se llevaron a cabo como se muestra a continuación:

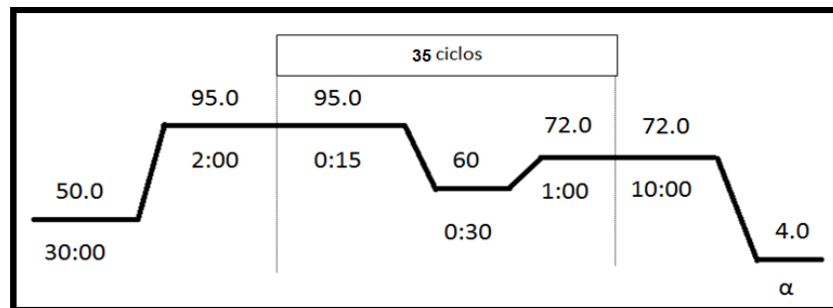


Figura 7. Protocolo del termociclador convencional para la amplificación de la RNA del Virus de la Rubéola.

Fuente: Elaboración propia.

Los productos de amplificación fueron amplificados en geles de agarosa al 2,0 %, con 0,5 µg/ml bromuro de etidio (Promega), se colocaron 8 µl del producto amplificado mezclados con 2 µl de buffer-carga (glicerol 60 % Xilene cyanol 0,003 %, azul de bromofenol 0,003 %, EDTA 60mM), como marcador de peso molecular se utilizó (Ladder, 100bp Plus DNA) los geles se corrieron a 120 voltios durante 40 minutos, utilizando buffer TAE 1 %. Para documentar los

geles se utilizó el UV-transiluminador (modelo 2000, BioRad, Hercules, California, USA) y el software Launch Doc It ® Ls image acquisition).

2.3.4 PCR en tiempo real

Para este procedimiento se utilizó un termociclador para tiempo real Rotor-Gene® Q MDx. El genoma viral fue amplificado por el método PCR en tiempo real en un solo paso utilizando los oligonucleótidos específicos (CDC, Cat. # KK0815).

Cebador directo (RV11): 5'CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3'

Cebador inverso (RV12): 5'CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA 3'

Cebador inverso (RV12-2): 5'CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG3'

Sonda: 5'FAM-AG GTC CAG GTC CCG CCC GAC-BHQ1 3'

Además se contó con un conjunto de genes para el análisis de la ribonucleasa P humana

Cebador directo (HuRNase-P-F): 5'AGA TTT GGA CCT
GCG AGC G 3'

Cebador inverso (HuRNase-P-R): 5'GAG CGG CTG TCT
CCA CAA GT 3'

Sonda: 5'FAM TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG BHQ
1 3'

Se utilizó la sonda TaqMan la cual está marcada con 6-Carboxy fluoresceína (FAM) como reportero y un black-hole quencher (BHQ1)

El ensayo de PCR en tiempo real, se llevaron a cabo empleando el protocolo de amplificación recomendado por la OPS/OMS, 2011.

Protocolo 2: (OPS/OMS 2011)

Preparación de la mezcla de reacción.

1. Se mezcló los reactivos del kit mediante centrifugación rápida por 10 segundos.
2. Se determinó el número de reacciones finales (N) para la prueba. Se hace referencia al número de muestras (n) incluyendo los controles.

3. Se consideró un control de extracción nucleica, un control de reactivo (agua pura), un control positivo (muestra positiva) de todos los primer y sondas de rubéola y un control positivo (vacuna combinada) al virus de rubéola y sarampión.
4. Se distribuyó los reactivos según el orden que se indica a continuación.

Tabla 5.-Fórmula de los componentes para PCR en tiempo real

Reactivo	Volumen en ul (por Rx)
Agua libre de nucleasa (Invitrogen)	8,0 µl
Cebador (RV11) (Operon)	0,4µl
Cebador (RV12) (Operon)	0,4µl
Cebador (RV12-2) (Operon)	0,4µl
SondaTaqMan®(Operon)	0,4µl
SuperScript® III RT/Platinum® One Step qRT-PCR system(Invitrogen)	0,4 µl
2X PCR Master Mix (Invitrogen)	10 µl
Volumen Total (sin RNA)	20 µl

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6.- Fórmula de los componentes para PCR en tiempo real del ARNsa P humano

Reactivo	Volumen en μl (por Rx)
Agua libre de nucleasa (Invitrogen)	8,4 μ l
Cebador directo (HuRNase-P-F) (Operon)	0,4 μ l
Cebador indirecto (HuRNase-P-R) (Operon)	0,4 μ l
Sonda TaqMan® (Operon)	0,4 μ l
SuperScript® III RT/Platinum® One Step qRT-PCR system (Invitrogen)	0,4 μ l
2X PCR Master Mix (Invitrogen)	10 μ l
Volumen Total (sin RNA)	20 μl

Fuente: Elaboración propia.

- Se distribuyó 20 μ l a cada uno de los tubos de PCR. (Se Mantuvo en cadena de frío 2-8 °C y trasladó al área de procesamiento)

Amplificación de la PCR en Tiempo Real.

1. Se mezcló las muestras extraídas con el agitador de tubos por 5 segundos y luego se centrifugó a 8000 rpm por 5 segundos.
2. Se agregó 5 µl de muestra extraída de ARN a los tubos de PCR correspondientes, siguiendo el orden del protocolo de trabajo.
3. Se agregó 5 µl de agua libre de nucleasa en el tubo de control negativo y posteriormente el control positivo.
4. Se mezcló suavemente con la micropipeta.
5. Se cerró finalmente la tapa de cada tubo de PCR y se colocó en el termociclador.
6. Se programó el termociclador según la temperatura, ciclaje y el tiempo requerido que se detalla a continuación:

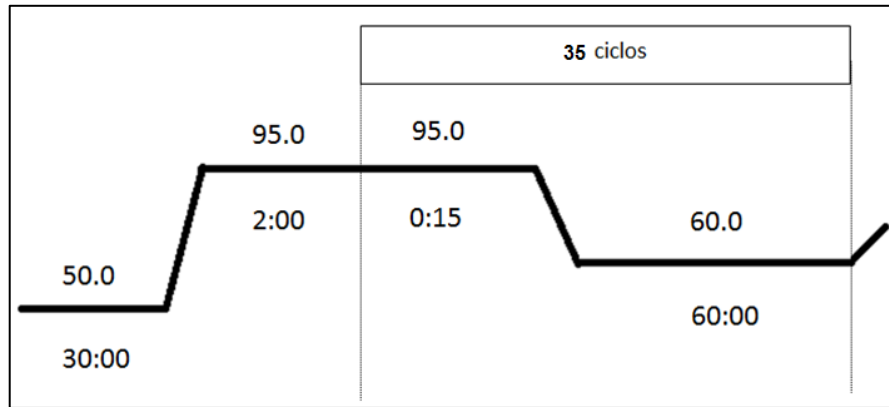


Figura 8. Protocolo del termociclador en tiempo real para la amplificación de RNA del Virus de la rubéola.

Fuente: Elaboración propia.

Se recolectó los datos de fluorescencia durante el paso de incubación de 60 °C. La amplificación, adquisición y análisis de datos fue analizado por el programa ROTOR GENE Q (Series Software) Pure Detection versión 2.1.0. La concentración de ARN fue calculado por la interpolación de las curvas estándar, donde el valor de Ct (ciclo umbral), fue calculado a base del logaritmo conocido de la concentración de ARN (ng/ μ L). Para determinar el número de copias por microlitro se usó los controles de la CDC (Kit Cat. #:KT0128) para la detección del virus de la rubéola y el RNase Humano P.

Tabla 7. Valores de ciclo de umbral (CT) y concentración (copias/μl) de los controles de la CDC*

CONTROLES	CT	Copias/μl
Control Alto*	24,3-28,1	10 ⁵
Control Bajo*	32,3-36	10 ³
Control RNase P*	25,5-29,9	

Fuente: CDC, kit Cat. # KT0128*

La eficiencia de la amplificación promedio, fue determinada a partir de la pendiente obtenida de las concentraciones producidas usando la ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

La interpretación y examen de los resultados para el virus de la rubéola, la RNase P y los controles:

- Si los controles negativos presentan señales positivas con valores de umbral de ciclo inferiores a 35 ciclos o si los controles positivos dan negativo, hay que repetir el experimento.

- Todas las muestras clínicas deben presentar curvas de reacción de la ribonucleasa P que crucen el umbral antes de llegar a 35 Ct, lo cual indica que se produjeron la extracción de ácido nucleico y la amplificación por PCR.

Tabla 8. Interpretación de los valores del ciclo de umbral

Gen vírico	Gen de la ribonucleasa P	Resultado de la muestra
<35	<35	Positivo
<35	Negativo	Positivo
Negativo	<35	Negativo

Fuente: Elaboración propia.

2.3.5 Especificidad de la RT-PCR para el virus de rubéola

La estandarización de las pruebas se realizó con el objetivo de determinar la especificidad de los cebadores utilizados, así como de optimizar esta técnica. En este paso fue utilizada la vacuna combinada (Wistar RA 27/3 y Edmoston-Zagreb) como control positivo referencial y una

muestra patrón positivo a rubéola, en conjunto con los virus relacionados en la vigilancia y utilizando como control negativo a:

- Cultivo celular positiva a Sarampión
- Muestras de suero positivas a *Mycoplasma*
- Muestras de suero positivas a Parvovirus B19
- Muestras de suero positivas a Herpes 1
- Muestras de suero positivas a Herpes 2

Se utilizaron los protocolos de extracción de ARN y RT-PCR convencional y en tiempo real descritos anteriormente. Así como los cebadores RV11, RV12, RV12-2 específicos para el Virus de la Rubéola, dichos cebadores amplifican 185 nucleótidos, región que codifica para la proteína estructural E1.

Tabla 9. Características del set de cebadores utilizados en la estandarización de RT-PCR convencional y en tiempo real para la Rubéola.

Cebadores	Tamaño	Longitud del amplicón	Secuencia
Cebador directo (RV11)*	20 nts	185pb	F: 5´CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3´
Cebador inverso (RV12)*	20 nts		R: 5´CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA 3´
Cebador inverso (RV12-2)*	20 nts		R: 5´CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG 3´

Fuente: CDC, Kit Catalog #: KK0815*

Para la evaluación de la prueba de PCR convencional y en tiempo real con el set de cebadores RV11, RV12 y RV12-2, se utilizaron los perfiles de temperaturas descritos anteriormente.

2.3.6 Sensibilidad de la RT-PCR para el virus de rubéola

Para la sensibilidad de la prueba de RT-PCR convencional y en tiempo real se utilizaron, como muestras positivas: vacuna combinada (Wistar RA 27/3 y Edmoston-Zagreb), control positivo a rubéola y 150 muestras patrones positivos a rubéola provenientes de los cultivos celulares, 150 muestras patrones negativos a anticuerpos monoclonales (IFD) inoculadas en cultivos celulares Vero.

Para la realización de la técnica se utilizaron los protocolos de extracción de ARN, la técnica de RT-PCR convencional y en tiempo y el patrón de temperaturas descritos anteriormente. Para determinar el grado de sensibilidad de la prueba de RT-PCR convencional y en tiempo real se realizaron diluciones seriadas hasta 1/5242880 del ARN del Virus de Rubéola (de concentración inicial 45,76 ng/μl) y controles positivos: alto (10^5 copias/μl) y bajo (10^3 copias/μl); luego fueron procesadas por la prueba de RT-PCR convencional y en tiempo real respectivamente,

obteniendo así el límite de detección para cada prueba. Fue cuantificado espectrofotométricamente.

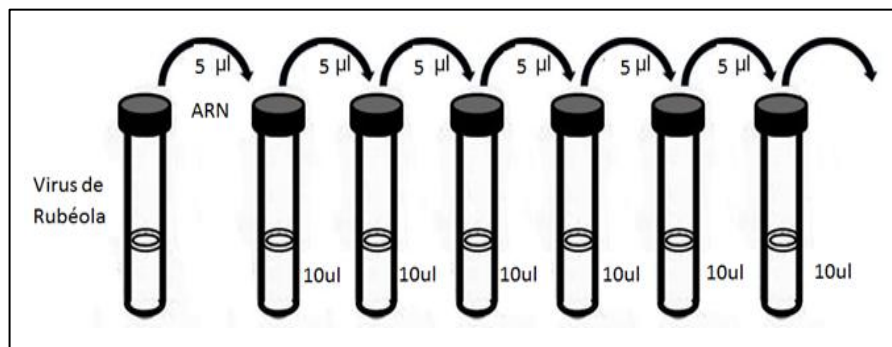


Figura 9. Diluciones seriadas para el límite de detección del VR

Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron 10 diluciones seriadas a partir de una concentración de 45,76 ng/ μ l, donde las concentraciones varió de la siguiente manera: dilución 1 (11,44 ng/ μ l), 2 (2,86 ng/ μ l), 3 (0,715 ng/ μ l), 4 (0,179 ng/ μ l), 5 (0,045 ng/ μ l), 6 (0,011 ng/ μ l), 7 (0,0028 ng/ μ l), 8 (0,000698 ng/ μ l), 9 (0,000175 ng/ μ l) y 10 (0,0000436 ng/ μ l).

2.3.7 Análisis estadístico de los datos

Los resultados de las estandarizaciones de las técnicas de detección molecular se analizaron mediante estadística descriptiva. Se verificó la presencia o ausencia del virus teniendo en cuenta el peso en pares de base del amplicón obtenido y los valores Ct.

Para el análisis de la capacidad diagnóstica se hizo uso de las fórmulas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Éstos se obtuvieron mediante una tabla de 2x2 a partir de las muestras de aislamiento viral provenientes de vigilancia a la cual se aplicaron las respectivas fórmulas estadísticas con un intervalo de confianza del 95 %, confrontando los resultados de las pruebas de RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real. La tabla de 2x2 y fórmulas se detallan a continuación:

Tabla 10.- Cálculos de capacidad diagnóstica mediante una tabla de 2x2 que asocia el estado del Patrón referencial por IFD con los resultados de la prueba de PCR.

		Patrones referenciales por IFD		Total
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	VP ^a	FP ^c	(VP+FP)
	Negativo	FN ^d	VN ^b	(FN+VN)
Total		(VP+FN)	(FP+VN)	N

Fuente: Elaboración propia.

^a VP=Verdaderos Positivos

^bVN= Verdaderos Negativos

^c FP= Falsos Positivos

^d FN= Falsos Negativos

De donde se obtienen las siguientes definiciones:

– Sensibilidad:
$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

– Especificidad:
$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

– Valor Predictivo Positivo:
$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

– Valor Predictivo Negativo:
$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

Se calculó el valor kappa para analizar la concordancia entre los resultados obtenidos con PCR convencional y PCR en tiempo real, utilizando el programa SPSS versión 19.0

Tabla 11.- Valoración del Índice Kappa

Valor de K	Fuerza de concordancia
< 0,20	Pobre
0,21 – 0,40	Débil
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Buena
0,81 – 1,00	Muy buena

Fuente: Altman, 1991

III. RESULTADOS

3.1 Aislamiento viral

Las muestras positivas y negativas a anticuerpos monoclonales (IFD) fueron cultivadas en células vero en tres pases. Los resultados obtenidos no son concretados hasta realizar las pruebas de PCR. En la Figura 10 se puede observar la comparación del efecto citopático del virus de sarampión con el virus de la rubéola que es casi imperceptible.

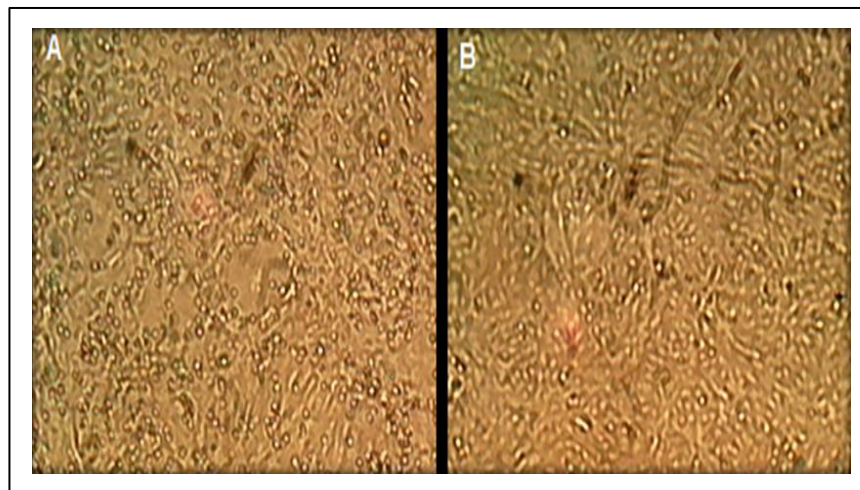


Figura 10. Efecto citopático en células Vero del virus de rubéola y sarampión.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Se aprecian el efecto citopático en células Vero a partir del tercer pasaje; Figura A) efecto citopático del virus de sarampión, observación de sincitios celulares en células Vero, Figura B) Virus de la rubéola en células Vero no se observa cambio alguno, la célula permanece intacta.

3.2 Extracción de ácido ribonucleico

Tabla 12.- Resultados obtenidos de la extracción de RNA para cultivos celulares infectados con la muestra control positiva del virus de rubéola.

Técnicas de extracción	Número de pasaje	A _{260nm}	RNA (ng/ul)	Proteínas (ng/ul)	
Qiagen	Células Vero	1	0,318	12,72	0
	Células Vero	1	1,118	31,49	0
QIAamp	Células Vero con VR	2	1,127	45,08	0
Viral	Células Vero con VR	3	1,144	45,76	0

Fuente: Elaboración propia.

3.3 PCR convencional

a) Detección del gen E1 mediante RT-PCR convencional

Se evaluó la presencia/ausencia del gen E1 del VR en 300 muestras patrones referenciales de aislamientos celulares. De los que 300 aislamientos celulares 150 fueron positivos para el gen E1 y 150 fueron negativos.

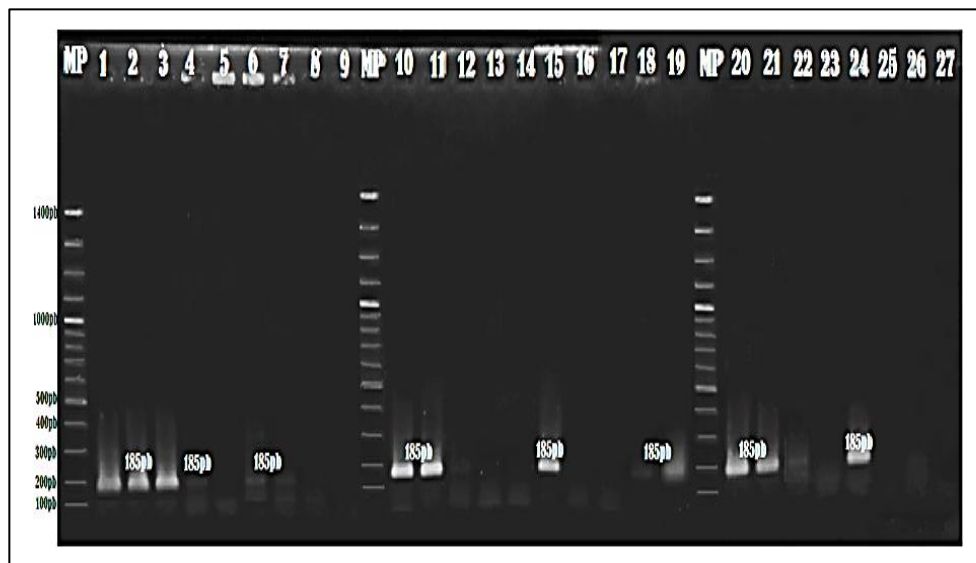


Figura 11. Diagnóstico del VR a partir de aislamiento celular

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En cada carril se colocó 8 µl de producto de PCR: 1 (control positivo), 2 (Vacuna), 3, 10, 11, 15, 19, 20, 21, 24 (aislamientos positivos-tercer pase), 4, 6, 7, 18, (aislamientos virales-primer pase), 5, 8, 11, 12, 13, 4, 16, 17, 22, 23, 25, 26 (aislamientos negativos), 9, 27 (Control Negativo de sistema). Se observa bandas positivas a 185 pb para el virus de la rubéola.

b) Especificidad de la detección del gen E1 por RT-PCR convencional

Los cebadores aparearon con la secuencias E1 de múltiples controles del VR con un 100 % de homología. La amplificación convencional del ARN viral con los cebadores seleccionados resultó en el producto de amplificación de 185 pares de base esperado para los controles de referencia empleados.

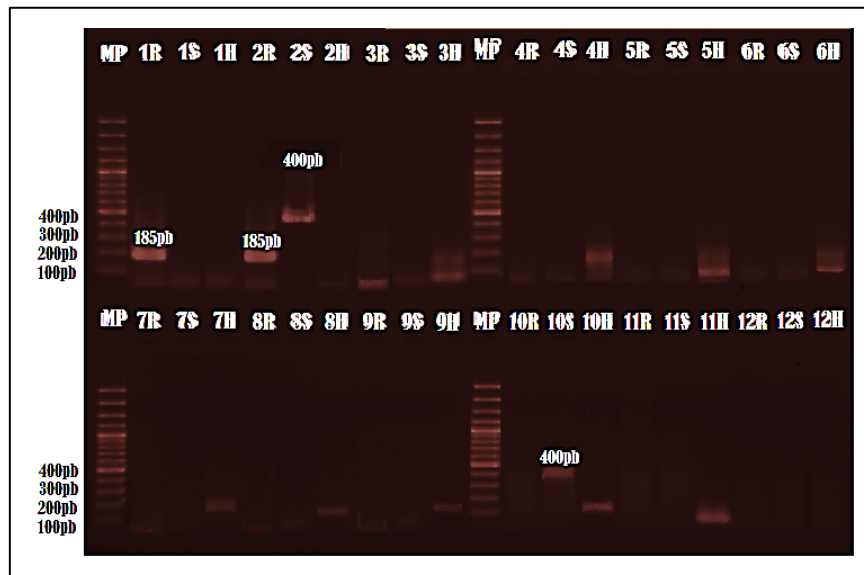


Figura 12. Especificidad de cebadores-PCR convencional

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Los carriles 1 (Control Positivo a rubéola), 2 (Vacuna), 3 (VHS-1(a)), 4 (VHS-1(b)), 5 (VHS-1(c)), 6 (VHS-2), 7 (PVB19(a)), 8 (Mycoplasma 1), 9 (Mycoplasma 2), 10 (Sarampión), 11 (Control de Extracción), 12 (Agua). Se observa las bandas esperadas de 185pb para diagnóstico de rubeola en los carriles 1R y 2R, en los carriles 2S y 10S se observa una amplificación de 400 pb que fueron para el virus del sarampión. No se muestra productos en ningún carril diferente a los controles para el virus de la rubéola.

Donde R= Cebadores de Rubéola, S= Cebadores de Sarampión y H= Ribonucleasa Humana.

c) Sensibilidad de la detección del gen E1 por RT-PCR convencional

La sensibilidad se determinó mediante la visualización del producto de 185 pb en bandas, en gel de agarosa al 2 %. Se encontró además el límite de detección a una concentración mínima de $4,47 \times 10^{-2}$ ng/ μ l de ARN.

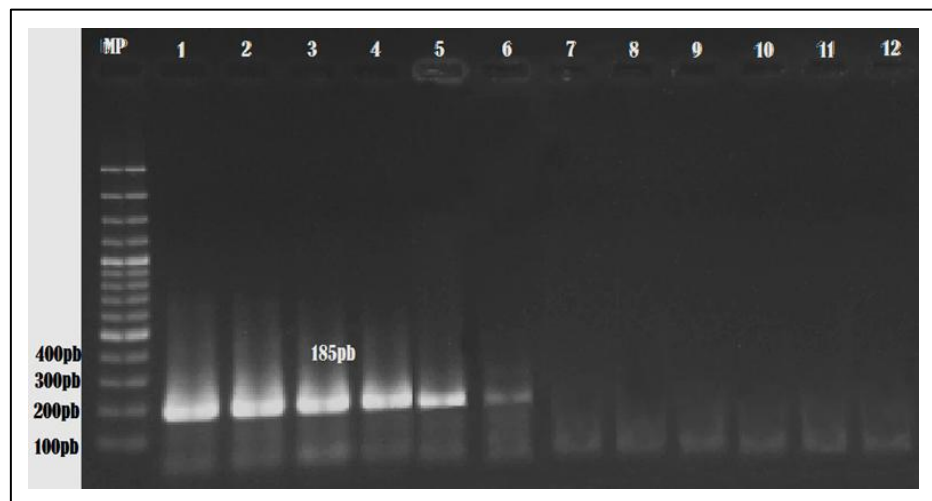


Figura 13. Límite de detección del VR-PCR convencional.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Diluciones del ARN a partir de una concentración inicial de 45,76 ng/μl del control positivo de rubéola cuyas diluciones fueron: Carril 1(45,76 ng/μl), 2(11,44 ng/μl), 3 (2,86 ng/μl), 4(0,715 ng/μl), 5(0,179 ng/μl), 6(0,0447 ng/μl), 7(0,011 ng/μl), 8(0,0028 ng/μl), 9(0,000698 ng/μl), 10(0,000175 ng/μl), 11(0,0000436 ng/μl), 12(Agua). Se observan las diferencias de las bandas de 185pb de los productos de amplificación según concentración de dilución hasta la dilución 6.

3.4 PCR en tiempo real

a) Detección del gen E1 de VR mediante RT-PCR en tiempo real

Con el propósito de evaluar la técnica de PCR en tiempo real para la detección del gen E1 se analizaron 300 aislamientos celulares. En el ensayo de RT-PCR en tiempo real se obtuvieron resultados concordantes con los resultados obtenidos en la RT-PCR convencional, en los 150

aislamientos positivos la concentración de ARN viral oscilo entre 40,05 ng/μl y 3,57x10⁻² ng/μl.

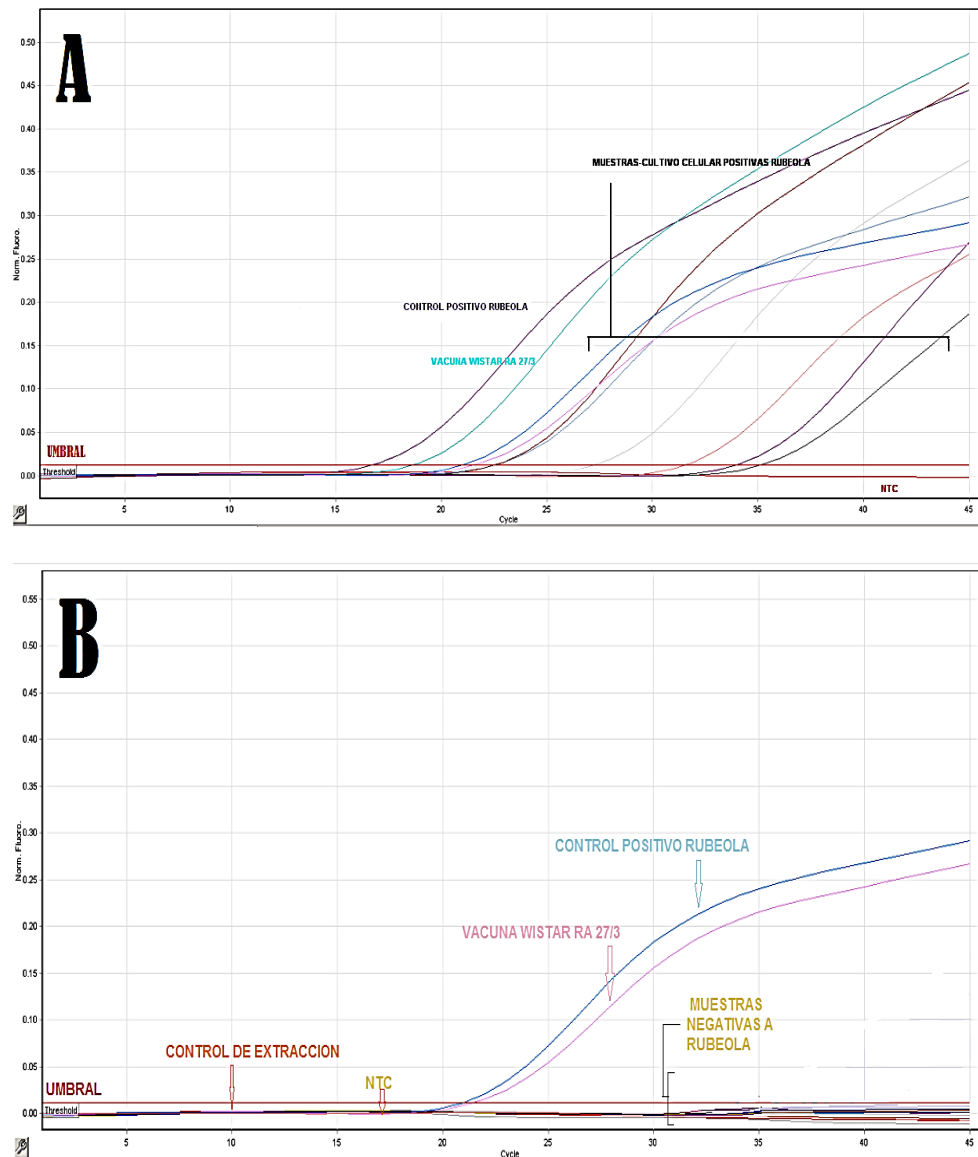


Figura 14. Diagnóstico de aislamientos virales positivos y negativos al VR por PCR en tiempo real.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

A. Amplicones positivos al VR provenientes de aislamiento celular de hisopado nasofaríngeo y orina.

B. Aislamientos virales negativos. Cada corrida está con sus respectivos controles positivos y negativos.

b) Especificidad de la detección del gen E1 por RT-PCR en tiempo real

La amplificación en tiempo real del ARN viral con los cebadores seleccionados resultó en valores de CT menores de 35 para los controles positivos (Vacuna combinada (Wistar RA 27/3 y Edmoston-Zagreb) y una muestra patrón positivo). Se obtuvieron valores de la ribonucleasa humana esperado para los controles de referencia empleados. Además en el enfrentamiento con controles positivos a otras etiologías los resultados fueron negativos, esto se evidencia en la Figura 15 y Anexo 8.5 donde se muestran los valores de CT para cada control enfrentado con los cebadores de rubéola, sarampión y la ribonucleasa humana.

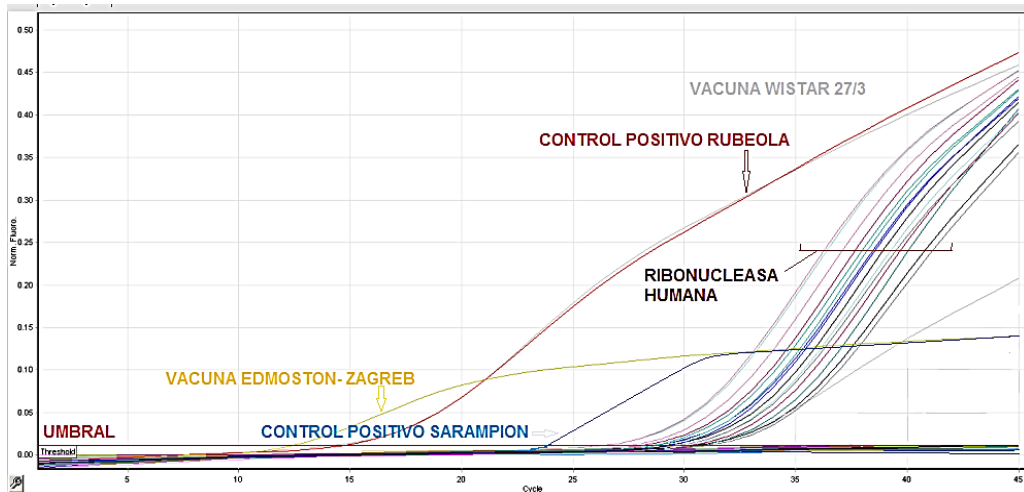


Figura 15. Especificidad de cebadores en PCR-Tiempo Real.

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Curvas de amplificación, de los controles positivos al virus de la rubéola, vacuna combina (Wistar 27/3 y Edmoston-Zagreb), como un conjunto de controles positivos a otras etiologías (VHS-1 (a), VHS-1 (b), VHS-1 (c), VHS-2, PVB19 (a), PVB19 (b), *Mycoplasma* 1, *Mycoplasma* 2), además del Control de Extracción y NTC, enfrentados con los cebadores de rubéola, sarampión y la ribonucleasa humana. Se observa la amplificación de controles con los cebadores de rubéola (CP a rubéola (CT: 15,9), vacuna (CT: 20,39)); cebadores de sarampión (CP sarampión (CT: 25,88), vacuna (CT: 13,6);

cebadores de ribonucleasa humana (CT: 23,84 - 31,39); no se observa amplificación de los controles negativos.

c) Sensibilidad de la detección del gen E1 por RT-PCR en tiempo real

La concentración del ARN viral del gen E1 fue determinado con base en la curva estándar. Como se muestra en la Figura 15a, los valores calculados mediante PCR en tiempo real para cada dilución fueron muy cercanas a sus valores estándar, se obtuvo una línea recta con un coeficiente de correlación de 0,99; el gen E1 varió linealmente (Figura 15b). La sensibilidad de la detección de E1 fue de 0,0000436ng/μl con un valor de Ct de 37,63; también se observaron incrementos sucesivos en los valores de Ct desde 13,51 hasta 37,63 para los estándares que se diluyeron seriadamente desde 1/20 hasta 1/5242880 (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración de ARN y número de copias en dilución

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)
1	E01	Standard	13.51	45.08	40.0595086591096
2	E02	Standard	15.78	11.45	11.0567472355589
3	E03	Standard	18.09	2.8625	2.55816617530838
4	E04	Standard	20.41	0.715625	0.72435211279275
5	E05	Standard	22.56	0.17890625	0.200009449275491
6	E06	Standard	24.20	0.0447265625	4.56503632630512E-02
7	E07	Standard	26.82	0.011181640625	1.128206888560225E-02
8	E08	Standard	29.64	0.00279541015625	4.04898343177184E-03
9	E09	Standard	32.76	6.988525390625E-04	9.79044582461872E-04
10	E010	Standard	36.40	1.74713134765625E-04	1.3146131023376E-04
11	E011	Standard	37.63	4.36782836914063E-05	3.20108907147348E-05
12	NTC	NTC			

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (cop)	Calc Conc (copie)	% Var
1	HIGT CONTROL 1	Standard	19.90	100,000.0	98,885.8	1.1%
2	HIGT CONTROL 2	Standard	19.86	100,000.0	101,126.8	1.1%
3	DILUCION 1	Unknown	13.51		5,982,798.3	
4	DILUCION 2	Unknown	15.78		1,389,324.4	
5	DILUCION 3	Unknown	18.09		316,023.4	
6	DILUCION 4	Unknown	20.41		71,144.8	
7	DILUCION 5	Unknown	22.56		17,915.5	
8	DILUCION 6	Unknown	24.20		6,238.2	
9	DILUCION 7	Unknown	26.82		1,163.8	
10	DILUCION 8	Unknown	29.64		189.8	
11	DILUCION 9	Unknown	32.76		25.8	
12	DILUCION 10	Unknown	36.40		2.5	
13	DILUCION 11	Unknown	37.63		1.1	
14	NTC	NTC				
15	LOW CONTROL 1	Standard	27.06	1,000.0	1,000.0	0.0%

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

(A) Concentración de las diluciones seriadas, límite de detección de $4,36 \times 10^{-5}$ ng/μl partiendo de una concentración de 45,76 ng/μl, que equivale a 1,1 copias/μl
 (B) en base a concentraciones conocidas de los controles

altos (10^{-5} copias/ μ l) y bajos (10^{-3} copias/ μ l), con un valor de CT de 13,51 como máximo y con un límite de detección en CT de 37,63.

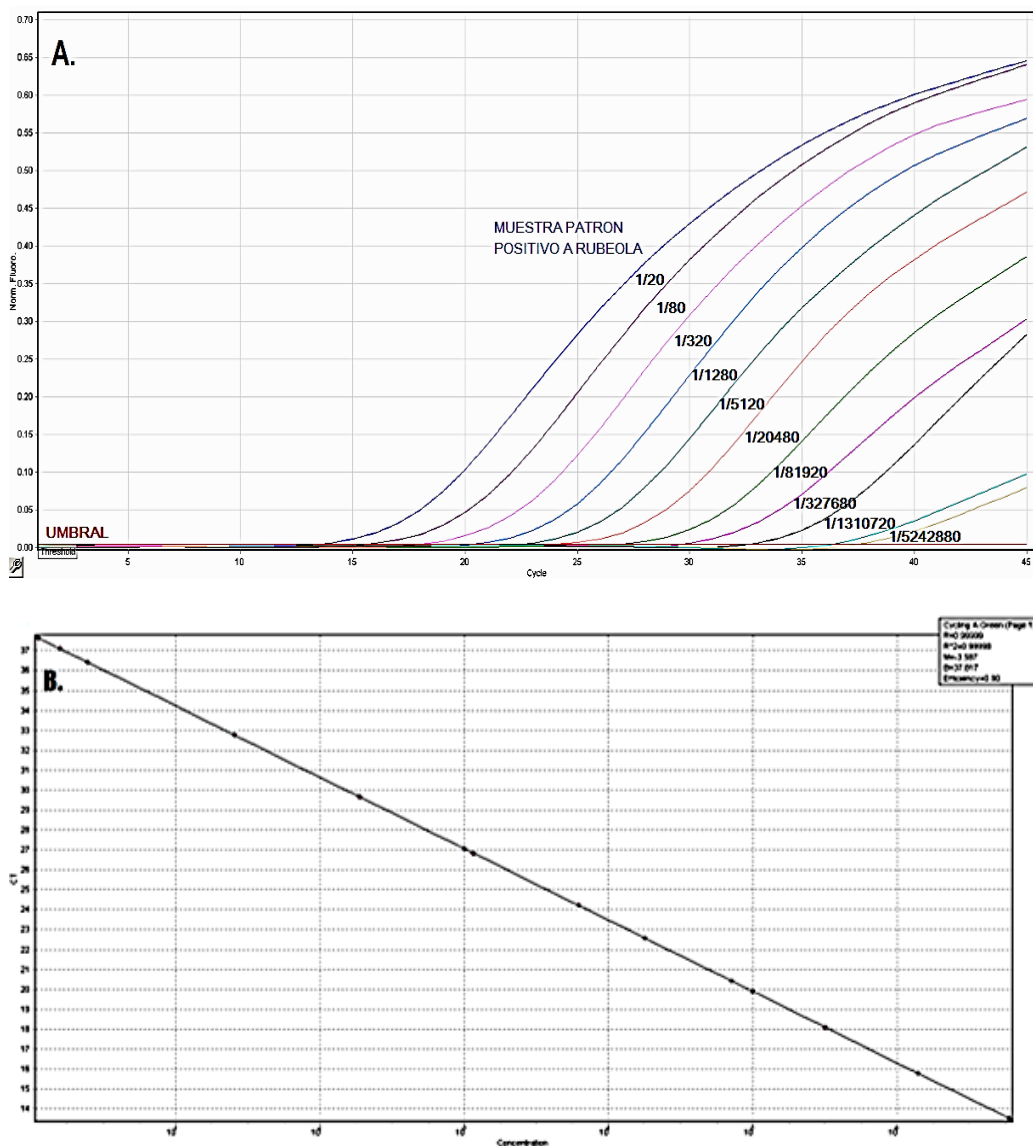
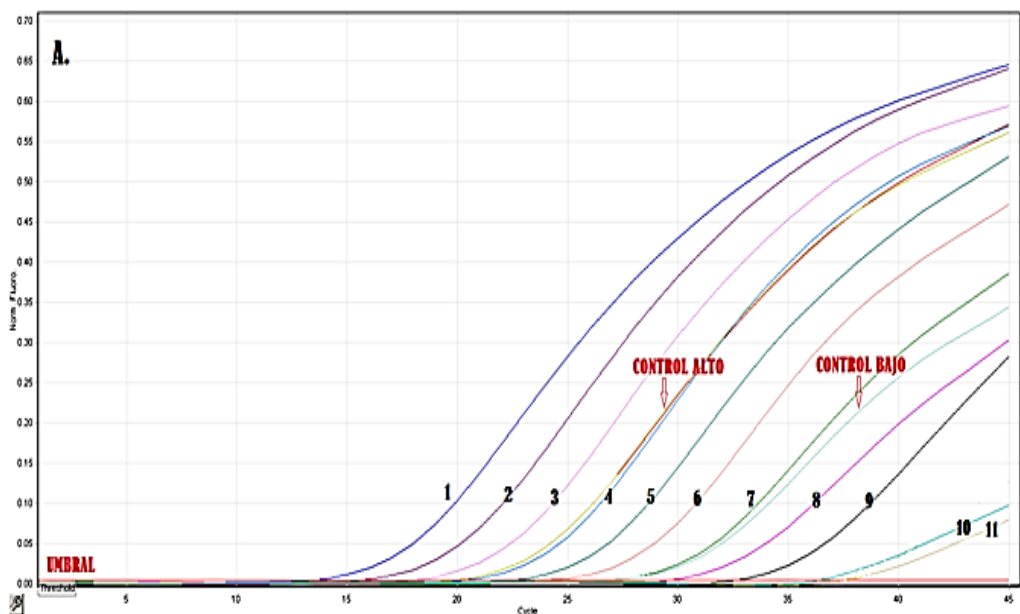


Figura 16. Curva de calibración con estándares del VR

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Curva estándar del Virus de la Rubéola (gen E1) usando las diluciones seriadas: $45,76 - 4,47 \times 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$. A. Figura del logaritmo de la concentración v/s número de ciclo umbral, en el cual la curva de fluorescencia entra en fase exponencial. B. Curva estándar, se observa una línea recta con Pendiente = $-3,587$, coeficiente de correlación (r^2) = $0,9999$ con una eficacia del 90%.



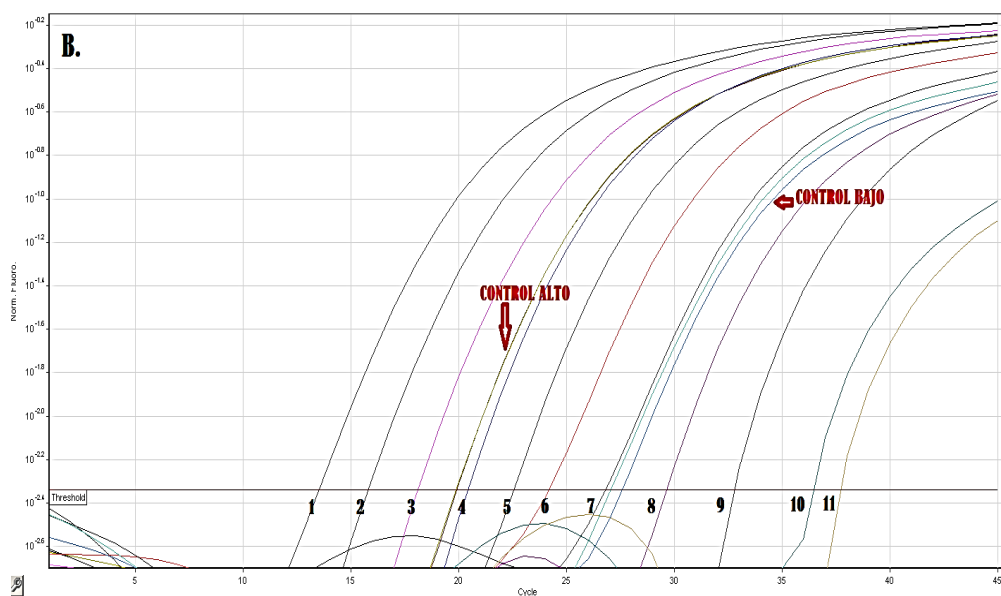


Figura 17: Curva de amplificación del VR en copias/ μ l

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Curva de amplificación, donde se grafica en el eje de las ordenadas el aumento de fluorescencia producido durante el transcurso de la reacción y en el eje de las abscisas, cada ciclo de la PCR, la línea horizontal de rojo está indicando dicho valor umbral de fluorescencia a partir de la cual se define los CT, siendo este umbral fijado en la fase exponencial de la reacción. A. Figura de la escala linear. B. Figura de la escala logarítmica. En ambos casos se

observa el aumento de forma ascendente de los Ct para las diluciones del control positivo (1-11), en comparación con los controles altos (10^{-5} copias/ μ l) y bajos (10^{-3} copias/ μ l).

3.5 Capacidad diagnóstica para la detección del virus de rubeola

Para el diagnóstico molecular por PCR se tomó como referencia el ensayo de anticuerpos monoclonales. Obteniendo como resultados para el PCR convencional un 98 % sensibilidad, 100 % especificidad, 100 % VPP y 98 % VPN; para el caso del PCR en tiempo real se obtuvo una sensibilidad del 98,6 %, una especificidad del 100 %, un VPP de 100 % y un VPN de 98,6 %; éstos datos se obtuvieron a partir de la tabla 14 y 15 respectivamente.

Tabla 14.- Capacidad diagnóstica mediante una tabla de 2 x 2 que asocia el estado del patrón referencial con los resultados de la prueba de PCR convencional.

		Patrones referenciales		Total
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	147	0	147
	Negativo	3	150	153
Total		150	150	300

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15.- Capacidad diagnóstica mediante una tabla de 2 x 2 que asocia el estado del Patrón referencial con los resultados de la prueba de PCR en tiempo real.

		Patrones referenciales		Total
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	148	0	148
	Negativo	2	150	152
Total		150	150	300

Fuente: Elaboración propia.

3.6 Comparación entre PCR en tiempo real y PCR convencional

El coeficiente de correlación kappa fue de 0,967, lo que indica una concordancia es muy buena entre las dos pruebas.

Tabla 16. Tabla de contingencia PCR convencional PCR en tiempo real

		PCR en tiempo real		Total
		Positivo	Negativo	
PCR convencional	Positivo	150	3	153
	Negativo	2	145	147
Total		152	148	300

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 17. Medidas simétricas-INDICE KAPPA de la tabla de contingencia entre las pruebas de PCR convencional y PCR en tiempo real

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada	Sig. Exacta
Medida de acuerdo	Kappa	0,967	0,015	16,743	0,000	0,000
	N de casos válidos	300				

- a. Asumiendo la hipótesis alternativa.
- b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Fuente: Elaboración propia.

IV. DISCUSIÓN

Las pruebas de laboratorio relativas a las enfermedades dependen básicamente de la calidad y de la idoneidad de las muestras que se obtienen para los análisis, así como para la futura investigación y desarrollo, para llevar a cabo estudios retrospectivos e investigaciones epidemiológicas y para contar con material de referencia esencial para fines de estandarización y validación de pruebas (OIE, 2013); el presente trabajo que se basa en un estudio retrospectivo contó con las muestras óptimas y necesarias para llevar a cabo el estudio; siendo estas crioconservadas en el Laboratorio de Sarampión y Rubéola-INS durante los años 2008-2013 cumpliendo con los criterios desde la toma de muestra, transporte (reglamento internacional, guía de la OMS relativa al “Transporte de Sustancias Infecciosas”) hasta el procesamiento (OIE, 2013) y almacenamiento respectivo dentro de la institución; tal como se indica en el “Protocolo de vigilancia basada en laboratorio de Sarampión y Rubéola” (MINSA/INS, 2007).

La rubéola por su condición de vigilancia a nivel mundial y estar inmerso en el proceso de erradicación. Hace consecuente un desarrollo de técnicas más específicas, sensibles, rápidas y confiables a un resultado certero y oportuno. Por otro lado, aunque en la literatura existen algunas publicaciones sobre la detección del genoma del virus de la rubéola, en el Perú esta técnica se está implementando con fines de cumplir los objetivos de la RM N°800-2012., por lo que en este estudio se planteó el objetivo de estandarizar la RT-PCR convencional como RT-PCR en tiempo real, por ser una prueba más sensible. Asimismo, ambas podrían ser utilizadas para el diagnóstico molecular.

Para minimizar o evitar incertidumbres en torno a la seguridad y fiabilidad de la PCR en el diagnóstico, se tomó precauciones especiales, con el fin de evitar resultados positivos falsos o negativos falsos (OIE, 2006), utilizando controles internos. Para tal fin se procedió a la amplificación del virus en Células Vero, mediante la inoculación de muestras controles (vacunas combina: Wistar RA 27/3 y Edmoston-Zagreb; muestras positivas a rubéola y sarampión).

4.1 Aislamiento viral

La formación de efecto citopático, en el virus de la rubéola produce un efecto muy débil en las células de Vero (Grutadauria *et al.*, 1998), por lo cual es difícil de evidenciar bajo las condiciones de este ensayo; sin embargo el efecto citopático se observa en el virus del sarampión, con la formación de sincitios, tal como se observa en la Figura 10, este efecto se da como consecuencia de la fusión de células, inducida por el virus del sarampión (Nates *et al.*, 1994), observando claramente las células gigantes multinucleadas (sincitios), con gran cantidad de núcleos en el centro. Es por ello que el cultivo celular para rubéola no se puede usar como diagnóstico, en tanto el cultivo celular forma parte importante en la amplificación viral, haciendo más enfocado el trabajo a un estudio epidemiológico y de relevancia a nivel político sanitario.

4.2 Extracción de ácido ribonucleico

Actualmente los procedimientos comerciales de extracción se basan en métodos de extracción por adsorción en

fase sólida de sílica o una extracción mediante agentes caotrópicos (guanidina-tiocianato) y separación en fase acuosa mediante saturación con fenol-cloroformo (Secchi *et al.*, 2009). Para la extracción de ARN viral se utilizó la técnica de QIAamp® Viral ARN Mini Kit de QIAGEN (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EEUU), siendo unas de las ventajas del uso de este kit: todos los tampones y reactivos suministrados con el kit están garantizados para estar libre de ribonucleasa, y no requiere el uso de fenol / cloroformo, lo que conlleva a la obtención de concentraciones altas de ARN como se refleja en los resultados, además de ser un proceso de purificación sencillo y rápido (QIAGEN, 2014). Este kit se basa en el uso de minicolumna; basada en el método BOOM, desarrollado por Boom *et al.*, (1990), éste lleva a cabo la extracción con el ácido tiosanato de guanidina, separando los ácidos nucleicos con base en su alta afinidad para enlazarse en matrices de sílica en vez de utilizar fenol. Este método fue escogido debido a las ventajas y estudios de comparación en extracción de ARN con otros reactivos y métodos de extracción convencionales como el uso de fenol-cloroformo obteniendo una mayor concentración de ARN a partir del cultivo de células Vero infectadas con el virus de rubéola mediante la extracción por

QIAamp® Viral ARN tal como se evidencia en el estudio por Venegas *et al.*, (2008). Las concentraciones obtenidas en diferentes pasajes de células mostradas en la tabla 9 muestra una mayor concentración de ARN a partir del cultivo de células Vero infectadas con el virus de rubéola en el tercer pase; sin embargo la concentración es similar a la obtenida en el segundo pase. Esto se puede deber a que se esté en una etapa de máxima producción de virus; por lo que, la concentración de virus producida se mantiene sin cambio (Condit, 2001). En el 1º pase, es posible que no todas las células sean infectadas por el virus debido a que la cantidad de virus inoculado no es suficiente, sino hasta el día 7 de exposición. En el caso del 2º y 3º pase, la cantidad de virus con la que se infectan a las células es mayor; originando que la mayoría o todas las células en el cultivo sean infectadas y que después de un determinado tiempo, la infección entre en fase de crecimiento rápido seguido de una meseta (Venegas *et al.*, 2008).

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Se realizó la reacción de RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real con un sistema de 3 cebadores: RV11, RV12 y RV12-2 (referidos por la CDC) para la detección del VR. Estos cebadores fueron desarrollados en base a un segmento de VR, en gen E1 (Ver anexo 8.6). Estos permitieron la amplificación de un producto específico de 185 pares de base, visualizado en gel de agarosa después de una electroforesis y valores del ciclo de umbral (CT). En el presente trabajo se optó por utilizar éstos cebadores para la detección del VR, debido a que son aplicables a esta técnica, porque genera la amplificación de un segmento específico y no mayor de 400pb como es requerido para un PCR en tiempo real (Bustin, 2000).

a) Detección del gen E1 mediante PCR convencional

Para la amplificación por PCR, se necesita un ADN diana de doble cadena, pero ésta no está disponible en los virus de ARN. Para este caso se realizó un paso previo antes de comenzar la PCR; mediante la utilización de la transcriptasa inversa, es posible transcribir el ARN a ADN complementario (ADNc), y poder utilizarse en ensayos de PCR (transcriptasa inversa (RT-PCR)), (OIE, 2008). En los protocolos de PCR empleados, se realizó un calentamiento de 50 °C por 30 minutos para realizar la transcripción inversa y otro calentamiento de 95 °C por 2 minutos para la activación de la Taq polimerasa (parámetros de la enzima SuperScript® III Platinum® One Step qRT-PCR system). Estos dos puntos permiten prevenir la reamplificación de los productos de ARN presentes después del primer paso (RT), e inhibir la actividad de la polimerasa a temperatura ambiente (Chou *et al.*, 1992), dando productos más específicos y con menor riesgo de producción de inespecificidades.

Los resultados de la estandarización de la RT-PCR convencional siguiendo el protocolo 1 (parámetros para RT-PCR de Qiagen) para la detección del ARN viral del VR, indican que el protocolo a seguir es eficiente. El empleo de los cebadores (RV11, RV12, RV12-2) permitieron amplificar las cadenas de ARN presentes en las muestras tal como se muestra en las bandas de electroforesis (Figura 11). El uso del reactivo “SuperScript® III Platinum® One Step qRT-PCR system” permitió realizar los ensayos con mayor eficacia, evitando así una mayor manipulación y posible contaminación del PCR.

b) Especificidad de la detección del gen E1 por RT- PCR convencional

El valor de una prueba diagnóstica, es decir su confiabilidad para distinguir un sujeto enfermo de otro no enfermo, se basa en dos categorías: la especificidad y la sensibilidad (Toman, 1981). En la PCR convencional, se utiliza unos cebadores para amplificar una pequeña parte del

genoma de entre 100 y 1000 copias del genoma detectable (OIE, 2008).

Para establecer la especificidad y determinar la capacidad que tiene el método de hacer un diagnóstico correcto de ausencia de la enfermedad de las muestras de orina e hisopado nasofaríngeo de pacientes con enfermedad exantemática bajo sospecha clínica de rubéola; para éste caso el protocolo a utilizar reveló que el RT-PCR convencional tiene una especificidad del 100 % revelado en gel de agarosa al 2 %.

Para la determinación de la especificidad se usaron muestras positivas a diferentes etiologías así como los respectivos controles positivos y negativos contra los cebadores de rubéola, sarampión y la ribonucleasa humana. Como se aprecia en la Figura 12, donde se observa bandas producto de la amplificación de 185 pb para los controles y muestras positivas a rubéola enfrentados con los cebadores del VR, además se observa la amplificación de 400 pb para los controles positivos a sarampión con su respectivos

cebadores, no se visualizan bandas de amplificación con respecto a las otras etiologías para los cebadores de rubéola y sarampión.

c) Sensibilidad de la detección del gen E1 por RT-PCR convencional

La sensibilidad de la RT-PCR convencional determinó que el fragmento de interés de 185 pb detecta hasta una dilución de 1/5120 en un gel de agarosa al 2 % revelado con bromuro de etidio a partir del ARN obtenido por transcripción inversa (Figura 13), la cual corresponde al carril 6 con una concentración de ARN de $4,47 \times 10^{-2}$ ng/ μ L como límite de detección.

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Los resultados de PCR en tiempo real se basan en la lectura de la emisión de la fluorescencia a lo largo de la reacción (Fletcher, 2002). La temperatura de extensión de 72 °C (por 60 segundos) presente en los ciclos en el protocolo 1, que

normalmente es usada para la extensión y actividad de una polimerasa convencional, permite la generación productos inespecíficos ya que la polimerasa modificada prolongará su acción. La tasa de extensión de *Taq* polimerasa es entre 30 y 70 bases/segundo (Jeffreys *et al.* 1988; Bustin, 2000), lo que significa que el tiempo de polimerización debe ser corto para que la amplificación de contaminantes de ADN sea menos probable (Bustin, 2000). Al requerir de la amplificación de un producto de 185 pb y utilizando una polimerasa de actividad en un amplio rango de temperatura, es posible la amplificación a partir de la temperatura de hibridación y el tiempo establecido permite la hibridación y extensión a la vez, dando lugar a la generación del producto específico reduciendo el riesgo de formarse productos no deseados. De esta manera, el paso de extensión a 72 °C en los ciclos puede omitirse (Castro *et al.*, 2010).

a) Detección del gen E1 de VR mediante RT-PCR en tiempo real ARN

En la estandarización, al utilizar los cebadores (RV11, RV12, RV12-2) y la enzima “SuperScript® III Platinum® One

Step qRT-PCR system”, se observó en las curvas de amplificación la generación de productos específicos con el control positivo VR, la vacuna y las muestras positivas analizadas (148/150), oscilando entre una concentración de 40,05 ng/ul y $3,57 \times 10^{-2}$ ng/ul a diferencia del resto de controles negativos, en donde, no hubo la generación de productos específicos (Figura 14).

b) Especificidad de la detección del gen E1 por RT-PCR en tiempo real

La especificidad se basa en la temperatura de hibridación de los cebadores, siendo esta calculada por la fórmula $T_H = [2(A+T)+4(G+C)]-5$ (Entrala, 2000), obteniendo así una T_H de 60 °C para los cebadores del VR. Dicha temperatura de hibridación se basa en la unión complementaria de ácidos nucleicos partiendo de una sonda complementaria a ella, obteniendo de esta manera resultados específicos.

Con los resultados obtenidos de Ct se puede observar que los cebadores RV11, RV12 y RV12-2 permiten detectar la presencia del VR mediante la técnica RT-PCR en tiempo real, diferenciándolo incluso de cepas virales relacionadas como el virus del sarampión que contiene genoma ARN. La especificidad de la prueba se determinó utilizando muestras positivas a diferentes etiologías (VHS-1, VHS-2, PVB19, y *Mycoplasma*) determinando así el 100 % para la especificidad de los cebadores del VR no observándose amplificación, lo cual puede observarse en la Figura 15.

c) Sensibilidad de la detección del gen E1 por RT-PCR en tiempo real

La sensibilidad de la prueba se determinó en 98,6 % (148/150), con un límite de detección correspondiente a un valor de Ct=37, a una concentración de hasta $4,36 \times 10^{-5}$ ng/ μ l de ARN (Figura 16.a). Comparada con otros trabajos en donde utilizan RT-PCR para el diagnóstico de rubéola, como la realizada en el trabajo de Venegas, *et. al.*, (2008), donde se detectan ADN a partir de una concentración de ARN de

1.584×10^{-6} ng/ μ l aunque el límite de detección es alto a comparación del encontrado en el trabajo, esto se podría deber al empleo de cebadores diferentes como R2 y R7 del estudio de Venegas, *et. al.*, (2008); el trabajo de Eggerding y colaboradores (1991) donde la concentración mínima de ARN detectable es de 5×10^{-5} ng/ μ l, y para incrementar la sensibilidad de su técnica, utilizan cebadores internos para realizar un RT-PCR anidado, donde, se detectan concentraciones de hasta 5 fg, por lo que se hace más sensible el método; de acuerdo a éste resultado se recomendaría el uso de cebadores internos para mejorar el límite de detección. Con la interpretación de los resultados, no existe la necesidad de la realización de procesos posteriores a la prueba de PCR para demostrar la presencia de ARN viral en las muestras, por lo que no es necesaria la realización de una electroforesis.

Se obtuvo además una curva de calibración a partir de las diluciones serias con una eficiencia de la prueba del 90% y un coeficiente de correlación (r^2) de 0,9999 (Figura 16.b)

Además de la cuantificación del ARN viral se comparó este resultado con las copias/ul (Figura 17) utilizando los controles altos y bajos referidos por el centro colaborador de la OMS el laboratorio de referencia de Sarampión y Rubeola del CDC, para las mismas diluciones encontrando que mi límite de detección para un RT-PCR en tiempo real para la detección del VR es de 1,1 copias/ul equivalente a una concentración de $4,36 \times 10^{-5}$ ng/ul de ARN (tabla 13).

4.5 Capacidad diagnóstica para la detección del virus de rubeola

La prueba obtuvo valores para el PCR convencional un 98 % sensibilidad, 100 % especificidad, 100 % VPP y 98 % VPN; para el caso del PCR en tiempo real se obtuvo una sensibilidad del 98,6 %, una especificidad del 100 %, un VPP de 100 % y un VPN de 98,6 % (Tabla 14 y 15).

El valor predictivo positivo refleja la probabilidad de encontrar enfermedad al existir un resultado positivo (Fletcher *et al.*, 1998), por lo tanto, un resultado positivo mediante la prueba

de RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real utilizando los cebadores RV11, RV12 y RV12-2 refleja la presencia de la enfermedad. El valor predictivo negativo indica la ausencia de falsos negativos en los resultados del muestreo, es decir, la ausencia de enfermedad ante un resultado negativo (Fletcher *et al.*, 1998), por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio reflejan la seguridad de que todas las muestras son verdaderamente negativas para el PCR convencional en 147/150 y para el PCR en tiempo real de 148/150.

Para éste propósito sería importante distinguir los cuadros clínicos causados por el virus de la rubéola de los ocasionados por el virus del sarampión y de otros virus que tienen síntomas parecidos, aunque existen problemas con la información clínica del diagnóstico de rubéola, ya que hay individuos que son asintomáticos o tienen síntomas leves o parecidos a otras enfermedades (Mori *et al.*, 2006). La enfermedad no se diferencia del sarampión salvo que es más leve, su duración es menor y tiene menos complicaciones (Bellini e Icenogle, 2003).

4.6 Comparación entre PCR en tiempo real y PCR convencional

Al comparar los resultados de la estandarización del RT-PCR convencional y en tiempo real, tienen una concordancia de 0,967; siendo ésta muy buena tomando como referencia la tabla 11; debido a los resultados obtenidos, producto de aislamiento viral; aunque existe una buena relación entre ambos ensayos; el uso del protocolo 2 es el más eficiente debido a su límite de detección amplificando el producto esperado, ya que las modificaciones propias de la polimerasa utilizada permiten que actúe eficientemente a la temperatura de hibridación de los cebadores con el ADNc viral. En el anexo 8.5 se hace una comparación de resultados promedios obtenidos durante la estandarización de la RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real, como ya se mencionó, mientras que la RT-PCR convencional se detecta el genoma del virus de la rubéola en la dilución 1/5120 en la RT-PCR en tiempo real existió amplificación en las diluciones 1/5242880, aunque ésta fue débil, según podemos ver en la Figura 16.a

De las muestras de orina, hisopado nasofaríngeo provenientes de la vigilancia de los años 2008-2013 analizadas por RT-PCR, se detectaron 150 positivos a rubéola, y 150 muestras negativas. El diagnóstico realizado por la técnica de anticuerpos monoclonales (IFD) usados como prueba de oro, reporta casi los mismos resultados al realizar las pruebas de RT-PCR.

Una desventaja de este tipo de técnica y otros que requieren cultivos celulares, fue la necesidad de obtener un abasto con virus infectivo a partir de las muestras de los pacientes para poder detectarlo (Venegas, 2008); sin embargo al ser un trabajo de tipo epidemiológico e importante en cuestiones políticas sanitarias, es necesario la obtención de una concentración alta de virus para poder obtener resultados confiables y certeros en pruebas de PCR, para el descarte o posible observación del caso.

Una ventaja de la RT-PCR es que existe la posibilidad de hacer un diagnóstico temprano del virus de rubéola en sangre de feto, debido a que la IgM no se produce totalmente sino hasta la

semana 20-21 del embarazo (Tanemura *et al.*, 1996). En la práctica clínica la incorporación de procedimientos diagnósticos, es frecuente, sin que se abandonen los métodos en uso. La simultaneidad de exámenes para la misma finalidad, habitualmente arroja resultados confusos o contradictorios (Fescina *et al.*, 1985); por lo que es importante evaluar diferentes marcadores diagnósticos de infección para el virus de la rubéola (Mosquera *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007).

Las técnicas de RT-PCR, para la detección del virus han demostrado ser una técnica rápida que detecta el virus con precisión y en bajos títulos (Bowers *et al.*, 2008), logrando una sensibilidad de hasta 100 %, lo que la hace una técnica comparable al cultivo celular, aunque para el caso de rubéola el cultivo no sea evidente, es posible que influya la concentración de la carga viral. Sin embargo, la prueba de ELISA seguirá siendo parte importante en el diagnóstico clínico de vigilancia del virus de rubéola.

El presente estudio busca adaptar la técnica de RT-PCR convencional y en tiempo real para el diagnóstico de VR en

nuestro medio; esta prueba ha demostrado ser altamente específica, sensible, fácil de reproducir y rápida en la detección del virus, requiriendo de al menos un día para su realización.

Desde hace ya unos años se viene constatando las ventajas RT-PCR en tiempo real, y su uso está siendo cada vez más extendido (Mackay y Landt, 2007; Lutfalla y Uze, 2006). Ha conseguido mayor aceptación que la convencional porque además de ser más rápida y sensible minimiza el riesgo de contaminación cuando se realiza la RT-PCR en un solo paso (Battaglia M *et al*, 1998), además de la cuantificación.

V. CONCLUSIONES

- 5.1 Se logró estandarizar los protocolos de detección del virus de rubéola mediante la amplificación de secuencias específicas del gen E1 de 185 pb mediante PCR convencional y PCR en tiempo real, cuyas condiciones de reacción y del programa de amplificación son especificadas en la sección 2.3.3 y 2.3.4.
- 5.2 Se logró determinar el límite de detección para ambas pruebas utilizando el mismo control positivo de rubéola; determinando para la PCR convencional un límite de detección de hasta $4,47 \times 10^{-2}$ ng/ μ l de ARN observado en el gel de agarosa y un límite de detección alcanzado usando el PCR en tiempo real de $4,36 \times 10^{-5}$ ng/ μ l de ARN equivalente a 1,1 copias/ μ l, con una buena correlación entre los valores de Ct y el logaritmo de la concentración ($r^2=0,9999$) con una eficacia del 90%.
- 5.3 Los resultados obtenidos de las muestras de hisopado nasofaríngeo y orina provenientes de aislamiento viral indican que no en todos los casos de rubéola es posible la detección del virus

utilizando ambas pruebas. Teniendo así la capacidad diagnóstica para el PCR convencional de: 98 % sensibilidad, 100 % especificidad, 100 % VPP y 98 % VPN; y para el PCR en tiempo real se obtuvo una sensibilidad del 98,6%, una especificidad del 100 %, un VPP de 100 % y un VPN de 98,6 %.

5.4 Se logró evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos por PCR convencional y PCR en tiempo real determinando el Índice Kappa de 0,967 encontrando así que ambas pruebas se encuentran en una muy buena relación. Aunque el índice de concordancia es alto entre ambas pruebas una perspectiva de este trabajo sería la de trabajar con un PCR en tiempo real debido a su alto límite de detección y sus valores de capacidad diagnóstica a diferencia del PCR convencional.

VI. RECOMENDACIONES

- a. Antes de comenzar con el trabajo es necesario contar con equipos certificados y calibrados para minimizar el error de pipeteo o contaminación de las muestras. Para evitar ésta contaminación de las muestras es necesario contar con áreas particulares para el manejo de reactivos (ANEXO 8.2), En cada una de las etapas es ideal utilizar juegos de pipetas diferentes, con puntas de pipeta con filtro en la preparación de las mezclas de reactivos a utilizar en la amplificación, y el uso de guantes sin polvo. Las muestras y los reactivos se deben manejarse en cabinas de aire de flujo laminar, que se descontaminan regularmente utilizando luz UV y lejía. (OIE, 2008)

- b. Dado que las ARNasas no van a ser inactivadas en su totalidad en la autoclave, resulta esencial trabajar con material estéril y de preferencia de un solo uso. El material de plástico deberá limpiarse con etanol absoluto y meterse a la autoclave durante 45 minutos. Es importante que los reactivos que se utilicen en la extracción de ARN se mantengan en alícuotas con los volúmenes mínimos necesarios para cada etapa del proceso.

- c. Se deben tomar precauciones para evitar la introducción de material amplificado procedente de laboratorios potencialmente contaminados dentro de las áreas “limpias” del laboratorio mediante las restricciones en los movimientos de las muestras, los documentos, el equipo, las personas o cualquier otra forma de contaminación potencial.
- d. Una vez colectado el material es necesario trabajar en cadena de frío o agregarle alguna solución que estabilice al ARN lo antes posible, ya que los cambios en el patrón de expresión de los genes debido a la degradación del ARN o a inducciones en la transcripción ocurren inmediatamente. Debido a su estructura química el ARN es una molécula muy frágil que puede romperse por acción de los grupos 2'-OH (altamente reactivos) adyacentes al esqueleto de ribosa-fosfato. Existen paquetes comerciales para estabilización de muestras de ARN de compañías como QIAGEN, Ambion y RNA-works, que en general funcionan con una mezcla de anticuerpos específicos para ribonucleasas, inhibidores de ribonucleasas y/o contienen compuestos que neutralizan a los grupos 2'-OH (como es el caso de RNA-works).

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliverti, V. (2012). Desarrollo y validación intra-laboratorio de una metodología para la detección de Salmonella. Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de Magíster en Tecnología e Higiene de los Alimentos. Universidad Nacional de la Plata-Facultad de Ciencias Veterinarias. 107 pp.

Altman, D. (1991). Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall.

Battaglia, M., Pedrazzoli, P., Palermo, B., Lanza, A., Bertolini F., Robustellidella, G. (1998) Epithelial tumor cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR: a new sensitive one step method without false positive results. Bone Marrow Transplant. Oct; 22(7):693-8.

Bellini, W.J. & Icenogle, J.P. (2003) Measles and rubella viruses. In: Murray, P.P., Barron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. & R.H.

Yolken (Ed). Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. ASM Press, Washington D.C. USA.

Best, J., Thomson, A., Rey, N., O'Shea, S., & Banatvala, J. (1992). Rubella virus strains show no major antigenic differences. *Intervirology*; 34:164–168

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M.M., Jansen, Wertheim-van Dillen, C.L.P. & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3): 495-503.

Bowers, R.M., LaPatra, S.E., Dhar AK. (2008). Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods* 147: 226-234.

Bustin SA. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169–193.

Bustin SA, Benes B, Nolan T, Pfaffl MW. (2005). Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.

Chapter 12. (2004). Rubella, in *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases “The Pink Book”*. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta. p. 145-158.

Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. (1992). Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20: 1717–1723.

Clements, C.J., (1992). The epidemiology of measles. *World Health Stat Q*, 45(2-3): p.285-91.

Condit, R.C. (2001). Principles of Virology. In: Knipe, D.M. & P.M. Howley (Ed.). *Fields Virology* 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA.

Crespo MP, (2000). El diagnóstico viral por el laboratorio. Corporación Editora Médica del Valle. Colombia Méd 31:135-150
<http://www.bioline.org.br/pdf?rc00024>

Feigin, R.D. and J.D. Cherry, (1997). Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 4 ed. R.D. Feigin, Cherry, J.D.: W.B. Saunders. 2054-2074.

Fescina, R., Simini, F. & R. Belitzky. (1985). Difusión: Evaluación de los procedimientos diagnósticos. Aspectos metodológicos. Salud Perinatal 2; 5: 39-44.

Fletcher RH, Fletcher SW, Wagne EH. (1998). Epidemiología clínica: aspectos fundamentales. 2° Ed. España: Elsevier Doyma. p 48-63.

Forster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann Phys (Leipzig) 2, 55-75.

Grutadauria, S., Córdoba, P., Cuffini, C., Zapata, M. (1998). Cell-fusion assay for the detection of rubella virus in Vero cells. Clinical and diagnostic virology, 10(1), 9-16.

Grove Deborah S. (1999). Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Core Facility Using TaqMan and the Perkin-Eelmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *Journal Biomolechular Technique* 10, 11-16.

Jeffreys A., Wilson V., Neumann R., Keyte J. (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research* 16: 10953–10971

Lakowicz, J. (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York, chapter 2.

Lee J. y Bowden D. (2000), Rubella virus replication and links to teratogenicity. *J Clin Microbiol* 33:571-584.

Lie, Y. y Petropoulos, C. (1998). Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinion Biotechnol* 9, 43-48.

Loza-Rubio E., Aguilar S., Bahloul C., Brochier B., Pastoret P., Tordo N., (1999). Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *Arch med res* 30: 144-149.

Loza-Rubio E., Rojas A., Banda R., Nadin-Davis S., Cortez G. (2005). Detection of multiple strains of rabies virus RNA using primers designed to target Mexican vampire bat variants. *Epidemiol Infect*, 133, 927-934.

Lutfalla G, Uze G, Lutfalla G, (2006). Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods Enzymol.* 410:386-400. Review.

Mackay J, Landt O, Mackay J, Landt O. (2007). Real-time PCR fluorescent chemistries. *Methods Mol Biol.* 353:237-61.

Mori N., Motegi Y., Shimamura Y., Ezaki T., Natsumeda T., Yonekawa T., Ota Y., Notomi T., y T. Nakayama. (2006). Development of a New Method for Diagnosis of Rubella Virus Infection by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Clin Microbiol*, 44: 3268-3273

Mosquera M., Sanz J., Echevarría J., Herranz N., Fernández M. y Ory F. (2006). Estudio del rendimiento diagnóstico de la detección de IgM específica y de la amplificación genómica de rubéola. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24: 251-253.

Murray, P. (1998). *Medical Microbiology*. 3 ed. Mosby-Year Book.

Nates, S., Rey, G., Giordano, M., Zapata, M., Depetris, A., Boshell, J. (1994). Modified seroneutralization assay for measles virus antibody detection. *Research in Virology*, 145, 45-49.

Panduro, A., Vera, J., Armendáriz, J. (2000). *Biología molecular en la clínica*. Ed McGraw Hill Interamericana Mexico DF.

Perú. Ministerio de Salud. (2007). *Protocolo de vigilancia basada en laboratorio de Sarampión y Rubéola*. Lima; MINSA/INS.

Perú, Ministerio de Salud. (2012). *Plan de acción para mantener la eliminación del Sarampión, la Rubéola y el Síndrome de Rubéola Congénita en el Perú 2013 – 2014*. Lima; MINSA.

Plotkin, S. (1999). Rubella, in Vaccines, S.A. Plotkin and W.A. Orenstein, (Ed). W.B.Saunders: Philadelphia. p. 409-440.

Plotkin S. & Reef S. (2004). Rubella vaccine. In: Plotkin S.A. & W.A. Orenstein (Ed.). Vaccines 4th edition. Saunders, Elsevier Inc. p 707-743.

Pinilla, B., Cubillos, K., Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). NOVA-PUBLICACIÓN CIENTIFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS. 9 de junio; 6(9):101-212.

[RM] Resolución Ministerial N°800-2012. Directiva sanitaria para la vigilancia epidemiológica de Sarampión, Rubéola y otras enfermedades febriles eruptivas. Directiva sanitaria N°49-MINSA/DGE-V-01. Disponible en:

<http://www.dge.gob.pe/normas/rm/2012/RM800-2012.pdf>

Rojas A., Loza-Rubio E., Banda R, Hernández B., (2006). Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. J Vet Diag Invest 18:98-101.

Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Ehrlich H. & Arni I. (1985). Enzymatic amplification of flglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; 230,1350-1354.

Salto, M. (2006). Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de *Babesia bigemina* en muestras sanguíneas. Tesis para obtener el grado de médico veterinario zootecnista. Veracruz. Universidad veracruzana-facultad de medicina veterinaria y zootecnia. 54pp.

Sevin, L. (2003). Sistema de PCR en Tiempo Real ABI PRISM 7000 SDS. Manual para usuarios Applied Biosystems p 4-16.

Tanemura M., Suzumori K., Yagami Y., & Katow S. (1996). Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: A study of 34 cases diagnosed in fetuses. *Am J Obstet Gynecol*, **174**:578-582.

Toman K. (1981). Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos de los tests diagnósticos. Boletín de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis **56**; 1-2: 19-30.

Valasek, M., Repa, J. (2005). The power of real-time PCR. Adv in Physiol Educ 29: 151-159.

Vinueza, B., (2009). PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. Rev elect vet. ISSN: 1695-7504. Vol.10, Nº2. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Walker, N. (2002). Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.

Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J., Nicholson, B. (1999). Multiplex Reverse Transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. J Clin Microbiol 37: 4139-4141.

Wittwer, C., Herrmann, M., Moss, A., Rasmussen, R. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 22:130–138.

[WHO] World Health Organization. (2000). Rubella Vaccines. Position paper. *Wkly Epidemiol Rec.*; 75(20): p. 161-169.

[WHO] World Health Organization. (2005). Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. 2005. 8 de abril; 80(14):125-32.

[WHO] World Health Organization. (2011). Weekly epidemiological record. 15 de Julio; 86(29):301-16.

Wolinsky, J., (1996). Rubella, in *Fields' Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Hawley. Editors. Raven Press: New York. p. 899-929.

Zhu, Z., Xu, W., Abernathy, E., Chen, M-H., Zheng Q., Wang T., Zhang Z., Li C., Wang C., He W., Shou S., & j. Icenogle. (2007). Comparison of Four Methods Using Throat Swabs To Confirm Rubella Virus Infection. *J Clin Microbiol* 45: 2847-2852.

Páginas web

Asuar, L. (2013). Guía práctica sobre la técnica de PCR. [Citado 17 de setiembre de 2013]; Recuperado a partir de:

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>

Contreras, A. (2012). Detección de bacterias en alimentos mediante técnicas macromoleculares [Internet]. Servei de Recursos Audiovisuales de Microbiología a la Xarxa. [Citado 18 de abril de 2014]. Recuperado a partir de:

<http://seramix.blogs.uv.es/author/aconga/page/2/>

Dorak, T. (2006). Real Time PCR (Advanced Methods Series). Oxford: Taylor & Francis. [Internet], [10 setiembre 2013]. Recuperado a partir de:

<http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>

Entrala, C. (2000). Técnicas de análisis del ADN en genética forense. [Internet], [10 mayo 2014]. Recuperado a partir de:

<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>

Ministerio de Salud. (2014). Boletín Epidemiológico. 9 de febrero de 2014; 23(7):129-30. Recuperado a partir de:

<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2014/07.pdf>

[OIE] Organización Mundial de la Sanidad animal. (2006).

Principios de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas [Internet]. [Citado 19 de abril de 2014].

Recuperado a partir de:

[http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.2 Principios de validacion.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.2_Principios_de_vali_dacion.pdf)

[OIE] Organización Mundial de la Sanidad animal. (2008).

Validación y control de calidad de los métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas [Internet]. [Citado 19 de abril de 2014].

Recuperado a partir de:

http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.05.%20Validadci%C3%B3n%20y%20control%20de%20calidad.pdf

[OIE] Organización Mundial de la Sanidad animal. (2012). Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias [Internet]. 2012 [citado 19 de abril de 2014]. Recuperado a partir de:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.04_Gesti%C3%B3n_calidad.pdf

[OIE] Organización Mundial de la Sanidad animal. (2013). Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico. [Internet]. [Citado 19 de abril de 2014]. Recuperado a partir de:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.01_COLLECTION_DIAG_SPECIMENS.pdf

[OMS] Organización Mundial de la Salud. (2006). Manual de la OMS para los procedimientos diagnósticos de laboratorio para infecciones por los virus del sarampión y de la rubéola. [Internet]. [Citado 13 de Enero de 2014]. Recuperado a partir de:

http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_meas_rub_sp.pdf

[OMS] Organización Mundial de la Salud. (2013) Rubéola [Internet]. [Citado 17 de setiembre de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs367/es/>

[OPS] Organización Panamericana de la Salud. (2009). DT. Plan de acción para mantener la Eliminación del Sarampión, la Rubéola y el Síndrome de Rubéola Congénita en la región de las Américas. 2009. Recuperado a partir de: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/sct/048018.pdf>

[OPS] Organización Panamericana de la Salud. (2012). Plan de acción para mantener la eliminación de sarampión, la rubéola y el síndrome de rubéola congénita en la región de las américas. Washington, D.C.; [citado 18 de enero de 2014]. p. 1-6. Recuperado a partir de: <http://www.paho.org/arg/images/Gallery/CSP28-16-s1.pdf>

QIAGEN. (2014). QIAamp Viral RNA Mini Kit [Internet]. Sample & Assay Technologies. [Citado 22 de abril de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/viral-rna/qiaamp-viral-rna-mini-kit>

Secchi, S., Serrano, A., García, P., Gutiérrez, S., Arís, A. (2009) Comparación de cuatro kits comerciales de extracción de ARN bacteriano a partir de muestras de leche. XXXIX Jornadas de Estudio: XIII Jornadas sobre producción animal, Zaragoza, 12 y 13 de Mayo de 2009 [Internet]. Barcelona, España. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario; 2009 [citado 22 de abril de 2014]. p. 66-8. Recuperado a partir de:
<http://acteon.webs.upv.es/congresos/aida%202009/secchi%20%20et%20al..pdf>

Venegas, A., Butista, N., Ribas, R. (2008). Estandarización de la RT-PCR para el diagnóstico de la rubéola en México [Internet]. México D.F. Recuperado a partir de:
http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/chiapas/cd/Biomedicina_y_salud%5CExtensos%5C1524696.pdf

Weighardt F. (2014). PCR Cuantitativa para la Detección de OGM [Internet]. [Citado 18 de abril de 2014]. Recuperado a partir de:
<http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n10.pdf>

VIII ANEXOS

8.1 Protocolo de extracción

El ARN viral se extrajo manualmente usando el sistema RNeasy **Mini Qiagen QIAamp Viral** (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EEUU), basado en la extracción mediante el uso de minicolumnas; siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de soluciones amortiguadoras con el estuche:

- Ponga 310 µl de solución amortiguadora AVL en el tubo que contiene el ARN transportador liofilizado. Mezcle bien en la agitadora vorticial.
- Divida la solución de ARN transportador en alícuotas y guárdelas a -20 °C. no las congele y descongele más de tres veces.

- Mezcle la solución amortiguadora AVL y la solución de ARN transportador a razón de 100 partes de AVL por 1 parte de ARN transportador; por ejemplo, para 10 muestras, mezcle 5,6 ml de AVL con 56 μ l de ARN transportador.

- Añada 25 ml de solución de 95 % a 100 % de etanol a la solución amortiguadora AW1 (siguiendo las indicaciones del frasco).

- Añada 30 ml de solución de 95 a 100 % de etanol a la solución amortiguadora AW2 (siguiendo las indicaciones del frasco).

- Caliente la solución amortiguadora AVE en baño maría a 37°C, entre 5 y 10 minutos, hasta que se disuelvan todos los cristales.

- Añada ARN transportador hasta obtener la cantidad necesaria de solución amortiguadora AVL.

- Añada 560 μ l de solución amortiguadora AVL a un tubo de 1.5 ml limpio y estéril.

- Añada 140 μ l de muestra (si está usando muestras clínicas o lisados de células) al tubo indicado en el paso 3, mezcle con pulsos vorticiales durante 15 segundos e incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Añada 560 μ l de solución de 95 a 100 % de etanol a cada tubo y mezcle con pulsos vorticiales durante 15 segundos. Centrifugue el tubo brevemente en una microcentrífuga a fin de recoger las gotas de la parte de adentro de la tapa.

- Para cada muestra, rotule una microcolumna de centrifugado y colóquela en un tubo colector de 2 ml (ambos vienen en el estuche). Añada 630 μ l de la mezcla a la columna y centrifugue durante 1 minuto a 8000 rpm.

- Vacíe el tubo colector y repita el paso 5 una vez.

- Saque la columna del tubo colector y póngala en un tubo colector limpio. Añada 500 μ l de solución amortiguadora AW1. Centrifugue durante 1 minuto a 8000 rpm.

- Saque la columna del tubo colector y póngala en un tubo colector limpio. Añada 500 µl de solución amortiguadora AW2. Centrifugar durante 3 minutos a 14000 rpm.

- Saque la columna del tubo colector y póngala en un tubo de 1,5 ml estéril rotulado.

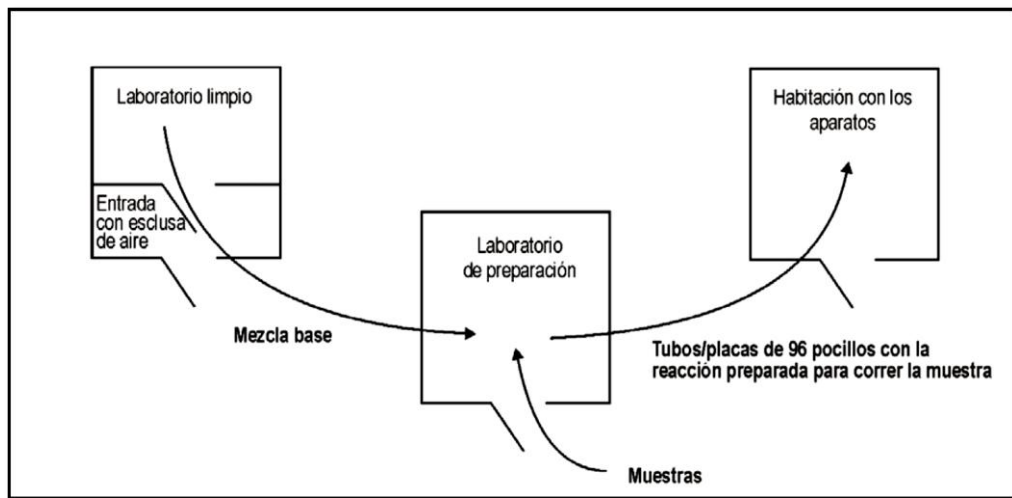
- Añada 60 µl de solución amortiguadora AVE, que viene en el estuche (se puede usar agua destilada), espere 1 minuto y centrifugue durante 1 minuto a 8000 rpm.

- Saque la columna y deséchela; ponga el tubo de 1,5 ml que contiene ARN sobre hielo para usar de inmediato o guárdelo en el congelador a -20 ó -70 °C para usar más adelante.

Tabla de preparación de buffer lisis AVL

N° de Muestras	Buffer AVL (ml)	Carrier ARN y AVE (µl)
1	0,56	5,6
2	1,12	11,2
3	1,68	16,8
4	2,24	22,4
5	2,8	28,0
6	3,36	33,6
7	3,92	39,2
8	4,48	44,8
9	5,04	50,4
10	5,6	56,0
.	.	.
.	.	.
.	.	.
N	n(0,56)	n(5,6)

8.2 Esquema de trabajo propuesto por OIE (2008)



Preparación del laboratorio recomendada para la PCR de diagnóstico en tiempo real.

8.3 Flujo de trabajo



8.4 Especificidad de cebadores del VR (PCR en tiempo real)

CONTROLES	RUBEÓLA	SARAMPIÓN	RNAsa-P	RESULTADO
NTC	0			NEGATIVO
		0		
			0	
CONTROL DE EXTRACCION	0			NEGATIVO
		0		
			23,84	
VHS-1 (A)	0			NEGATIVO
		0		
			27,64	
VHS-1 (B)	0			NEGATIVO
		0		
			26,13	
VHS-1 (C)	0			NEGATIVO
		0		
			29,72	
VHS-2	0			NEGATIVO
		0		
			28,91	
PV-B19	0			NEGATIVO
		0		
			28,96	
MYCOPLASMA 1	0			NEGATIVO
		0		
			31,39	
MYCOPLASMA 2	0			NEGATIVO
		0		
			30,38	
CONTROL POSITIVO SARAMPION	0			POSITIVO
		25,88		
			29,98	
VACUNA	20,39			POSITIVO
		13,6		
			30,7	
CONTROL POSITIVO RUBEOLA	15,9			POSITIVO
		0		
			30,86	

Fuente: Elaboración propia

8.5 Tabla de resultados del PCR convencional y PCR en tiempo real con la prueba referencial (IFD)

N°	PRUEBA PATRON	PCR convencional	PCR en tiempo real	N°	PRUEBA PATRON	PCR convencional	PCR en tiempo real
1	HP-001	POSITIVO	POSITIVO	1	HN-001	NEGATIVO	NEGATIVO
2	HP-002	POSITIVO	POSITIVO	2	HN-002	NEGATIVO	NEGATIVO
3	HP-003	POSITIVO	POSITIVO	3	HN-003	NEGATIVO	NEGATIVO
4	HP-004	POSITIVO	POSITIVO	4	HN-004	NEGATIVO	NEGATIVO
5	HP-005	POSITIVO	POSITIVO	5	HN-005	NEGATIVO	NEGATIVO
6	HP-006	POSITIVO	POSITIVO	6	HN-006	NEGATIVO	NEGATIVO
7	HP-007	POSITIVO	POSITIVO	7	HN-007	NEGATIVO	NEGATIVO
8	HP-008	POSITIVO	NEGATIVO	8	HN-008	NEGATIVO	NEGATIVO
9	HP-009	POSITIVO	POSITIVO	9	HN-009	NEGATIVO	NEGATIVO
10	HP-010	POSITIVO	POSITIVO	10	HN-010	NEGATIVO	NEGATIVO
11	HP-011	POSITIVO	POSITIVO	11	HN-011	NEGATIVO	NEGATIVO
12	HP-012	POSITIVO	POSITIVO	12	HN-012	NEGATIVO	NEGATIVO
13	HP-013	POSITIVO	POSITIVO	13	HN-013	NEGATIVO	NEGATIVO
14	HP-014	POSITIVO	POSITIVO	14	HN-014	NEGATIVO	NEGATIVO
15	HP-015	POSITIVO	POSITIVO	15	HN-015	NEGATIVO	NEGATIVO
16	HP-016	POSITIVO	POSITIVO	16	HN-016	NEGATIVO	NEGATIVO
17	HP-017	POSITIVO	POSITIVO	17	HN-017	NEGATIVO	NEGATIVO
18	HP-018	POSITIVO	POSITIVO	18	HN-018	NEGATIVO	NEGATIVO
19	HP-019	POSITIVO	POSITIVO	19	HN-019	NEGATIVO	NEGATIVO
20	HP-020	POSITIVO	POSITIVO	20	HN-020	NEGATIVO	NEGATIVO
21	HP-021	POSITIVO	POSITIVO	21	HN-021	NEGATIVO	NEGATIVO
22	HP-022	POSITIVO	POSITIVO	22	HN-022	NEGATIVO	NEGATIVO
23	HP-023	POSITIVO	POSITIVO	23	HN-023	NEGATIVO	NEGATIVO
24	HP-024	POSITIVO	POSITIVO	24	HN-024	NEGATIVO	NEGATIVO
25	HP-025	POSITIVO	POSITIVO	25	HN-025	NEGATIVO	NEGATIVO
26	HP-026	POSITIVO	POSITIVO	26	HN-026	NEGATIVO	NEGATIVO
27	HP-027	POSITIVO	POSITIVO	27	HN-027	NEGATIVO	NEGATIVO
28	HP-028	POSITIVO	POSITIVO	28	HN-028	NEGATIVO	NEGATIVO
29	HP-029	POSITIVO	POSITIVO	29	HN-029	NEGATIVO	NEGATIVO
30	HP-030	POSITIVO	POSITIVO	30	HN-030	NEGATIVO	NEGATIVO
31	HP-031	POSITIVO	POSITIVO	31	HN-031	NEGATIVO	NEGATIVO
32	HP-032	POSITIVO	POSITIVO	32	HN-032	NEGATIVO	NEGATIVO
33	HP-033	POSITIVO	POSITIVO	33	HN-033	NEGATIVO	NEGATIVO
34	HP-034	POSITIVO	POSITIVO	34	HN-034	NEGATIVO	NEGATIVO
35	HP-035	POSITIVO	POSITIVO	35	HN-035	NEGATIVO	NEGATIVO
36	HP-036	POSITIVO	POSITIVO	36	HN-036	NEGATIVO	NEGATIVO

37	HP-037	POSITIVO	POSITIVO	37	HN-037	NEGATIVO	NEGATIVO
38	HP-038	POSITIVO	POSITIVO	38	HN-038	NEGATIVO	NEGATIVO
39	HP-039	POSITIVO	POSITIVO	39	HN-039	NEGATIVO	NEGATIVO
40	HP-040	POSITIVO	POSITIVO	40	HN-040	NEGATIVO	NEGATIVO
41	HP-041	POSITIVO	POSITIVO	41	HN-041	NEGATIVO	NEGATIVO
42	HP-042	POSITIVO	POSITIVO	42	HN-042	NEGATIVO	NEGATIVO
43	HP-043	POSITIVO	POSITIVO	43	HN-043	NEGATIVO	NEGATIVO
44	HP-044	POSITIVO	POSITIVO	44	HN-044	NEGATIVO	NEGATIVO
45	HP-045	POSITIVO	POSITIVO	45	HN-045	NEGATIVO	NEGATIVO
46	HP-046	POSITIVO	POSITIVO	46	HN-046	NEGATIVO	NEGATIVO
47	HP-047	POSITIVO	POSITIVO	47	HN-047	NEGATIVO	NEGATIVO
48	HP-048	POSITIVO	POSITIVO	48	HN-048	NEGATIVO	NEGATIVO
49	HP-049	POSITIVO	POSITIVO	49	HN-049	NEGATIVO	NEGATIVO
50	HP-050	POSITIVO	POSITIVO	50	HN-050	NEGATIVO	NEGATIVO
51	HP-051	POSITIVO	POSITIVO	51	HN-051	NEGATIVO	NEGATIVO
52	HP-052	POSITIVO	POSITIVO	52	HN-052	NEGATIVO	NEGATIVO
53	HP-053	POSITIVO	POSITIVO	53	HN-053	NEGATIVO	NEGATIVO
54	HP-054	POSITIVO	POSITIVO	54	HN-054	NEGATIVO	NEGATIVO
55	HP-055	POSITIVO	POSITIVO	55	HN-055	NEGATIVO	NEGATIVO
56	HP-056	POSITIVO	POSITIVO	56	HN-056	NEGATIVO	NEGATIVO
57	HP-057	POSITIVO	POSITIVO	57	HN-057	NEGATIVO	NEGATIVO
58	HP-058	POSITIVO	POSITIVO	58	HN-058	NEGATIVO	NEGATIVO
59	HP-059	POSITIVO	POSITIVO	59	HN-059	NEGATIVO	NEGATIVO
60	HP-060	POSITIVO	POSITIVO	60	HN-060	NEGATIVO	NEGATIVO
61	HP-061	POSITIVO	POSITIVO	61	HN-061	NEGATIVO	NEGATIVO
62	HP-062	NEGATIVO	POSITIVO	62	HN-062	NEGATIVO	NEGATIVO
63	HP-063	POSITIVO	POSITIVO	63	HN-063	NEGATIVO	NEGATIVO
64	HP-064	POSITIVO	POSITIVO	64	HN-064	NEGATIVO	NEGATIVO
65	HP-065	POSITIVO	POSITIVO	65	HN-065	NEGATIVO	NEGATIVO
66	HP-066	POSITIVO	POSITIVO	66	HN-066	NEGATIVO	NEGATIVO
67	HP-067	POSITIVO	POSITIVO	67	HN-067	NEGATIVO	NEGATIVO
68	HP-068	POSITIVO	POSITIVO	68	HN-068	NEGATIVO	NEGATIVO
69	HP-069	NEGATIVO	POSITIVO	69	HN-069	NEGATIVO	NEGATIVO
70	HP-070	NEGATIVO	POSITIVO	70	HN-070	NEGATIVO	NEGATIVO
71	HP-071	POSITIVO	POSITIVO	71	HN-071	NEGATIVO	NEGATIVO
72	HP-072	POSITIVO	POSITIVO	72	HN-072	NEGATIVO	NEGATIVO
73	HP-073	POSITIVO	POSITIVO	73	HN-073	NEGATIVO	NEGATIVO
74	HP-074	POSITIVO	POSITIVO	74	HN-074	NEGATIVO	NEGATIVO
75	HP-075	POSITIVO	POSITIVO	75	HN-075	NEGATIVO	NEGATIVO
76	HP-076	POSITIVO	POSITIVO	76	HN-076	NEGATIVO	NEGATIVO
77	HP-077	POSITIVO	POSITIVO	77	HN-077	NEGATIVO	NEGATIVO
78	HP-078	POSITIVO	POSITIVO	78	HN-078	NEGATIVO	NEGATIVO

79	HP-079	POSITIVO	POSITIVO	79	HN-079	NEGATIVO	NEGATIVO
80	HP-080	POSITIVO	POSITIVO	80	HN-080	NEGATIVO	NEGATIVO
81	HP-081	POSITIVO	POSITIVO	81	HN-081	NEGATIVO	NEGATIVO
82	HP-082	POSITIVO	POSITIVO	82	HN-082	NEGATIVO	NEGATIVO
83	HP-083	POSITIVO	POSITIVO	83	HN-083	NEGATIVO	NEGATIVO
84	HP-084	POSITIVO	POSITIVO	84	HN-084	NEGATIVO	NEGATIVO
85	HP-085	POSITIVO	POSITIVO	85	HN-085	NEGATIVO	NEGATIVO
86	HP-086	POSITIVO	POSITIVO	86	HN-086	NEGATIVO	NEGATIVO
87	HP-087	POSITIVO	POSITIVO	87	HN-087	NEGATIVO	NEGATIVO
88	HP-088	POSITIVO	POSITIVO	88	HN-088	NEGATIVO	NEGATIVO
89	HP-089	POSITIVO	POSITIVO	89	HN-089	NEGATIVO	NEGATIVO
90	HP-090	POSITIVO	POSITIVO	90	HN-090	NEGATIVO	NEGATIVO
91	HP-091	POSITIVO	POSITIVO	91	HN-091	NEGATIVO	NEGATIVO
92	HP-092	POSITIVO	POSITIVO	92	HN-092	NEGATIVO	NEGATIVO
93	HP-093	POSITIVO	POSITIVO	93	HN-093	NEGATIVO	NEGATIVO
94	HP-094	POSITIVO	POSITIVO	94	HN-094	NEGATIVO	NEGATIVO
95	HP-095	POSITIVO	POSITIVO	95	HN-095	NEGATIVO	NEGATIVO
96	HP-096	POSITIVO	POSITIVO	96	HN-096	NEGATIVO	NEGATIVO
97	HP-097	POSITIVO	POSITIVO	97	HN-097	NEGATIVO	NEGATIVO
98	HP-098	POSITIVO	POSITIVO	98	HN-098	NEGATIVO	NEGATIVO
99	HP-099	POSITIVO	POSITIVO	99	HN-099	NEGATIVO	NEGATIVO
100	HP-100	POSITIVO	POSITIVO	100	HN-100	NEGATIVO	NEGATIVO
101	HP-101	POSITIVO	POSITIVO	101	HN-101	NEGATIVO	NEGATIVO
102	HP-102	POSITIVO	POSITIVO	102	HN-102	NEGATIVO	NEGATIVO
103	HP-103	POSITIVO	POSITIVO	103	HN-103	NEGATIVO	NEGATIVO
104	HP-104	POSITIVO	POSITIVO	104	HN-104	NEGATIVO	NEGATIVO
105	HP-105	POSITIVO	POSITIVO	105	HN-105	NEGATIVO	NEGATIVO
106	OP-001	POSITIVO	POSITIVO	106	HN-106	NEGATIVO	NEGATIVO
107	OP-002	POSITIVO	POSITIVO	107	HN-107	NEGATIVO	NEGATIVO
108	OP-003	POSITIVO	POSITIVO	108	HN-108	NEGATIVO	NEGATIVO
109	OP-004	POSITIVO	POSITIVO	109	HN-109	NEGATIVO	NEGATIVO
110	OP-005	POSITIVO	POSITIVO	110	HN-110	NEGATIVO	NEGATIVO
111	OP-006	POSITIVO	POSITIVO	111	HN-111	NEGATIVO	NEGATIVO
112	OP-007	POSITIVO	POSITIVO	112	HN-112	NEGATIVO	NEGATIVO
113	OP-008	POSITIVO	POSITIVO	113	HN-113	NEGATIVO	NEGATIVO
114	OP-009	POSITIVO	NEGATIVO	114	HN-114	NEGATIVO	NEGATIVO
115	OP-010	POSITIVO	POSITIVO	115	HN-115	NEGATIVO	NEGATIVO
116	OP-011	POSITIVO	POSITIVO	116	HN-116	NEGATIVO	NEGATIVO
117	OP-012	POSITIVO	POSITIVO	117	HN-117	NEGATIVO	NEGATIVO
118	OP-013	POSITIVO	POSITIVO	118	HN-118	NEGATIVO	NEGATIVO
119	OP-014	POSITIVO	POSITIVO	119	HN-119	NEGATIVO	NEGATIVO
120	OP-015	POSITIVO	POSITIVO	120	HN-120	NEGATIVO	NEGATIVO

121	OP-016	POSITIVO	POSITIVO	121	HN-121	NEGATIVO	NEGATIVO
122	OP-017	POSITIVO	POSITIVO	122	HN-122	NEGATIVO	NEGATIVO
123	OP-018	POSITIVO	POSITIVO	123	HN-123	NEGATIVO	NEGATIVO
124	OP-019	POSITIVO	POSITIVO	124	HN-124	NEGATIVO	NEGATIVO
125	OP-020	POSITIVO	POSITIVO	125	HN-125	NEGATIVO	NEGATIVO
126	OP-021	POSITIVO	POSITIVO	126	HN-126	NEGATIVO	NEGATIVO
127	OP-022	POSITIVO	POSITIVO	127	HN-127	NEGATIVO	NEGATIVO
128	OP-023	POSITIVO	POSITIVO	128	HN-128	NEGATIVO	NEGATIVO
129	OP-024	POSITIVO	POSITIVO	129	HN-129	NEGATIVO	NEGATIVO
130	OP-025	POSITIVO	POSITIVO	130	HN-130	NEGATIVO	NEGATIVO
131	OP-026	POSITIVO	POSITIVO	131	ON-001	NEGATIVO	NEGATIVO
132	OP-027	POSITIVO	POSITIVO	132	ON-002	NEGATIVO	NEGATIVO
133	OP-028	POSITIVO	POSITIVO	133	ON-003	NEGATIVO	NEGATIVO
134	OP-029	POSITIVO	POSITIVO	134	ON-004	NEGATIVO	NEGATIVO
135	OP-030	POSITIVO	POSITIVO	135	ON-005	NEGATIVO	NEGATIVO
136	OP-031	POSITIVO	POSITIVO	136	ON-006	NEGATIVO	NEGATIVO
137	OP-032	POSITIVO	POSITIVO	137	ON-007	NEGATIVO	NEGATIVO
138	OP-033	POSITIVO	POSITIVO	138	ON-008	NEGATIVO	NEGATIVO
139	OP-034	POSITIVO	POSITIVO	139	ON-009	NEGATIVO	NEGATIVO
140	OP-035	POSITIVO	POSITIVO	140	ON-010	NEGATIVO	NEGATIVO
141	OP-036	POSITIVO	POSITIVO	141	ON-011	NEGATIVO	NEGATIVO
142	OP-037	POSITIVO	POSITIVO	142	ON-012	NEGATIVO	NEGATIVO
143	OP-038	POSITIVO	POSITIVO	143	ON-013	NEGATIVO	NEGATIVO
144	OP-039	POSITIVO	POSITIVO	144	ON-014	NEGATIVO	NEGATIVO
145	OP-040	POSITIVO	POSITIVO	145	ON-015	NEGATIVO	NEGATIVO
146	OP-041	POSITIVO	POSITIVO	146	ON-016	NEGATIVO	NEGATIVO
147	OP-042	POSITIVO	POSITIVO	147	ON-017	NEGATIVO	NEGATIVO
148	OP-043	POSITIVO	POSITIVO	148	ON-018	NEGATIVO	NEGATIVO
149	OP-044	POSITIVO	POSITIVO	149	ON-019	NEGATIVO	NEGATIVO
150	OP-045	POSITIVO	POSITIVO	150	ON-020	NEGATIVO	NEGATIVO

Fuente: Elaboración propia

8.6 Mapa del cebador E1

Mapa del cebador E1	
8221	GGTCGTCCTGCAGGGGTACAACCCCCCGCCTATG(inicio del E1 CTTTCACCTACCTCTG 8280
8281	CACTGCACCCGGGTGCGCCACTCAAGCACCTGTCCCCGTGCGCCTCGCTGGCGTCCGTTT 8340
8341	TGAGTCCAAGATTGTGGACGGCGGTGCTTTGCCCATGGGACCTCGAGGCCACTGGAGC 8400
8401	CTGCATTTGCGAGATCCCACTGATGTCTCGTGCGAGGGCTTGGGGCCCTGGGTACCCGC 8460
8461	AGCCCTTGCGCGCGCATCTGGAATGGCACACAGCGCGGTGCACCTTCTGGGTGTCAA 8520
8521	CGCCTACTCCTCTGGCGGGTACGCGCAGCTGGCCTCTTACTTCAACCCTGGCGGCAGCTA 8580
8581	CTACAAGCAGTACCACCCTACC CGGTGCGAGGTTGAACCTGCCTTCGGACACAGCGACGC 8640
8641	GGCCTGCTGGGGCTTCCCCACCGACACCGTGTGAGCGTGTTCGCCCTTGCTAGTACGT 8700
8701	CCAGCACCCCTCACAAAGACCGTCCGGGTCAAAGTTCATACAGAGACCAGGACCGTCTGGCA 8760
8761	ACTCTCCGTTGCCGGCGTGTGCTGCAACGTCAACACTGAACACCCGTTCTGCAACACGCC 8820
8821	GCACGGACAACCTCGAGGTCCAGGTCCC GCCCGACCCCGGGGACCTGGTTGAGTACATTAT 8880
8881	GAATTACACCGGCAATCAGCAGTCCCGGTGGGGCCTCGGGAGCCCGAATTGCCACGGCCC 8940
8941	CGATTGGGCCTCCCCGGTTTGC CAACGCCATTCCCCTGACTGCTCGCGGCTTGTGGGGGC 9000
9001	CAGGCCAGAGCGCCCCCGGTGCGCCTGGTTCGACGCCGACGACCCCTGCTGCGCACTGC 9060
9061	CCCTGGACCCGGCGAGGTGTGGGTACGCCTGTCA TAGGCTCTCAGGCGCGCAAGTGCGG 9120
9121	ACTCCACATACGCGCTGGACCGTACGGCCATGCTACCGTCGAAATGCCCGAGTGGATCCA 9180
9181	CGCCCACACCACCAGCGACCCCTGGCATCCACCGGGCCCCTTGGGGCTGAAGTTCAAGAC 9240
9241	AGTTCGCCCGGTGGCCCTGCCACGCACGTTAGCGCCACCCCGCAATGTGCGTGTGACCGG 9300
9301	GTGCTACCAGTGCGGTACCCCGCGCTGGTGGAAAGCCTTGCCCCGGGGGAGGCAATTG 9360
9361	CCATCTCACCGTCAATGGCGAGGACCTCGGCGCCGTCCCCCTGGGAAGTTCGTCACCGC 9420
9421	CGCCCTCTCAACACCCCCCCGCCCTACCAAGTCAGTGCAGGGGGCGAGAGCGATCGCGC 9480
9481	GACCGCGCGGGTCACTGACCCCGCCGCGCAATCGTTTACCGCGTGGTGTATGGCACACA 9540
9541	CACCACTGCTGTGTCGGAGACCCGGCAGACCTGGGCGGAGTGGGCTGCTGCCATTGGTG 9600
9601	GCAGCTCACTCTGGGGGCCATTGCGCCCTCCCACTCGCTGGCTTACTCGCTTGTGTGC 9660
9661	CAAATGCTTGTACTACTTGGCGGGCGCTATAGCGCCTCGCTAGTGGGCCCCCGCGGAAA 9720
9721	CCCGCACTAGGCCACTAGATCCCCGCACCTGTTGCTGTATAG 9762

Fuente: OPS, 2011

INTERPRETACIÓN:

Se indica la ubicación de los iniciadores del fragmento 1 y el fragmento 2 para el diagnóstico del virus de la rubeola. También están marcados la ventana de genotipificación 739 y los puntos de inicio y fin de la región codificante E1

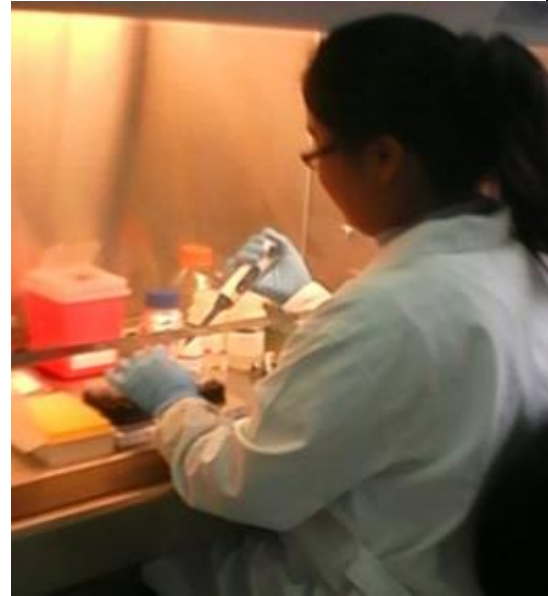
8.7 Células Vero en incubación a 37 °C



8.8 Kit de extracción de ácido nucleico



8.9 Extracción de ARN- Cabina de bioseguridad nivel II



8.10 Área limpia-Preparación de mezcla de reacción



8.11 Área Sucia-Suspensión de ARN



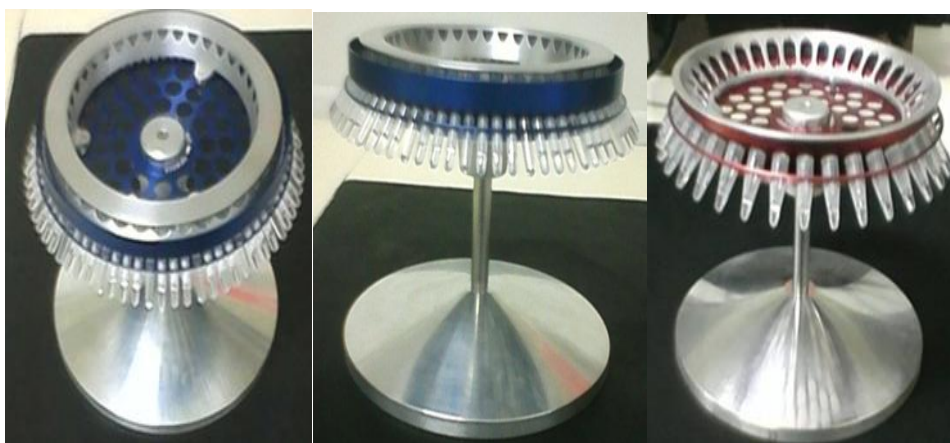
8.12 Área de Amplificación- Termociclador Convencional



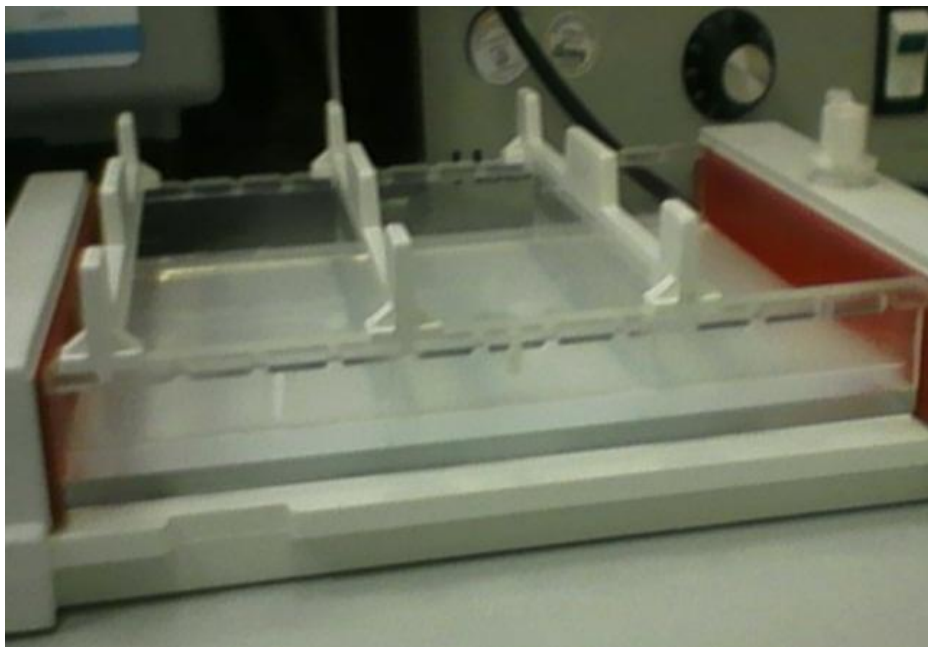
8.13 Área de Amplificación y Recolección de datos- Termociclador en Tiempo Real



8.14 Coronas del Termociclador en Tiempo Real



8.15 Gel de Electroforesis



8.16 Potenciómetro-Corrida Electroforética



8.17 Espectrofotómetro-NANODROP



8.18 Constancia de realización de tesis.

<p style="text-align: center;">MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD</p> <p style="text-align: center;"><i>"Año de la promoción de la industria responsable y del compromiso climático"</i></p> <p style="text-align: center;">CONSTANCIA</p> <p>A QUIEN CORRESPONDA:</p> <p>El Laboratorio de Referencia Nacional de Sarampión y Rubéola hace constar, que la Srta. Bachiller en Ciencias Biológicas, Priscila Nayu Lope Pari, realizó la ejecución de la Tesis Titulado "Estandarización de Técnicas Moleculares por PCR convencional y PCR en tiempo real para el diagnóstico de Rubéola en el INS". Durante los meses de octubre del 2013 a junio del 2014; realizado en el Laboratorio de sarampión y rubéola del Instituto Nacional de Salud, Lima.</p> <p>La presente se extiende a petición de la interesada para los trámites de presentación del informe final de tesis.</p> <p style="text-align: center;">Lima, 10 junio del 2014.</p> <p style="text-align: right;"> Bigo. Néstor Edwin Cabeza Pilpe COORDINADOR DEL LABORATORIO DE SARAMPIÓN Y RUBEOLA CNSP/INS</p> <p style="text-align: right;"></p>



Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
Asesor



Bach. Priscila Nayu Lope Pari
Tesista