


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA




ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN  
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO  
SIMULTÁNEO DE *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* Y VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO EN MUESTRAS CERVICALES DE MUJERES  
TRABAJADORAS DEL SERVICIO SEXUAL

ROBERT SAMUEL GARCÍA MARTÍNEZ

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, MAYO DEL 2016

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN  
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) MÚLTIPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO  
SIMULTÁNEO DE *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* Y VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO EN MUESTRAS CERVICALES DE MUJERES  
TRABAJADORAS DEL SERVICIO SEXUAL

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

ROBERT SAMUEL GARCÍA MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, MAYO DEL 2016

## **JUNTA DIRECTIVA**

|   |            |
|---|------------|
| Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda                  | Decano     |
| Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A. | Secretaria |
| MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo                   | Vocal I    |
| Dr. Juan Francisco Pérez Sabino                     | Vocal II   |
| Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera               | Vocal III  |
| Br. Andreina Delia Irene López Hernández            | Vocal IV   |
| Br. Carol Andrea Betancourt Herrera                 | Vocal V    |

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Por prestarme la vida y darme la oportunidad de completar esta etapa.

### **A MI FAMILIA**

Por su apoyo y comprensión en todo momento.

### **A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

Por brindarme el conocimiento para mi formación profesional.

A M.Sc. Gerardo Arroyo, Flora Arana Ph.D., M.A. Keila Guerrero por su valiosa asesoría y apoyo en la culminación de este trabajo de tesis.

A las autoridades y personal de las siguientes instituciones: Unidad de VIH del centro de estudios en salud de la Universidad del Valle de Guatemala por la asistencia técnica y financiera, área de Virología de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE), del Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social por abrir sus puertas para desarrollar el estudio, Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad (EDC) y a las instituciones donde se recolectaron las muestras.

## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| <b>I. RESUMEN</b>  | 1      |
| <b>II. INTRODUCCIÓN</b>  | 3      |
| <b>III. ANTECEDENTES</b>   |        |
| <b>A. Generalidades</b>  | 4      |
| <b>B. Agentes etiológicos de infecciones de transmisión sexual</b> | 9      |
| 1. <i>Chlamydia trachomatis</i>                                    | 10     |
| 1.1 Taxonomía y ciclo de desarrollo                                | 11     |
| 1.2 Epidemiología  | 15     |
| 2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>                                    | 18     |
| 2.1 Morfología   | 19     |
| 2.2 Epidemiología  | 21     |
| 3. Virus del papiloma humano                                       | 22     |
| 3.1 Epidemiología  | 26     |
| <b>C. Métodos tradicionales de diagnóstico</b>                     | 29     |
| <b>D. Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiplex</b>            | 32     |
| 1. Análisis de ADN   | 32     |
| 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa                             | 34     |
| <b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>   | 38     |
| <b>V. OBJETIVOS</b>  |        |
| <b>A. Objetivo General</b>   | 39     |
| <b>B. Objetivos Específicos</b>                                    | 39     |
| <b>VI. HIPÓTESIS</b>   | 40     |
| <b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                   |        |
| <b>A. Universo</b>   | 41     |
| <b>B. Materiales</b>   | 41     |
| <b>C. Métodos</b>  | 43     |
| <b>D. Diseño de la investigación</b>                               | 47     |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>VIII. RESULTADOS</b>    | 48 |
| <b>IX. DISCUSIÓN</b>       | 53 |
| <b>X. CONCLUSIONES</b>     | 57 |
| <b>XI. RECOMENDACIONES</b> | 58 |
| <b>XII. REFERENCIAS</b>    | 59 |
| <b>XIII. ANEXOS</b>        | 64 |



## I. RESUMEN

El propósito de este trabajo de tesis fue realizar la estandarización y validación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiplex, punto final para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras cervicales de mujeres trabajadoras del servicio sexual. Se utilizaron muestras confirmadas por PCR-Tiempo Real del agente de interés, cepa liofilizada ATCC y además muestras de otros estudios como controles positivos y negativos.

La finalidad del proyecto fue aportar una alternativa al diagnóstico simultáneo de estos tres agentes etiológicos de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) adaptando la técnica en el área de Biología Molecular para lograr una mayor cobertura y reducir costos. El estudio se llevó a cabo en dos fases, la primera consistió en estandarizar de forma individual y luego simultánea los segmentos diana de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y virus del papiloma humano y en la segunda fase se validó la técnica utilizando muestras cervicales de 203 trabajadoras del servicio sexual que asisten al Centro Especializado de ITS No. 2 de la zona 3 a su control rutinario y de un banco de ADNs de otro estudio de VPH.

En forma paralela se efectuó la confirmación de los resultados del PCR múltiplex convencional con un PCR en tiempo real (Fast Track Diagnostics), No. de catálogo FTD 12-96/12 que fue catalogada como el Estándar de oro para esta comparación. Los datos obtenidos se introdujeron en una tabla 2x2 con la finalidad de obtener la evaluación de validez y fiabilidad de la prueba de PCR múltiplex convencional.

La estandarización se basó principalmente en proporcionar condiciones óptimas como lo son el perfil de los ciclos de amplificación (la temperatura y tiempo), pureza del material genético, concentración de los cebadores y concentración de  $MgCl_2$ , las cuales fueron fundamentales para lograr amplificar el material genético de los agentes etiológicos de ITS.



La validación se constituyó en alcanzar el funcionamiento de esta técnica para demostrar la presencia de los tres agentes simultáneamente en muestras cervicales de trabajadoras del servicio sexual, y para conocer la factibilidad de esta técnica en detectar juntamente los tres microorganismos se desarrolló la evaluación de la validez (sensibilidad y especificidad) y fiabilidad (valores predictivos positivos y valores predictivos negativos) del PCR múltiplex convencional, determinando por separado para cada agente tres tablas de 2x2. Se obtuvo para *C. trachomatis* una sensibilidad de 100% y una especificidad de 89%, para *N. gonorrhoeae* una sensibilidad de 100% y una especificidad de 84% y por último para VPH una sensibilidad de 41% y una especificidad de 93%. Estos resultados estadísticos alcanzados nos revelan que la técnica de PCR-múltiplex convencional al ser utilizada para la detección de infecciones mixtas para detectar a *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* es altamente sensible; sin embargo, al estar presente VPH la sensibilidad para detectar este agente disminuye significativamente.

En la validación de la técnica de PCR múltiplex para el diagnóstico simultáneo de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y virus del papiloma humano, los resultados obtenidos revelan que no presenta una sensibilidad y especificidad comparables al método de referencia para los tres agentes en conjunto, por lo tanto no se valida la hipótesis planteada en este estudio.

## II. INTRODUCCIÓN

Las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), causadas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* son causas comunes de enfermedades transmitidas sexualmente las que constituyen una de las mayores causas de morbilidad en mujeres sexualmente activas (Flores, 2000). La presencia de Virus del Papiloma Humano (VPH) se considera como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer cervical (Arroyo, Zetina, Villeda, Guerra, Gravitt, Daniel, Kindilien & Shan, 2008), estos problemas de salud que en ocasiones suelen ser de difícil diagnóstico y aunque existen varios métodos para diagnosticar estas enfermedades, algunos ofrecen resultados en períodos de tiempo prolongado (Cabral, Cruz, Ramos & Ruiz, 2006).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (PCR-M por sus siglas en inglés), es relativamente simple que amplifica fragmentos específicos del ácido desoxirribonucleico (ADN) de varios microorganismos que estén presentes en la muestra recolectada (Álvarez, 2004). La PCR múltiple requiere pequeñas cantidades de ADN blanco para obtener los más altos niveles de amplificación de secuencias específicas, estas características hacen de la PCR múltiple un instrumento sumamente útil no solamente en la investigación sino también en el diagnóstico *in vitro* (Dorado, 2005).

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron y validaron los procesos de estandarización de la PCR múltiple para el diagnóstico simultáneo de tres agentes etiológicos de ITS en 203 muestras cervicales de trabajadoras del servicio sexual que acuden al centro de salud No. 2 zona 3 de la ciudad, los cuales son *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y Virus del Papiloma Humano, empleando los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de PCR múltiple y paralelamente se realizó una comparación con otro método diagnóstico (PCR en tiempo real, Fast Track Diagnostics) en un lapso de cinco meses, con la finalidad de determinar su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la PCR múltiple. Con la adaptación de esta técnica en el laboratorio se buscó obtener una alternativa en el diagnóstico de las ITS que dará lugar a una mayor cobertura en el servicio en este tipo de pruebas.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

En general existe escasa información sobre la magnitud y tendencias de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), y Guatemala no es la excepción. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 1999 ocurrieron en todo el mundo 340 millones de casos nuevos de ITS curables. Para América Latina y el Caribe se estimaron 38 millones (11%) (Rembert, 2007).

En Guatemala las ITS son atendidas por el Ministerio de Salud y Asistencia Social (MSPAS), sobre todo a través de clínicas de profilaxis sexual en Centros de Salud (CS), estas atienden básicamente a las Trabajadoras del Comercio Sexual (TCS), de su área de influencia, servicios que con frecuencia no demanda la población general. La actividad de vigilancia de ITS más común es la notificación de casos por un sistema de notificación universal, basado en el reporte sindrómico de casos. Esto se ha complementado con diferentes estudios realizados en poblaciones que viven en contexto de vulnerabilidad (Rembert, 2007).

En América Latina, la epidemia del Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se mantiene estable en general, la transmisión del VIH sigue siendo más amplia en poblaciones en mayor riesgo y vulnerabilidad, como las transgénero femeninas, los hombres que tienen sexo con hombres, y las trabajadoras sexuales. Para el 2010 se estima que en la región Centroamericana, existían 100,081 casos acumulados de VIH y VIH avanzado. La mayor parte de casos se concentra en Honduras (28,292); El Salvador (24,098) y Guatemala (22,260) seguidos por Panamá (16,243), Belice (5,175) y Nicaragua (4,742). La epidemia de VIH en la región, se concentra principalmente en hombres que tienen sexo con hombres, transgénero femeninas y trabajadoras sexuales (Aguilar, Álvarez, Arambú, Castillo, Figueroa, Huamán, Mendizábal, Morales, Osuna, & Rosales, 2013).

Al igual que el VIH, la sífilis continúa siendo un problema de salud pública, debido a su frecuencia y a las complicaciones derivadas del diagnóstico tardío. Aunque en América Latina no hay notificación obligatoria de casos de sífilis, diversos estudios han documentado prevalencias en diferentes grupos poblacionales. Las guías de vigilancia de segunda generación propuestas por la OMS promueven además del monitoreo de VIH e ITS, monitorear de cerca los comportamientos vinculados al VIH, contar con información biológica y de comportamiento resulta crucial para el diseño, la implementación y evaluación de programas de control de VIH e ITS (Aguilar, Álvarez, Arambú, Castillo, Figueroa, Huamán, Mendizábal, Morales, Osuna, & Rosales, 2013).

La información proveniente del sistema pasivo de vigilancia es escasa y adolece de marcadas inconsistencias, a lo que se suma el hecho de que muchas personas que padecen unas ITS se automedican o solicitan sistemáticamente consejo fuera del sistema nacional de atención, lo que dificulta el mantenimiento de los sistemas de vigilancia (Rembert, 2007).

En Guatemala, la implementación la clínica de Vigilancia Centinela de las Infecciones de Transmisión Sexual (VICITS) inicia en julio del año 2007, con la apertura de un sitio -VICITS- para mujeres trabajadoras sexuales en el Centro de Salud No. 2 en zona 3, como clínica especializada de las ITS, seguido por la apertura en 2008 del Centro de Salud de Puerto Barrios. En 2010 se agregan dos nuevos sitios, uno en la ciudad de Guatemala en la Fundación Marco Antonio (FUNDAMACO), para la atención de hombres que tienen sexo con hombres y otro sitio en el Centro de Salud de la ciudad de Quetzaltenango para mujeres trabajadoras sexuales. Ese mismo año se incluye de manera diferenciada entre las poblaciones para la vigilancia a las transgénero. En 2013 se inicia con la vigilancia en las personas con VIH (PVIH), en la Clínica No. 12 del Hospital Juan José Ortega Coatepeque, Quetzaltenango; este sitio constituye la tercera clínica de atención integral más grande del país (Flores, González, & Mendizábal, 2014).

En pocas áreas de las enfermedades infecciosas, se han producido descubrimientos y cambios en su epidemiología, como en el caso de las ITS durante las pasadas tres décadas, a pesar de la era de antibióticos las ITS bacterianas permanecieron epidémicas y en adición con las de “nueva” generación, como el herpes genital, clamidiosis y VPH/condilomas acuminados en una primera etapa (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

En general las ITS tienen consecuencias más graves para las mujeres que para los hombres. En ellas con frecuencia las ITS son asintomáticas o cursan con escasa sintomatología, lo que determina una tardanza en la búsqueda de un diagnóstico certero. El diagnóstico exacto es más difícil en la mujer que en el hombre debido a que la sintomatología es menos específica, además existe mayor riesgo de complicaciones, ocasionando secuelas graves y permanentes en su salud sexual, durante el embarazo, al feto y/o a el recién nacido y porque las pruebas de diagnóstico microbiológico son menos sensibles (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

La mayoría de ellas afectan a personas entre 15 y 49 años, en plena etapa productiva y reproductiva. Las ITS muestran un incremento en el riesgo de la transmisión del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

La relación que existe entre la infección por ITS y VIH es que en las personas que con VIH la severidad de las manifestaciones clínicas en las ulceraciones genitales es mayor, por ejemplo, se pueden dar con frecuencia manifestaciones atípicas de chancro blando, sífilis y herpes genital. Otro aspecto importante es que la historia natural de algunas ITS y el tiempo de tratamiento se modifican de acuerdo con el grado de inmunodeficiencia de la persona (Rembert, 2007).

Las ITS funcionan como alarma temprana aún entre aquellas poblaciones en las que el VIH todavía no es tan común. Un aumento de los casos de ITS puede servir para

llamar la atención acerca del potencial de diseminación de la infección por VIH. Esto debido a que las ITS curables indican que la persona ha tenido relaciones sexuales sin protección, y pudo haber estado con múltiples parejas sexuales (Rembert, 2007).

Debido a que la infección por VIH toma varios años en presentarse como enfermedad sintomática, el impacto de la epidemia no se observa hasta un tiempo después en que la prevalencia de la infección comienza a aumentar. Las ITS en cambio muestran el cuadro clínico en menos tiempo (Rembert, 2007).

Las ITS y el VIH comparten varias características en común:

- Vías de transmisión
- Estrategias de promoción y prevención
- Seguimiento por parte de los programas de control

Hay evidencia que sugiere un incremento en la severidad de las manifestaciones clínicas y en la infectividad de diversas ITS, también una respuesta reducida los regímenes terapéuticos convencionales en personas infectadas por VIH. Lo más importante es el efecto facilitador de las ITS en la transmisión del VIH. Se ha observado que las ITS pueden incrementar de 2 a 10 veces su transmisión (Rembert, 2007).

A partir de los años setenta se describieron más agentes patógenos (bacterianos y virales) que afectan a los órganos sexuales, tanto bacterianos como virales, constituyendo en la actualidad el grupo más numerosos de infecciones en muchos países del mundo (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

Su distribución no es única y varía en todas las áreas geográficas, algunas en descenso y control, sobre todo en países desarrollados gracias a campañas de control basadas en un mejor diagnóstico y tratamiento. Por el contrario, en algunos países

en vías de desarrollo tienen carácter epidémico, afectando gran parte de la población (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

La Organización Mundial de la Salud propone llamarlas Infecciones del Tracto Reproductivo (ITR) que abarca a los órganos sexuales del hombre y la mujer y que son causadas por microorganismos que normalmente están presentes en el tracto reproductivo, o que son introducidos desde el exterior durante el contacto sexual o durante procedimientos médicos (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

En los años 90 se ha observado un nuevo repunte en las cifras de ITS, que se ha asociado a:

- Modificación en los microorganismos; evolución natural de éstos y resistencia a antibióticos
- Modificación en las costumbres sociales y familiares; desarrollo socioeconómico, mayor libertad y tolerancia, mayor ocio y poder adquisitivo, emancipación de la mujer, mayor población joven, falta de educación sanitaria y sexual
- Mayor movilidad de la población: dispersión de los microorganismos (Martínez & Cabezón, 2003)

Así, paralelamente a este aumento de las cifras, también ha aumentado la preocupación, tanto sanitaria como social, por el problema de las ITS, conscientes de que éstas forman uno de los grupos de patologías más influenciadas por las actitudes, los comportamientos, la promiscuidad, factores sociales, psíquicos y comunitarios muy particulares, debido a su vinculación con el ámbito sexual, la capacidad reproductiva, la autoestima de la persona y el rechazo de los demás (Martínez & Cabezón, 2003).

Por tanto, para lograr una prevención de las ITS es fundamental la educación sanitaria, que debe ir dirigida a:

- Población general

- Grupos de alto riesgo: trabajadoras del servicio sexual, homosexuales, adictos a drogas por vía parenteral, alcohólicos, promiscuos, población privada de libertad y migrantes
- Jóvenes que se inicien en las relaciones sexuales (e incluso a niños en las escuelas)
- Personal sanitario que se encarga de las ITS (Martínez & Cabezón, 2003)

## **B. Agentes etiológicos de infecciones de transmisión sexual**

La epidemia de las ITS se desarrolla a través de una dinámica de interrelación de los agentes patógenos, el comportamiento de los grupos poblacionales en los que se desarrolla y los esfuerzos para prevenirla. Las redes sociales y sexuales que condicionan la epidemia se ubican en los subgrupos de población caracterizados por un alto intercambio de parejas sexuales y un pobre contacto con el sistema de salud (Rembert, 2007).

El estudio de una epidemia de ITS empieza por identificar la existencia de segmentos de la población que tienen actividad sexual. Una persona sana y sexualmente activa deberá exponerse a otra infectada, pero para que este encuentro ocurra tendrán que interactuar factores ecológicos (alta densidad poblacional y migraciones), de comportamiento (tener múltiples parejas sexuales, con comportamientos de riesgo e infectadas, consumo de alcohol y drogas, realizar prácticas sexuales de alto riesgo como relaciones anales sin protección) y biológicos de alta capacidad infecciosa como estadio de la enfermedad y presencia de otras ITS, susceptibilidad como ectopia cervical, falta de circuncisión masculina y el lugar anatómico de exposición (Cabral, Cruz, Ramos, & Ruiz, 2006).

En los últimos decenios, la morbilidad y mortalidad de la población adolescente-joven, ha variado sustancialmente ya que las enfermedades físicas no suelen ser la principal causa de mortalidad. Por el contrario, los problemas principales de salud suelen estar asociados a comportamientos y prácticas que podrían ser evitables. La identidad sexual exige, al mismo tiempo, una buena concepción del rol sexual y una



cierta comprensión de la propia sexualidad, para lo cual han de reconocer y aceptar su nuevo cuerpo desarrollado y la imagen corporal, también es cuando han de especificar la orientación del deseo sexual ya que es en ese momento de la vida que van a iniciar determinados comportamientos y prácticas sexuales, como los primeros contactos coitales (Pérez, 2005).

Pero, un porcentaje considerable de este grupo de población, empieza a tener relaciones sexuales que podrían ser de riesgo, sin disponer de información exacta acerca de la salud sexual y reproductiva, corriendo el peligro de encontrarse con embarazos no planificados e ITS. Determinadas prácticas sexuales son consideradas como nuevas por lo que actualmente es necesario buscar la presencia de agentes etiológicos de ITS en vagina, ano, uretra y boca (Pérez, 2005).

Las enfermedades de transmisión sexual históricamente han sido un problema de salud. Además de provocar lesiones en el sitio de contagio, muchas de ellas tienen manifestaciones sistémicas importantes que hacen necesario que el personal de salud posea el conocimiento tanto de sus complicaciones como de su diagnóstico. Existen varios agentes etiológicos de ITS de los que se eligieron solamente tres para llevar a cabo este estudio: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y Virus del papiloma humano.

### **1. *Chlamydia trachomatis***

En décadas recientes, *Chlamydia trachomatis* ha sido reconocida como uno de los microorganismos que se ha extendido y transmitido sexualmente. Las infecciones por *C. trachomatis* son asociadas regularmente con ciertos síndromes genitales inespecíficos tanto en hombres como en mujeres (Bolaños, 1990).

En mujeres esto puede causar uretritis, cervicitis, enfermedades de inflamación pélvica (por ejemplo, endometritis y salpingitis) y las secuelas de estas condiciones, tal como infertilidad, embarazo ectópico y dolor pélvico crónico. En hombres la infección con *C. trachomatis* puede causar uretritis y epididimitis, lo

cual puede raramente resultar en estenosis y disminución de la fertilidad. A los neonatos que pasan a través del canal uterino de una mujer infectada se les pueden desarrollar infecciones, principalmente conjuntivitis y neumonía (Genc & Mardh, 1996).

*C. trachomatis* fue visualizada por primera vez en 1907 por Halberstaedter y Prowazek, en raspados de conjuntiva tomados de orangutanes que habían sido inoculados con material obtenido de pacientes con tracoma (Bolaños, 1990).

Sustituyendo la tediosa técnica usando saco vitelino la cual consumía mucho tiempo y era muy difícil de aplicar a gran escala, Gordon y Quan describieron el procedimiento del cultivo celular para el aislamiento de los agentes causantes de tracoma y conjuntivitis por inclusión (Bolaños, 1990).

#### 1.1 Taxonomía y ciclo de desarrollo

La familia Chlamydiae es un grupo de parásitos intracelulares obligados, caracterizada por un ciclo de desarrollo único común a todos los miembros de la familia, por lo que pertenecen a un mismo orden, los Chlamydiales (Bolaños, 1990).

Han recibido una gran variedad de nombres los cuales fueron aceptados por mucho tiempo. El término aceptado hoy en día, proviene del que originalmente propusieron en 1907 Halberstaedter y Von Prowazek, quienes observaron inclusiones intracitoplasmáticas en células provenientes de raspados conjuntivales de pacientes con tracoma, describiéndolas como “animales envueltos en una capa o mano” y por ello adjudicaron el nombre “Chlamydozoae”, que proviene de la raíz griega “chlamys”, cuyo significado alude al estar cubierto con capa (Bolaños, 1990).

Solo se conocen dos especies diferentes: *C. trachomatis* que es inhibida por sulfonamidas y produce inclusiones citoplasmáticas que se tiñen con yodo y

*C. psittaci* que no es inhibida por sulfonamidas y no produce inclusiones que se tiñen con yodo (Bolaños, 1990).

*Chlamydia* actúa de manera que forma un grupo de parásitos intracelulares obligados incapaces de sintetizar adenosiltrifosfato (ATP) considerados inicialmente como virus y relacionados con las bacterias Gram negativo (Bolaños, 1990).

Sin embargo, difiere del virus por las siguientes características:

- Como bacterias poseen ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN)
- Se multiplican por fisión binaria y los virus se replican
- Poseen paredes celulares parecidas a las bacterias con peptidoglicano y ácido murámico
- Poseen ribosomas y los virus no
- Poseen enzimas metabólicamente activas y algunos pueden sintetizar folatos
- Su crecimiento puede ser inhibido por drogas antimicrobianas (Bolaños, 1990)

El ciclo de desarrollo en ambas especies comienza con la infección de una célula por el cuerpo elemental, que es la fase extracelular del microorganismo y posee tres fases mayores; la primera es adherencia y penetración del cuerpo elemental en el citoplasma de la célula huésped, la segunda es la transformación del cuerpo elemental en el cuerpo reticulado y la tercera y última es la formación de la progenie de cuerpos elementales (Bolaños, 1990).

El cuerpo elemental es la mínima unidad infectante es un cuerpo pequeño, denso y esférico de 0.2 a 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro, rodeado por una pared celular rígida similar en aspecto y composición a las bacterias Gram negativo. Contiene ADN y ARN, el cual está organizado compactamente en una

estructura central de nucleótidos y tanto en la *C. trachomatis* como en *C. psittaci* se encuentran en una molécula circular cerrada, con un peso molecular de  $660 \times 10^6$  Daltones. Esta molécula podría proporcionar información de aproximadamente 600 proteínas diferentes y aproximadamente una cuarta parte de la cantidad proporcionada por el genoma de *Escherichia coli* (Bolaños, 1990).

La partícula infecciosa (cuerpo elemental) se adhiere a la membrana celular de la célula huésped susceptible induciendo fagocitosis activa, mediante un contacto íntimo entre la célula huésped y el cuerpo elemental, utilizando receptores sensibles a tripsina (para *C. psittaci*) (Bolaños, 1990).

Luego de la fagocitosis de la célula huésped, el cuerpo elemental es rodeado por la membrana invaginada de dicha célula para formar el cuerpo de inclusión. Durante las primeras 12 horas postinfección, el cuerpo elemental aumenta gradualmente de tamaño hasta formar una estructura de 0.7-1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Este inicialmente es un cuerpo reticulado, rodeado por una doble membrana y contiene numerosos ribosomas. Veinte horas después de la infección comienza la fisión binaria, donde el núcleo de la célula huésped ha sido desplazado por los cuerpos reticulados que llenan el citoplasma. De 30 a 40 horas después de iniciado el ciclo, puede observarse la progenie de los cuerpos elementales dentro de la inclusión; algunos de los cuales están maduros y otros se encuentran en estado intermedio de desarrollo. La multiplicación continúa por varias horas, durante las cuales se produce gran número de cuerpos elementales. Así los cuerpos de inclusión intracelulares contienen grandes cuerpos reticulados no infecciosos y cuerpos elementales en diferentes estadios de su desarrollo. Estos representan microcolonias bacterianas intracelulares. Después de 48 horas de iniciada la infección, la célula hospedera sufre ruptura liberando cuerpos elementales y comenzando así un nuevo ciclo infeccioso (Bolaños, 1990).

La infección se acompaña de cambios notables en el metabolismo de la *C. trachomatis* y de la célula huésped. El cuerpo elemental pierde su densa estructura nucleoide preparatoria para la transcripción y duplicación. También desaparece la pared celular. La iniciación del desarrollo depende de la presencia de mitocondrias funcionales en las células infectadas y de las funciones nucleares activas. *C. trachomatis* además utiliza los depósitos totales de pirimidina y purina solubles en ácido de su huésped para la síntesis de su propio ARN (Bolaños, 1990).

Las actividades enzimáticas de los cuerpos elementales de *C. trachomatis* incluyen ARN-polimerasa ADN dependiente, que es inhibida por rifampicina. Aunque las clamidias utilizan enzimas para el metabolismo de la glucosa, luego de la glucosa-6-fosfato, la hexoquinasa es una enzima del huésped. Las clamidias además son incapaces de sintetizar ATP y otros fosfatos de alta energía, por lo que se les denomina “parásitos de energía” (Bolaños, 1990).

Durante el desarrollo de los cuerpos elementales en el cuerpo reticular hay una biosíntesis activa de ADN. El contenido de ARN de las células infectadas por *C. psittaci* aumenta gradualmente y llega al máximo de 20 horas. Las enzimas codificadas están involucradas en la biosíntesis de membrana del cuerpo reticulado. En *C. trachomatis* el glucógeno es sintetizado durante un período de 10 horas, comenzando 20 horas después de la infección. Con la síntesis de la pared celular se producen cuerpos elementales y se completa el ciclo. El tratamiento con penicilina inhibe el desarrollo de los cuerpos reticulados (Bolaños, 1990).

La pared celular se asemeja a la de una bacteria Gram negativo. Sin embargo contiene una cantidad alta de lípidos, peptidoglicano y tal vez ácido murámico. La formación de la pared celular es inhibida por penicilinas y cicloserina, sustancias que inhiben la síntesis de peptidoglicano en las

bacterias. El ADN está distribuido en todo el citoplasma en partículas grandes y la mayoría de ARN está distribuido en los ribosomas (Bolaños, 1990).

Las propiedades de tinción de *C. trachomatis* dependen del estadio del desarrollo que tenga. Los cuerpos elementales se tiñen de púrpura con la tinción de Giemsa y rojo con la tinción de Machiavelo, en contraste con el color azul del citoplasma de la célula huésped (Bolaños, 1990).

*C. trachomatis* es negativa o parcialmente positiva a la reacción de Gram por lo que no es útil para identificar inclusiones formadas por dicho microorganismo (Bolaños, 1990).

## 1.2 Epidemiología

Este agente causa una gran variedad de infecciones tanto en hombres como en mujeres y recién nacidos. La edad, el número de parejas sexuales, la situación socioeconómica y preferencia sexual constituyen factores predictivos en las infecciones por *C. trachomatis*. Las tasas de infección genital parecen estar en relación inversa a la edad y positivamente relacionadas con el número de parejas sexuales. Las mujeres sexualmente activas menores de 20 años, tienen una tasa de infección por *C. trachomatis* dos a tres veces más altas que las incidentes en mujeres mayores. En forma similar, la tasa de infección uretral en adolescentes varones es superior a la de los adultos. El riesgo de infección aumenta con el número de parejas sexuales. Algunos estudios han relacionado el aumento en el riesgo de infecciones por *C. trachomatis* con el factor étnico y una baja situación económica. La prevalencia de infecciones uretrales por *C. trachomatis* entre homosexuales es de aproximadamente la tercera parte de la prevalencia entre los heterosexuales vistos en las clínicas de enfermedades de transmisión sexual que tienen infecciones rectales (Bolaños, 1990).

Existen dos síndromes asociados a *C. trachomatis* comunes en hombres: la uretritis no gonocócica (UNG) y la orquiepididimitis aguda. En forma consistente se ha aislado *C. trachomatis* de un 50% de hombres con epididimitis aguda, habiéndose demostrado que este microorganismo es la causa principal conocida de la epididimitis aguda en hombres menores de 35 años (Bolaños, 1990).

El número anual de casos de uretritis no gonocócica en los Estados Unidos de América se estima en 2.5 millones y la prevalencia de uretritis a *C. trachomatis* en pacientes asintomáticos es de 3-12% (Bolaños, 1990).

En el ámbito nacional el número de casos de ITS, notificados al Sistema de Información Gerencial en Salud (SIGSA) de forma sindrómica, muestra un incremento entre 2006 y 2008, reportando 65,908 casos en el último año (Álvarez, Flores, García, López, Miller, Miranda, Paz, & Samayoa, 2011)

La uretritis post gonorrea es la uretritis persistente, resultado de una doble infección (clamidia y gonococo) en una persona tratada solo para gonorrea. *C. trachomatis* puede provocar proctitis, particularmente en homosexuales y debe distinguirse de otros agentes casuales como *N. gonorrhoeae* y virus herpes simplex. Las manifestaciones clínicas incluyen dolor, diarrea, hematoquezia, descarga purulenta y ulceraciones (Bolaños, 1990).

El síndrome de Reiter es una enfermedad sistémica en el hombre constituida por uretritis, conjuntivitis y artritis, pero con mayor frecuencia uretritis y artritis (Bolaños, 1990).

La prevalencia de infección cervical por *C. trachomatis* varía entre un 3-5% en mujeres asintomáticas y un 16-38% en mujeres que asisten a las clínicas de enfermedades de transmisión sexual (Bolaños, 1990).

Algunos estudios han demostrado que este agente juega un papel muy importante en desórdenes del sistema reproductor femenino. Esto incluye embarazo ectópico, enfermedad pélvica inflamatoria e infertilidad. Una prevalencia alta de anticuerpos contra *C. trachomatis* ocurre en mujeres con aborto recurrente (57.6%) en comparación con mujeres infértiles (44.2%) (Bolaños, 1990).

La salpingitis ocurre más frecuentemente en mujeres jóvenes y en edad reproductiva. Las secuelas de salpingitis incluyen enfermedad pélvica inflamatoria, hidrosalpinx, infertilidad, absceso ovárico, embarazo ectópico y el Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis. En la literatura de los países escandinavos se describieron muchos estudios apoyando a *C. trachomatis* como principal agente etiológico en salpingitis aguda. Investigadores estadounidenses han aislado *C. trachomatis* del cérvix de un 5-20% de mujeres con diagnóstico de salpingitis aguda (Bolaños, 1990).

Aproximadamente un 25-30% de mujeres con infección por *N. gonorrhoeae* también tienen infección por *C. trachomatis*. Las mujeres que tienen otras enfermedades de transmisión sexual, tales como tricomoniasis y vaginosis tiene un riesgo alto de adquirir *C. trachomatis* (Bolaños, 1990).

La infección del cérvix por *C. trachomatis* puede o no manifestarse clínicamente, aunque comúnmente se representa con una descarga mucopurulenta endocervical y ectopia del cuello de la matriz. Los efectos de una infección persistente en las células epiteliales del cérvix son desconocidos. Varios estudios mantienen el concepto de que *C. trachomatis* es usualmente asociada con atipia celular, incluyendo atipia metaplásica y cambios sugestivos de displasia (Bolaños, 1990).

El linfogranuloma venéreo es una enfermedad de transmisión sexual provocada por los serotipos L1, L2 y L3 de *C. trachomatis* que afecta a



hombres y mujeres. Cuando no es tratada puede progresar a tres diferentes estadios. La lesión primaria aparece en los genitales 3-30 días después del contacto sexual. Se forman pápulas, erosiones o úlceras no dolorosas. El estadio bubónico es el segundo, el cual se caracteriza por marcada linfadenopatía, durante el cual los bubones pueden supurar y formar fístulas. Aparece obstrucción linfática en el tercer estadio con presencia de Linfogramuloma venéreo (Bolaños, 1990).

El tracoma consiste en una inflamación crónica de la conjuntiva y de la córnea secundaria a *C. trachomatis*. Los síntomas tempranos incluyen conjuntivitis folicular (no es muy dolorosa), inflamación de párpados (inferior y superior) e irritación ocular. La secuela potencial de ceguera del tracoma incluye distorsión del párpado, triquiiasis y entropión. Estas pueden causar ulceración corneal seguido de pérdida de la visión. El tracoma es la causa más común de ceguera en ciertas partes del mundo. Existe la creencia que se adquiere por contacto indirecto (manos, ropa y toalla). El contacto directo de ojo a ojo, también ha sido propuesto como posible forma de transmisión (Bolaños, 1990).

## 2. *Neisseria gonorrhoeae*

*Neisseria gonorrhoeae* es un diplococo Gram negativo que forma parejas y colonias oxidasa positivas las cuales utilizan la glucosa por lo que se diferencia de otras neisserias y además tiene como único hospedero al hombre. Este agente causa gonorrea que es una infección e inflamación del epitelio cilíndrico y de transición de la mucosa uretral y vías genitales (Martínez & Cabezón, 2003).

La gonorrea está ampliamente distribuida en el mundo y se le reconoció desde tiempos bíblicos. Galeno en el año 130 antes de Cristo acuñó el término gonorrea (que significa en griego salida de flujo o semilla) por la impresión errónea de considerar a la secreción purulenta una espermatorrea. *N. gonorrhoeae* fue identificada por primera vez en 1879 por Albert Neisser a partir de exudados de

pacientes con uretritis y oftalmía neonatal. El aislamiento *in vitro* de la bacteria lo realizaron Leistikow y Loeffler por primera vez en 1882. En 1884 Hans Gram un bacteriólogo Danés facilita la identificación tintorial del agente causal. En 1885 Bumm logró cultivos puros de este microorganismo y demostró la relación etiológica mediante la inoculación en personas voluntarias y en el mismo año Trevisan empleó el nombre definitivo de *N. gonorrhoeae* para esta bacteria (Dore & González, 2009).

## 2.1 Morfología

El género *Neisseria* está formado por 10 especies siendo *N. gonorrhoeae* patógeno humano estricto. La especie bacteriana *N. gonorrhoeae* está constituida por diplococos con forma de riñón o de grano de café Gram negativo no móviles, no esporulados y con un diámetro aproximado de 0.6 a 0.8 mm (de manera individual) (Dore & González, 2009).

El gonococo es un germen muy lábil al calor, temperaturas de refrigeración y a diversos antisépticos. La superficie más externa de su estructura está compuesta por fimbrias que son consideradas como factores de virulencia. También es sensible a la desecación y en condiciones ordinarias puede resistir poco tiempo a la exposición al aire (de 1-2 horas) (Dore & González, 2009).

*N. gonorrhoeae* contiene en su citoplasma varios plásmidos, 95% de las cepas poseen un plásmido pequeño “críptico” con un peso molecular de  $2.4 \times 10^6$  de función desconocida, otros dos plásmidos con pesos moleculares de  $3.4 \times 10^6$  y  $4.7 \times 10^6$  contienen genes que codifican para la producción de  $\beta$ -lactamasa responsable de la resistencia a la penicilina. Estos plásmidos son transmisibles de un gonococo a otro por conjugación. Cabe destacar además que entre 5 y 20% de los gonococos contienen un plásmido con peso molecular de  $24.5 \times 10^6$  con los genes que codifican para la conjugación (Dore & González, 2009).

Cabe destacar que los gonococos son patógenos invasores de mucosa; sin embargo, deben evitar el riesgo de ser eliminados por la descamación de las células epiteliales (vaginales, bucales) y el flujo de los líquidos (flujo vaginal, secreción salival), además se encuentra a merced de la acción de los anticuerpos y deben resistir a la destrucción de los leucocitos polimorfonucleares. Por otra parte, los gonococos se desplazan del lumen de la mucosa a la submucosa en el curso de la infección y algunas cepas pueden invadir la sangre. Esto depende de los factores de patogenicidad y su estructura antigénica (Dore & González, 2009).

Como cualquier bacteria, *N. gonorrhoeae* se reproduce asexualmente por división binaria. Esta división no es completa ya que no se separan los tabiques o septos de cada una de las células que se originan y de allí que se dispongan en pares. Este diplococo es inmóvil, aerobio y/o anaerobio facultativo y crece mejor a una temperatura que oscila entre 35-37°C, en una atmósfera entre 3-5% de CO<sub>2</sub> y con un pH entre 7.2 y 7.6. Los gonococos experimentan autólisis rápida cuando se exponen al aire del ambiente, a la desecación, luz ultravioleta, sales de plata, fenol y calor húmedo a 55°C. Se diferencian de otras especies de *Neisseria* por su capacidad de transformar la glucosa, pero no la maltosa, sacarosa, lactosa, fructosa y manosa en ácido a través de la prueba de agar con tripticasa de cistina (CTA) y por su respuesta positiva en las pruebas de oxidasa y catalasa (Dore & González, 2009).

La transmisión ocurre principalmente por la vía sexual, durante el parto si la madre estuviese contaminada y contacto de las secreciones infectadas con los ojos. La gonorrea se clasifica entre las más comunes infecciones de transmisión sexual en el mundo. La bacteria tiene predilección por el epitelio columnar de la uretra y endocérvix. De hecho, en las mujeres el cérvix es el primer sitio usual de infección. Otros sitios no genitales que también son afectados son el recto, la faringe y la conjuntiva. El microorganismo no

puede infectar a las células del epitelio escamoso que recubre la vagina después de la pubertad. Las pacientes sintomáticas experimentan generalmente flujo vaginal, disuria y dolor abdominal. Entre el 10-20% de las mujeres se observa una infección ascendente, con salpingitis, absceso tuboovárico y enfermedad inflamatoria pélvica (Dore & González, 2009).

## 2.2 Epidemiología

El único huésped natural para *N. gonorrhoeae* es el ser humano. Las tasas de prevalencia e incidencia de gonorrea se han relacionado a factores como edad, sexo, preferencia sexual, raza, estatus socioeconómico, estado civil, área de residencia y nivel de educación; factores que al mismo tiempo influyen en la conducta sexual, el comportamiento de la enfermedad y la accesibilidad a servicios de salud. Entre los individuos sexualmente activos, las mayores tasas de esta infección ocurren en adolescentes, indigentes, personas con bajo nivel educativo, ciudades grandes y en personas solteras, particularmente si viven solas. Estas personas constituyen el “foco” o los “transmisores eficientes”, quienes juegan un papel peligrosamente significativo en lo que respecta a la diseminación de la enfermedad (Dahinten, 1998).

Existen evidencias que la diseminación de la gonorrea, al igual que la de la sífilis y el chancroide, está relacionada con la epidemia de adicción a cocaína, así como en el intercambio de sexo por drogas ilegales como el crack y la cocaína. La incidencia de gonorrea es mayor en hombres, mientras que la prevalencia es mayor en mujeres. La tasa de prevalencia continúa tan alta en las mujeres estadounidenses, que se ha establecido la rutina de realizar cultivos endocervicales para detectar casos de gonorrea en mujeres asintomáticas adultas, o en aquellas que se consideran de alto riesgo debido a su conducta sexual o a los factores demográficos. Sin embargo, debe prestarse mucha atención a la notificación de la pareja sexual, lo cual es más efectivo para el control de la gonorrea que los cultivos endocervicales de

rutina, que resultan difíciles y no se centran en el verdadero “transmisor efectivo” (Dahinten, 1998).

El único y más importante axioma acerca de la epidemiología de esta enfermedad es que la gonorrea usualmente es diseminada por portadores que no tienen síntomas o que ignoran sus síntomas. Generalmente los pacientes sintomáticos, hombres o mujeres, han sido infectados por este tipo de portadores, quienes deben ser contactados y tratados, para prevenir la reinfección. Los pacientes con gonorrea asintomática deben ser entrevistados cuidadosamente para identificar a sus contactos sexuales recientes, quienes deben ser examinados y tratados en caso de presentar infección (Dahinten, 1998).

El riesgo de infección por gonorrea difiere de acuerdo con el sexo de los individuos. Se ha estimado que el riesgo de transmisión de *N. gonorrhoeae* de una mujer infectada a la uretra de su pareja masculina es de aproximadamente 20% por cada exposición y se incrementa entre 60% y 80% después de cuatro exposiciones. Aunque el riesgo de transmisión de hombre a mujer ha sido menos estudiado, se estima que es de aproximadamente 50% por contacto sexual y se incrementa a más de 90% después de tres exposiciones (González & Salas, 1997).

### **3. Virus del papiloma humano**

Los papiloma virus son una familia de virus de doble cadena de ADN de más o menos 8000 pares de bases, son partículas icosaédricas sin envoltorio, de aproximadamente 55nm. Muestran una marcada predilección para infectar células epiteliales y han sido aislados en un amplio espectro de huéspedes. Algunos papiloma virus infectan epitelios cutáneos mientras otros prefieren las mucosas epiteliales. El genoma del virus se divide en tres regiones: la LCR o “Long Control Región”, el origen de la replicación viral, y dos regiones que codifican los genes E de “Early” y L de “Late” (Chiovatero, 2010).

Los genes E son esenciales para conquistar la célula huésped así como para la producción de la progenie viral. Los genes L codifican para las proteínas del capsido viral. La infección se establece en las células basales del epitelio escamoso, estas células están normalmente protegidas por varias capas celulares. El acceso a las células basales se da por microtraumas que las exponen, o bien en la región de la unión escamo-columnar donde éstas están normalmente expuestas. El mecanismo de penetración celular todavía no es claro, hay indicios de que podría ser vía heparán sulfato y ciertas estructuras celulares “integrina” que tapizan las células basales. La replicación viral así como la formación del virión se dan en el estrato terminal del epitelio (Chiovatero, 2010).

Las células de esta capa normalmente están desprovistas de la maquinaria necesaria para la replicación del ADN, pues habiendo alcanzado su madurez son sacadas del ciclo de división celular y son incapaces de mantener la replicación del genoma viral. Por lo tanto, el esfuerzo del virus es asegurar que la célula diferenciada mantenga los mecanismos necesarios para la replicación viral; en práctica ha logrado una estrategia de replicación que desacopla la proliferación y la diferenciación celular. Este mecanismo produce las lesiones hiperproliferativas conocidas como verrugas. A su vez cuando el mecanismo de replicación comete errores, se producen lesiones malignas que pueden comprometer la salud del huésped. Dependiendo del tipo de lesión el virus se clasifica como de bajo riesgo (verruga o bien condiloma acuminata) o de alto riesgo (neoplasia intraepitelial cervical -NIC-) (Chiovatero, 2010).

El evento característico que define una cepa de alto riesgo es la integración de parte del genoma viral al ADN celular, si bien la integración no ocurre en un lugar específico del cromosoma del huésped en cambio sigue un patrón específico con respecto al genoma viral. El segmento mínimo retenido incluye a los genes L1, LCR, E6, E7 y E1. Consistentemente hay abrogación del gen E2, este codifica para una proteína que, entre otras funciones, actúa como represor de

E6 y E7. La pérdida de E2 por lo tanto permite un aumento en la codificación de E6 y E7 que son factores de malignidad (Chiovatero, 2010).

El objetivo principal del virus es tomar el control de la célula diferenciada, que normalmente se encuentra en un estado de quiescencia, para devolverla a su estado replicativo. Para el efecto se necesita deshabilitar los controles del ciclo celular y el virus lo logra actuando principalmente sobre la pRB (proteína del retinoblastoma), la p53 y la telomerasa. La pRB actúa en el ciclo celular inhibiendo el factor de transcripción E2F indispensable para la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ADN. El control sobre la pRB normalmente es llevado por una quinasa dependiente de ciclina que fosforila la pRB inactivándola, lo cual permite que la E2F se mantenga en su estado activo e induzca el paso de G1 a S en el ciclo celular. En su forma no fosforilada la pRB se liga a E2F inhibiéndola y mantiene la célula fuera del ciclo de división en G0 (Chiovatero, 2010).

El producto proteico de E7 actúa sobre pRB inhibiéndolo y por lo tanto mantiene la célula en constante división. La p53, llamada así por su peso molecular, se dispara cuando detecta un daño celular o bien una síntesis aberrante de ADN. Cuando la célula se encuentra en G1 actúa deteniendo el ciclo celular interviniendo sobre el complejo ciclina-cdk que regula la actividad de pRB, permitiendo así intervenir sobre el ADN y repararlo. O bien puede disparar la apoptosis vía FASL cuando detecta una síntesis incorrecta de ADN. La vida media de la p53 es breve y se degrada constantemente por medio de la ubiquitina-quinasa acelerando la ubiquitinación de la p53 y por lo tanto aumentando sus proteólisis. El resultado de la acción de las dos oncoproteínas virales E6 y E7 es descontrolar los puntos de control de la replicación celular permitiendo no solo un retorno de la célula diferenciada en el ciclo celular sino que células aberrantes continúen su división y se perpetúen (Chiovatero, 2010).

Los cromosomas en las células normales están protegidos en sus extremidades por secuencias de G que se repiten en tándem, o bien telómeros. En cada división celular estas estructuras se acortan y la telomerasa se encarga de repararlas. Las células diferenciadas no poseen normalmente actividad telomerasica, por lo tanto pueden dividirse solamente un número limitado de veces antes que los telómeros se acorten a una longitud crítica y las células se saquen de la fase proliferativa. La proteína viral E6 incrementa la actividad telomerasica permitiendo que la célula se mantenga en el ciclo de división celular. Por sí solas las proteínas virales no son suficiente causa para determinar los procesos cancerosos, pero están asociadas al descontrol que provocan en las células y a eventos que pueden desencadenar cambios malignos a nivel celular son los causantes de los procesos cancerosos (Chiovatero, 2010).

Los virus del papiloma humano (VPH) son un grupo de más de 100 virus relacionados. Algunos de ellos se asocian a con papilomas genitales que son tumores benignos no cancerosos y de allí se deriva su nombre. Algunos VPH se asocian con ciertos tipos de cáncer y se denominan VPH oncogénicos, de alto riesgo o carcinogénicos. Algunos tipos de VPH se consideran de bajo riesgo porque raramente causan lesiones que terminen en cáncer. Los tipos de VPH de alto riesgo transmitidos sexualmente incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 73 (Torres, 2011).

Estos causan crecimientos anormales en el cuello del cérvix que usualmente son planos y casi invisibles, comparados con las verrugas externas asociadas con los VPH de bajo riesgo: VPH 6 y 11. Los tipos 16 y 18 en conjunto causan aproximadamente el 70% de los casos de cáncer cervical. No obstante, la mayoría de infecciones por VPH de alto riesgo se eliminan espontáneamente y no causan cáncer. El VPH es un agente que causa infección extraordinariamente común, es más, se considera como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente. Casi cada persona sexualmente activa se expone por lo menos una vez, si no más, a uno de los 15 virus carcinogénicos. Una persona infectada con VPH



fácilmente deja de estarlo, no se sabe por qué o cómo la mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente. El problema radica en la persistencia del VPH, no en la prevalencia puntual del VPH, ya que la persistencia se vincula con la progresión hacia pre-cáncer. Por lo que el mayor problema de los casos persistentes de VPH es la pérdida de seguimiento, ya que, en condiciones ideales, una mujer infectada debe ser evaluada a los seis meses (Torres, 2011).

Así mismo, en 1999 se descubre que la infección por VPH puede persistir algunas veces por muchos años, con o sin causar anomalías celulares o displasia que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer cervical (Torres, 2011).

### 3.1 Epidemiología

La Organización Panamericana de la Salud -OPS- estima que el 79% de los casos de cáncer cervical se encuentran en países en vías de desarrollo y que en América Latina se producen de 5 a 6 muertes por cada 100,000 mujeres. Para el caso concreto de Guatemala, el cáncer de cérvix es la tercera causa de muerte por cáncer en personas mayores de 30 años, siendo la primera causa de mortalidad en mujeres y corresponde al 50% de neoplasias femeninas (García & Vásquez, 2008).

En dos centros de toma del Papanicolaou, Instituto de Cancerología (INCAN) y Asociación Pro Bienestar de la Familia de Guatemala (APROFAM), reportan aproximadamente 5% de los casos algún tipo de lesión intraepitelial de bajo y alto grado cervical; de estos casos el 30% de los casos se evidencia el VPH debido a las imágenes patológicas denominadas coilocitosis (García & Vásquez, 2008).

En diversos países han investigado la presencia del VPH y los serotipos de alto riesgo, pudiendo iniciar diversas medidas preventivas como la aplicación de la vacuna bivalente o tetravalente dependiendo de la frecuencia de los virus. Los estudios en cada región geográfica de las variantes

intratipo, son importantes para establecer una base de datos sobre la diversidad y patogenicidad de distintas especies, tipos y variantes de VPH, que ayude al diseño y optimización de protocolos de tratamiento y vacunación (García & Vásquez, 2008).

El cáncer de cérvix es de impacto sobre la vida de millones de mujeres alrededor del mundo, particularmente aquellas de países en desarrollo. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, ocurren un total de 529,000 casos nuevos de cáncer cervicouterino y 275,000 muertes cada año. Aproximadamente el 83% de casos nuevos ocurren en países en vías de desarrollo en donde constituye la principal causa de muertes por cáncer en mujeres mayores de 35 años. La incidencia de cáncer en la mayoría de países es muy baja antes de los 25 años, aumenta entre los 35 y 40 y llega a su máximo en mujeres entre los 50 y 60 años de edad. El cáncer cervical resulta en la pérdida de aproximadamente 3.02 millones de años potenciales de vida y 3.28 millones de años ajustados por discapacidad (Garcés, 2010).

En Guatemala se ha reportado en un estudio realizado en el periodo de mayo 2007 a abril del 2008 en pacientes que asistieron a los departamentos de colposcopia de APROFAM y del INCAN los siguientes datos; de 99 muestras 45(45.45%) lesiones de bajo grado, 28 (28.28%) lesiones de alto grado, y 26 (26.26%) de cáncer invasor. De estos casos se detectaron virus de alto riesgo en 66 muestras (66.66%). El VPH de alto riesgo fue detectado en 24 casos de 32 (75%) de lesiones de bajo grado, en 17 casos de 33 (73.9%) de lesiones de alto grado y en los 25 casos (100%) de los casos de cáncer invasor. El VPH de alto riesgo más frecuente fue el tipo 16, detectado en el 50% para lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, 50% y en lesión escamosa de alto grado el 47.06% y para cáncer invasor el 60%. El resto de virus detectados de alto riesgo fueron según su orden de frecuencia 58, 18, 59, 53, 31, 51, 39, 56, 33, 66 y 52. Los VPH de alto riesgo en este estudio se

encontraron en todos los casos de cáncer del cérvix y el tipo 16 fue el más frecuente por lo que generó la recomendación para las máximas autoridades de salud de nuestro país, gestionar la vacunación contra el VPH ya que protegería contra el VPH 16 y 18 (García & Vasquéz, 2008).

Las regiones del mundo más afectadas por el cáncer cervicouterino son las más pobres, como América Central y Sudamérica, el Caribe, África subsahariana. Se estima que cada año ocurren cerca de 80,000 casos nuevos de cáncer cervicouterino y 36,000 muertes prevenibles en América Latina. Existen diferencias marcadas entre las subregiones de las Américas. Aproximadamente 1.4 millones de mujeres en todo el mundo viven con cáncer cervical. Este estimado refleja una acumulación de casos y el hecho de que pocas mujeres reciben tratamiento. Adicionalmente y basado en la epidemiología conocida del cáncer cervicouterino, hay actualmente aproximadamente siete millones de mujeres con lesiones precancerosas que necesitan ser diagnosticadas y tratadas (Garcés, 2010).

Si no se detecta y trata de manera oportuna, el cáncer cervicouterino es casi siempre fatal. En países en desarrollo, la tasa de mortalidad es tres veces mayor que la de países desarrollados. La muerte de una madre compromete la salud de la familia de manera dramática, especialmente la salud de los niños. Sin embargo, estas muertes son prevenibles (Garcés, 2010).

El prevenir la exposición a subtipos de alto riesgo de VPH por medio de la vacunación sería la forma más efectiva y logísticamente más sencilla de evitar la infección. La vacuna, de reciente creación, podría salvar a cientos de miles de mujeres de este padecimiento, la mayor parte de ellas en los países pobres. La vacuna debe administrarse durante la adolescencia y está planeada originalmente para mujeres, pero en un futuro próximo su uso podría extenderse a los hombres cuando estén en edad de iniciar su vida sexual. Aunque la vacuna ya está disponible en Guatemala, el alto costo de

la vacuna, la hace inaccesible para la gran mayoría de mujeres guatemaltecas (Garcés, 2010).

Los antígenos en los dos tipos de vacunas para el VPH (bivalente y cuadrivalente) actualmente disponibles protegen contra los subtipos 16 y 18, mientras que otros subtipos oncogénicos responsables de aproximadamente el 30% de la carga de la enfermedad restante, no son cubiertos. La vacuna cuadrivalente (Gardasil, Merck & Co, Inc, Whitehouse Station, NJ USA) también provee protección contra las verrugas genitales debidas a los subtipos 6 y 11 (Garcés, 2010).

Las vacunas comercialmente disponibles no van a erradicar completamente los casos de cáncer cervical en Guatemala, ya que no protege con los genotipos aislados en estudios recientes, aunque si se tiene acceso a la vacuna, la misma es recomendable para adolescentes y mujeres vírgenes ya que cualquier mujer que tenga relaciones sexuales está en riesgo de infectarse con VPH (Torres, 2011).

### **C. Métodos tradicionales de diagnóstico**

*Chlamydia trachomatis*: los métodos que eran aceptados en la época de los años 90 para la selección de la infección eran el cultivo celular y diferentes pruebas para la detección de antígenos. Por ejemplo, en el frote directo se usan anticuerpos fluorescentes para la detección de cuerpos de inclusión y los resultados debían ser comparados con los obtenidos por cultivo. Los inmunoensayos con enzimas no habían sido evaluados como las pruebas de inmunofluorescencia y la importancia de la existencia de laboratorios de control regional, para monitorizar el desarrollo de estas y otras pruebas para la detección de antígenos además se debía aconsejar sobre las aplicaciones más apropiadas y problemas de control de calidad (Bolaños, 1990)

La tinción con inmunoperoxidasa (PAP) para la identificación de este agente emplea anticuerpo monoclonal primario específico para todos los serotipos conocidos; así

como otros reactivos de unión y marcaje necesarios para realizar un procedimiento sensible de peroxidasa-antiperoxidasa y por último la determinación de anticuerpos IgG e IgM específicos es de poco valor en el manejo clínico de rutina y se le considera básicamente una herramienta de investigación. La sonda de hibridación (PACE 2 ensayo) se han convertido en la prueba de detección más ampliamente utilizada. Mientras que sus costos son razonables, la sensibilidad de este ensayo es menor que de los ensayos de amplificación. Recientemente, múltiples ensayos de amplificación que permiten una mayor sensibilidad y aumento de la estabilidad de muestras en comparación con los antiguos métodos de diagnóstico se han vuelto disponibles (Chapin, Landers, Lauderdale, & Thorneycroft, 1999).

*Neisseria gonorrhoeae*: para la identificación del gonococo desde los años 80 se ha empleado la tinción o coloración de Gram luego en los años 60 se introduce el test de anticuerpos fluorescentes para la identificación de esta especie sin embargo años más tarde se desarrolla el medio de cultivo selectivo con antibióticos para favorecer el crecimiento confirmando la identificación con pruebas bioquímicas. De esa época a la actualidad han existido modificaciones en los medios de cultivo para favorecer el crecimiento es por eso que las técnicas de cultivo poseen un mayor grado de sensibilidad respecto a los análisis microscópicos (Dore & González, 2009).

**Virus del papiloma humano:** la detección de la infección por este agente puede realizarse mediante distintos métodos lo que se clasifican en tres grupos:

Grupo No. 1: diagnóstico morfológico el cual se basa en la identificación morfológica de las alteraciones citopáticas producidas por el virus en las células escamosas, las cuales pueden observarse tanto en el examen citológico como en el estudio histológico.

Grupo No. 2: detección de proteínas del virus que se conocen comúnmente como métodos inmunohistoquímicos.

Grupo No. 3: detección de secuencias genómicas del virus también denominadas técnicas de Biología Molecular, las cuales consisten en un análisis cualitativo del ADN. Todas ellas se basan en la detección específica de secuencias de ADN en tejido o bien en tomas de material procedente del área a estudiar (cérvix) y permiten, por lo tanto, identificar el tipo de virus presente en la lesión (Castaño, & Estrada, 2012).

En la actualidad los laboratorios de diagnóstico clínico están recurriendo al empleo de técnicas avanzadas como lo son los métodos de genética molecular para evidenciar la presencia de estos agentes, dejando atrás algunos de los métodos tradicionales antiguamente empleados. El avance de nuestro conocimiento de la genética molecular ha permitido el desarrollo de tecnologías nuevas y revolucionarias que facilitan el análisis detallado de los genes normales y anómalos. La aplicación de estas técnicas ha incrementado la comprensión de los procesos moleculares a todos los niveles, del gen al microorganismo (Thompson, 2006).

La base fundamental de una de las técnicas de Biología Molecular (reacción en cadena de la polimerasa) consiste en las características de la estructura química del ADN y su replicación semiconservativa. Es decir, de acuerdo al modelo del ADN que es un polímero formado por dos cadenas complementarias (cadenas antiparalelas), constituido por unidades de desoxirribonucleótidos de cuatro bases nitrogenadas. Para duplicarse el ADN se separa en sus dos cadenas complementarias; así cada una de ellas sirve de molde o plantilla. Lo que permite producir un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica (amplificarla) (Torres & Baca, 1995).

En la microbiología, la reacción en cadena de la polimerasa se ha utilizado en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, particularmente de aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo (Torres & Baca, 1995).

La sensibilidad de la técnica en la reacción en cadena de la polimerasa es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Y para solventar el problema de la cuantificación se han generado variaciones sobre el esquema inicial de la reacción en cadena de la polimerasa, dando lugar a lo que se conoce como reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (Costa, 2004).

La clave en la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación del genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero la mayoría están basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementando a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. En la PCR tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004).

#### **D. Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiplex**

##### **1. Análisis de ADN**

Las técnicas de Biología Molecular están basadas en la manipulación y detección de gran número de moléculas. Dicho con otras palabras, la tecnología actual no permite, en general, el estudio de moléculas aisladas o únicas. Es por ello que uno de los proyectos de Biología Molecular consiste en la amplificación de secuencias de ADN (Dorado, 2005).

El análisis de ADN está desempeñando un papel de creciente importancia en el refinamiento del diagnóstico de las ITS y en las decisiones sobre el tratamiento (Tom, Kaeda & Bain, 2002).

La información para la producción de proteínas está codificada por cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Estas bases se encuentran distribuidas a lo largo de la “cadena” de azúcares con ácido fosfórico que conforma la molécula de ADN. El ADN que se encuentra en el núcleo de todas las células eucariotas es una molécula de doble cadena y estas cadenas están unidas por puentes de hidrógeno, de forma específica entre los residuos de A y T, y entre los residuos de G y C (Tom, Kaeda & Bain, 2002).

Debido a esto, la secuencia de bases en una cadena de la molécula de ADN (por ejemplo TAGGTAG) sólo tiene una posible pareja en la otra cadena (ATCCATC). Estas secuencias se denominan complementarias. Las cadenas presentan polaridad; un extremo es llamado extremo 5´ y el otro es el extremo 3´. Las dos cadenas corren en direcciones opuestas (esto es, antiparalelas) (Tom, Kaeda & Bain, 2002).

La capacidad para manipular el ADN como moléculas recombinantes fue consecuencia del descubrimiento de las enzimas bacterianas modificadoras de ADN, en concreto de las enzimas de restricción. Éstas son endonucleasas que cortan las moléculas de ADN siempre que se presenta una secuencia de bases específica y corta. Actualmente se han comercializado más de 100 enzimas de restricción diferentes. Utilizando estas enzimas es posible cortar el material genético de los núcleos celulares humanos (el genoma humano) en fragmentos específicos de un tamaño manejable. Con las enzimas modificadoras de ADN necesarias, estos fragmentos específicos de un tamaño manejable. Con las enzimas modificadoras de ADN necesarias, estos fragmentos de restricción pueden insertarse en vectores de clonación como plásmidos (Tom, Kaeda & Bain, 2002).

Los genes pueden ser aislados como moléculas de ADN recombinante clonadas y así establecer su secuencia de ADN. El clonado y la secuenciación del genoma



humano están prácticamente completados. La capacidad de amplificar fragmentos de ADN específicos a partir de pequeñas cantidades de material de partida mediante la reacción en cadena de la polimerasa se ha convertido en la base de la mayoría de los análisis de ADN. Debido a que esta técnica es relativamente simple, rápida y barata y requiere sólo algunas piezas básicas de equipamiento de laboratorio, ha abierto el campo de la genética molecular, permitiendo el acceso al diagnóstico molecular lejos de los centros especializados (Tom, Kaeda, & Bain, 2002).

## 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue desarrollada por Kary Mullis en los años ochenta, al que en 1993 le fue concedido el Premio Nobel de Química. La PCR ha revolucionado la genética molecular, haciendo posible el estudio y análisis de una amplia gama de genes (Torres & Baca, 1995).

Se considera la PCR como una clonación *in vitro*, en el sentido de que se puede amplificar en un tubo de ensayo una secuencia de ADN determinada millones de veces y además en un tiempo mínimo de horas o incluso minutos. La PCR puede amplificar selectivamente una sola molécula de ADN o ARN varios miles de millones de veces en período de tiempo corto y ha mejorado el diagnóstico y el análisis molecular de las enfermedades génicas. La PCR consiste en una amplificación enzimática de un fragmento de ADN (diana) localizado entre dos oligonucleótidos (cebadores). Estos cebadores están diseñados de forma que uno de ellos es complementario a una cadena de una molécula de ADN en el lugar opuesto de la secuencia diana. Por tanto, los oligonucleótidos cebadores flanquean la secuencia diana y sus extremos 3' están dirigidos hacia la secuencia diana a amplificar. Después, se usa la ADN polimerasa para sintetizar dos nuevas cadenas de ADN usando como plantilla la secuencia que se localiza entre los cebadores (Thompson, 2006).

En microbiología resulta muy valiosa la PCR para el diagnóstico precoz de enfermedades infecciosas y en la identificación de microorganismos ya que usando los cebadores apropiados pueden amplificarse secuencias específicas que generan patrones de bandas típicos de cada especie e incluso de cada género (Dorado, 2005).

Las cadenas recién sintetizadas de ADN son en sí mismas complementarias y pueden formar una segunda copia de la secuencia diana original. Repetidos ciclos de desnaturalización con calor, hibridación de los cebadores y síntesis enzimática de ADN dan como resultado una amplificación exponencial de la secuencia diana de ADN. El resultado es la generación de un número asombroso de copias del segmento de ADN existente entre los cebadores, hasta que desaparecen por completo los sustratos (cebador, desoxinucleótidos). Utilizando termocicladores diseñados al efecto, una ronda de amplificación requiere sólo unos minutos. De este modo en pocas horas pueden crearse billones de copias de una molécula de ADN (Thompson, 2006).

La rápida amplificación mediante PCR de secuencias específicas puede utilizarse para facilitar la clonación de genes a partir de muestras de ADN y para analizar sus mutaciones. El análisis del ADN generado mediante PCR se puede llevar a cabo en menos de un día, facilitando en gran medida el desarrollo y la aplicación clínica de muchas pruebas diagnósticas de ADN (Thompson, 2006).

La PCR es una técnica extraordinariamente sensible, que además es más rápida, barata, sensible y sencilla que cualquier otro método de análisis de los ácidos nucleicos. Permite la detección y el análisis de determinadas secuencias de un gen en una muestra de un paciente sin necesidad de clonación ni de transferencias Southern o Northern. Puede efectuarse análisis incluso a partir de las pocas células obtenidas de un enjuague bucal, de una única célula obtenida en un embrión de tres días constituido por 4-8 células, del esperma recuperado de la vagina de una víctima de violación o de una gota de sangre seca en la escena del

crimen. De esta forma la PCR ha eliminado la necesidad de preparar grandes cantidades de ADN o ARN a partir de muestras de tejidos. La PCR se está convirtiendo rápidamente en un método estándar para el análisis de muestras de ADN o de ARN en laboratorios de investigación, de diagnóstico clínico molecular y forense (Thompson, 2006).

La amplificación múltiple es el método que se usa para amplificar más de un fragmento simultáneamente durante un proceso de PCR. Los cebadores deben elegirse de forma que no hibriden entre sí y que generen fragmentos de tamaños diferentes para que puedan separarse adecuadamente por electroforesis en gel. Al aumentar el número de fragmentos que se amplifican a la vez, hay que aumentar el tiempo de extensión que puede ser de hasta varios minutos por ciclo (Buitrago, 2010).

Cuando se realice este proceso deben extremarse las precauciones para minimizar la formación de aerosoles y otras posibilidades de contaminación. Deben separarse físicamente las áreas del laboratorio donde se efectúen la PCR de aquellas en las que se analicen los productos de la reacción (Buitrago, 2010).

El método más empleado para analizar los productos del proceso de PCR es la electroforesis en gel. Se utilizan geles de agarosa o de poliacrilamida, según el tamaño de las secuencias de ADN amplificadas. Los productos de amplificación separados en el gel pueden visualizarse directamente con colorantes fluorescentes como el bromuro de etidio (Buitrago, 2010).

La forma más frecuente de identificar los productos del proceso de PCR es usar sondas marcadas en fase sólida o en fase líquida. Las sondas pueden marcarse con isótopos radioactivos o con marcadores no radioactivos. El isótopo radioactivo más utilizado para este fin es el  $^{32}\text{P}$ . Para la rutina de los laboratorios clínicos se prefieren los marcajes no radioactivos. Se han utilizado sondas de oligonucleótidos marcadas con ésteres de acridinio, peroxidasa, fosfatasa

alcalina, digoxina, colorantes fluorescentes y quimioluminiscencia (Buitrago, 2010).

Los productos del proceso de PCR pueden secuenciarse para su detección. Tras eliminar los desoxinucleótidos y los cebadores que no se hayan utilizado, el producto de doble cadena podrá secuenciarse por los métodos habituales (Buitrago, 2010).

#### IV.JUSTIFICACIÓN

Con el presente trabajo se pretendió llevar a cabo el diseño y validación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiplex (PCR-M) punto final con la finalidad de realizar el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y Virus del Papiloma Humano (VPH), que ocasionan Infecciones de Transmisión Sexual (ITS).

La determinación en Biología Molecular de estos microorganismos suministra valiosa información acerca del diagnóstico temprano de estas ITS en personas que han estado en riesgo de contraerlas y contribuye a la identificación y control de estos agentes.

La importancia de realizar este esfuerzo en validar la metodología en PCR múltiplex se debió a que puede ser replicada a nivel nacional y permitir un diagnóstico especializado de estos tres agentes etiológicos de ITS, a costos sustentables para la realidad económica del país.

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

Validar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiplex para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y virus del papiloma humano en muestras cervicales.

### B. Objetivos Específicos

1. Estandarizar la amplificación de forma individual de segmentos diana de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y virus del papiloma humano en muestras cervicales por medio de reacción en cadena de la polimerasa.
2. Estandarizar la amplificación de forma simultánea de segmentos diana de ADN de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y virus del papiloma humano en muestras cervicales por medio de reacción en cadena de la polimerasa múltiplex.
3. Validar el funcionamiento de PCR múltiplex en muestras cervicales de trabajadoras del servicio sexual que asisten al Centro de infecciones de transmisión sexual No. 2 (ITS) de la zona 3 de la ciudad capital.
4. Establecer la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de PCR múltiplex al compararla con una prueba de referencia comercial (PCR tiempo real Fast-Track Diagnostics).

## **VI.HIPÓTESIS**

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiplex para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y virus del papiloma humano presenta una sensibilidad y especificidad comparables al método de referencia.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Universo**

Trabajadoras del servicio sexual que asisten al Centro Especializado de Infecciones de Transmisión Sexual No.2 (ITS) de la zona 3 de la ciudad capital.

#### 1. Muestra

Se evaluaron 203 muestras cervicales de pacientes trabajadoras del servicio sexual.

#### 2. Recursos humanos

- Asesores: Flora Eugenia Arana Figueroa, Ph.D  
M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán
- Presentado por: Br. Robert Samuel García Martínez
- Personal profesional y técnico del Centro Especializado de Infecciones de Transmisión Sexual No. 2 de la zona 3 de la ciudad capital
- Personal de la Unidad Central de Referencia en Virología del Laboratorio Nacional de Salud

### **B. Materiales**

#### 1. Equipo

- Campana de Flujo Laminar clase II
- Centrífuga Refrigerada
- Congelador de -80°C
- Incubadora de 37°C
- Mezclador tipo Vortex
- Microscopio
- Termociclador Applied Biosystem (gene amp® PCR system 9700)



## 2. Reactivos

- Agua destilada estéril grado PCR
- Cebadores (KL1, KL2, HO1, HO3, MY09, MY011)
- Cepa liofilizada de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226
- Colorantes para la tinción de Gram (cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina)
- DNA polimerasa
- DNTPS (Desoxirribonucleótidos de Trifosfato)
- Etanol Absoluto grado reactivo (para almacenamiento de muestras a -80°C)
- Etanol al 70% (para la extracción de ADN)
- MgCl<sub>2</sub>
- Proteinasa K
- Solución de precipitación
- Tampón para lisis TAE

## 3. Materiales

- Cepillos para toma de muestras cervicales (CITOBUSH)
- Fósforos
- Gradillas para tubos cónicos
- Hielera con baterías
- Hisopos de madera
- Hisopos (PACE2) para toma de muestras uretrales
- Laminillas de vidrio “portaobjetos”
- Papel limpia lentes
- Papel parafilm
- Pinzas
- Puntas para pipetas automáticas (5, 10, 50 y 100 µL)
- Tijeras
- Tubos cónicos de 20 mL (FALCON)

## C. Métodos

1. Primera fase: estandarización primaria de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
  - a. Controles positivos de *C. trachomatis*: se recolectaron 5 muestras uretrales de pacientes sintomáticos y que tenían diagnóstico de una prueba rápida con sonda de ADN basada en la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (PACE2).
  - b. Verrugas cutáneas: se recolectaron 5 verrugas correspondientes de pacientes del Centro Especializado de ITS zona 3 como de clínicas periféricas, para evaluar virus del papiloma humano y con diagnóstico de PCR-Tiempo real.
  - c. Se reconstituyó la cepa liofilizada de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 para control interno positivo de la amplificación.
  - d. Extracciones del Ácido Desoxirribonucleico (ADN): se extrajo de cada uno de los controles recolectados el ADN de la siguiente manera:
    - Se extrajo el hisopo y/o cepillo del contenedor limpiándolo cuidadosamente contra el borde del mismo recuperando la mayor cantidad de material
    - Se centrifugó a 12,000 rpm durante cinco minutos
    - Se descartó el sobrenadante y se agregaron 600 µL de la solución de lisis celular con Proteinasa k
    - Se incubó a 55°C durante 24 horas
    - Se retiró de la incubadora y se llevó a temperatura ambiente (37°C)
    - Se agregaron 300 µL de Solución de Precipitación (previamente se realizaron soluciones de trabajo, transporte, se llevó a cabo la lisis y precipitación buffer) y se agitó con vortex durante 20 segundos
    - Se incubó 5 minutos sobre hielo (10°C)
    - Se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 5 minutos
    - Se transfirió el sobrenadante en un tubo cónico de polipropileno conteniendo 600 µL de isopropanol y se mezcló
    - Se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto

- Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se agregaron 600 µL de etanol al 70%
  - Se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto
  - Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire el botón
  - Se agregaron 100 µL de agua destilada estéril grado PCR
- e. Estandarización de PCR individual y PCR múltiplex: se utilizaron las muestras previamente descritas para estandarizar el procedimiento de PCR múltiplex. Se emplearon los siguientes primers KL1, KL2, HO1, HO3, MY09, MY011.
- *Chlamydia trachomatis*, se utilizaron  
 KL1: 5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3'  
 KL2: 5'-AATCAATGCCCGGGATTGGT-3'  
 Esperando un amplificado de 241 pares de bases (pb).
  - *Neisseria gonorrhoeae*, se utilizaron  
 HO1: 5'-GCTACGCATACCCGCGTTGC-3'  
 HO3: 5'-CGAAGACCTTCGAGCAGACA-3'  
 Esperando un amplificado de 390 pares de bases (pb).
  - Amplificación región L1 del VPH, utilizando los cebadores consenso  
 MYB09: 5'-CGTCCAAGAGGATACTGATC-3'  
 MYB11: 5'-GCACAGGGACATAATAATGG-3'  
 Esperando un amplificado de 450 pares de bases (pb).

- Se procedió a realizar una curva, utilizando el control positivo, para establecer la mejor concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizando las siguientes condiciones:

Volumen final de Reacción 50 µL

DNA polimerasa 2.0 U

Gotaq® Hot Start Colorless  
Master Mix

DNTPS 200 mM

Cebadores 0.5 uM

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 4 mM

ADN muestra de 100 a 200 ng

- Las amplificaciones fueron procesadas en el termociclador Applied Biosystems (gene amp® PCR system 9700), el cual llevó a cabo 40 ciclos. Cada ciclo constó de las siguientes condiciones:

Desnaturalización 95°C por 10 minutos

Desnaturalización 95°C por 1 minuto

Alineamiento 55°C por 1 minuto

Elongación 72°C por 1 minuto

Extensión terminal 72°C por 5 minutos

} 40 ciclos

- Lectura de la corrida: los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 0.8 y 2%, conteniendo 1% de “gel red”, y se utilizó 100 volts, visualizándolos en un transiluminador de rayos ultravioleta

2. Segunda fase: validación del funcionamiento del PCR múltiplex en muestras cervicales de trabajadoras del servicio sexual.

a. Toma de muestra: se muestreó, con un cepillo cónico “citobrush”, la porción proximal del canal endocervical. El cepillo una vez tomada la muestra se introdujo en un tubo cónico de Falcon con capacidad de volumen de 10 mL que contenía 2 mL de alcohol absoluto grado reactivo el cual se almacenó a -80°C hasta la realización del PCR múltiplex.

b. Preparación de la mezcla de amplificación proporcionando las condiciones para un PCR múltiplex

- Volumen final de Reacción 25 uL
- DNA polimerasa 2.0 U
- DNTPS 200 mM

- Cebadores 0.5 uM
- MgCl<sub>2</sub> 4 mM
- ADN muestra de 100 a 200 ng

Las amplificaciones fueron procesadas en el termociclador Applied Biosystems (gene amp® PCR system 9700), el cual llevó a cabo 40 ciclos. Cada ciclo consta de las siguientes condiciones:

- Desnaturalización 95°C por 10 minutos
  - Desnaturalización 95°C por 1 minuto
  - Alineamiento 55°C por 1 minuto
  - Elongación 72°C por 1 minuto
  - Extensión terminal 72°C por 5 minutos
- } 40 ciclos

Lectura de la corrida: los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 2%, conteniendo 1% de “gel red” y se utilizó 100 volts, visualizándolos en un transiluminador de rayos ultravioleta.

- c. Los resultados fueron comparados con un PCR en tiempo real (Fast Track Diagnostics); y se introdujeron en una tabla 2x2 con la finalidad de obtener la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de PCR múltiplex al compararla con una prueba de referencia comercial.

#### **D. Diseño de la investigación**

1. Tipo de estudio: prospectivo y transversal. Estandarización de prueba diagnóstica y validación de la misma.
2. Muestra: el tamaño de la muestra para que sea estadísticamente significativa utilizando un nivel de confianza de 95% fue de 203 muestras cervicales de trabajadoras del servicio sexual que acuden al centro de salud zona 3, dato calculado con el programa Epi-dat 3.1 esperando obtener un límite de error para la estimación de 3%.
3. Análisis estadístico:
  - Los métodos estadísticos que se utilizaron para el análisis de resultados fueron exactitud o fiabilidad de la prueba diagnóstica que se llevó a cabo elaborando tablas de contingencia de 2x2 realizando una comparación de la prueba evaluada con los resultados del método de referencia, desarrollando las tablas por microorganismos individuales para lo cual se necesitó una tabla por cada agente a evaluar (tres). Además se calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (negativos y positivos) (ver anexo 1).
  - Para la estandarización se compararon los resultados de los controles de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y VPH con la prueba estándar de PCR tiempo real de cada microorganismo y se esperó correlación del 100%.

## VIII. RESULTADOS

En la estandarización individual y simultánea se observaron bandas de amplificadas para *C. trachomatis* de un tamaño igual a 241pb (carril 3), para *N. gonorrhoeae* 390pb (carril 4) y para VPH 450pb (carril 5). Los fragmentos generados se compararon con el marcador de peso molecular de 100pb ADN Ladder (carril 1), observar que las bandas de 390pb y 450pb

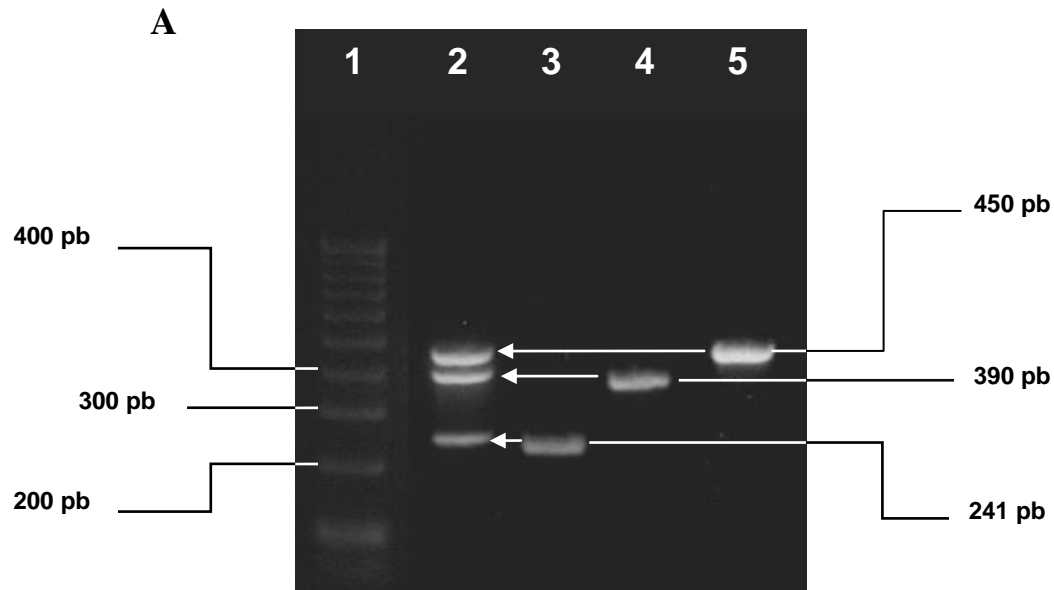


Figura 1. Estandarización y validación del PCR-M. **A) Estandarización individual y simultánea de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y VPH.** Carriles: 1. peso molecular 100 pb ADN Ladder; 2. control positivo; 3. ADN *C. trachomatis*; 4. ADN *N. gonorrhoeae*; 5. ADN virus del papiloma humano.

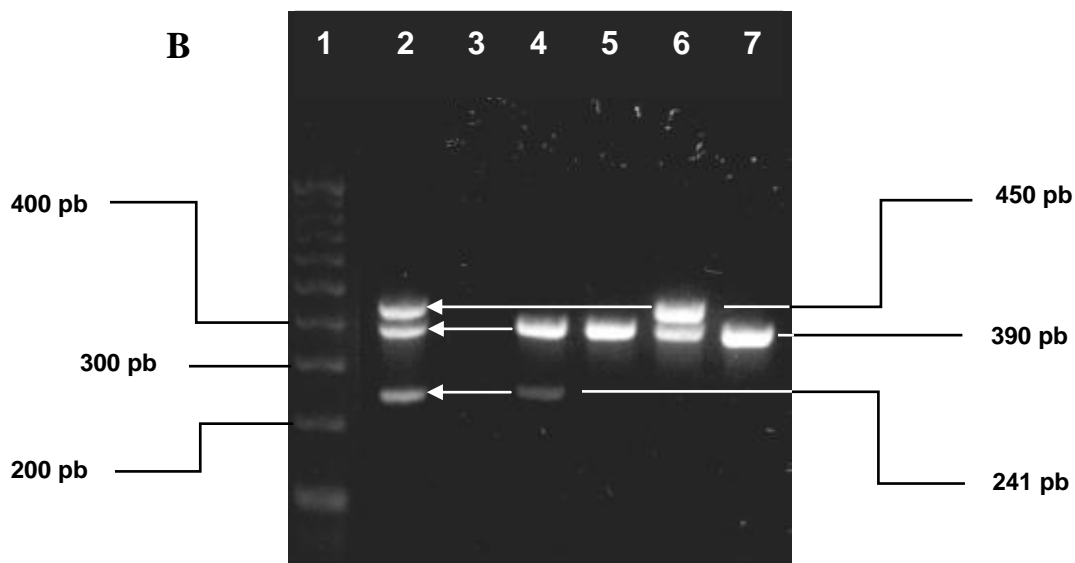


Figura 2. Estandarización y validación del PCR-M. **B) Validación del PCR-M.** Carriles: 1. peso molecular 100 pb ADN Ladder; 2. control positivo; 3. control negativo; 4. ADN *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*; 5 y 7. ADN *N. gonorrhoeae*; 6. ADN *N. gonorrhoeae* y VPH.

(carril 2) se encuentran posicionadas a una distancia próxima como se muestra en la Figura 1 (A). Los productos obtenidos en una de las corridas de la validación de la técnica de PCR-M identifican a los tres agentes de manera simultánea como se ejemplifican en la Figura 2 (B). Se observaron 4 muestras, una positiva para *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* (carril 4), dos positivas solo para *N. gonorrhoeae* (carriles 5 y 7) y una positiva para *N. gonorrhoeae* y VPH (carril 6), con el control positivo (carril 2) y control negativo (carril 3). Todos los productos obtenidos se compararon con el marcador de peso molecular de 100pb ADN Ladder (carril 1).

### Gel de agarosa al 2% con 1% de gel red

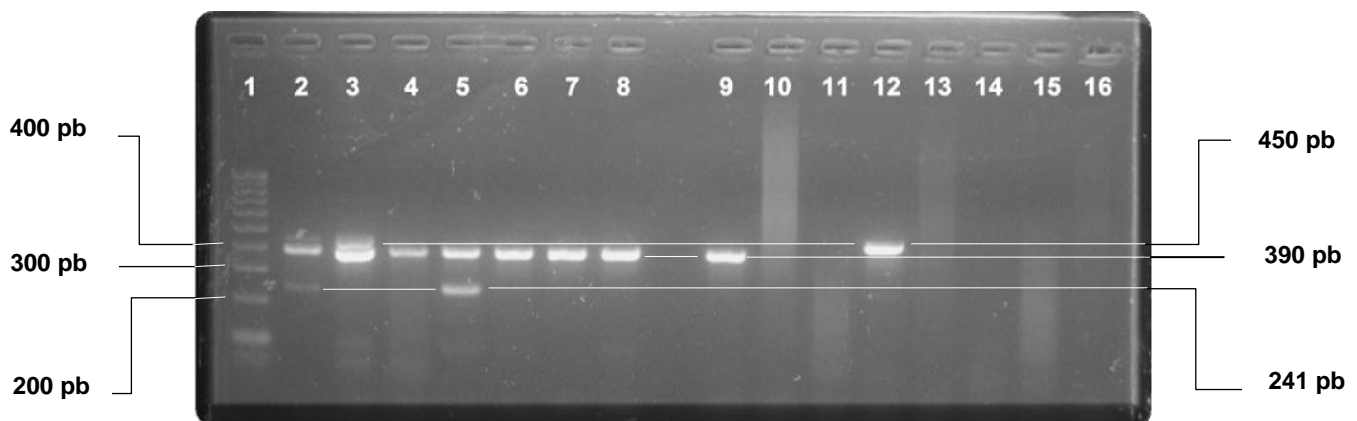


Figura 3. Validación del PCR-M convencional vrs PCR tiempo real (Fast-track Diagnostics) Carriles: 1. peso molecular 100 pb ADN Ladder; 2. control positivo; 3. ADN *N. gonorrhoeae* y VPH; 4, 6, 7, 8 y 9. ADN *N. gonorrhoeae*; 5. ADN *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*; 12. ADN VPH; 10, 11, 13, 14, 15 y 16. Negativo.

El revelado de una de las corridas de la validación del PCR-M convencional se presenta en la Figura 3, en la cual se aprecia la corta distancia entre el fragmento de ADN de *N. gonorrhoeae* y VPH que amplificó para ambos agentes en la misma muestra (carril 3), 5 muestras fueron positivas solo para *N. gonorrhoeae* (carriles 4, 6, 7, 8 y 9), una muestra fue positiva para *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* (carril 5), una muestra fue positiva para VPH (carril 12) y 6 muestras fueron negativas (carriles 10, 11, 13, 14, 15 y 16).



Se evaluaron un total de 203 muestras para luego realizarse la tabulación de datos, con el propósito de obtener los valores comparados con el patrón de referencia (estándar de oro), como se muestra en la Tabla No.1, la cantidad de verdaderos positivos fueron para *C. trachomatis* 6, *N. gonorrhoeae* 72 y VPH 53. Los verdaderos negativos para *C. trachomatis* 176, *N. gonorrhoeae* 110 y VPH 68; la cantidad de falsos positivos para *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* 21, y para VPH 5. Y se obtuvieron únicamente resultados de falsos negativos para VPH que fueron de 77.

Tabla 1. Resultados de la evaluación del PCR-M convencional vrs PCR-Tiempo Real (Fast-track Diagnostics)

| PCR-M convencional           | Verdaderos Positivos | Verdaderos Negativos | Falso Positivo | Falso Negativo | Total |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------|----------------|-------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 6                    | 176                  | 21             | 0              | 203   |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 72                   | 110                  | 21             | 0              | 203   |
| VPH                          | 53                   | 68                   | 5              | 77             | 203   |

VPH: Virus del Papiloma Humano

Fuente: Análisis base de datos de la validación

La sensibilidad y especificidad para cada agente etiológico de ITS se describen en la Tabla 2 en donde la prueba de PCR múltiplex presentó para la detección de *C. trachomatis* una sensibilidad de 100% (IC95%, 61.0-100.0) y especificidad de 89% (IC95%, 84.3-92.9), para *N. gonorrhoeae* la sensibilidad fue de 100% (IC95%, 94.9-100.0) y especificidad de 84% (IC95%, 76.7-89.3) y para VPH la sensibilidad fue de 41% (IC95%, 32.7-49.4) y especificidad de 93% (IC95%, 84.9-97.0).

Tabla 2. Sensibilidad y Especificidad de la PCR-M convencional evaluada vrs PCR-Tiempo Real (Fast-track Diagnostics)

| PCR-M convencional           | Sensibilidad % | IC 95%       | Especificidad % | IC 95%      |
|------------------------------|----------------|--------------|-----------------|-------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 100            | 61.0 – 100.0 | 89              | 84.3 – 92.9 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 100            | 94.9 – 100.0 | 84              | 76.7 – 89.3 |
| VPH                          | 41             | 32.7 – 49.4  | 93              | 84.9 – 97.0 |

IC 95%: Intervalo de Confianza 95%

VPH: Virus del Papiloma Humano

Fuente: Análisis base de datos de la validación

Se determinó el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de la prueba, y de acuerdo con la Tabla 3, *C. trachomatis* el VPP fue de 22% (IC95%, 10.6-40.8) con VPN 100% (IC95%, 97.9-100.0), *N. gonorrhoeae* presentó VPP de 77% (IC95%, 67.9-84.7) con VPN 100% (IC95%, 96.6-100.0) y para VPH el VPP fue de 91% (IC95%, 81.4-96.3) y VPN de 47% (IC95%, 39.0-55.0).

Tabla 3. Valor predictivo positivo y Valor predictivo negativo de la PCR-M convencional evaluada vrs PCR-Tiempo Real (Fast-track Diagnostics)

| PCR-M convencional           | VPP % | IC 95%      | VPN % | IC 95%       |
|------------------------------|-------|-------------|-------|--------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 22    | 10.6 – 40.8 | 100   | 97.9 – 100.0 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 77    | 67.9 – 84.7 | 100   | 96.6 – 100.0 |
| VPH                          | 91    | 81.4 – 96.3 | 47    | 39.0 – 55.0  |

IC 95%: Intervalo de Confianza 95%

VPP: Valor Predictivo Positivo

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPH: Virus del Papiloma Humano

Fuente: Análisis base de datos de la validación

El Coeficiente *Kappa* de la prueba se aprecia en la Tabla 4, la cual señala para *C. trachomatis* fue de 0.33 (IC95%, 0.06-0.60), para *N. gonorrhoeae* 0.79 (IC95%, 0.70-0.87) y para VPH 0.28 (IC95%, 0.16-0.40).

Tabla 4. Coeficiente *Kappa* de la PCR-M convencional evaluada vs PCR-Tiempo Real (Fast-track Diagnostics)

| PCR-M convencional           | Coeficiente <i>Kappa</i> | Intervalo de confianza 95% |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 0.33                     | 0.06 – 0.60                |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 0.79                     | 0.70 – 0.87                |
| Virus del Papiloma Humano    | 0.28                     | 0.16 – 0.40                |

Fuente: Análisis base de datos de la validación

En la Tabla 5 se muestra la comparación de precios y se detalla en Quetzales por prueba para PCR-M convencional es de 113.12, para PCR-Tiempo Real es de 536.80 y por costo total 22,625 para PCR-M convencional y 51,532 para PCR-Tiempo Real.

Tabla 5. Comparación de precios por prueba PCR-M convencional evaluada vs PCR-Tiempo Real (Fast-track Diagnostics)

| Prueba             | Precio por prueba (Q) | Costos totales (Q) |
|--------------------|-----------------------|--------------------|
| PCR-M convencional | 113.12                | 22,625             |
| PCR-Tiempo Real    | 536.80                | 51,532             |

Fuente: Análisis financiero del estudio

## IX. DISCUSIÓN

En el presente estudio se planteó establecer las condiciones óptimas para lograr la estandarización individual y simultánea de los segmentos diana de ADN de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y VPH, las pruebas empleadas se basaron en cambiar la concentración de primer, variar los ciclos del termociclador con sus temperaturas y para el revelado de los amplificadores se varió la concentración del gel de agarosa y el voltaje de la electroforesis, se debe mencionar también que se realizaron pruebas con el transiluminador de rayos ultravioleta debido a que el programa de software no constaba de su actualización. Teniendo el procedimiento estandarizado se procedió a conocer el funcionamiento de la técnica de PCR-M convencional. Paralelamente las muestras fueron corridas con el PCR-tiempo real (Fast-track Diagnostics), que fue tomado como el estándar de oro.

Los valores generales obtenidos para *C. trachomatis* fueron 6 verdaderos positivos, 176 verdaderos negativos, 21 falsos positivos y 0 falsos negativos. Para *N. gonorrhoeae* fueron 72 verdaderos positivos, 110 verdaderos negativos, 21 falsos positivos y 0 falsos negativos, lo que se considera para ambos microorganismos esta cantidad de falso positivo (10%) no significativo debido al bajo porcentaje en relación al total. Y para el virus del papiloma humano fueron 53 verdaderos positivos, 68 verdaderos negativos, 5 falsos positivos y 77 falsos negativos, la proporción de falsos negativos (34%) es considerada estadísticamente significativa.

En la estandarización individual y simultánea del PCR-M convencional se llevaron a cabo varias pruebas en las que se modificaron las condiciones para lograr la amplificación de los segmentos de ADN correspondientes a los tres agentes de ITS evaluados en este estudio, realizando diluciones de la solución madre de primer para disminuir la concentración y obtener soluciones de trabajo de 10 $\mu$ M y 5 $\mu$ M, además se estableció la concentración óptima del cloruro de magnesio de 4mM empleando como temperatura de hibridación de primer 55<sup>0</sup>C; se estableció un volumen final de reacción de 25 $\mu$ L y se varió la concentración del gel de agarosa preparándolo al 2%. Los fragmentos de ADN obtenidos en la amplificación se observaron según su peso molecular esperado, en las regiones para *C. trachomatis* 241pb, para *N. gonorrhoeae* 390pb y para VPH fue de 450pb (Chernesky, Krepel, Luinstra, Mahony, Sellors & Tyndall, 1995).

Los productos de ADN conseguidos en la validación del PCR-M convencional se amplificaron de manera simultánea según los agentes presentes en las muestras cervicales, como se esperaba fueron observados en las tres regiones diferentes (241pb, 390pb y 450pb), sin embargo para realizar la lectura de los productos se tuvo a la vista la corta distancia existente entre las bandas de 390pb y 450pb, lo que dificultó su lectura considerándose este aspecto de la técnica como desventaja para el diagnóstico de los agentes implicados (González, 2008).

*C. trachomatis* presentó sensibilidad de 100% demostrando que la prueba tiene alta capacidad para detectar la presencia del agente sin embargo la especificidad fue de 89%, este dato revela que la capacidad para detectar la ausencia de este microorganismo disminuye. Para *N. gonorrhoeae* la sensibilidad fue de 100% y se deduce que posee una alta capacidad para detectar la presencia de la bacteria, la especificidad fue de 84% este dato evidencia que la capacidad para detectar la ausencia es baja (Lee, Pappu, & Vigliotti, 2009). Para el virus del papiloma humano la sensibilidad fue de 41%, a diferencia de los anteriores agentes para este es bajo y es posible que se deba este comportamiento a la degradación del material genético y a la baja estabilidad que se considera más lábil que el de las bacterias evaluadas (Alessandro, Blanco, Caraballo & García).

Además toman un papel importante los factores externos como lo son el transporte de la muestra y la extracción del ADN, estos factores son puntos críticos para la detección de la presencia y ausencia de estos microorganismos en muestras cervicales. Y la especificidad fue de 93%, manifestando que la capacidad para detectar la ausencia del virus es alta. Como parte de la validación de la técnica se determinó la probabilidad de que los agentes estudiados estuvieran presentes y ausentes en las muestras evaluadas, se encontró para *C. trachomatis* un valor predictivo positivo de 22% y valor predictivo negativo de 100%, y para *N. gonorrhoeae* el valor predictivo positivo de 77% y valor predictivo negativo de 100%, estos datos nos indican que para estos dos agentes la probabilidad de presencia es baja y la probabilidad de la ausencia es alta. Ahora bien para VPH el valor predictivo positivo de 91% y valor predictivo negativo de 47%, esto nos revela la elevada

probabilidad de presencia del virus y la baja probabilidad de ausencia (Castillo, Espinoza & Samayoa, 2007).

Por último se llevo a cabo la determinación del coeficiente *kappa*, el cual indica para *C. trachomatis* un valor de 0.33 y para el virus del papiloma humano de 0.28 los cuales dentro de la escala de concordancia (anexo 2), están clasificados como sufribles estos valores y se catalogan debajo de lo aceptable, lo cual nos expone que la concordancia de los resultados comparados con el estándar de oro poseen un nivel bajo de repetibilidad por lo tanto para estos agentes no es de utilidad el establecimiento de un diagnóstico para las infecciones de transmisión sexual. Y para *N. gonorrhoeae* el valor fue de 0.79 encontrándose dentro de la escala de concordancia clasificado como bueno, este valor es aceptable y señala que la concordancia posee un nivel de alta repetibilidad por lo tanto para este agente la presente técnica es de utilidad en el diagnóstico para estas infecciones en particular (Castillo, Espinoza & Samayoa, 2007).

Para el proceso de estandarización y validación, además de los controles y muestras obtenidas en este estudio se utilizó ADN de muestras de otro estudio de HPV, algunas muestras proporcionaron resultados falsos negativos, sin embargo al correr la prueba de  $\beta$ -globina como control interno se observó que la muestra era adecuada, pero es posible que el ADN viral se degradara por el tiempo y tipo de almacenamiento. En relación al método de extracción del material genético se debe destacar que la preparación de la muestra puede tener un impacto muy significativo en la sensibilidad y reproducibilidad del método diagnóstico (Lee, Pappu, & Vigliotti, 2009).

En general en la extracción de ADN se liberó el material genético intracelular, rompiendo la membrana celular y la nuclear, además se concentró las moléculas blanco de ADN que estuvieron presentes y se eliminaron los restos de proteínas y otros materiales extraños sin degradar el ácido nucleico.

En este estudio debido a que la extracción se llevo a cabo de manera no automatizada tomo un día adicional a la obtención del material nuclear, y se detectó contaminación de muestras

debido a la extracción simultánea de controles y muestras. A diferencia del sistema automatizado este método es de bajo costo. En la comparación de precios por prueba se determinó que el PCR múltiplex convencional evaluada tiene un 79% menos de costo que el PCR-Tiempo Real, esto indica que económicamente está al alcance la adaptación de la técnica para la demanda del diagnóstico de estos tres agentes en particular.

## X. CONCLUSIONES

- Utilizando una temperatura de 55<sup>0</sup>C para la hibridación de primer, en la PCR múltiplex convencional se favorece la amplificación del material genético de los tres agentes estudiados.
- Para los tres microorganismos en estudio se favoreció el revelado de los segmentos de ADN empleando gel de agarosa al 2% con 1% de gel red.
- La sensibilidad obtenida de la validación de *C. trachomatis* 100% (IC95%, 61.0-100.0) y *N. gonorrhoeae* 100% (IC95%, 94.9-100.0) es alta y aceptable para el diagnóstico de estos dos microorganismos.
- La sensibilidad obtenida de la validación de VPH 41% (IC95%, 32.7- 49.4) es baja y no es aceptable para el diagnóstico de este agente.
- La baja estabilidad del ADN del virus del papiloma humano afecta la detección del mismo por esta técnica de PCR múltiplex convencional.
- La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiplex para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* presenta una sensibilidad y especificidad comparables al método de referencia, a excepción del virus del papiloma virus.
- Las condiciones óptimas para lograr la amplificación simultánea del ADN de los tres agentes estudiados fueron; concentración de primer 0.5 μM, ciclos del termociclador compuestos de desnaturalización 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C, 55°C, 72°C por 1 minuto c/u y extensión terminal 72°C por 5 minutos.
- En la estandarización de la técnica de PCR múltiplex se compararon los resultados de los controles de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* y VPH con la prueba estándar de PCR tiempo real de cada microorganismo y se obtuvo una correlación del 100%.



## **XI. RECOMENDACIONES**

- Realizar más investigaciones en personas de la diversidad sexual con la finalidad de continuar perfeccionando la técnica de PCR múltiplex convencional para el diagnóstico de los tres agentes indagados en este estudio.
- Para obtener mejores resultados en el empleo de esta técnica se recomienda utilizarla prontamente posterior a la toma de muestra, debido a la baja estabilidad del material genético del VPH.
- Debido al grado de pureza del ADN obtenido se sugiere realizar el método de extracción de material genético no automatizado por separado de los controles positivos para disminuir el riesgo de contaminación de muestras.
- Elaborar un estudio de costo-beneficio en el caso de que se considere la introducción de la técnica de PCR múltiplex convencional como prueba de apoyo diagnóstico.
- Secuenciar los productos obtenidos en este estudio para establecer el segmento de ADN de interés y no cualquier otra cadena de ADN presente.

## XII. REFERENCIAS

- Aguilar, J., Álvarez, E., Arambú, N., Castillo, A., Figueroa, W., Huamán, B., Mendizábal, R., Morales, S, Osuna, I., & Rosales, P. (2013). *Encuesta de vigilancia de comportamiento sexual y prevalencia del VIH e ITS, en poblaciones vulnerables y poblaciones clave*. Universidad del Valle de Guatemala & MSPAS. Guatemala: HIVOS, Inc. Publicación UVG.
- Alessandro, C., Blanco, M., Caraballo, L., García, G., & Venegas, C. (2010). Detección del virus papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial cervical. *Ginecólogo Obstetra Venezuela*, 70(4), 240-248.
- Álvarez, B., Flores, R., García, E., López, M., Miller, W., Miranda, S., Paz, G., & Samayoa, C. (2011). Perfil epidemiológico del VIH Guatemala 2011. Guatemala: Publicación UVG/Tephinet Inc.
- Álvarez, M.S., & Roth, E.P. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas*. 22(3), 183-192.
- Arroyo, G., Zetina, F., Villeda, M., Guerra, W., Gravitt, P., Daniel, R., Kindilien, K., & Shan, K. (2008). Prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) y otros factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical en Guatemala. *Revista Científica*, 4(1), 49-57.
- Bolaños, J. C. (1990). Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* genital en el embarazo. (Tesis de Médico y Cirujano). Facultad de Medicina. Universidad Francisco Marroquín. Guatemala.
- Buitrago, J. M. (2010). Técnicas de diagnóstico molecular. En J. M. Buitrago, *Bioquímica* (págs. 227-251). España: Elsevier.
- Cabral, J., Cruz, C., Ramos, U., & Ruiz, P. (2006). [www.paho.org/mex/index](http://www.paho.org/mex/index). Recuperado de [www.paho.org/mex/index](http://www.paho.org/mex/index):

[www.paho.org/mex/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=303&itemid=329](http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=303&itemid=329)

Castaño, M. & Estrada, G. (2012). Test de HPV en pacientes tratadas con radiofrecuencia. *Investigación Materno infantil*, IV(1), 13-21.

Castillo, C., Espinoza, L., & Samayoa, B. (2007). Epidemiología, manual de laboratorio de Epidemiología. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Microbiología.

Chapin, K., Landers, L., Lauderdale, T., & Thorneycroft, I. (1999). Comparison of the PACE 2 assay, two amplification assays, an clearview EIA for detection of *Chlamydia trachomatis* in female endocervical and urine specimens. *Journal of clinical Microbiology*. 37(7), 2223-2229.

Chernesky, M., Krepel, J., Luinstra, K., Mahony, J., Sellors, J., & Tyndall, M. (1995). Multiplex PCR for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(11), 3940-3053.

Chiovatero, L. (2010). *Estandarización de una metodología en reacción de cadena de polimerasa para la determinación de genotipos de alto riesgo en dos regiones de la República de Guatemala*. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Formación Médica continuada*, 22(5), 299-305.

Dahinten, K. P. (1998). Resistencia bacteriana de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* en población de alto riesgo. (Tesis de Medico y Cirujano). Facultad de Medicina. Universidad Francisco Marroquín. Guatemala.

- Dorado, G.P. (2005). Amplificación de ADN mediante PCR “Reacción en Cadena de la Polimerasa”. [Resumen]. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.44,1-18.
- Dore, A., & González, J., (2009). Prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en mujeres sexualmente activas. (Tesis de Medico y Cirujano). Universidad De Oriente Núcleo Bolívar. Perú. Recuperado de [www.bvs.insp.mx: http://bvs.insp.mx/rsp/\\_files/File/1997/v39n6/gonorrea\\_396-10.pdf](http://bvs.insp.mx/rsp/_files/File/1997/v39n6/gonorrea_396-10.pdf)
- Flores, C., González, M., & Mendizábal, B. (2014). *Boletín de Vigilancia Centinela de las Infecciones de Transmisión Sexual (VICITS)*. MSPAS, Unidad de VIH de la UVG, Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Guatemala.
- Flores, E. (2000). Optimización de la técnica Reacción de polimerasa en cadena para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en el centro regional de diagnóstico y referencia en Managua. Encuentro, Aplicaciones biotecnológicas en Nicaragua, 32(52), 30-44.
- Garcés, A.L. (2010). Seroprevalencia del Virus del Papiloma Humano en dos Regiones del País: Zacapa y Chimaltenango. (Informe de Investigación Fodecyt No. 83-2007). Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.83.pdf>
- García, A., & Vásquez, C., (2008). Detección y tipificación de los virus de Papiloma humano de alto riesgo en pacientes con lesiones preinvasivas e invasivas del cérvix por medio de PCR. (Informe de Investigación Fodecyt No. 06-2007). Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.06.pdf>
- Genc, M., & Mardh, P. A. (1996). A cost effectiveness Analysis of screening and treatment for *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic women. *Annals of Internal Medicine*, 124(1), 1-7.

- González, A.G. (2008). Detección y tipificación de los Virus del Papiloma Humano de alto riesgo en pacientes con lesiones preinvasivas e invasivas del cérvix por medio de PCR. (Informe de Investigación Fodecyt No. 06-2007). Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.06.pdf>
- González, C. & Salas, F. (1997). Gonorrea: la perspectiva clásica y la actualidad. *Salud Pública de México*. 39(6), 1-7.
- Lee, S., Pappu, S., & Vigliotti, V. (2009). Molecular tests for human papillomavirus (HPV), *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in liquid-based cytology specimen. *BMC Women's Health*. 9 (8), 1-10.
- Martínez, A., & Cabezón, G. (2003). Conocimientos y actitudes sobre enfermedades de transmisión sexual en distintas poblaciones universitarias. *Informedica*, 1-14.
- Pérez, R. (2005). Prácticas sexuales y riesgo asociados en la población adolescente-joven. Recuperado de <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%20Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=Cadena&blobheader>
- Rembert, D. (2007). <http://mispas.gob.gt/salud>. Recuperado de [http://mispas.gob.gt/salud:http://mispas.gob.gt/salud/web/images/stories/proteccion\\_de\\_la\\_salud/vih-sida/Infecciones%20sexuales1.pdf](http://mispas.gob.gt/salud:http://mispas.gob.gt/salud/web/images/stories/proteccion_de_la_salud/vih-sida/Infecciones%20sexuales1.pdf)
- Thompson, T. (2006). Herramientas utilizadas por la genética molecular humana. En T. Thompson, *Genética en Medicina* (págs. 41-58). México: Elsevier.
- Tom, V., Kaeda, J., & Bain, B. (2002). Análisis molecular y citogenético. En W. Comac, *Hematología Práctica* (págs. 407-509). México: Elsevier.
- Torres, A. G., & Baca, B. (1995). Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, 3(23), 16-21.

Torres, O., (2011). Factores de riesgo para cáncer cervical en Guatemala: Epidemiología de los virus de papiloma humano en la población general. (Informe de Investigación Fodecyt No. 04-2007). Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202007.04.pdf>

### XIII. ANEXOS

#### Anexo No.1

“Pruebas estadísticas y validez de una prueba diagnóstica”.

##### a) Intervalo de Confianza

Se puede definir intervalos de confianza de 95%, 99% u otros intervalos usando la tabla de la distribución  $t$  (tablas de estadísticas para la investigación biológica, agrícola y médica), de esta manera puede estimarse la media poblacional  $\mu$  dentro de determinados límites de confianza. Fórmula:  $-t < \bar{X} - \mu/s\sqrt{N-1} < t = \bar{X} \pm t(s/\sqrt{N-1})$

##### b) Tablas de contingencia

Las tablas en las que las frecuencias observadas ocupan un solo renglón se les llama tablas de clasificación en un solo sentido. Como el número de columnas es  $k$ , se les llama también tablas  $1 \times k$  (que se lee “1 por  $k$ ”). Por extensión de estas ideas, se obtienen tablas de clasificación en dos sentidos, o tablas  $h \times k$ , en las que las frecuencias observadas ocupan  $h$  renglones y  $k$  columnas. A estas tablas se les suele llamar tablas de contingencia. Para calcular  $X^2$  puede deducirse fórmulas sencillas en las que únicamente se emplean las frecuencias esperadas, por ejemplo tablas  $2 \times 2$ .

Fórmula:  $[X^2 = N(a_1b_2 - a_2b_1)^2 / (a_1+b_1)(a_2+b_2)(a_1+a_2)(b_1b_2)] = [N\Delta^2 / N_1N_2N_A N_B]$

##### c) Sensibilidad y especificidad

La prueba que se va a evaluar puede presentar valores, datos categóricos o continuos.

Fórmula: Sensibilidad =  $\frac{a}{(a+c)}$  Especificidad =  $\frac{d}{(b+d)}$

##### d) Valores predictivos de la prueba

En el contexto epidemiológico y clínico, la validez de un marcador diagnóstico es el grado en que se puede predecir la ocurrencia de la enfermedad/infección

Fórmula: Valor Predictivo Positivo =  $\frac{a}{(a+b)}$  Valor Predictivo Negativo =  $\frac{d}{(c+d)}$

## Anexo No. 2

### “Índice *Kappa* (*k*)”

Una manera común de expresar la fiabilidad de una prueba es por medio del índice *k*, que constituye un avance en relación con la tasa general de concordancia porque es un indicador de concordancia ajustada que toma en cuenta la concordancia casual. El índice *k* representa la porción de concordancia además de la esperada por causalidad y su valor varía de “-1” (que es un desacuerdo total) a “1.00” (que es una concordancia total). El cero indica lo mismo que las lecturas hechas por casualidad. El siguiente cuadro presenta los valores de *k* y sus interpretaciones.

| Escala de concordancia de <i>Kappa</i> |              |
|--|--------------|
| <i>Kappa</i>                           | Concordancia |
| <0.00                                  | Malo         |
| 0.00 – 0.20                            | Pobre        |
| 0.21 – 0.40                            | Sufrible     |
| 0.41 – 0.60                            | Regular      |
| 0.61 – 0.80                            | Buena        |
| 0.81 – 0.99                            | Optima       |
| 1.00                                   | Perfecta     |

## Anexo No. 3

“Manual de Procedimientos Operativos Estándar de la estandarización del PCR múltiplex convencional vrs PCR tiempo real/Fast-track Diagnostic”

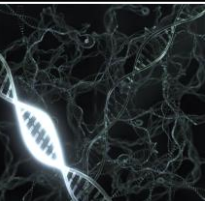
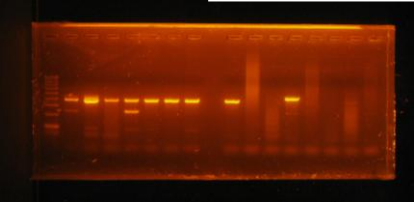


2015

# Procedimientos Operativos Estándar

## Estandarización PCR-M

Estandarización y validación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Múltiplex para el diagnóstico simultáneo de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y Virus del Papiloma Humano en muestras cervicales de mujeres trabajadoras del servicio sexual



**USAC**  
TRICENTENARIA  
Universidad de San Carlos de Guatemala

**Q. B. Robert García**

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Unidad de VIH del Centro de Estudios de la Salud  
Universidad del Valle de Guatemala  
Laboratorio Nacional de Salud (MSPAS)



|                    |  |                                      |
|--------------------|--|--------------------------------------|
| USAC<br>UVG<br>LNS | PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR No. 1 | Vigencia a<br>partir de:<br>21.08.14 |
|--------------------|--|--------------------------------------|

|  | <b>Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN)</b>   | Área                                      |
|--|--|---|
|  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se prepara la campana de flujo laminar limpiándola con cloro al 0.5% y alcohol al 70%, luego se deja 15 minutos con luz ultravioleta.</li> <li>2. En un eppendorf se agregan 250 µL de muestra y 250 µL de Buffer de lisis (buffer TE+200 ug/µL proteinasa K).</li> <li>3. Se coloca el eppendorf en el vortex por 30 segundos.</li> <li>4. Se deja incubando en baño de maría a 55<sup>0</sup>C por 24 horas (overnight).</li> <li>5. Se lleva a temperatura ambiente 37<sup>0</sup>C.</li> <li>6. Se agregan 200 µL de isopropanol y 20 µL de acetato de sodio (3.5M).</li> <li>7. Se incuba por 2 horas a -20<sup>0</sup>C.</li> <li>8. Se centrifuga a 12,000rpm por 15 minutos.</li> <li>9. Se decanta el sobrenadante y se coloca el eppendorf boca abajo hasta que seque la parte inferior (pellet).</li> <li>10. Se agregan 25 µL de agua destilada estéril grado PCR.</li> <li>11. Si no se utiliza inmediatamente se debe almacenar a -20<sup>0</sup>C.</li> </ol> | Se desarrolla en el cuarto de extracción. |

|                           |                                |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|
| Elaboró: Robert<br>García | Fecha de elaboración: 16.10.14 |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|

|                    |  |                                      |
|--------------------|--|--------------------------------------|
| USAC<br>UVG<br>LNS | PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR No. 2 | Vigencia a<br>partir de:<br>21.08.14 |
|--------------------|--|--------------------------------------|

| Orden | <b>Preparación de Mastermix Tiempo Real<br/>(Fast-Track diagnostics)</b>  | Área                               |
|-------|---|------------------------------------|
|       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. La preparación dependerá de la cantidad de muestras que se deseen correr.</li> <li>2. Para 04 muestras más los controles (positivo y negativo), se debe proceder de la siguiente manera;</li> <li>3. Se prepara la campana limpiándola con alcohol al 70% y luego se deja 15 minutos con luz ultravioleta.</li> <li>4. Se debe mantener el buffer y la enzima en un bloque frío (8<sup>0</sup>C) todo el tiempo.</li> <li>5. Se colocan los tubos de reactivos en el rotador para lograr una sedimentación en el fondo del tubo.</li> <li>6. En dos eppendorf rotulados como mastermix (pp1 y pp2) se agregan las siguientes cantidades de reactivos.</li> <li>7. En pp1 se agregan: PPmix<sub>1</sub> 10.5 µL, Buffer 87.5 µL y Enzima 7 µL.</li> <li>8. En pp2 se agregan: PPmix<sub>2</sub> 10.5 µL, Buffer 87.5 µL y Enzima 7 µL.</li> <li>9. Se colocan ambos eppendorf en el rotador para lograr una sedimentación en el fondo.</li> <li>10. En una placa con una base en frío se colocan por fila las cantidades de 15 µL de mastermix (abarcando las filas A y B hasta la columna 6).</li> <li>11. Se coloca una tapadera de plástico para llevar a cabo el traslado hacia el cuarto gris.</li> </ol> | Se desarrolla en el cuarto blanco. |

|                           |                                |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|
| Elaboró: Robert<br>García | Fecha de elaboración: 16.10.14 |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|

|                    |  |                                   |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| USAC<br>UVG<br>LNS | PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR No. 3 | Vigencia a partir de:<br>21.08.14 |
|--------------------|--|-----------------------------------|

| Orden | <b>Montaje de la Placa de 96 pozos para el equipo Applied Biosystems®7500 Tiempo Real (Fast-Track diagnostics)</b>  | Área                                      |
|-------|---|---|
|       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. El montaje de la placa dependerá de la cantidad de muestras que se deseen correr y de la preparación del mastermix.</li> <li>2. Para 04 muestras más los controles (positivo y negativo), se debe proceder de la siguiente manera;</li> <li>3. Se prepara la campana limpiándola con lisol inhibidor de nucleasas y luego se deja 15 minutos con luz ultravioleta.</li> <li>4. Se retira la tapadera plástica para agregar muestras y controles.</li> <li>5. En la placa con la base en frío donde se agregaron los 15 µL de los mastermix se agregan 10 µL de cada muestra en los distintos pozos, se debe sellar los pozos con los selladores plásticos.</li> <li>6. Se agregan 10 µL del control negativo en el pozo mapeado y se sella.</li> <li>7. Por último se agregan los controles positivos para cada fila (PC<sub>1</sub> y PC<sub>2</sub>) y se sella.</li> <li>8. Se centrifuga la placa a 3000rpm durante 3 minutos.</li> <li>9. Se coloca la placa en el equipo ABI 7500 (el código de barras hacia el frente).</li> </ol> | Se desarrolla en el cuarto gris y oscuro. |

|                           |                                |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|
| Elaboró: Robert<br>García | Fecha de elaboración: 16.10.14 |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|

|                    |  |                                   |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| USAC<br>UVG<br>LNS | PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR No. 4 | Vigencia a partir de:<br>21.08.14 |
|--------------------|--|-----------------------------------|

| Orden | <b>Reconstitución de Cebadores Liofilizados para PCR múltiplex convencional</b>  | Área                               |
|-------|--|------------------------------------|
|       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se prepara la campana limpiándola con lisol inhibidor de nucleasas y luego se deja 15 minutos con luz ultravioleta.</li> <li>2. Debido a que los primer están liofilizados deben mantenerse a -20<sup>0</sup>C hasta el momento de la reconstitución.</li> <li>3. Para reconstituir los primer se debe revisar cuidadosamente la concentración que tiene impresa alrededor del vial.</li> <li>4. Teniendo la concentración establecida y clara se efectúa una conversión de dimensionales a través de estequiometria.</li> <li>5. Para este caso se utilizaron la siguientes formulas con la finalidad de llegar a la concentración deseada (5.0 Nmol conversión a 10 µMolar);</li> </ol> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <p>[5 Nmol] → [Pmol]      y      1 Nmol-----1,000 Pmol<br/> (5 Nmol) (1,000 Pmol/1 Nmol) = 5,000 Pmol<br/> Pmol/µL = µMolar<br/> Solución Madre: 5,000 Pmol/50 µL = [100 Pmol/µL] = 100 µMolar<br/> Solución de Trabajo: C<sub>1</sub>V<sub>1</sub>=C<sub>2</sub>V<sub>2</sub> (10 µM)(50 µL)/(100 µM) = 5 µL y diluir con 45 µL de agua grado PCR para un volumen de 50 µL</p> </div> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. En el momento de agregar el agua grado PCR se deja reposar como mínimo 2 horas y posterior a ese tiempo se pueden utilizar.</li> <li>7. Si no se utilizarán los primer en el momento transcurrido de la reconstitución se deben almacenar a -20<sup>0</sup>C.</li> </ol> | Se desarrolla en el cuarto blanco. |

|                        |                                |  |
|------------------------|--------------------------------|--|
| Elaboró: Robert García | Fecha de elaboración: 16.10.14 |  |
|------------------------|--------------------------------|--|

|                    |  |                                   |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| USAC<br>UVG<br>LNS | PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR No. 5 | Vigencia a partir de:<br>21.08.14 |
|--------------------|--|-----------------------------------|

| Orden                 | <b>Preparación de Mastermix para PCR múltiplex convencional</b>   | Área     |              |            |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
|-----------------------|---|----------|--------------|------------|---------|------------|--------------|-----|----|---------|--------|-------------------|------|--------|--------|-------|-------------------|------|--------|--------|-------|-------------------|------|--------|--------|-------|-------------------|------|--------|--------|-------|---------------------|------|--------|--------|-------|---------------------|------|--------|--------|-------|------------|-----|-----|--------|-------|-----------------------|-----|-----|--------|-------|------------------------------------|
|                       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. La preparación dependerá de la cantidad de muestras que se deseen correr.</li> <li>2. Para 08 muestras (10 reacciones) más los controles (positivo y negativo), se debe proceder de la siguiente manera;</li> <li>3. Se prepara la campana limpiándola con alcohol al 70% y luego se deja 15 minutos con luz ultravioleta. Se debe mantener la enzima en un bloque frío (8<sup>0</sup>C) todo el tiempo.</li> <li>4. En un tubo de reacción se sirven las siguientes cantidades de reactivo:</li> </ol> <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Reactivo</th> <th style="text-align: left;">[ ]S.Trabajo</th> <th style="text-align: left;">[ ]final</th> <th style="text-align: left;">Volumen</th> <th style="text-align: left;">Vol. Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>2Mmix</b></td> <td>---</td> <td>1X</td> <td>12.5 µL</td> <td>125 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Primer HO1</b></td> <td>5 uM</td> <td>0.5 µM</td> <td>1.0 µL</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Primer HO3</b></td> <td>5 uM</td> <td>0.5 µM</td> <td>1.0 µL</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Primer KL1</b></td> <td>5 uM</td> <td>0.5 µM</td> <td>1.0 µL</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Primer KL2</b></td> <td>5 uM</td> <td>0.5 µM</td> <td>1.0 µL</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Primer MYBO9</b></td> <td>5 uM</td> <td>0.5 µM</td> <td>1.0 µL</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Primer MYB11</b></td> <td>5 uM</td> <td>0.5 µM</td> <td>1.0 µL</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td><b>ADN</b></td> <td>---</td> <td>---</td> <td>2.5 µL</td> <td>25 µL</td> </tr> <tr> <td><b>Agua Grado PCR</b></td> <td>---</td> <td>---</td> <td>4.0 µL</td> <td>40 µL</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. Se mezcla y se coloca el tubo de reacción en el rotador.</li> <li>6. En los tubos eppendorf para termociclador se colocan por fila las cantidades de 22.5 µL de la mezcla. Luego se agregará la cantidad de 2.5 µL de muestra en el cuarto gris.</li> <li>7. Se tapan los tubos con su propia tapadera de plástico para llevar a cabo el traslado hacia el cuarto gris donde se servirán las muestras y controles.</li> </ol> | Reactivo | [ ]S.Trabajo | [ ]final   | Volumen | Vol. Total | <b>2Mmix</b> | --- | 1X | 12.5 µL | 125 µL | <b>Primer HO1</b> | 5 uM | 0.5 µM | 1.0 µL | 10 µL | <b>Primer HO3</b> | 5 uM | 0.5 µM | 1.0 µL | 10 µL | <b>Primer KL1</b> | 5 uM | 0.5 µM | 1.0 µL | 10 µL | <b>Primer KL2</b> | 5 uM | 0.5 µM | 1.0 µL | 10 µL | <b>Primer MYBO9</b> | 5 uM | 0.5 µM | 1.0 µL | 10 µL | <b>Primer MYB11</b> | 5 uM | 0.5 µM | 1.0 µL | 10 µL | <b>ADN</b> | --- | --- | 2.5 µL | 25 µL | <b>Agua Grado PCR</b> | --- | --- | 4.0 µL | 40 µL | Se desarrolla en el cuarto blanco. |
| Reactivo              | [ ]S.Trabajo  | [ ]final | Volumen      | Vol. Total |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>2Mmix</b>          | ---   | 1X       | 12.5 µL      | 125 µL     |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Primer HO1</b>     | 5 uM  | 0.5 µM   | 1.0 µL       | 10 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Primer HO3</b>     | 5 uM  | 0.5 µM   | 1.0 µL       | 10 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Primer KL1</b>     | 5 uM  | 0.5 µM   | 1.0 µL       | 10 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Primer KL2</b>     | 5 uM  | 0.5 µM   | 1.0 µL       | 10 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Primer MYBO9</b>   | 5 uM  | 0.5 µM   | 1.0 µL       | 10 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Primer MYB11</b>   | 5 uM  | 0.5 µM   | 1.0 µL       | 10 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>ADN</b>            | ---   | ---      | 2.5 µL       | 25 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |
| <b>Agua Grado PCR</b> | ---   | ---      | 4.0 µL       | 40 µL      |         |            |              |     |    |         |        |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                   |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |                     |      |        |        |       |            |     |     |        |       |                       |     |     |        |       |                                    |

|                        |                                |  |
|------------------------|--------------------------------|--|
| Elaboró: Robert García | Fecha de elaboración: 16.10.14 |  |
|------------------------|--------------------------------|--|

|                    |  |   |
|--------------------|--|---|
| USAC<br>UVG<br>LNS | PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR No. 6 | Vigencia<br>a partir<br>de:<br>21.08.14 |
|--------------------|--|---|

| Orden | <b>Preparación de gel de agarosa al 2%<br/>con 1% de gel red para PCR múltiplex convencional</b>   | Área   |
|-------|--|--|
|       | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. La preparación del gel de agarosa se preparará para 1gel grande (16 pozos) y 2 pequeños (8 pozos cada uno).</li> <li>2. Se debe proceder de la siguiente manera;</li> <li>3. Se prepara la campana limpiándola con alcohol al 70% y luego se deja 15 minutos con luz ultravioleta.</li> <li>4. Se prepara la cristalería a utilizar (1 Beaker de 200 mL y 1 probeta de 250 mL).</li> <li>5. En la balanza analítica se pesan 4 gramos, posteriormente se disuelven en un erlenmeyer con 200 mL de Buffer TAE 1X.</li> <li>6. Se calienta hasta lograr la disolución total del gel de agarosa.</li> <li>7. Se agregan por cada 100 mL, 10 µL de solución gel red.</li> <li>8. En el gel de agarosa ya montada en la cámara de electroforesis se depositan las siguientes cantidades de reactivo:<br/>2 µL de Buffer Loading + 5 µL de amplificado.</li> <li>9. Se tapa la cámara de electroforesis con su propia tapadera de plástico.</li> </ol> | Se desarrolla en el cuarto blanco y cuarto gris. |

|                           |                                |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|
| Elaboró: Robert<br>García | Fecha de elaboración: 16.10.14 |  |
|---------------------------|--------------------------------|--|

Robert Samuel García Martínez  
Autor

Flora Eugenia Arana Figueroa, Ph.D.  
Asesora

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Asesor

M.A. Keila Guerrero  
Revisora

M.Sc. Alba Marina Valdés de García  
Directora de Escuela

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda  
Decano