



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN**

**BUENOS AIRES. ARGENTINA**

**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR.**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO ACADÉMICO DE MÁSTER EN  
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR.**

**TÍTULO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VIRUS RUBÉOLA EN EL INSTITUTO  
NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.**

**ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRÁN" 2003-2012.**

**AUTOR: FARM. FABIÁN PARDÓN**

**DIRECTOR: MSC. ANGÉLICA DISTÉFANO**

**CO-DIRECTOR: MSC. ELSA BAUMEISTER**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRÁN"**

**SERVICIO DE VIRUS CONGÉNITOS, PERINATALES Y DE TRASMISIÓN SEXUAL.**

***A mis Padres que fueron fundamentales para llegar hasta aquí.***

***A mis Hijas: Lucía y Maribel, a quienes amo profundamente.***

***A mis hermanos: Hugo y Mabel  
y especialmente a Lilian.***

## **Agradezco a:**

*Lilian Teresa que ha sido la responsable de ordenar no sólo mis ideas, sino también mi corazón para realizar esta tesis.*

*Angélica Distéfano, por confiar en mí para llevar adelante el tema de mi tesis, por su calidad profesional y por su calidad humana.*

*Marta Zapata, por brindarme todos sus conocimientos sobre el virus rubéola, su apoyo y por el cariño que siempre recibí de ella.*

*Pilar Adamo, por el apoyo que siempre me brindó en relación al tema de la tesis.*

*Marilda Siqueira por el apoyo y las capacitaciones brindadas en el tema.*

*Erika por la colaboración que demostró siempre hacia el trabajo y por la calidad de su desempeño.*

*Alicia Alonso actual jefe del servicio de Virosis Congénitas y Perinatales por el apoyo brindado.*

*Elsa Baumeister por la buena voluntad demostrada a la hora de co-dirigir la presente tesis y en su carácter de Jefe del Laboratorio Nacional de Referencia en Sarampión-Rubéola, donde se realizaron parte de los estudios que componen esta tesis.*

*Mirta Carlomagno por haberme brindado la posibilidad de presentar esta tesis.*

*Virginia Alonio y Viviana Molina por el apoyo brindado.*

*Jacqueline, Roberto y Pedro que colaboraron especialmente en lo relativo a la edición y estadísticas que dieron forma a esta Tesis.*

*Mis compañeros del laboratorio y del Departamento de Virus.*

*El querido Instituto "Dr. Carlos G. Malbrán" que aún con sus altibajos me brindó la posibilidad de formarme como profesional y como trabajador del Estado.*

***“Las palabras deshonran cuando no llevan  
detrás un corazón limpio y entero.  
Las palabras están de más, cuando no fundan,  
cuando no esclarecen, cuando no atraen,  
cuando no añaden”.***

***José Martí  
(1853 - 1895)***

***“Frente a las enfermedades  
que genera la miseria,  
frente a la tristeza, la angustia  
y el infortunio social de los pueblos,  
los microbios, como causas de enfermedad,  
son unas pobres causas”.***

***Dr. Ramón Carrillo  
(1906 – 1956)***

**Resumen**

La presente Tesis para optar por el título académico de Máster en Microbiología Molecular tuvo por principal objeto realizar la detección mediante técnicas moleculares, del virus Rubéola para contribuir al Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (PRONACEI) en la eliminación de la rubéola y la prevención del Síndrome de rubéola congénita.

Para ello fue seleccionada una muestra de pacientes sobre la cual se determinaron los anticuerpos específicos IgM e IgG y se realizó la búsqueda directa del ARN viral, mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR convencional) y en tiempo real (RT-PCR real time). Se clasificaron filogenéticamente los casos positivos detectados.

En el grupo especial de pacientes embarazadas se determinaron los anticuerpos específicos IgM e IgG y el porcentaje de avidéz de los anticuerpos de clase IgG.

El estudio se realizó sobre una muestra de 481 pacientes compuesta por 64% de pacientes de sexo femenino. El grupo etario mayoritario fue el de los pacientes de 0 a 12 meses de edad (54%), seguido de los pacientes de 15 a 45 años (34%) con predominio de mujeres (95%).

Se determinó en muestras de suero la presencia de anticuerpos de clase IgM, característicos de infección aguda por rubéola; detectándose estos anticuerpos en cinco neonatos con edades que van de 9 a 25 días de vida. Todos ellos con criterios compatibles con síndrome de rubéola congénita, con diferentes grados de malformaciones características de embriopatía rubeólica.

Los resultados de los estudios moleculares demostraron la presencia de genoma de virus rubéola en muestras clínicas de 4 de los 5 neonatos previamente estudiados, en uno de ellos no se pudo obtener muestras para estudios moleculares.

Del análisis filogenético de las mismas se observa que el primero de los casos aislados en 2003 queda clasificado como perteneciente al genotipo 1 a. Se evidenció una relación muy cercana con dos cepas de origen japonés, no pudiéndose establecer nexo epidemiológico con ellas. Los otros tres casos quedaron clasificados como pertenecientes al genotipo 2B. Se estima que este genotipo es importado en América y probablemente ingresó a Brasil desde Europa en 2006 y se confirmó que fue responsable de brotes en Sudamérica desde 2006 (Brasil) hasta su último aislamiento de brote en la semana epidemiológica 5 de 2009 en Argentina y en los tres casos de SRC en la SE 13 a 18/09 en Buenos Aires.

En el subgrupo etario compuesto por niños de 1 a 14 años, cuyo n= 56 niños, solo se determinó como positivo para rubéola, un paciente de un año de edad con antecedente cercano (<1 mes) de vacunación con triple viral. El caso se clasificó filogenéticamente como cepa vacunal.

En nuestro estudio se determinaron por métodos serológicos 7 casos de embarazadas con resultado de IgM positiva. Todas fueron pacientes vacunadas sin saber su estado de embarazo, durante la campaña masiva de vacunación de mujeres en edad fértil realizada en 2006. Las siete pacientes se clasificaron como casos vacunales y cursaron de manera asintomática la reacción a la vacuna y en 5 de ellas se pudo establecer seguimiento hasta el nacimiento de sus niños, presentando todos ellos resultados de IgM negativa y ausencia de síntomas compatibles con SRC.

## Índice de Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Epidemiología.....	2
1.3	Características generales de la enfermedad por rubéola.....	4
1.4	Características del virus.....	5
1.5	Participación de las vías de supervivencia/proliferación celular en la replicación viral.....	10
1.6	Características clínicas y epidemiológicas.....	10
1.6.1	Rubéola infanto juvenil o postnatal.....	12
1.6.2	SRC e infección congénita por el virus de la RUB (IRC).....	13
1.7	Impacto de la introducción de la vacuna antirrubéolica.....	13
1.8	Síndrome de Rubéola Congénita (SRC) en Argentina.....	15
1.9	Diagnóstico de laboratorio.....	16
1.9.1	Determinación de anticuerpos de clase IgM.....	19
1.9.2	Determinación de anticuerpos de clase IgG.....	19
1.9.3	Determinación de la avidéz de anticuerpos IgG.....	20
1.9.4	Cultivo con identificación positiva del virus de la RUB por Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	21
1.10	Epidemiología molecular y genotipificación.....	22
1.11	Vigilancia del virus de la rubéola.....	24
1.11.1	Función del laboratorio en la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola.....	24
1.11.2	Función del laboratorio en el control y la eliminación de la RUB.....	25
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo General.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1	Población de estudio.....	26
3.2	Criterios de inclusión.....	26
3.3	Criterios de exclusión.....	27
3.4	ELISA de captura para detección de anticuerpos IgM específicos anti-rubéola.....	27
3.5	ELISA de captura para detección de anticuerpos IgG específicos anti-rubéola.....	30
3.6	ELISA para detección de Avidéz de anticuerpos IgG específicos anti-rubéola.....	30
3.7	Operaciones preliminares a la detección molecular del genoma viral.....	32
3.7.1	Recepción de muestras clínicas para diagnóstico de Sarampión y Rubéola.....	32
3.7.2	Técnica de extracción del ARN viral.....	35

3.8	Protocolo para la detección de ARN viral de RUB mediante técnicas de diagnóstico por RT-PCR convencional.....	36
3.9	Protocolos de uso de técnicas de diagnóstico por RT-PCR en tiempo real. (POE del LNR-SR). 39	
3.10	Aislamiento de virus RUB a partir de muestras clínicas (POE del LNR-SR).....	48
3.11	Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección del virus de RUB en células de cultivo.....	49
3.12	Protocolo de RT-PCR para la genotipificación de rubéola (Sistema de 2 Fragmentos). POE del LNR-SR.....	51
3.13	Protocolo de Electroforesis en gel de agarosa.....	55
3.14	Purificación de Productos de PCR.....	58
3.15	Protocolo de secuenciación para la genotipificación de rubéola.....	59
3.16	Análisis de secuencias para la genotipificación de rubéola.....	63
4	RESULTADOS.....	70
4.1	Caracterización de la muestra.....	70
4.2	Resultados de los diferentes ensayos para diagnóstico de infección por virus RUB.....	74
	A. Infantes y neonatos (0 a 12 meses).....	74
	B. Niños (1 a 14 años).....	74
	C. Embarazadas.....	75
4.3	Estudio de casos con diagnóstico positivo para RUB por subgrupos etarios y especiales (embarazadas).....	77
	A. Infantes y neonatos.....	77
	B. Niños de 1 a 14 años.....	78
	C. Embarazadas.....	79
4.4	Cálculo de la Prevalencia de SRC en la población estudiada para los 10 años de búsqueda. 81	
4.5	Clasificación filogenética de los casos diagnosticados.....	81
4.6	Descripción clínica de los casos con SRC.....	89
5	DISCUSIÓN.....	91
5.1	Caracterización de la muestra.....	91
5.2	Análisis y discusión de los resultados de las pruebas diagnósticas para RUB en neonatos y niños de 1 a 14 años.....	92
5.3	Análisis y discusión de los resultados de las pruebas diagnósticas para RUB en el subgrupo de pacientes embarazadas.....	93
5.4	Valores Predictivos Positivos y Negativos de los equipos comerciales de determinación de anticuerpos IgM.....	93
5.5	Estudio de los casos positivos confirmados.....	94
5.6	Clasificación filogenética de los casos diagnosticados.....	95
5.7	Situación regional: En Argentina y Sudamérica.....	95

6	CONCLUSIONES.....	98
7	RECOMENDACIONES.....	99
8	BIBLIOGRAFÍA.....	100
9	ANEXOS .....	103
9.1	Anexo 1. Fichas epidemiológicas de embarazada y de recién nacido. ....	103
9.2	Anexo 2. Modelo de Informe. ....	107
9.3	Anexo 3. Cuaderno de ELISAS. ....	108
9.4	Anexo 4. Hoja de Carpeta de Entrada. ....	109

## Índice de Figuras

Figura N° 1.	Virus Rubéola. CDC/Dr. Erskine Palmer 1980. ....	2
Figura N° 2.	Países que incluyen la vacuna SRP en sus calendarios nacionales. Fuente: WHO. ....	3
Figura N° 3.	Rubéola infanto-juvenil o posnatal. ....	4
Figura N° 4.	Neonato con SRC. ....	5
Figura N° 5.	Estructura del Virus de la rubéola. ....	5
Figura N° 6.	Estructura genómica del virus RUB. ....	7
Figura N° 7.	Esquema de la región estable de la gp E1 y las posiciones nucleotídicas que amplifican para el diagnóstico por RT-PCR del ARN del virus de la RUB. ....	7
Figura N° 8.	Complejos de replicación de RUB. La barra representa 200 nm. (Microfotografía electrónica Dr. JIA- Yee Lee.) ....	8
Figura N° 9.	Vacuola conteniendo viriones de RUB. La barra representa 100 nm. (Microfotografía electrónica Dr... JIA- Yee Lee.) ....	8
Figura N° 10.	Tinción con Giemsa en células VeRo de 1° a 4° dpi con virus de Rub. ....	9
Figura N° 11	Célula apoptótica por efecto del virus de RUB ....	9
Figura N° 12.	Participación de las vías de supervivencia/proliferación celular en la replicación viral. ....	10
Figura N° 13.	Evolución de una infección aguda por RUB. ....	12
Figura N° 14	Casos notificados de rubéola. Argentina, 1979 – 2010 ....	15
Figura N° 15	Distribución de los casos sospechosos y confirmados de SRC y su relación con la incidencia de rubéola. Argentina, 1970-2002. Fuente: Rev. Hosp. Niños Buenos Aires ....	15
Figura N° 16	Respuesta Inmunitaria del niño con SRC. ....	18
Figura N° 17.	Inmunofluorescencia indirecta de RUB en células Vero. Foto: Laboratorio de Virosis Congénitas.....	21
Figura N° 18.	Gráfico de reacción de RT-PCR para diagnóstico de RUB en tiempo real con controles (alto y bajo) y una muestra típica. ....	21
Figura N° 19	Genotipos del virus de la rubéola detectados en las Américas, 1997-2010.....	23
Figura N° 20.	El análisis filogenético de las secuencias de 32 virus de referencia de rubéola. ....	24
Figura N° 21.	Ejemplo de resultados de las corridas electroforéticas para genotipificación (fragmentos 1 y 2) y de diagnóstico de RUB. ....	58

Figura N° 22. Esquema del ARN control (positivo) de rubéola con su inserción y delección. ARN sintético del gen E1 de Rubéola con la ubicación de la inserción de 30 nucleótidos y 2 delecciones. Fuente: CDC Protocols. ....	58
Figura N° 23. Ejemplo de plantilla de gel con productos de PCR purificados. Foto: CDC.....	59
Figura N° 24. Imagen de un análisis de calidad de un archivo de secuencias ABI utilizando el Programa de Análisis de Secuencias.....	63
Figura N° 25. Gel que revela el resultado de RT-PCR de diagnóstico del paciente ID 12135.....	78
Figura N° 26. Gel que revela el resultado de la RT-PCR para los casos aislados en 2009.....	78
Figura N° 27. Gel que revela el resultado de la RT-PCR del caso ID 32016. ....	79
Figura N° 28a. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135.....	82
Figura N° 28 b. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135 .....	83
Figura N° 28 c. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135.....	84
Figura N° 28 d. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135 .....	85
Figura N° 29 Casos aislados en Argentina .....	86
Figura N° 30. Á Árbol filogenético de los aislamientos de virus de rubéola producidos en distintos años y eventos Argentina 2007-2011. ....	87
Figura N° 31. Árbol filogenético de los aislamientos de virus de rubéola producidos en Argentina en 2009 y su relación con aislamientos acaecidos en otras regiones de Sudamérica. ....	88
Figura N° 32 . Neonato ID 12135/03.....	89
Figura N° 33. Neonato ID 21869/09.....	89
Figura N° 34. Neonato ID 21887/09.....	89
Figura N° 35. Neonato ID 22355/09.....	90

## Índice de Tablas

Tabla N° 1. Distribución de pacientes para estudio de EFE y SRC por Institución de Salud .....	70
Tabla N° 2. Distribución de pacientes para estudio de EFE y SRC por distritos o localidades.....	71
Tabla N° 3. Distribución etaria de Mujeres en edad fértil para estudio de EFE. ....	72
Tabla N° 4. Resultados de las pruebas diagnósticas para Rub en Infantes y neonatos (0 a 12 meses). ....	74
Tabla N° 5. Resultados de las pruebas diagnósticas para Rub en Niños (1 a 14 años).....	74
Tabla N° 6. Resultados de las pruebas diagnósticas para Rub en pacientes embarazadas.....	75
Tabla N° 7. Clasificación de casos con resultado de IgM indeterminadas mediante pruebas adicionales (Seroconversión y avidéz en 1° y 2° muestra serológica; RT-PCR en Orina e Hisopado de exudado nasofaríngeo). ....	76
Tabla N° 8. Interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas adicionales para Rub en pacientes embarazadas. (Incluye aquellas con IgM indeterminadas).....	76
Tabla N° 9. Casos de neonatos con diagnóstico positivo para RUB.....	77
Tabla N° 10. Casos de embarazadas con diagnóstico presunto positivo para RUB.....	79

Tabla N° 11. Detección del ARN viral, mediante técnicas moleculares en el total de muestras estudiadas. ....	79
--	----

## Índice de Gráficos

Gráfico N° 1 Distribución de pacientes por provincias estudiados para EFE y SRC. (n= 481) .....	71
Gráfico N° 2 . Distribución de la muestra según sexo de pacientes para estudio de EFE y SRC (n= 481) .....	71
Gráfico N° 3 . Distribución etaria de la muestra para estudio de EFE y SRC (n= 481) .....	72
Gráfico N° 4 Distribución por sexo de los pacientes de 15 a 45 años de edad para estudio de EFE y SRC (n= 162) .....	72
Gráfico N° 5 Distribución de Mujeres en edad fértil según estados fisiológicos especiales (embarazo). (n=154) .....	73
Gráfico N° 6 Diagnóstico diferencial en infantes (0 a 12 meses) que presentaron diagnósticos negativos para RUB. (n=254) .....	74
Gráfico N° 7 Diagnóstico diferencial en Niños (1 a 14 años) que presentaron diagnósticos negativos. (n= 55) .....	75
Gráfico N° 8 Diagnóstico diferencial en mujeres embarazadas que presentaron resultados negativos para RUB. n = 113.....	77

## Abreviaturas

RUB: Rubéola.

SRC: Síndrome de Rubéola congénita.

IRC: infección congénita por el virus de la RUB.

SAR: Sarampión.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la salud.

CDC: Centers for Disease Control.

PAI: Programa Ampliado de inmunizaciones.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

RT-PCR RT: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real.

EFE: enfermedad febril exantemática.

SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

PRONACEI: Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles.

RN: recién nacido.

RCIU: retardo de crecimiento intrauterino.

Gp: glicoproteína.

ARN: ácido ribonucleico.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Nt: nucleótido.

G+C: guanina + citosina.

ORF: marcos de lectura abiertos o por sus siglas en inglés ORF (open readingframe).

V: Vacuola.

UV: Ultravioletas.

ECP: efecto citopático.

Dpi: día post infección.

IgM: Inmunoglobulinas M.

IgG: Inmunoglobulinas G.

IgA: Inmunoglobulinas A.

LCR: Líquido céfalo raquídeo.

CNV: Calendario Nacional de Vacunaciones.

CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades.

PI3K-Akt y Ras-RAF-MEK-ERK: vías de supervivencia/proliferación celular o vías de las quinasas.

Bp: pares de bases.

n PCR: nested PCR o PCR anidada.

BHK-21: Línea celular de hámster.

SE: semana epidemiológica.

UI/ml.: Unidades internacionales/mililitro.

RIA: radioinmunoensayo.

MACRIA: m-antibody-capture-RIA.

cut-off: punto de corte.

ELISA: enzimoimmuno ensayo.

HRPO: marcador de peroxidasa.

TMB: cromógeno.

Nm: nanómetros.

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

SP – ORF: proteína estructural del marco de lectura abierto.

INEI: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.

ANLIS: Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud.

VCP: Virosis Congénitas y Perinatales.

LNR-SR: Laboratorio Nacional de Referencia en Sarampión- Rubéola.

POE: procedimiento operativo estandarizado

CBS: cabina biológica de seguridad.

RNasa ZAP: Nombre comercial de un agente de limpieza de enzimas que degradan el ARN (RNAsas).

RNAsas: Enzimas que degradan el ARN.

DNAsas: Enzimas que degradan el ADN.

PBS, libre de RNasa: Solución tampón balanceada de sales de fosfatos, libre de enzimas que degradan el ARN.

cDNA: Cadena de ADN complementaria al ARN viral que se obtiene como producto de la retro transcripción.

MMLV transcriptasa reversa: Enzima obtenida del virus de la leucemia murina de Moloney, que cataliza la transcripción reversa del ARN en ADN complementario.

Master MIX de reacción: Mezcla de reactivos necesarios para que se produzca la reacción de síntesis molecular de ADN.

dNTPS: Moléculas de desoxinucleotidos trifosfatos. (dATP; dTTP; dCTP y dGTP).

RNAsin: Inhibidor de enzimas RNAsas.

RNasa P: Gen celular de referencia.

Primer: iniciador o cebador de la reacción de PCR.

NTC: Control Negativo de Templado (sin templado)

Probes: sondas marcadas en sus extremos 5' y 3'.

Quencher: extintor o terminador.

Vero: Línea celular establecida de células epiteliales renales extraídos de un mono verde africano.

RK/13: Línea celular establecida de células epiteliales renales extraídos de un conejo.

Vero/hslam: Las células Vero / hSLAM son células Vero que han sido transfectadas de manera estable con un plásmido que codifica el gen para la molécula de SLAM humana (h).

SLAM se ha demostrado que es un receptor para ambos de tipos de cepas: salvajes y adaptadas en el laboratorio. La sensibilidad de las células Vero / hSLAM para el aislamiento de virus del sarampión es equivalente a la de las células B95a.

La ventaja de las células Vero / hSLAM es que, a diferencia de las células B95a, no están persistentemente infectados con el virus. Esto proporciona una significativa ventaja de seguridad para los técnicos de laboratorio y facilita en gran medida los envíos internacionales.

La desventaja de las células Vero / hSLAM es que deben ser cultivadas en medio que contenía geneticina para retener la expresión de SLAM. Esto aumenta el costo del medio de cultivo de tejidos.

DMEM: Es un medio de cultivo líquido para células que consiste en medio BME modificado por Dulbecco con una mayor cantidad de vitaminas y aminoácidos y se emplea para una amplia gama de líneas celulares de mamífero.

BME: Medio Basal de Eagle, esta considera uno de los primeros medios formulados para el crecimiento de células de mamíferos.

SFB: Suero fetal bovino.

Tween 20: Es el polisorbato 20 o Monooleato de Polioxietileno Sorbitan conocido comercialmente como Tween 20, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas y farmacológicas.

Background: Tinción inespecífica del fondo en una monocapa de células infectadas.

GC: Guanina-citosina.

Agua NF: agua "nucleasa free" o agua libre de nucleasas.

TBE: Es una solución amortiguadora constituida por tris-borato EDTA.

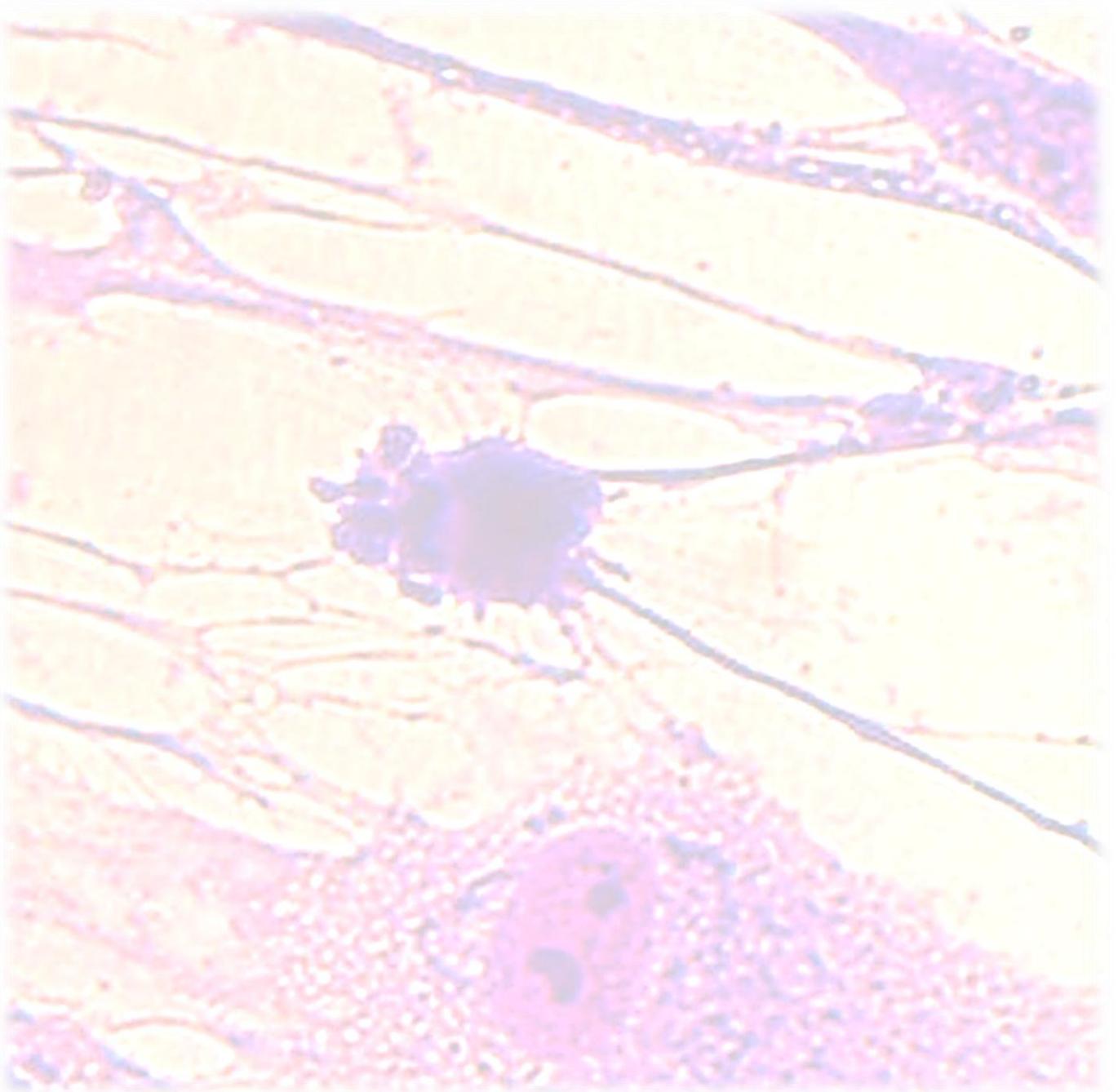
TAE: Es una solución amortiguadora constituida por tris-acetato EDTA.

GelRed: Es un colorante que no es carcinógeno y que es por lo menos tan sensible como el bromuro de etidio para visualizar bandas de ADN en geles de agarosa. Nota: en los estudios desarrollados en esta tesis se utilizó bromuro de etidio por falta de disponibilidad de otro colorante.

Clado o clade: En biología se denominan clados a cada una de las ramas de un árbol filogenético determinado. Por consiguiente un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas (con un antepasado común).

Programa BLAST: Programa que permite realizar un análisis filogenético rápido para orientar la clasificación de la secuencia obtenida. (del inglés Basic local alignment search tool).

# 1 Introducción



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes.

### Primeras noticias acerca de la Rubéola.

La historia conocida de la Rubéola (RUB) se remonta a mediados del siglo XVIII, cuando fue descrita por primera vez por autores alemanes que la llamaron Rötheln. En 1866, el Dr. Henry Veale, cirujano inglés, acuñó el nombre “rubéola” (plural de la palabra latina rubellus “rojo”). Fue reconocida oficialmente como enfermedad en 1881 en el Congreso Internacional de Medicina de Londres, pero continuó recibiendo con frecuencia el nombre de “sarampión alemán”. (SAR alemán)

### Rubéola y embarazo: Australia 1940.

Tras una grave epidemia de RUB que azotó a Australia en 1940, el Dr. Norman Mc Alister Gregg, oftalmólogo, identificó el Síndrome de RUB congénita (SRC). En 1941, el Dr. Gregg notó que había una cantidad desacostumbrada de bebés con cataratas congénitas entre sus pacientes y tras consultar con sus colegas, se enteró de que lo mismo ocurría en toda Australia. En su informe, titulado “Las cataratas congénitas tras un episodio de SAR alemán en la madre”, señala que los bebés en general eran “pequeños, mal nutridos y difíciles de alimentar”, tenían defectos cardíacos congénitos y presentaban un estado eczematoso y fiebre alta.

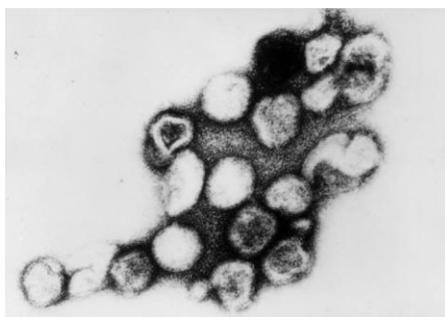
El Dr. Gregg llegó a la conclusión de que las cataratas que había observado en todo el país eran “el resultado de algún trastorno general de índole tóxica o infecciosa”. Se dio cuenta de que los primeros meses del embarazo habían coincidido con el apogeo de la epidemia de “SAR alemán” y llegó a dos conclusiones correctas: la RUB inhibe el desarrollo del feto y cuanto antes se contrae la infección en el embarazo, peor es el daño.

Observó que el grupo más afectado era el de madres jóvenes, porque las mujeres de mayor edad tenían mayores probabilidades de haber adquirido inmunidad natural. También comentó en su pronóstico que “en esta etapa no podemos estar seguros de que no haya otros defectos que no son evidentes ahora pero que puedan manifestarse a medida que continúe el desarrollo”.

Planteó una pregunta que despertó el interés en la RUB y el SRC: “¿Qué se puede hacer para evitar una repetición de la tragedia en otra epidemia?” También señaló algo que continúa vigente en la actualidad:

“Debemos reconocer y enseñar los posibles peligros de una epidemia de ese tipo”. Lamentablemente, la observación del Dr. Gregg no recibió de inmediato la atención que merecía.

El virus de la RUB se aisló en 1962 por Parkman y Weller. Figura N° 1.



**Figura N° 1. Virus Rubéola. CDC/Dr. Erskine Palmer 1980.**

El Virus de la RUB es el agente causal de la enfermedad vírica exantemática y transmisible del mismo nombre. El accionar y las consecuencias de la infección por este virus dependen del huésped y cabe distinguir dos formas muy diferentes: la RUB postnatal, benigna y autolimitada, y el SRC, con riesgo de teratogenicidad y daño fetal de diversos grados. [1]

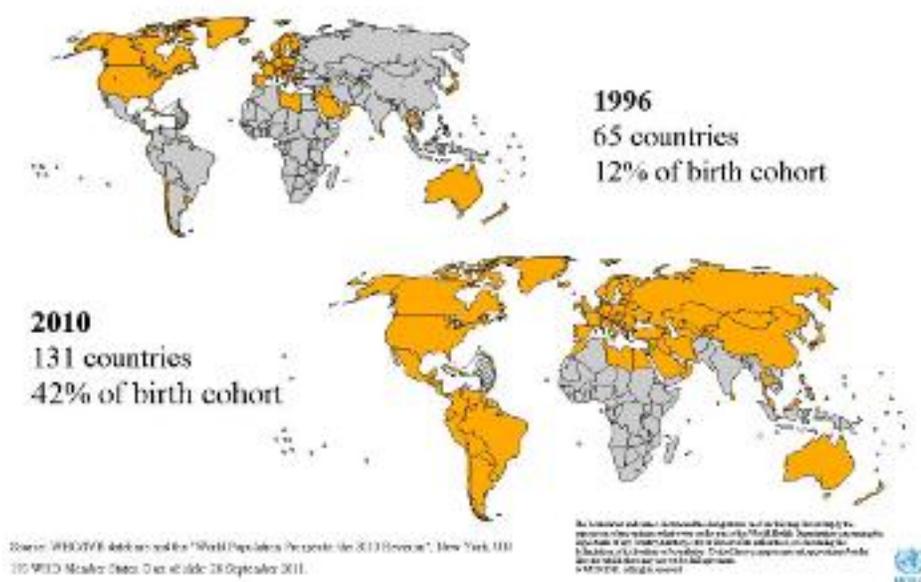
## **1.2 Epidemiología.**

Según la OMS dos tercios de la población mundial en regiones donde no se administra la vacuna rutinariamente, son susceptibles de infección. Figura N° 2. Por ejemplo, en 1996 nacieron en África aproximadamente 22 000 niños con SRC y otros 46.000 y 12.634 niños nacían con SRC en el Sudeste asiático oriental y el Pacífico Occidental, respectivamente. [2]

Desde principios del año 2013 se encuentra activo un brote en Japón, con más de 4.000 casos ya declarados. Los afectados son fundamentalmente varones entre 20 y 49 años, por la baja tasa de vacunación de este grupo poblacional. [2]

La OMS lanzó un nuevo Plan Estratégico Mundial de Lucha contra el SAR y la RUB que abarca el periodo 2012-2020, con el objetivo de reducir la mortalidad en un 95% respecto a las cifras del año 2000, alcanzar los objetivos regionales de eliminación del SAR y la RUB y el SRC. El mismo se basa en años de experiencia en la aplicación de programas de inmunización dirigidas a poblaciones determinadas y al diagnóstico de los casos de RUB y SRC para vigilar la diseminación del virus. [3]

## Countries using rubella vaccine in their national immunization system



**Figura N° 2. Países que incluyen la vacuna SRP en sus calendarios nacionales. Fuente: WHO.**

La incidencia de la enfermedad ha disminuido drásticamente desde la introducción de la vacuna, tanto la RUB postnatal como la RUB congénita, sobre todo en países desarrollados. En Argentina se puede observar claramente el impacto de las campañas de inmunización en el gráfico de la figura N°14.

El diagnóstico de la RUB basado exclusivamente en los signos y síntomas es poco fiable pues existen muchas otras causas de exantema que pueden imitar la infección por el virus de la RUB y por otra parte más del 50% de las infecciones pueden ser asintomáticas. [4]

Los sistemas de detección directa de fragmentos del genoma de SAR y la RUB mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se están generalizando.

Aunque no se recomienda en el diagnóstico rutinario de laboratorio, el cultivo de los virus del SAR y de la RUB a partir de muestras clínicas sí constituye un componente importante de las estrategias de control.

En Argentina, se ha intensificado la vigilancia epidemiológica de casos sospechosos de enfermedad febril exantemática (EFE), en todos los sectores de atención de salud, especialmente en el sector privado y centros particulares que brindan atención a turistas, para evitar la aparición de casos secundarios de RUB y así prevenir el SRC. El Ministerio de Salud de la Nación ha tomado medidas como la creación del Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (PRONACEI). En los años 2006 y 2008 se realizaron campañas de vacunación masivas dirigidas a mujeres y varones (15-39 años) con coberturas de 98,8 y 90,0 % respectivamente.[5]

En 2009 se realizó la campaña de seguimiento entre 13 meses y 5 años, lográndose una cobertura de 98% y en este mismo año se identificó el último caso de RUB en la provincia de Buenos Aires, en el municipio de Almirante Brown y se identificaron los últimos casos de SRC.[6]

En la Región de las Américas los casos confirmados de RUB disminuyeron un 98% entre 1998 y 2006, en tanto pasaron de 135.947 a 3.005. En 2007 la región de las Américas experimentó un resurgimiento de los casos debido a importaciones del virus a los países que inicialmente habían dirigido las campañas de vacunación masiva solamente a las mujeres. Como resultado de los brotes ocurridos en tres países, los casos confirmados de RUB aumentaron de 3.005 en 2006 a 13.187 en 2007. Como consecuencia de esta situación, entre 2008 y 2009 se notificaron en la Región de las Américas 27 casos de SRC. [7]

Los países que culminaron las campañas para adolescentes y adultos, hombres y mujeres no notificaron casos de RUB endémica. El último de estos casos se notificó en febrero de 2009 en nuestro país, iniciando el proceso de documentación para verificar la eliminación del SAR y la RUB. En 2011, se registraron siete casos de RUB asociados con la importación. En 2010, 2011, 2012 y 2013 no se notificaron casos de SRC. [8]. Figura N° 15.

### **1.3 Características generales de la enfermedad por rubéola.**

La infección por virus RUB está ampliamente extendida a nivel mundial y las dos entidades clínicas diferentes que el virus de la RUB genera se nombran de la siguiente forma según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE): RUB como enfermedad exantemática infanto-juvenil que cursa en forma leve, autolimitada y sin complicaciones: CIE 10 B06.9 (Figura N° 3) y la RUB congénita o SRC: CIE 10 P35.0 (Figura N° 4).



**Figura N° 3. Rubéola infanto-juvenil o posnatal.**

La RUB en su entidad infanto – juvenil sin complicaciones, adquiere importancia clínica cuando la infección ocurre en pacientes que cursan el 1<sup>er</sup> trimestre de su embarazo más precisamente hasta la semana 20 de gestación. La necesidad de intensificar la vigilancia de RUB en embarazadas obedece a la posibilidad de nacimientos con SRC y a que la misma se presenta en un 10% de los casos en forma subclínica, dificultando su diagnóstico temprano sin apoyo del laboratorio. [9]

El SRC por sus consecuencias en el recién nacido (RN), representa un grave problema para Salud Pública y su gravedad varía según la semana de gestación en la que se produce la transmisión, pudiendo provocar desde la pérdida del embarazo hasta el nacimiento con múltiples malformaciones, que se manifiestan entre un 85% (1<sup>er</sup> trimestre) a un 16% (2<sup>o</sup> trimestre) de los casos. [1, 10]



Figura N° 4. Neonato con SRC.

#### 1.4 Características del virus.

El virus de la RUB es el único miembro del género Rubivirus de la familia Togavirus. Se relaciona estrechamente con el género Alfa virus, al cual pertenecen los virus de la fiebre chikungunya y de la encefalitis equina del oeste y del este. A diferencia de la mayoría de Togavirus, el virus de la RUB no es transmitido por artrópodos, sino que se adquiere por vía respiratoria. Este virus es casi esférico con un diámetro de 60 a 70 nm. Está compuesto por una nucleocápside de simetría icosaédrica que contiene un genoma monocatenario de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva; el núcleo está rodeado por una cubierta lipídica compleja (toga= cubierta). El virus contiene tres proteínas estructurales, dos en la envoltura (E1 y E2) y una en el núcleo (cápside o proteína C) alrededor del ARN. Figura N° 5. Las proteínas de la envoltura, E1 y E2, son glicoproteínas que existen como heterodímeros y se proyectan en forma de seis a ocho espículas de 8 nm en la superficie. E1 parece ser la molécula dominante de la superficie y se asocia con los epítopes neutralizantes y hemaglutinantes. La proteína C presenta 2 epítopes, uno para linfocitos B y otro para linfocitos T. [11]

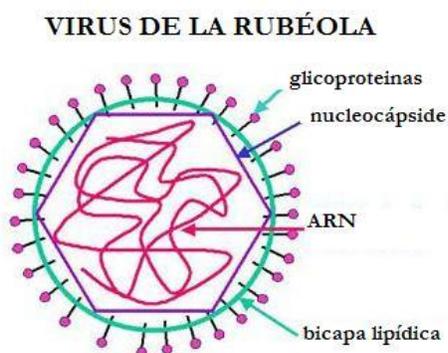


Figura N° 5. Estructura del Virus de la rubéola.

La replicación del virus es intracitoplásmica y madura mediante la liberación de viriones a través de vesículas en la membrana. El virus RUB coloniza la vellosidad coriónica y las células endoteliales de la

placenta, formando focos de necrosis que se desprenden a la circulación fetal y a través de ella a todos los órganos. Su capacidad teratogénica está dada por su acción a tres niveles celulares: en primer lugar actuando sobre los filamentos de actina que conforman el huso acromático, desensamblándolos e inhibiendo la mitosis, en segundo lugar afectando la función mitocondrial y por último desencadenando la respuesta apoptótica en la célula infectada. Todo ello con el agravante de que ocurre en un sistema inmunológico inmaduro como es el de un feto en desarrollo. Teniendo por resultante desde la pérdida del embarazo hasta el nacimiento con retardo de crecimiento intrauterino armónico (RCIU) o con múltiples malformaciones. [12]

Sólo se conoce un serotipo del virus, pero los análisis del árbol filogénico, principalmente de la región que codifica para la glicoproteína E1, indicaban hasta 2003 la existencia de nueve genotipos establecidos y cuatro genotipos provisionales. [13]

El virus contiene una cadena simple de ARN de 9.762 nucleótidos. El extremo 5' del genoma posee una cofia de 7-metilguanosa y el extremo 3' una cola de poli (A) de unos 53 nucleótidos (nt) promedio. El genoma de RUB posee un contenido de 69% de G+C, lo cual explica su estabilidad. El genoma presenta dos marcos de lectura abiertos o por sus siglas en inglés ORF (open reading frame) policistrónicos. El ORF del extremo 5' codifica para las proteínas no estructurales p150 y p90, mientras que el ORF del extremo 3' codifica para las tres proteínas estructurales antes mencionadas (E1; E2 y C). [14]. Figura N°6. La síntesis y el procesamiento de las proteínas del virus de la RUB tienen lugar a partir de precursores poliproteicos de alto peso molecular. Ejemplos con información sobre la secuencia nucleotídica del virus de la RUB se han depositado en el banco de datos EMBL/GenBank con los siguientes números de acceso: M15240; M18901; y M32735.

Tanto las pruebas moleculares de diagnóstico (RT-PCR y RT-PCR Real Time), como así también las RT-PCR de genotipificación dirigen sus diseños de cebadores a la amplificación de regiones de la gp E1. Regiones de baja variabilidad entre cepas o estables, en el caso de las reacciones destinadas a diagnóstico (Figura N° 7) y regiones de alta variabilidad en el caso de las reacciones de genotipificación.

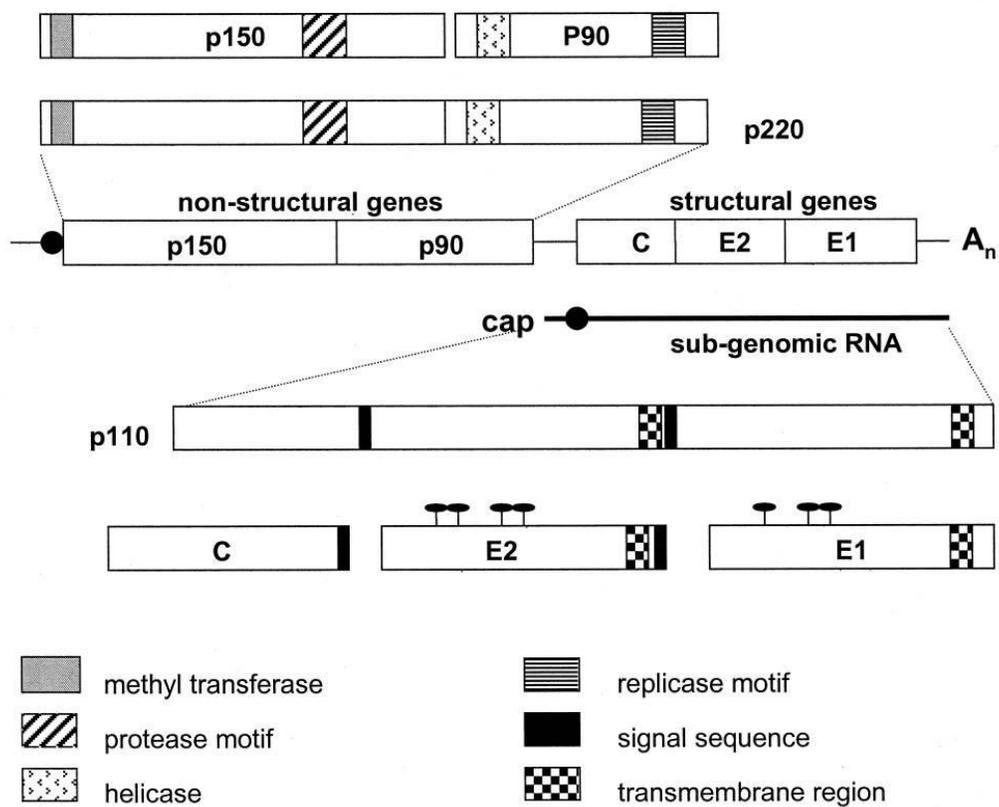


Figura N° 6. Estructura genómica del virus RUB.

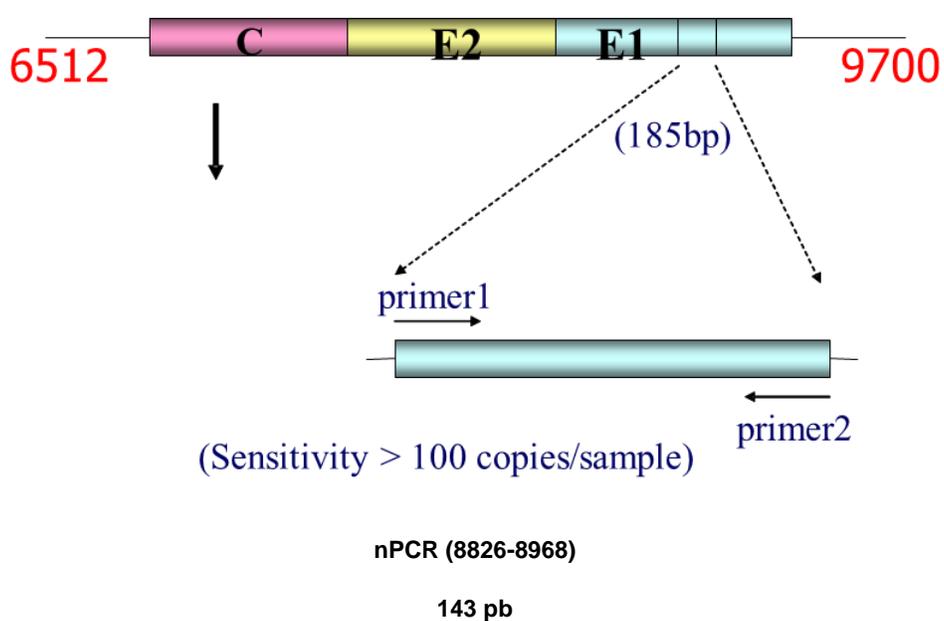
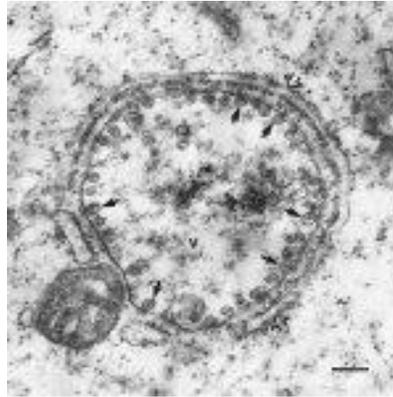


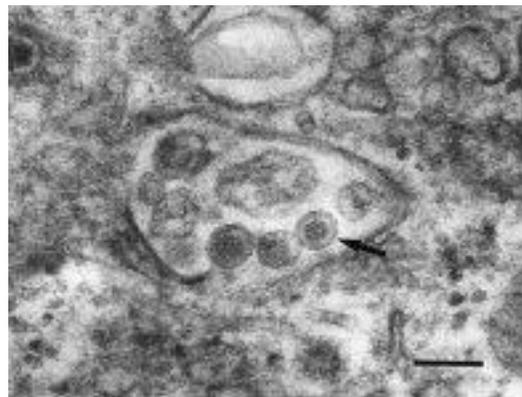
Figura N° 7. Esquema de la región estable de la gp E1 y las posiciones nucleotídicas que amplifican para el diagnóstico por RT-PCR del ARN del virus de la RUB.

## Ultra estructura viral:



**Figura N° 8. Complejos de replicación de RUB. La barra representa 200 nm. (Microfotografía electrónica Dr. JIA- Yee Lee.)**

En la figura N° 8 se puede observar un típico complejo de replicación de RUB. El complejo de replicación consiste en un lisosoma modificado por el virus conteniendo vesículas (flechas cerradas) alineadas en la cara interna de la membrana de la vacuola (v). Cada vesícula posee una doble membrana y contiene una estructura interna irregular. Estas vesículas presentan diferente morfología y no deberían confundirse con viriones de RUB. El retículo endoplasmático rugoso (flecha abierta) circunda el complejo de replicación. [15]



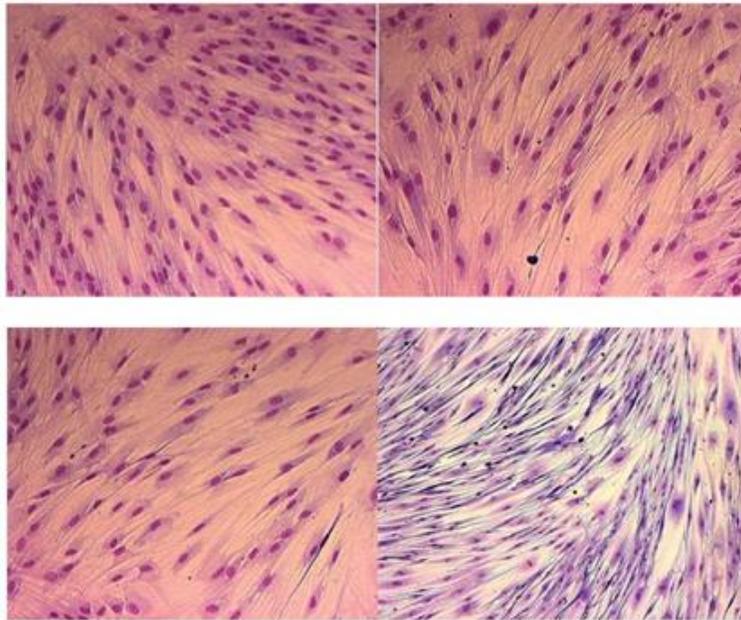
**Figura N° 9. Vacuola conteniendo viriones de RUB. La barra representa 100 nm. (Microfotografía electrónica Dr... JIA- Yee Lee.)**

En la figura N° 9 se puede observar una vacuola citoplasmática conteniendo viriones de virus RUB maduros. Un típico virión de RUB (flecha) consistente en un núcleo esférico circundado por una bicapa lipídica derivada del huésped. [15]

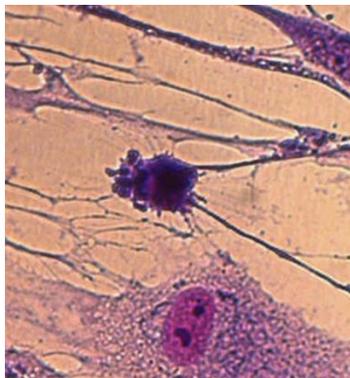
Es un virus muy inestable que se inactiva rápidamente con los disolventes lipídicos, tripsina, formalina, rayos UV y calor (56° C 30 minutos), es relativamente termolábil pero es más estable al calor que el virus del SAR. Resiste la congelación y los ultrasonidos, pero se degrada rápidamente con la congelación convencional a -20° C, pero es estable a -60° C o menos y cuando se liofiliza con estabilizadores. Cuando el virus se estabiliza con una proteína, es posible someterlo en forma reiterada a congelación y

descongelación sin pérdida del título. Es también sensible a una amplia gama de desinfectantes y se inactiva en hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70% y formaldehído

Cuando el virus de RUB se cultiva en tejidos de origen humano, mono o ratón no produce efecto citopático (ECP) por lo que su presencia debe demostrarse mediante técnicas de interferencia o mediante tinciones que permitan observar células que ingresan en fase de apoptosis. Como por ejemplo: Tinción con Giemsa. Obsérvese la evolución diaria de los cultivos y la aparición de apoptosis al 4° día post infección (dpi). [16]. Figuras N° 10 y 11.



**<sup>1</sup>Figura N° 10. Tinción con Giemsa en células VeRo de 1° a 4° dpi con virus de Rub.  
Foto: Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella"**



**<sup>2</sup>Figura N° 11 Célula apoptótica por efecto del virus de RUB  
Foto: Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella"**

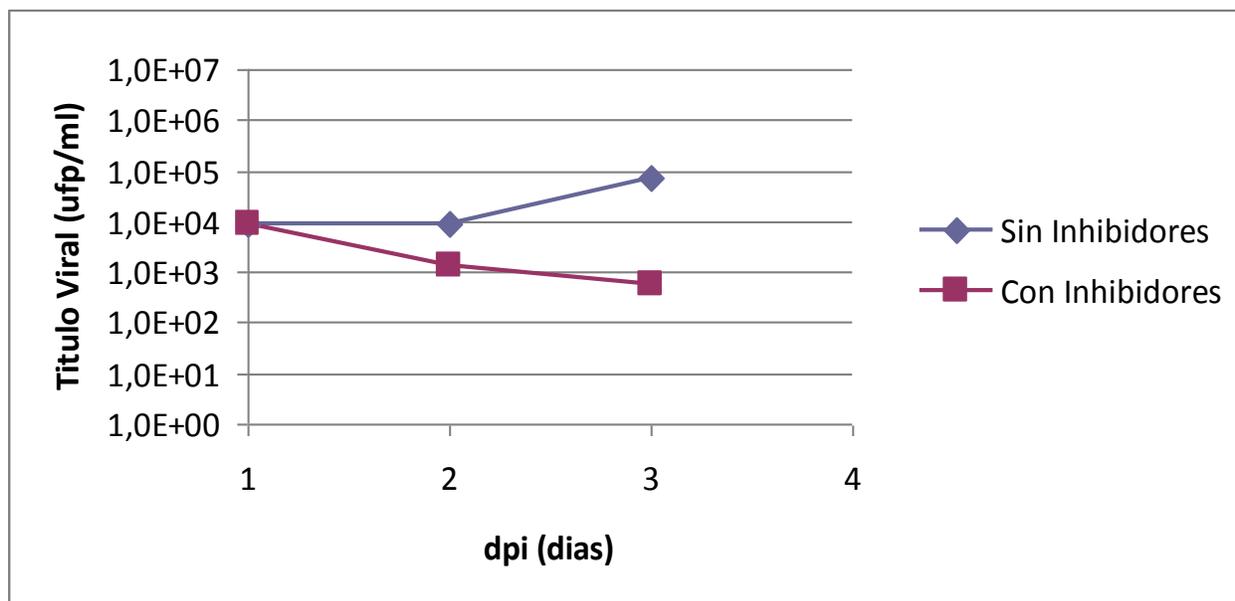
---

<sup>1</sup> Adamo MP, Zapata M, Frey TK. Analysis of gene expression in fetal and adult cells infected with rubella virus. *Virology*. 2008; 370:1-11

<sup>2</sup> Adamo MP. Estudio de un mecanismo de persistencia del virus Rubéola en la infección congénita. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias de la Salud con mención en Biomedicina. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. 2006

### 1.5 Participación de las vías de supervivencia/proliferación celular en la replicación viral.

El virus de RUB requiere de la supervivencia celular para optimizar su ciclo biológico y se la asegura induciendo la activación de las vías de proliferación celular. La actividad de las vías de las quinasas PI3K-Akt y Ras-RAF-MEK-ERK permite completar el ciclo de replicación viral. La participación de estas vías se demostró con la observación del incremento en el título viral cuando se cultivaron células infectadas sin la presencia de inhibidores específicos de las vías de proliferación celular. [16] Figura N° 12.



<sup>3</sup>Figura N° 12. Participación de las vías de supervivencia/proliferación celular en la replicación viral.

La inhibición de estas vías desencadena respuesta apoptótica (incremento de ECP, actividad de caspasa-3 y disminución del título viral)

La línea celular de hámster BHK-21 es el único sistema celular reportado hasta ahora en el que rubéola no induce apoptosis, por lo tanto puede constituir un modelo in vitro para el estudio de la relación virus-célula en la infección no lítica por rubéola como la que ocurre a nivel de las células embrionarias humanas. Esto se demostró en un estudio en el que se caracterizó el comportamiento in vitro de la cepa salvaje aislada del paciente ID 12135/03 para evaluar el comportamiento dual del virus RUB ya sea induciendo apoptosis en la infección aguda en células Vero o induciendo la activación de las vías de Akt y ERK (promotoras de la supervivencia /proliferación celular) en células BHK-21 en un modelo de infección persistente como el que ocurre en el tejido embrionario fetal. [17, 47]

### 1.6 Características clínicas y epidemiológicas.

El reservorio es el hombre y el modo de transmisión es por contacto directo con una persona infectada, a partir de gotitas respiratorias, o por contacto directo con las secreciones respiratorias de personas infectadas.

<sup>3</sup> Adamo MP. Estudio de un mecanismo de persistencia del virus Rubéola en la infección congénita. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias de la Salud con mención en Biomedicina. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. 2006

La transmisión de la RUB se puede producir desde 7 días antes a 5-7 días después de la aparición del exantema, pero es más contagiosa mientras persiste el exantema. También puede transmitirse a partir de casos subclínicos (suponen aproximadamente entre 25-50% de todas las infecciones).

La clínica de la RUB en niños y adultos es habitualmente benigna. Tras un período de incubación medio de 14 días con un rango de 12 - 23 días, aparece un exantema maculo papular en cara y cuello que se extiende al resto del cuerpo durante 1-3 días. Previamente, aparecen linfadenopatías retroauriculares y occipitales, febrícula o fiebre menor de 39° C, malestar general y conjuntivitis leve. Otras manifestaciones clínicas posibles son artralgias y artritis (principalmente en adultos) y menos frecuentemente, trombocitopenia y encefalitis.

En la mujer embarazada con infección por RUB clínica o asintomática, el virus infecta la placenta en el período de viremia; posteriormente, se produce la infección fetal. La infección intrauterina por reinfección materna es rara, esto se explica porque la inmunidad inducida por infección primaria (natural o por vacuna) hace que la viremia sea mínima o inexistente. [18, 19]

El determinante más importante de secuelas en el feto es la edad gestacional al momento de la infección. El riesgo de infección fetal depende de la etapa del embarazo en la que se produzca la infección: si la RUB se adquiere en el primer trimestre, el riesgo de infección fetal es del 40-90%; la tasa de infección fetal disminuye al 12% entre las 12 y 28 semanas de gestación, pero se vuelve a incrementar a un 58% si se adquiere la infección cerca del término.

La infección por RUB en una mujer embarazada puede producir aborto, muerte fetal o anomalías congénitas en el recién nacido. Así, en las mujeres infectadas durante las primeras 11 semanas un alto porcentaje de los fetos (65-85%) desarrollan un síndrome conocido como SRC que incluye, defectos oculares, sordera neurosensorial, defectos cardiacos, anomalías neurológicas (retraso mental) y retraso del crecimiento. Otras manifestaciones menos frecuentes son: esplenomegalia, hepatitis, púrpura trombocitopenia o diabetes mellitus al final de la infancia.

Hasta dos tercios de los recién nacidos con RUB congénita, que son expuestos después de la semana 12 y son asintomáticos al nacimiento, requieren un seguimiento cercano a largo plazo, porque pueden desarrollar secuelas en los primeros cinco años de vida. [19]

Las manifestaciones del SRC pueden retrasarse de 2 a 4 años. El riesgo de SRC disminuye a un 10 -20% si la infección ocurre entre las semanas 13 y 16 de gestación, mientras que es muy raro que aparezcan defectos congénitos si la embarazada se infecta a partir de la 20 semana de gestación.

La mayoría de los recién nacidos afectados presenta serología IgM frente a RUB positiva durante los primeros 6 meses y el 60% permanecen con serología IgM positiva los 6 meses siguientes. Estos niños pueden excretar el virus durante más de un año, por lo que pueden transmitir la infección a sus contactos. [19, 20]

La susceptibilidad se manifiesta a partir de la pérdida de anticuerpos maternos entre los 6 y 9 meses de edad.

La vacuna de la RUB es una vacuna a virus vivos atenuados. En el 95% o más de los vacunados se produce seroconversión entre 21-28 días tras la vacunación.

Probablemente, con una sola dosis de vacuna se produce inmunidad para toda la vida en el 90% de los vacunados pero se aconseja realizar la determinación de anticuerpos de tipo IgG como control para establecer el estado serológico del paciente y aconsejar sobre la necesidad o no de vacunación

antirrubéolica. La IgM se puede detectar en sangre, dependiendo de la técnica que se utilice, hasta pasados 6 meses de la vacunación. [19, 20]

No se han identificado casos de SRC tras la vacunación, antes o en la fase temprana del embarazo. Sin embargo, se debe esperar un mes tras la vacunación frente a la rubéola antes de planificar un embarazo, dado que por tratarse de una vacuna producida con virus vivos atenuados, cabe la posibilidad de reversión a virus salvajes, aun cuando no existan casos registrados de niños nacidos con SRC a causa de la aplicación de la vacuna. En caso de administración accidental de la vacuna a una mujer embarazada, no está indicado el aborto terapéutico. [21, 22, 23]

### 1.6.1 Rubéola infanto juvenil o postnatal.

Es una enfermedad sistémica aguda benigna, inaparente en más del 50% de los casos. En los casos sintomáticos se inicia con un pródrómo escaso, con coriza, odinofagia, fiebre moderada, conjuntivitis, cefalea y mialgias. Es frecuente la linfadenopatía generalizada de preferencia suboccipital, retroauricular y cervical posterior, que se inicia en la fase prodrómica y persiste semanas. A los 4-5 días del inicio de los síntomas aparece un cuadro exantemático maculopapular rosáceo, que se inicia en la cara y se extiende rápidamente a tórax, abdomen y extremidades.

Durante el curso de una infección aguda por RUB se puede producir el contagio desde el inicio de la infección mediante micro gotas aerosolizadas. El exantema o rash, es con frecuencia el primer signo de infección, que aparece después de dos semanas y dura de 2 a 10 días. El paciente está infectado y libera virus desde el inicio de la infección hasta 1 a 2 semanas después de la aparición del exantema. Figura N° 13.

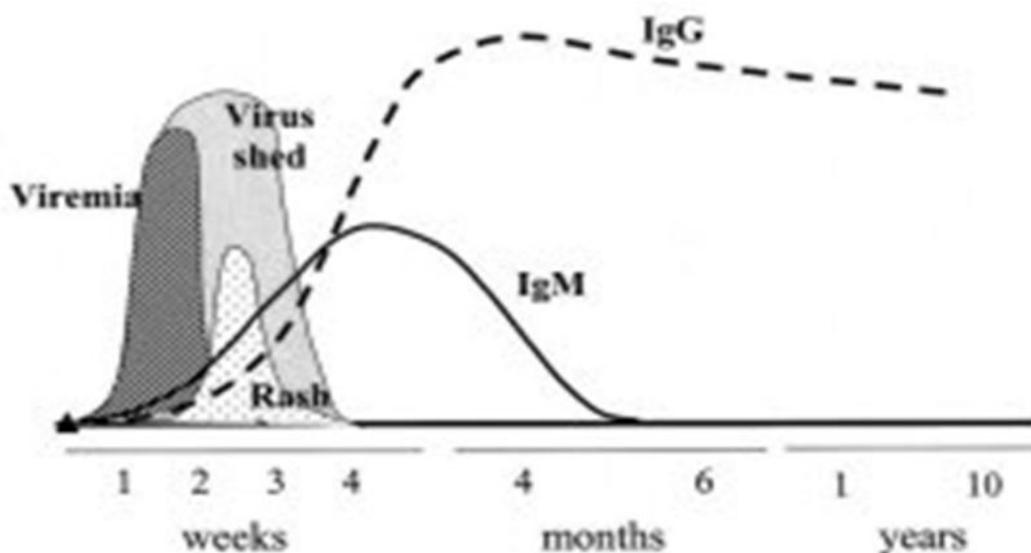


Figura N° 13. Evolución de una infección aguda por RUB.

Tras la infección por RUB se desarrolla inmunidad permanente en la mayoría de las personas. Esta inmunidad se basa en el desarrollo conjunto de anticuerpos neutralizantes y hemaglutinantes frente al virus. Después de la infección el título de anticuerpos séricos se eleva alcanzando su concentración máxima a las 2 o 3 semanas de la aparición de los síntomas. Figura N° 13. Esta infección natural provoca igualmente la aparición de IgA secretora en la mucosa respiratoria.

A pesar de la presencia de anticuerpos la reinfección es posible. Las reinfecciones son en la mayoría de los casos asintomáticas y únicamente son demostrables serológicamente (serorrefuerzo). En la

reinfección es posible que ocurra una replicación local del virus en el aparato respiratorio superior pero su paso a la sangre es controlado y abortado por los anticuerpos existentes (IgA e IgG). Así pues la reinfección no virémica en la embarazada no representa riesgo fetal. [18]

Las reinfecciones y por tanto las respuestas inmunes secundarias son posibles pero solo de forma excepcional van a tener relevancia clínica. [18].

En mujeres adultas son frecuentes las artralgias y artritis transitorias en dedos, rodillas y parece estar relacionada con la presencia de inmunocomplejos circulantes. Las complicaciones son raras y se presentan como casos de encefalitis, síndrome de Guillain-Barré, miocarditis y trombocitopenia. El diagnóstico presuntivo se basa en el cuadro clínico y los antecedentes epidemiológicos, pero el diagnóstico de certeza se realiza por serología para anticuerpos específicos o por aislamiento viral en secreción nasofaríngea, sangre, orina o LCR y por técnicas moleculares de amplificación y detección de fragmentos del genoma viral. (RT-PCR).

### **1.6.2 SRC e infección congénita por el virus de la RUB (IRC)**

El SRC es la consecuencia más grave de la RUB. Aparece como consecuencia de la infección del feto por el virus durante el primer trimestre del embarazo y puede ser causa de aborto espontáneo o inducido, nacido muerto o múltiples anomalías congénitas; pueden estar afectados prácticamente todos los órganos. La sordera es la manifestación más frecuente y a menudo la única del SRC. Cuando la infección fetal ocurre sin malformaciones congénitas se denomina infección congénita por el virus de la RUB (IRC).

La especificidad del órgano está dada en general por el momento de la infección intrauterina; sin embargo, la relación entre las anomalías fetales y el tiempo de la infección no siempre es clara.

Una vez establecida la infección, ésta se puede diseminar a muchos órganos y las lesiones se pueden acumular. Las anomalías oftálmicas y cardíacas se suelen presentar con una infección ocurrida durante las 8 primeras semanas del embarazo, mientras que el daño cerebral y la sordera cuando la infección ocurre en las 18 primeras semanas del embarazo.

Aunque la vacunación antirrubéólica está contraindicada durante el embarazo, no se han notificado casos de SRC en más de 1.000 embarazadas susceptibles, que recibieron de forma inadvertida la vacuna al comienzo del embarazo. En una investigación de casi 19.000 embarazadas inadvertidamente vacunadas contra la RUB en una gran campaña masiva, tampoco se encontraron pruebas de casos de SRC.

Un diagnóstico precoz en el RN permite tomar las precauciones necesarias para evitar la diseminación de la enfermedad en las terapias neonatales y en las guarderías, como así también permite adoptar medidas destinadas a paliar las secuelas de esta patología en el niño.

Si bien la RUB ha sido prácticamente erradicada en los países desarrollados, aun se detectan casos entre poblaciones no inmunizadas, probablemente debido a procesos migratorios desde países sin programas de vacunación o con programas deficientes.

### **1.7 Impacto de la introducción de la vacuna antirrubéólica.**

Con la incorporación de la vacunación triple viral sarampión-rubéola-parotiditis (SRP), al Calendario Nacional de Vacunaciones (CNV) en el año 1997 se produjo una disminución de la incidencia de RUB (Figura N° 14). Esto puede deberse a la introducción, en carácter de obligatoria de la vacuna, pero existen dudas al respecto ya que según estimaciones del propio Sistema Nacional de Vigilancia

Epidemiológica (SINAVE) un importante subregistro de casos con baja confirmación por laboratorio y la experiencia internacional en vacunación antirrubéolica habla de un mínimo de 15 a 20 años para evaluar el éxito de las campañas. La disminución tan marcada en el número de nuevos casos de RUB a partir de 1997 tendría su explicación fundamentalmente en la amplia diseminación natural generada por la gran epidemia de RUB ocurrida ese año, que por la acción de los planes de inmunización que recién se iniciaban y que fueron mutando en sus objetivos hacia diferentes grupos etarios generando un corrimiento hacia jóvenes y adultos tanto hombres como mujeres. Esto se observó en los altos valores (cerca del 100%) de anticuerpos protectores de tipo IgG hallados en un trabajo previo realizado a nivel país en 2004. [24]. Sucesivas modificaciones se fueron generando en las poblaciones objeto de inmunización y se comprobó esa necesidad de una mayor cobertura con la evidencia de los brotes ocurridos en 2007-2009 probablemente importados (genotipo 2B) que sufrieron precisamente los tres países (Argentina, Brasil y Chile) que aplicaron campañas segmentadas de inmunización hacia mujeres en edad fértil.

Antes de la introducción de la vacuna contra la rubéola en los esquemas regulares de inmunización, las epidemias de esta enfermedad ocurrían cada 4 a 6 años. El análisis de la distribución de casos de rubéola en los años previos y posteriores a la introducción de la vacuna muestra que el número absoluto de casos fue mayor en el grupo de edad de 5 a 9 años, seguido en frecuencia por el grupo de 1 a 4 años. Las tasas por 100.000 muestran una importante reducción en el número de casos en la población menor de 15 años, pues ha sido el grupo objeto de los programas de vacunación.

En la Figura N° 14 se muestra el cambio en el patrón de brotes en el país una vez introducida la vacunación de rutina.

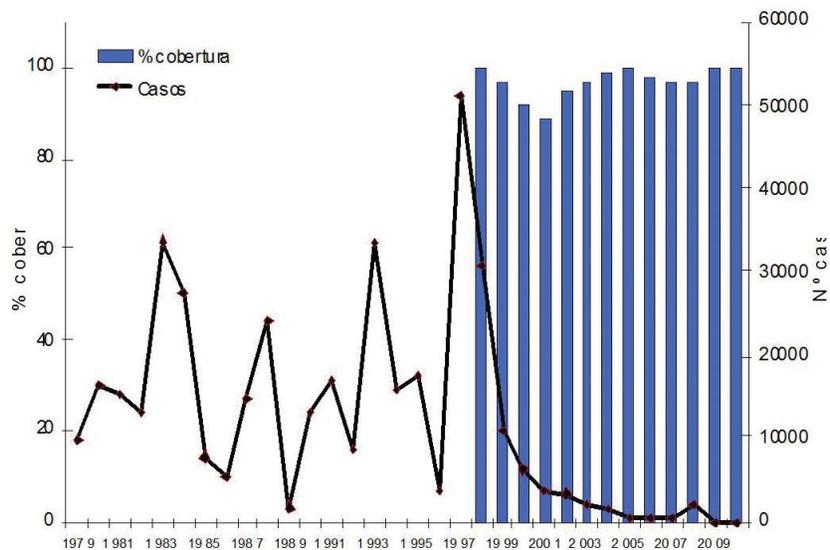
Durante 2002, se registraron dos brotes circunscriptos y limitados de rubéola: uno en Formosa (La Herradura) con cuatro casos confirmados y el otro en Salta (Tartagal), con ocho casos confirmados por criterios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. A partir del año 2003 se inició el proceso de confirmación de los casos de rubéola por laboratorio.

En agosto de 2007, se detectó un brote en Córdoba, que se extendió posteriormente a San Juan, Corrientes, San Luis, Santa Fe y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. El grupo más afectado fue el de los adolescentes varones.

Durante 2008 se registraron casos secundarios en la mayoría de las provincias de nuestro país. En este brote, que se extendió hasta 2009, se estudiaron 4.143 casos sospechosos. De estos, se confirmaron 93 casos en 2007, y 2 casos en 2008 y 2009, respectivamente.

Los últimos casos confirmados de rubéola endémica en el país fueron notificados en las provincias de Buenos Aires y Chaco en las SE 4 y 5 del año 2009, respectivamente. Se trató de varones adultos, sin antecedentes de vacunación. En ninguna provincia se identificaron nuevos casos en fechas posteriores a estas.

El 3 de Junio del 2014 se informa de un caso de rubéola en un varón de 31 años de edad residente de la Ciudad de Buenos Aires. El mismo se confirmó como perteneciente al genotipo 2B. [23]



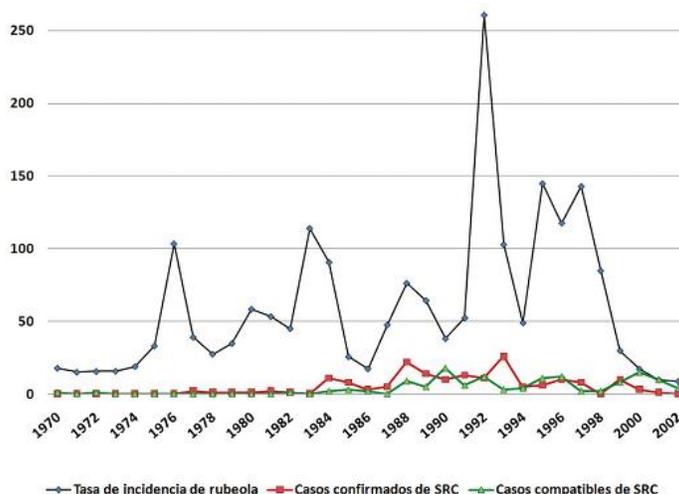
**Figura N° 14 Casos notificados de rubéola. Argentina, 1979 – 2010**  
Fuente: Sinave/Pronacei/Ministerio de Salud de La Nación

### 1.8 Síndrome de Rubéola Congénita (SRC) en Argentina.

La vacuna contra la rubéola, como componente de la vacuna triple viral, se incorporó al CNV en 1997 con un esquema de dos dosis (la primera, al año de vida y la segunda, al momento del ingreso escolar).

En 2003, se incluyeron al CNV la vacunación con vacuna contra sarampión y rubéola (doble viral) durante el puerperio o inmediatamente después de aborto y la vacunación contra sarampión, rubéola y parotiditis (triple viral) para niños y niñas de 11 años de edad. Ese año, se dio comienzo a la vigilancia integrada de sarampión y rubéola y la detección del SRC.

En la Figura N° 15, se puede observar la distribución de los casos sospechosos y confirmados de SRC y su relación con la incidencia de RUB en Argentina desde 1970 a 2002. [25]



**Figura N° 15 Distribución de los casos sospechosos y confirmados de SRC y su relación con la incidencia de rubéola. Argentina, 1970-2002. Fuente: Rev. Hosp. Niños Buenos Aires**

En 2003 se confirmó en nuestro laboratorio un caso de SRC en la provincia de Buenos Aires, el cual fue aislado y clasificado filogenéticamente según se demuestra en el cuerpo de esta tesis

En 2008, se confirmó un caso de SRC en San Juan. La madre no pudo certificar su vacunación antirrubéolica. Se identificó el genotipo 2B.

En el periodo de tiempo transcurrido desde septiembre de 2008 a diciembre de 2009 se confirmaron 12 casos de SRC, de los cuales 3 se aislaron en nuestro laboratorio y pudo efectuarse genotipificación, según se demuestra en el cuerpo de esta tesis.

Con esta perspectiva, que se ha repetido en la totalidad de los países de América, (con excepción de Haití) la OPS a través de su Programa Ampliado de inmunización en las Américas (PAI) Agosto / Diciembre de 2002 y la XVI Reunión de Enfermedades Prevenibles por vacunación de la Región Cono Sur y Brasil, 29 y 30 de agosto de 2002, estableció: **“la meta de la vacunación contra RUB es prevenir el SRC y no necesariamente la infección por RUB.”**Y en otro párrafo agregó: **“Acelerar la integración de la vigilancia de la RUB con la del SAR y proceder a la vigilancia del SRC”**. Para ello es necesario implementar un sistema de vigilancia epidemiológica activa en red con laboratorios de todo el país, y tomar como objetivo la detección de casos sospechosos de SRC, su confirmación por el laboratorio nacional de referencia y en los casos confirmados positivamente por serología se debe intentar el aislamiento viral, identificación y caracterización genética de cepa circulante, asimismo en los casos de fiebre y exantema no atribuidos a SAR o RUB es necesario determinar la etiología viral, mediante un diagnóstico diferencial completo. [26]

En la reunión de OPS/PAI de diciembre de 2002 se destacaba a propósito del funcionamiento de las redes de laboratorio de SAR y RUB el escaso número de muestras aisladas: **“...el aislamiento viral es crítico para asegurar la determinación de los genotipos y la evaluación de la estrategia para abordar la fase posterior a la eliminación”...**

Como conclusión, en Septiembre de 2003: OPS, CDC y los ministros de Salud de las Américas anunciaron una meta factible de alcanzar: **“La erradicación de la RUB y el SRC para el año 2010”**.

La evidencia muestra las dificultades que se presentan para cumplir con las metas previstas pero asimismo demuestran los grandes avances logrados en el control de estas patologías.

### 1.9 Diagnóstico de laboratorio.

Dado que la infección por el virus RUB produce una enfermedad generalmente leve el diagnóstico clínico es dificultoso. El cuadro clínico con presentación de fiebre y exantema es inespecífico y requiere de un diagnóstico diferencial preciso y completo. [26] Una lista de varias patologías de origen viral comparten la misma sintomatología o presentan leves diferencias. Ver el cuadro siguiente.

#### Características de algunas enfermedades que cursan con fiebre y exantema generalizado.

Enfermedad	Rubéola	Sarampión	Dengue	Erythema Infectiosum	Roséola Infantum
Agente causal	Rubéola	Sarampión	Dengue	Parvovirus B-19	Herpes virus VI
Incubación (días)	14-23	7-18	2-12	4-20	10
Fiebre	SI	SI	SI	SI	SI
Rash	SI	SI	SI	SI	SI
Conjuntivitis	Si	Si	Si	SI	NO

Catarro nasal	SI	SI	SI	SI	NO
Unión de síntomas	SI *	NO	SI	SI **	NO
Adenopatías ***	SI	NO	NO	NO	SI
Test diagnostico	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM
Muerte fetal	SI	SI	SI	SI	NO
Malformaciones	SI	NO	NO	NO	NO
Inmuno-prevenible	SI	SI	NO	NO	NO

\*Mujeres adultas; \*\* Adultos; \*\*\* post-auriculares. Adaptado de: Benenson 1995, Frieden & Resnick 1991, Remington & Klein 1995.

El cultivo del virus a partir de secreciones nasofaríngeas, orina, líquido amniótico y placenta es complicado ya que no produce efecto citopático en cultivos celulares. Por todo lo expuesto el diagnóstico de elección es el serológico.

El virus RUB tiene antígenos hemaglutinantes, fijadores del complemento, precipitantes y agregantes de las plaquetas. La hemaglutinina está en relación con las proyecciones virales fundamentalmente con la proteína E1 ya que E2 es prácticamente inaccesible al sistema inmune. Sobre E1 se localizan al menos seis epítopes lineales independientes. Cuatro de ellos están asociados con la hemaglutinación, otro con la neutralización y el sexto no tiene función conocida. Sobre la proteína C se encuentran dos epítopes para las células B y uno para las T. Sobre E2 se han encontrado cuatro antígenos específicos que han hecho posible identificar cuatro cepas diferentes de virus todas con igual proteína E1. Las dos proteínas-E1 y C- tienen un papel importante en el desarrollo de la inmunidad protectora por lo que la prueba serológica ideal será aquella que detecte, conjuntamente, la presencia de anticuerpos frente a todos los dominios. [20]

El principal problema para realizar el diagnóstico serológico fue definir la concentración de anticuerpos que conferirían protección frente al virus y el nivel de IgM específica que se correlacionaba con enfermedad clínica. Respecto al primer punto se ha establecido que un nivel protector se alcanza con 15 UI/ml (UI definida por OMS) y todos los valores de inmunidad deberán ser relacionados con esta unidad. La inexistencia de un suero patrón para la definición de unidades IgM en relación con la enfermedad aguda ha hecho difícil la estandarización de los procedimientos. En 1981 Mortiner y colaboradores definieron mediante un procedimiento de radioinmunoensayo (RIA) que tres unidades arbitrarias MACRIA (m-antibody-capture-RIA) de IgM se correspondían con enfermedad aguda. Desde entonces todos los cut-off de las técnicas ELISA para la detección de IgM específica se corresponden con estas 3 UA/ml sea cual sea el modo en que sea expresado. [20]

Algunas notas sobre *la cinética de los anticuerpos* merecen ser puntualmente resaltadas:

La IgG específica puede ser demostrable entre los 15-20 días después de la infección por lo que la presencia de esta clase de anticuerpos asegura una antigüedad de los mismos de 2 o 3 semanas. Tras la vacunación su detección es algo más tardía situándose entre los 30 y 50 días. Siempre son positivos en la fase de exantema. Figura N° 13.

Dado que en todas las infecciones congénitas la persistencia de los anticuerpos más allá del 6º o 7º mes con valores superiores o iguales de IgG a los del nacimiento es una evidencia de infección congénita

sean cuales sean los valores de IgM. La disminución significativa del título de los mismos (aproximadamente a la mitad por mes) indica que los anticuerpos han sido transferidos desde la madre. Figura N° 16.

### RESPUESTA INMUNITARIA DEL NIÑO CON SINDROME DE RUBEOLA CONGENITA

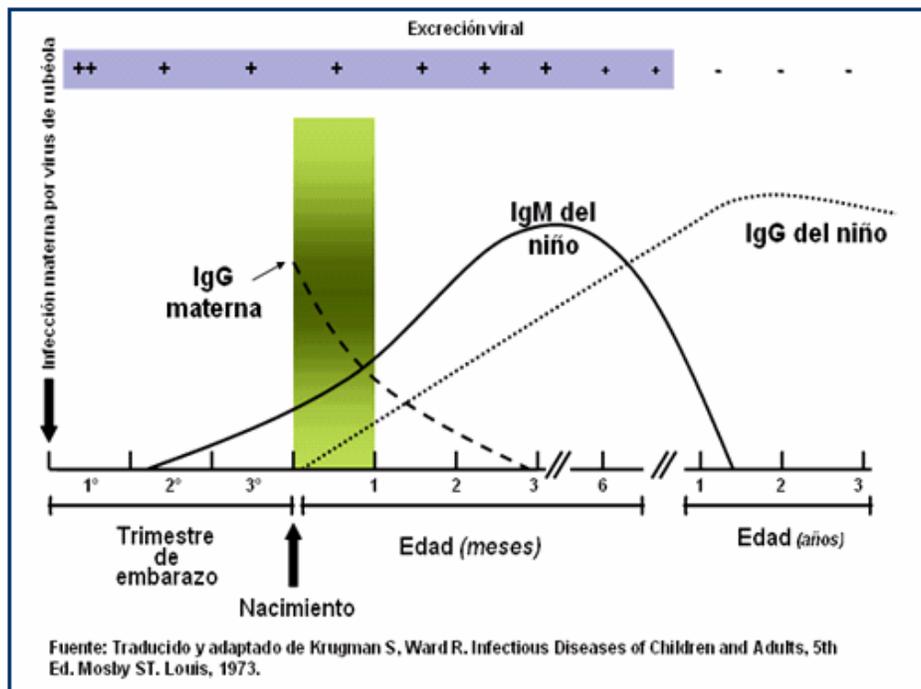


Figura N° 16 Respuesta Inmunitaria del niño con SRC.

Es importante diferenciar, en el caso de las embarazadas entre: primoinfección, vacunación previa, reinfección y anticuerpos IgM específicos con persistencia a largo plazo para valorar el posible riesgo fetal. Esto puede requerir más pruebas serológicas para interpretar los resultados y pruebas adicionales como, por ejemplo, la determinación de la avidéz de los anticuerpos IgG.

El término avidéz se utiliza para describir la fuerza neta (afinidad) de la interacción de un anticuerpo multivalente y un antígeno multideterminante.

La primera reacción del sistema inmune a una infección es la formación de anticuerpos de baja avidéz. Con el progreso de la infección y con el paso de tiempo, la avidéz se aumenta con la formación de IgG cada vez más adaptado al antígeno.

Mientras la IgG de alta avidéz no es detectada en el suero se puede deducir que una infección está en la etapa temprana.

Antes de considerar la necesidad de un diagnóstico prenatal o un aborto, se debe llevar a cabo una evaluación, tanto de los resultados serológicos realizados con diferentes métodos analíticos como de los datos clínicos (resultados anteriores, historia de vacunaciones, contacto reciente con el virus o síntomas)

La *avidéz alta de los anticuerpos* indica alta experiencia y conocimiento de la estructura del antígeno; esto solo se consigue después de un tiempo en el que el clon de linfocitos B productor de estos anticuerpos ha sido seleccionado, entre otros muchos, como único productor de los mismos. Esta

selección suele comenzar pasado al menos unas 6 - 10 semanas después de la infección. En general una avidéz inferior al 25% indica antigüedad de anticuerpos no superior a tres meses. [20]

Los **resultados de avidéz** se interpretan según los siguientes criterios:

- Avidéz **Baja** (< 50 %) y se considera que la infección es reciente.
- Avidéz **Indeterminada** (entre 50 y 60 %) No se puede asegurar que se trata de una infección primaria o pasada.
- Avidéz **Elevada** (> 60 %) Se considera que se trata de una infección antigua, ya sea producto de una infección natural o de la vacunación.

La determinación de avidéz en el neonato es de difícil interpretación, por lo que no resulta aplicable para confirmar la IgM positiva en el primer caso en que solo se cuenta con muestra serológica.

En algunas ocasiones, los recién nacidos infectados por rubéola presentan IgM específica negativa hasta que tienen un mes de vida, por lo cual en casos de fuerte evidencia clínica o sospecha del médico se recomienda la toma de una nueva muestra de suero al mes de vida junto con muestras para diagnóstico molecular (Orina y exudado nasofaríngeo.) [19]

En estas situaciones de infecciones neonatales o congénitas es donde cobra especial importancia el diagnóstico molecular mediante reacciones como la RT-PCR dado que desde el primer día de vida e incluso antes de su nacimiento se puede detectar la presencia de ARN viral, cuando los anticuerpos de tipo IgM aún no se elevan debido a inmadurez inmunológica. [27; 28] Los anticuerpos de clase IgM se detectan ya, en un número alto de casos, a partir del tercer día después del exantema y en el 100 % de los pacientes entre los días 7 y 11 después del mismo. En los individuos vacunados podemos evidenciarla en el 60-80% de los casos así como en el 90-97% de los niños infectados intraútero en algún momento de un período comprendido entre las 2 y las 24 semanas después del nacimiento. La persistencia de la IgM después de una infección aguda o vacunación puede estimarse en unos 30 días a títulos progresivamente decrecientes. [20] Figura N° 13.

Los estudios serológicos, en ocasiones son insuficientes para confirmar una RUB congénita, por causas, que pueden ser: Ausencia de exantema, resultados serológicos no concluyentes, infección contraída entre las semanas 13 a 20 de gestación o por reinfección durante el primer trimestre según describe [29, 30]. En estos casos es necesario recurrir a técnicas moleculares sensibles que determinen directamente la presencia de ARN viral aun en pequeñas cantidades, en muestras clínicas de la madre y principalmente en el líquido amniótico, estableciendo si corresponden a los genotipos circulantes en la región o si se trata de casos importados, determinando asimismo cuando estamos ante cepas salvajes o de tipo vacunal.

En el laboratorio se pueden usar uno o varios de los siguientes métodos con el fin de aportar la prueba de la infección.

### **1.9.1 Determinación de anticuerpos de clase IgM.**

En un laboratorio aprobado o certificado, excepto cuando la persona ha recibido una vacuna con componente antirrubéolico entre 8 días y 8 semanas antes de la obtención de la muestra y no existen pruebas de transmisión de RUB en la comunidad ni antecedentes de viaje.

### **1.9.2 Determinación de anticuerpos de clase IgG.**

El aumento al cuádruple o más de los títulos de anticuerpos IgG (cuando la segunda muestra de suero se recoge como mínimo 10 días después de la primera muestra aguda) indica infección primaria por

RUB excepto cuando la persona ha recibido una vacuna que contenga un componente antirrubéolico entre 8 días y 8 semanas antes de la obtención de las muestras y no existen pruebas de transmisión de RUB en la comunidad ni ningún antecedente de viaje. Las muestras séricas se deben analizar simultáneamente en paralelo (muestras pareadas).

### **1.9.3 Determinación de la avidéz de anticuerpos IgG.**

Un porcentaje significativo de mujeres no resulta inmunizado durante la adolescencia; se calcula que un 10-20% de las mujeres en edad fecunda, no vacunadas, no están inmunizadas contra el virus. El diagnóstico de la RUB en fase aguda, es especialmente importante en las mujeres embarazadas y puede hacerse determinando la presencia de anticuerpos IgM en una sola muestra, en este caso el diagnóstico puede verse complicado por la persistencia, algunas veces prolongada, de las IgM anti-RUB, o por la presencia de IgM en caso de reinfección asintomática que no presente riesgos para el feto. [20, 22]

En estas situaciones la medida de la avidéz de los anticuerpos IgG es particularmente útil ya que la primera respuesta de anticuerpos de clase IgG a la infección está formada por anticuerpos de baja avidéz, cuya unión con el antígeno puede disociarse fácilmente.

En general los ensayos comerciales de avidéz se basan en el método inmunoenzimático (ELISA), en el cual el suero del paciente se hace reaccionar en duplicado con el antígeno RUB adherido a los pocillos de una microplaca. Tras la primera incubación, seguida de un lavado de la microplaca, los duplicados de cada suero se incuban con dos soluciones de tampón diferentes, una de las cuales contiene urea. Este último reactivo provoca la disociación de la unión antígeno-anticuerpo formado precedentemente, en distinta medida según la avidéz de los anticuerpos. Tras un nuevo lavado, los anticuerpos que queden unidos a la fase sólida se evidencian mediante sucesivas reacciones con un anticuerpo anti-IgG humanas, marcado con peroxidasa (HRPO), y con un cromógeno (TMB) en tampón substrato. La relación entre las densidades ópticas de los dos pocillos, medidas a 450 nm o a 405 nm, se calcula y expresa como porcentaje de avidéz.

#### Interpretación de los resultados serológicos

Las pruebas serológicas ponen en evidencia la presencia de anticuerpos de tipo IgM contra la RUB o la persistencia, más allá del tiempo previsto de su desaparición, de los anticuerpos IgG transmitidos pasivamente por la madre.

En algunos casos de SRC, los anticuerpos IgM se pueden encontrar hasta un año después del nacimiento; se ha detectado persistencia de anticuerpos IgG después de los 6 meses de edad en un 95% de los casos. [31]

Se han descrito resultados falsos positivos de las pruebas serológicas de IgM contra la RUB, en personas con infecciones por parvovirus B19, con una prueba heterófila positiva para mononucleosis infecciosa o con un factor reumatoideo positivo. [31]

#### 1.9.4 Cultivo con identificación positiva del virus de la RUB por Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

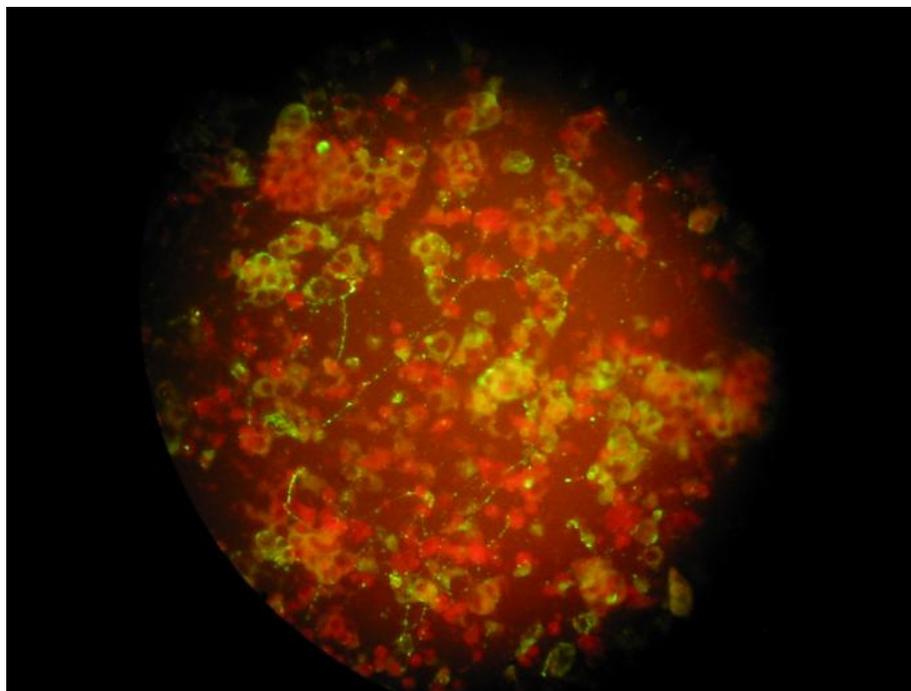


Figura N° 17. Inmunofluorescencia indirecta de RUB en células Vero. Foto: Laboratorio de Virosis Congénitas.

El virus de la RUB se puede aislar de muestras nasales, sanguíneas, faríngeas, urinarias y de LCR de casos de RUB y de SRC. El virus se puede aislar de la faringe desde una semana antes hasta dos semanas después de la aparición del exantema. Si bien el aislamiento viral es diagnóstico de infección por el virus de la RUB, este cultivo es laborioso y exige mano de obra experta. Las muestras nasales, faríngeas, sanguíneas, urinarias y de LCR se pueden usar, junto con tejidos de biopsia o de autopsia, en la confirmación por el laboratorio de los casos de SRC. El cultivo viral puede confirmarse mediante IFI dirigida contra epitopes de gp E1 y C (Figura N° 17) o mediante búsqueda del genoma viral en el sobrenadante de células infectadas por técnicas de RT-PCR y RT-PCR Real Time (Figura N° 18).

#### 1.9.5. Detección del ARN viral mediante RT-PCR Real Time.

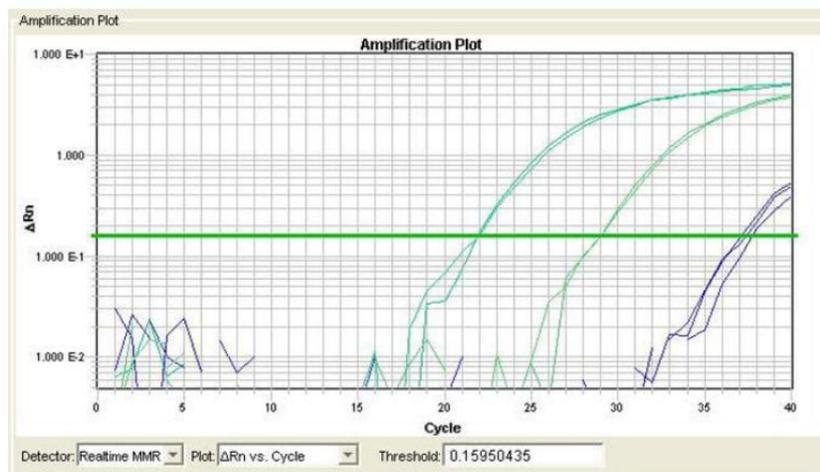


Figura N° 18. Gráfico de reacción de RT-PCR para diagnóstico de RUB en tiempo real con controles (alto y bajo) y una muestra típica.

#### Interpretación de resultados para RuV, RNasa P

Gen Viral	Gen RNasa P	Resultado
< 40	< 40	Positivo
< 40	Indeterminado	Positivo
Indeterminado	< 40	Negativo
Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado

- Si la PCR con los primers/sondas RuV producen un Ct por debajo de 40, la muestra es positiva para rubéola. No importa si la reacción RNasa P es positivo o negativo.
- Si el resultado de PCR para la RuV es indeterminado, pero la PCR del RNasa P de PCR produce un Ct por debajo de 40, la muestra es negativa para la rubéola. El resultado positivo RNasa P indica que el ARN que se extrajo es suficiente para la muestra y permite que la amplificación ocurra.
- Si el resultado de la PCR para RuV y la PCR RNasa P son indeterminado, la muestra se interpreta como indeterminada. Si no es posible determinar un resultado debido a que no era suficiente el ARN para permitir que la amplificación se produzca.
- Las muestras clínicas con 2 o 3 reacciones positivas (fuera de la 3 repeticiones en la corrida por placa) se reporta positivo.

### 1.10 Epidemiología molecular y genotipificación.

Los genotipos del Clado 2 serían por tanto considerados importados en las Américas, de acuerdo con lo que se plantea en el informe redactado por el Ministerio de Salud del vecino país de Chile en ocasión de la emisión de Certificados de la eliminación de SAR y RUB en Las Américas [45]. En este documento se analiza la distribución de los genotipos detectados en Las Américas de 1997 a 2010.

En 2007 se produjo un resurgimiento de los casos de RUB debido a la importación de virus en países donde inicialmente se había vacunado sólo a las mujeres en campañas de vacunación masiva. Los casos confirmados aumentaron de 2.919 en 2006 a 13.187 en 2007, como resultado de la aparición de brotes en Argentina, Brasil y Chile.

En el 2008 se notificaron 4.536 casos confirmados de rubéola en la Región, de los cuales Argentina y Brasil representaban al 98% de los casos. Argentina reportó el último caso confirmado de rubéola endémica en la semana epidemiológica 5 de 2009. Canadá y Estados Unidos han reportado 7 y 4 casos de rubéola asociados a importación (genotipo 2B en los Estados Unidos), respectivamente.

En 2009, en América se reportaron 20 casos de SRC en: de los cuales en Argentina (3), Brasil (7), Canadá (1), Estados Unidos (2) y otros.

Además, Brasil reportó 8 casos de infección de rubéola congénita (IRC).

A pesar de la limitada información sobre epidemiología molecular del virus rubéola, el genotipo 1C se considera endémico en América y no ha sido identificado en otras regiones del mundo. Una de las últimas transmisiones ocurridas en Chile y Perú ha sido por ese genotipo (2005).

Por otra parte, desde 2006, el genotipo 2B ha sido aislado durante los últimos brotes de rubéola reportados en Brasil, Chile y Argentina, por lo que se considera el segundo genotipo endémico en América (probablemente introducido desde Europa) Figura N° 19.



**Figura N° 19 Genotipos del virus de la rubéola detectados en las Américas, 1997-2010.**

En la reunión de la OMS en septiembre de 2004 se sentaron las bases sobre la normalización de una nomenclatura que describa las características genéticas del virus salvaje de la RUB y sobre la aplicación de protocolos uniformes de análisis genético [32].

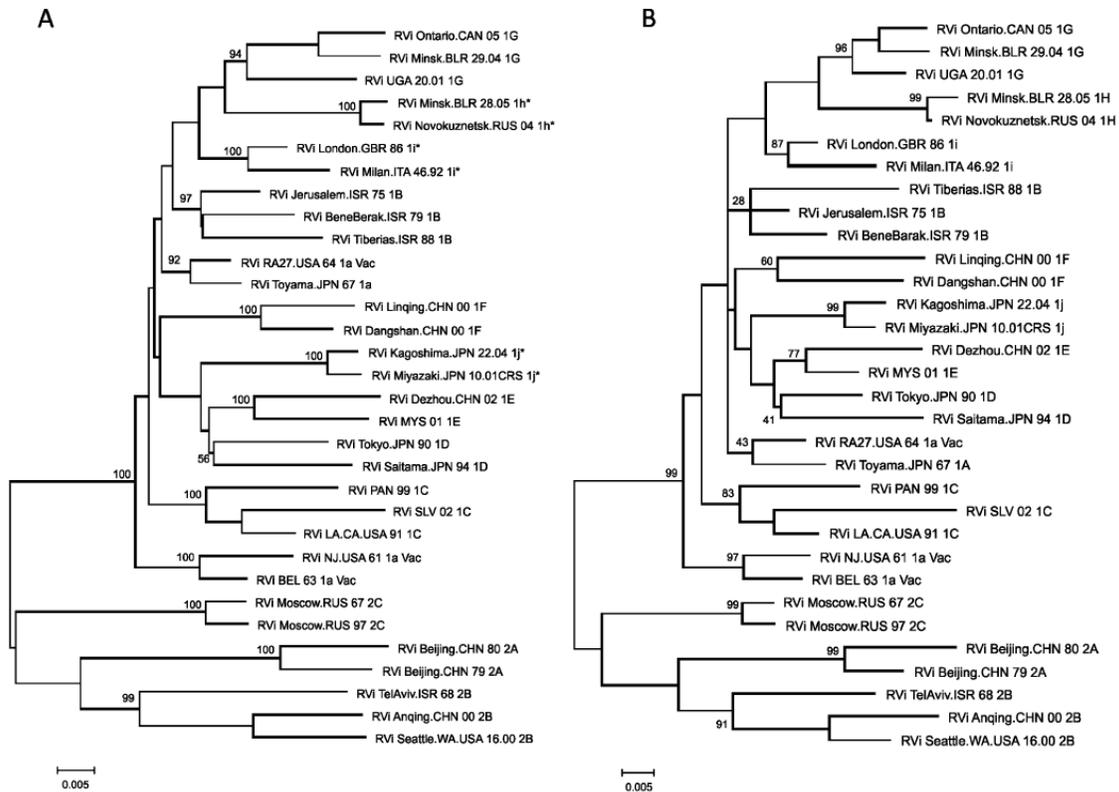
En 2005, una nomenclatura sistemática de los genotipos de RUB fue adoptada por la OMS y se ha descrito y actualizado en [32; 33; 34]

La mayoría de los estudios genéticos de los virus salvajes de la RUB se ha conducido mediante secuenciación completa del genoma o de porciones de la región que codifica la proteína E1 de la envoltura. En la actualidad, se utilizan en la caracterización genética diferentes porciones (ventanas) de la región que codifica E1, pero la OMS recomienda en los estudios de rutina de epidemiología molecular una ventana de 739 nucleótidos, entre los nucleótidos 8731 y 9469. [34]

La caracterización genética ha identificado 2 clados que difieren en un 8% -10 % a nivel de nucleótidos.

El clado 1 se divide en 10 genotipos ( 1a, 1B , 1C , 1D , 1E , 1F , 1G , 1H , 1I , y 1J ) , de los cuales 9 son reconocidos y solo 1 permanece como provisional: el genotipo 1a (designados por letras minúsculas) [34]. Un genotipo provisional se convertirá en un genotipo establecido (letra mayúscula) cuando se obtengan los virus de referencia y se aclaren las relaciones filogénicas entre el genotipo provisional y los demás genotipos. En 2007 fueron reconocidos como establecidos los genotipos provisionales 1h, 1 i y 1 j. [33]

El clado 2 contiene 3 genotipos (2A, 2B, y 2C). Todos los genotipos reconocidos deberán estar representadas por al menos 2 virus de referencia bien caracterizadas para el que se ha secuenciado la proteína estructural del marco de lectura abierto de 3192 nucleótidos (SP - ORF). Una región de 739 nucleótidos (nucleótidos 8,731-9,469) dentro de la SP- ORF fue designada como la ventana de secuencia mínima necesaria para la asignación de genotipos por comparación con las secuencias de virus de referencia. La figura N° 20 muestra los árboles filogenéticos producidos utilizando 32 secuencias de virus de referencia.



**Figura N° 20. El análisis filogenético de las secuencias de 32 virus de referencia de rubéola.**

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el software MEGA4 (versión 4.0). La historia evolutiva fue inferida por el método de vecindad neighbor-joining. Los porcentajes de árboles replicados en que los taxones asociaron agrupados en bootstrap test (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas para cada genotipo. Las longitudes de las ramas están en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 3 parámetros de Tamura y se encuentran en unidades del número de sustituciones de bases por sitio.

- Árbol filogenético basado en la región codificante (3192 nucleótidos de longitud) para proteína estructural de rubéola. Las secuencias de virus de referencia propuestos están marcados con asteriscos.
- Árbol filogenético basado en la región de 739 nucleótidos recomendado por la Organización Mundial de la Salud para la genotipificación del virus de la rubéola.

### 1.11 Vigilancia del virus de la rubéola.

Durante las fases de control y eliminación; la meta de la vigilancia debe ser obtener una secuencia viral de las muestras representativas de cada brote epidémico durante la fase de control o de cada cadena de transmisión durante la fase de eliminación. La red mundial de laboratorios de SAR y RUB de la OMS apoyará las iniciativas destinadas a obtener aislados de los virus salvajes circulantes y facilitará su remisión a los laboratorios designados, donde se realizará el análisis genético.

Los dos bancos de cepas de virus del SAR designados por la OMS, se ocupan también de los virus de la RUB.

#### 1.11.1 Función del laboratorio en la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola.

A medida que aumenta el nivel del control del SAR y la RUB, el laboratorio desempeña una función más importante en la vigilancia de estas enfermedades. Se sabe que en la fase de eliminación, la vigilancia

basada en el reconocimiento clínico de los casos es inexacta y que la confirmación por el laboratorio de los casos sospechosos, aunada a la genotipificación de las cepas de virus circulantes, es fundamental para una vigilancia eficaz.

El laboratorio ejerce dos funciones principales en la vigilancia del SAR y la RUB.

- **Monitoreo y verificación de la transmisión del virus.**

- confirmación de los brotes epidémicos: confirmar el diagnóstico clínico en las primeras etapas de un brote;
- confirmación de los casos: confirmar o descartar todos los casos sospechosos de SAR o RUB;
- identificación de las cepas de virus del SAR y de la RUB y caracterización genética de los aislados virales.

- **Monitoreo del perfil de susceptibilidad de una población.**

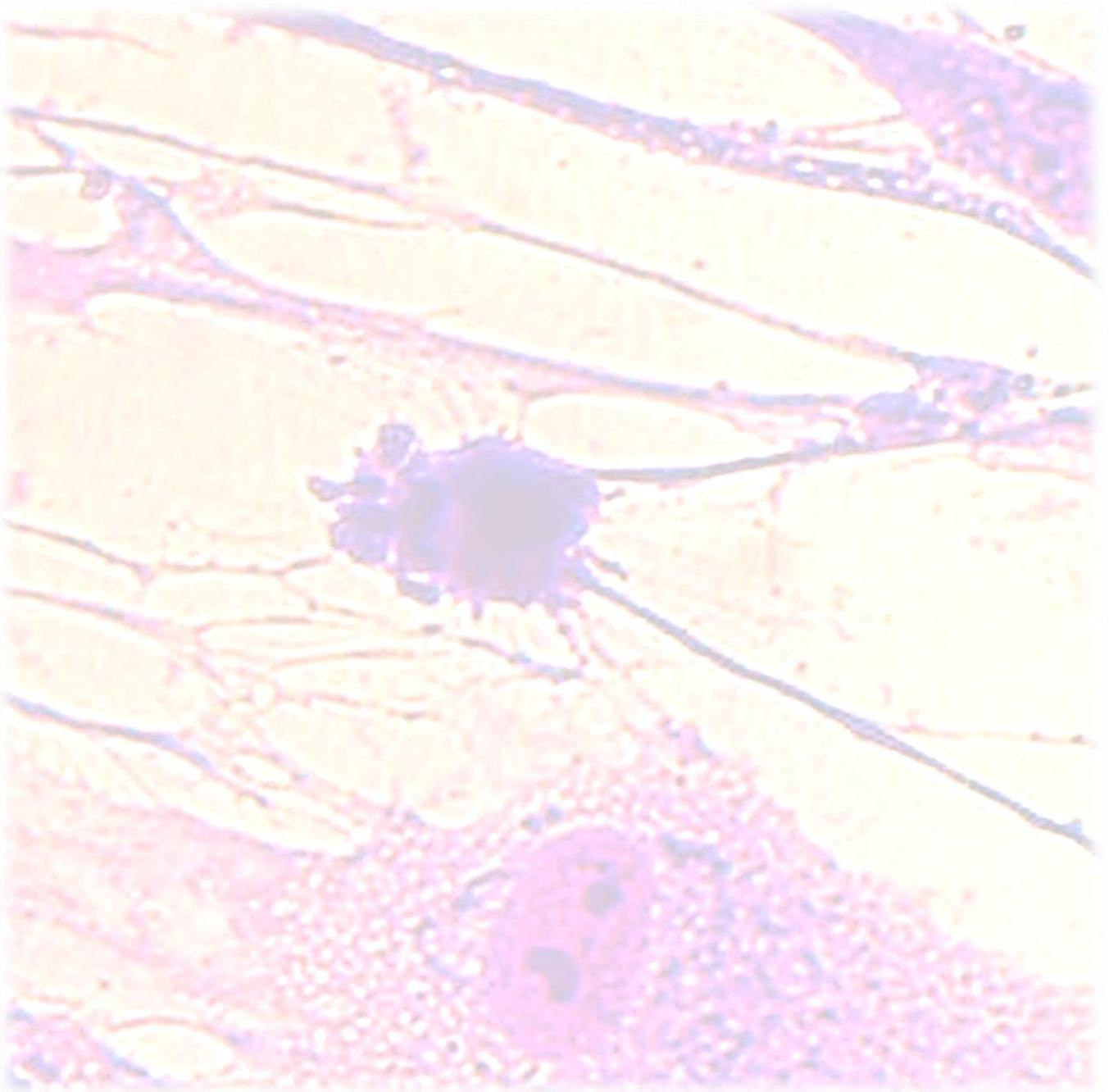
- determinación de la distribución etaria de la susceptibilidad al SAR y a la RUB, con el fin de facilitar la evaluación de la necesidad de campañas de vacunación;
- evaluación del impacto de las campañas masivas.

A cada fase consecutiva del programa de control del SAR y la RUB corresponden actividades específicas de vigilancia. Los laboratorios no pueden cumplir con sus funciones actuando aisladamente, sino que se deben organizar en una red de apoyo que suministre al programa la información precisa y en forma eficiente.

### 1.11.2 Función del laboratorio en el control y la eliminación de la RUB.

Fase de control de la RUB	Función del laboratorio
<b>Control</b>	<p>Confirmar los casos iniciales durante los brotes epidémicos mediante detección de anticuerpos de tipo IgM.</p> <p>Analizar las cepas de virus salvajes de casos seleccionados con el fin de establecer la información genética de referencia</p>
<b>Prevención y eliminación de brotes epidémicos</b>	<p>Confirmar el diagnóstico clínico de los casos sospechosos a fin de ayudar en la detección temprana de la circulación del virus.</p> <p>Analizar las cepas de virus salvajes de casos seleccionados con el fin de definir los genotipos circulantes, trazar las vías de transmisión, completar la cartografía mundial del genoma viral determinar el impacto de las estrategias de control.</p> <p>En circunstancias especiales, establecer la seroprevalencia en la población y contribuir con el pronóstico de brotes epidémicos</p>

# 2 Objetivos



## **2 OBJETIVOS**

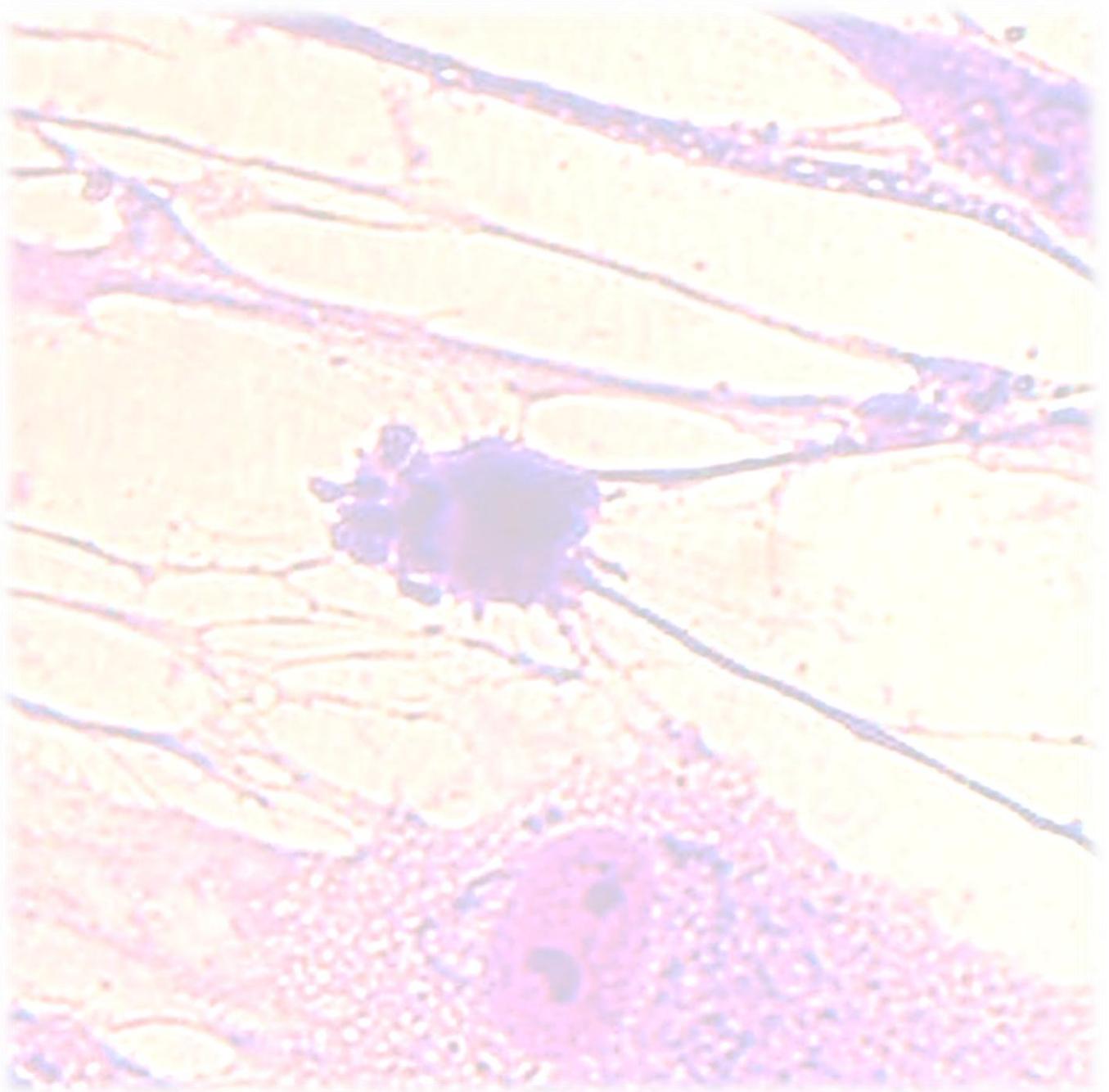
### **2.1 Objetivo General.**

Implementar la detección mediante técnicas moleculares del virus de Rubéola (RUB) en muestras de casos probables de infección aguda y de infección congénita por RUB, recepcionadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, (INEI) ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", para contribuir al Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (PRONACEI) en la eliminación de RUB y la prevención del Síndrome de rubéola congénita (SRC)

### **2.2 Objetivos Específicos.**

1. Caracterizar los pacientes estudiados según edad, sexo, procedencia y estados fisiológicos especiales (embarazo).
2. Detectar los anticuerpos específicos IgM e IgG mediante técnicas serológicas como criterio diagnóstico de elección.
3. Detectar el ARN viral, mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR convencional) y en tiempo real (RT-PCR real time).
4. Clasificar los casos diagnosticados mediante el aislamiento en cultivos celulares, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la secuencia genómica y sus árboles filogenéticos.
5. Detectar los anticuerpos específicos en pacientes embarazadas con el fin de contribuir al control y la prevención del SRC.

# 3 Materiales y Métodos



### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Población de estudio.**

Para detectar mediante técnicas moleculares el virus Rubéola (RUB) en muestras recepcionadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, (INEI) ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” se realizó un estudio retrospectivo, longitudinal y descriptivo.

Se estableció como período tiempo para la selección de pacientes: Un lapso de 10 años desde el 01/01/2003 al 31/12/2012.

Para identificar los casos sospechosos se reunió información de diferentes fuentes del Servicio de Virosis Congénitas, Perinatales y de transmisión sexual y del Laboratorio Nacional de Referencia en Sarampión y Rubéola (LNR-SR) que funciona en dependencias del Servicio de Virosis Respiratorias del Departamento de Virología del INEI-ANLIS Malbrán.

Las fuentes de información fueron:

Bases de datos de cada servicio.

Fichas epidemiológicas de embarazada y de recién nacido (anexo 1)

Planillas de registro de ingresos (anexo 2)

Se eligió el INEI-ANLIS por tratarse de un centro de referencia nacional y cabecera de redes para estas patologías. Para caracterizar los pacientes estudiados según edad, sexo, procedencia y estados fisiológicos especiales (embarazo), se estudiaron variables demográficas (institución de procedencia, provincia, y distrito); edades de la madre y el niño, epidemiológicas (estatus vacunal de la madre, antecedente de RUB en el embarazo), manifestaciones clínicas y pruebas de laboratorio (serologías IgM e IgG para RUB, avidéz de IgG, cultivo viral e identificación por inmunofluorescencia (IFI) y técnicas moleculares de detección del genoma viral como RT-PCR convencional y RT-PCR Real Time).

La población estuvo conformada por 2670 pacientes que acudieron en el período de estudio al servicio de Virosis Congénitas, Perinatales y de Trasmisión Sexual, por sospecha de infección viral congénita, para conformar la muestra se seleccionaron 481 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio.

Para el estudio se analizaron un total de 857 muestras clínicas, discriminadas de la siguiente forma: 484 muestras de suero, 194 muestras de orina y 179 muestras de hisopados/aspirados nasofaríngeos.

#### **3.2 Criterios de inclusión.**

- A. Para el estudio de casos de RUB posnatal se incluyeron aquellos pacientes con enfermedad febril exantemática (EFE) y uno de los siguientes síntomas/signos: adenopatías (cervicales, suboccipitales o retroauriculares) o artralgias o artritis, se incluyen además pacientes en que el profesional de la salud sospeche infección por RUB y aquellos pacientes con resultado positivo previo en otra institución de salud a los fines de confirmación.
- B. Para el estudio de pacientes con embarazo en curso se incluyen aquellas pacientes con o sin los síntomas descritos en el párrafo anterior y/o que refieran contacto con caso sospechoso de EFE. Se incluyen además pacientes en que el profesional de la salud sospeche infección por RUB y aquellos pacientes con resultado positivo previo en otra institución de salud a los fines de confirmación.

C. Para el estudio de Casos sospechosos de SRC se utilizaron las siguientes definiciones de caso de la OMS. [35]

SOSPECHOSO fue el que presentara 1 o más de las manifestaciones clínicas señaladas en la descripción clínica del SRC.

PROBABLE fue el caso que presentara 2 o más criterios mayores (categoría A), o 1 criterio mayor (categoría A) y 1 menor (categoría B), sin evidencia de otra etiología, pero cuya infección por RUB no fue confirmada por laboratorio.

CONFIRMADO fue el caso que es consistente con la descripción clínica y se confirmó por laboratorio mediante: serología IgM positiva a RUB realizada antes de los 12 meses de edad, o que mantienen los títulos de IgG persistentemente elevados por un periodo mayor al esperado, por la transmisión trasplacentaria materna, o un aislamiento viral o detección del genoma viral por RT-PCR.

El caso sospechoso o probable fue descartado si una vez analizadas las manifestaciones clínicas mediante evidencia válida plasmada en el expediente médico, el caso no cumplía con la descripción clínica de SRC, o se evidenció una etiología diferente a RUB, o las pruebas de laboratorio (serologías o cultivo viral) fueron negativas para RUB. Se definió como infección congénita por rubéola (IRC) el caso con serología IgM positiva para RUB, pero sin evidencia de síntomas o signos compatibles con SRC. (reinfecciones, nacidos de embarazadas vacunadas)

Se incluyeron por tanto pacientes menores de 1 año que presentaron dos criterios mayores o un criterio mayor y uno menor, siendo los criterios:

Criterios mayores: cataratas, glaucoma congénito, retinopatía pigmentaria, enfermedad cardíaca congénita, sordera neurosensorial.

Criterios menores: hepatomegalia, microcefalia, retraso en el crecimiento intrauterino, peso bajo al nacer, purpura trombocitopénica, osteopatías (enfermedad ósea radiolúcida), retraso mental, meningoencefalitis, ictericia que se presenta tras las primeras 24 hs del nacimiento y signos oculares: pupilas blancas o pálidas, disminución de la visión, nistagmus, estrabismo, globo ocular pequeño o grande.

Si los criterios comprometían al mismo órgano (por ejemplo, catarata y glaucoma), se tomó en cuenta como uno solo.

Se incluyen además, pacientes en que el profesional de la salud sospeche infección por rubéola y aquellos pacientes con resultado positivo previo en otra institución de salud a los fines de confirmación.

### **3.3 Criterios de exclusión.**

Se excluyeron del estudio todos aquellos pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión antes mencionados.

Para detectar los anticuerpos específicos IgM e IgG antirubéola se utilizaron equipos comerciales de enzimo-inmunoensayo de captura (ELISA, Radim SA, hasta 2012 y Siemens a partir de 2012)

### **3.4 ELISA de captura para detección de anticuerpos IgM específicos anti-rubéola.**

#### **1. Fundamento.**

Se trata de un ELISA para la detección cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra el virus de la RUB en suero.

El análisis de IgM específicas frente al virus de la RUB se utiliza para vigilar las enfermedades asociadas a la infección por dicho virus.

## 2. Condiciones de seguridad.

Antes de comenzar se recomienda lavar las manos con abundante agua y jabón. Esta maniobra debe repetirse cada vez que se termina de trabajar y se retira del laboratorio.

Si el operador es mujer debe tener el cabello recogido de manera tal que no cause molestia alguna en el transcurso del procedimiento.

Emplear hipoclorito de sodio al 5 % para limpieza de superficie de trabajo y materiales. Para cada una de las etapas debe utilizarse guardapolvo o camisolín, guantes y antiparras de seguridad que se encuentran en cada área; estos elementos son de uso exclusivo de cada sector no pudiendo pasar de un área a otra.

Una vez concluida la tarea, deben limpiarse todas las superficies de trabajo utilizadas con etanol al 70%, al igual que los materiales utilizados (pipetas, cajas de tips, gradillas).

El personal debe considerar que las muestras clínicas son potencialmente infecciosas; debe conocer los lineamientos del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ra edición, año 2005 de la Organización Mundial de la Salud (OMS). [36]

En todas las situaciones de exposición a la luz UV, debe usarse anteojos de protección UV ya que esta luz afecta la vista y la piel.

## 3. Operaciones preliminares.

Verificar que la muestra cumpla con los Criterios de Aceptación y rechazo de Muestra previamente establecidos.

- Si cumplen procesar las muestras.
- Si no cumplen con los requisitos previamente descritos para su aceptación las muestras serán rechazadas.

## 4. Materiales.

- Tubos o viales plásticos.
- Tips con filtro, estériles o nuevos de volúmenes que comprendan entre 10 ul y 1000 ul.
- Descartador de tips.
- Gradillas para tubos.
- 3 juegos de micropipetas de diversos volúmenes.
- Una pipeta multicanal.
- Marcadores indelebles para el rotulado.
- Guantes de látex descartables.
- Probetas de 50ml.
- Contenedores para soluciones.

## 5. Equipos.

- Vórtex.
- Heladera de 4/20°C.
- Baño Termostático.
- Lector de microplacas con longitud de onda de medición de 450nm, longitud de referencia de 650nm.
- Microcentrífuga.

## 6. Drogas reactivos y estándares.

Equipo Enzynost Anti-Rubéola Virus/IgM, Radim/Siemens

### 7. Procedimiento.

- Antes y después del uso de las distintas áreas de trabajo descontaminar con el algodón húmedo y solución de hipoclorito de sodio al 5% limpiando la mesada y demás superficies así como las gradillas y pipetas.
- Se usan los sueros guardados en la heladera del LNR-SR, caja de sueros EFE, estante N° 1.
- Se siguen las indicaciones del Fabricante del equipo y el procedimiento operativo estandarizado (POE) del LNR-SR. Una copia del inserto se encuentra en la carpeta de insertos y otra copia adjunta en la caja del equipo que se guarda en la heladera del servicio.

### 8. Validación/Verificación de los métodos.

El ensayo será válido cuando una vez realizado el análisis se observa:

- Control Positivo: Los valores de  $\Delta A$  han de estar comprendidos dentro de los márgenes superior e inferior mencionados en la correspondiente tabla de valores de códigos de barras, en función del lote.
- Control Negativo: El  $\Delta A$  debe ser igual o menor a 0,099.
- Los valores individuales de  $\Delta A$  Control Positivo (al principio y al final de una serie de mediciones) no se deben desviar más del  $\pm 20\%$  del valor medio calculado para esas dos determinaciones. Los ensayos realizados en VCP confirman esta especificación del equipo.

### 9. Aseguramiento de la calidad de los resultados.

Adicionalmente a los controles que posee el equipo se usan controles internos preparados en LNR-SR. Constan de un suero negativo (Control Negativo) y un suero positivo (Control Positivo) que se prepararon en el laboratorio LNR-SR.

- Los controles internos se procesan al comenzar a usar un equipo nuevo. Al principio, si se observa mucha variación con una lectura anterior se varían los tiempos de incubación y/o los lavados y se realiza nuevamente el ensayo hasta obtener valores acordes a los especificados en el equipo. Y aleatoriamente, adicionalmente a las muestras Incógnitas, hasta 2 veces por equipo.
- Adicionalmente se participa de un control de calidad externo enviado por OPS.

### 10. Interpretación de resultados

- Se considera Negativo todas las muestras con valores de  $\Delta A$  menor a 0,100 (límite).
- Se considera Positivo todas las muestras con valores de  $\Delta A$  mayores a 0,200.
- Se considera Indeterminado todas las muestras con valores de  $\Delta A$  entre 0,100 y 0,200.

### 11. Expresión del resultado

El resultado se expresa informando la metodología utilizada, la muestra estudiada y en forma cualitativa, es decir, positivo o negativo. Positivo se considera si se detectan anticuerpos de clase IgM y Negativo cuando no se detectan anticuerpos de clase IgM.

### 12. Conservación de las muestras

Los sueros se conservan a 4°C en heladera destinada para ello. No más de 3 días hasta su procesamiento.

### 13. Descarte de las muestras

El material descartable utilizado, así como las soluciones y restos de muestras biológicas serán descartadas en bolsa roja.

#### 14. Informe de resultados

Se elabora un informe escrito y firmado por la jefa del LNR-SR que se entrega por mail o personalmente. Ver anexo N° 2 Modelo de Informe.

Registrar en la base de datos del SIVILA.

#### 15. Registros

Base de datos del LRN-SR.

Carpeta de Entrada. Hojas rubricadas donde se ingresan todas las muestras a realizarse en el laboratorio de LRN-SR y se registran los resultados. Ver Anexo 3.

Cuaderno de ELISAS: Cuaderno rubricado donde se registran todos los ELISAS hechos en LRN-SR. Se encuentra en el laboratorio de LRN-SR. Ver anexo 3: Hoja de Cuaderno de ELISAS.

### **3.5 ELISA de captura para detección de anticuerpos IgG específicos anti-rubéola.**

#### 1. Fundamento.

Se trata de un ELISA para la detección cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra el virus de la RUB en suero.

El análisis de IgG específicas frente al virus de la RUB se utiliza para vigilar las enfermedades asociadas a la infección por dicho virus.

Puntos 2 al 5: Seguir las indicaciones del test de ELISA de captura para IgM anti-rubéola.

#### 6. Drogas reactivos y estándares.

Equipo Enzynost Anti-Rubéola Virus/IgG, Radim/Siemens

#### 7. Procedimiento.

- Antes y después del uso de las distintas áreas de trabajo descontaminar con el algodón húmedo y solución de hipoclorito de sodio al 5% limpiando la mesada y demás superficies así como las gradillas y pipetas.
- Se usan los sueros guardados en la heladera del servicio de LRN-SR, caja de sueros EFE de LRN-SR, estante N° 1.
- Se siguen las indicaciones del fabricante del equipo Enzynost Anti-Rubéola Virus/IgG, Radim/Siemens. Una copia del inserto se encuentra en la carpeta de insertos y otra copia adjunta en la caja del equipo que se guarda en la heladera del LRN-SR.

Puntos 8 al 15: Seguir las indicaciones del test de ELISA de captura para IgM anti-rubéola.

#### 16. Consideraciones especiales.

Se busca analizar una primera muestra junto con una segunda muestra tomada 2-3 semanas después para comprobar la seroconversión o cuadruplicación de títulos de anticuerpos de clase IgG.

### **3.6 ELISA para detección de Aidez de anticuerpos IgG específicos anti-rubéola.**

#### 1. Fundamento.

Se trata de un ELISA para la detección cuantitativa de la avidéz de anticuerpos IgG específicos contra el virus de la rubéola en suero.

El análisis de avidéz de IgG específicas frente al virus de la rubéola permite diferenciar una infección reciente o primaria de una infección pasada y poder evaluar el riesgo del feto a presentar alguna de los efectos de la infección por dicho virus.

Puntos 2 al 5: Seguir las indicaciones del test de ELISA de captura para IgM anti-rubéola.

6. Drogas, reactivos y estándares.

Equipo Rubéola Avidity IgG EIA WELL, Radim.

7. Procedimiento.

- Antes y después del uso de las distintas áreas de trabajo descontaminar con el algodón húmedo y solución de hipoclorito de sodio al 5% limpiando la mesada y demás superficies así como las gradillas y pipetas.
- Se usan los sueros guardados en la heladera del servicio de LRN-SR, caja de sueros EFE de LRN-SR, estante N° 1.
- Se siguen las indicaciones del Fabricante del Equipo Rubéola Avidity IgG EIA WELL, Radim. Una copia del El inserto se encuentra en la carpeta de insertos y otra copia adjunta en la caja del equipo que se guarda en la heladera del LRN-SR.
- Una vez reconstituidos los controles de baja y alta avidéz se conservan en congelador.

8. Validación/Verificación de los métodos.

Será válido cuando una vez realizado el análisis se observa

- Los controles de Baja y Alta avidéz tratados con diluyente de muestra den valores > de 0,400 de absorbancia a una longitud de onda de 450nm
- El porcentaje del Control de Baja Avidéz < al 50% y el porcentaje del Control de Alta Avidéz > al 60%

9. Aseguramiento de la calidad de los resultados.

Adicionalmente a los controles que posee el equipo se usan controles internos preparados en LRN-SR. Constan de un suero de baja avidéz (Control de baja Avidéz) y un suero de alta avidéz (Control de alta avidéz) que se determinaron en el LRN-SR.

- Los controles internos se realizan al comenzar un equipo nuevo. Al principio, si se observa mucha variación con una lectura anterior se varían los tiempos de incubación y/o los lavados y se realiza nuevamente el ensayo hasta obtener valores acordes a los especificados en el equipo. Y aleatoriamente, adicional a las muestras Incógnitas, hasta 2 veces por equipo.

10. Interpretación de resultados.

- Se considera IgG con Alta avidéz a todas las muestras con un porcentaje mayor al 60%.
- Se considera IgG con Baja avidéz a todas las muestras con un porcentaje menor al 50%.
- Se considera Indeterminado todas las muestras con porcentaje de avidéz entre 50-60%.

11. Expresión del resultado.

El resultado se expresa informando la metodología utilizada, la muestra estudiada y en forma cuantitativa, es decir, el porcentaje de avidéz obtenido.

Puntos 12 al 15: Seguir las indicaciones del test de ELISA de captura para IgM anti-rubéola.

16. Consideraciones especiales.

Se busca realizar el ensayo en paralelo sobre muestras del mismo paciente extraídas con meses de diferencia.

### **Diagnóstico molecular**

El diagnóstico molecular presentó un cambio tecnológico a partir de septiembre de 2011. A partir de este momento se comienza a trabajar unificando procedimientos entre los servicios de Virosis Congénitas y Virosis Respiratorias que a partir de octubre de 2012 se acredita ante OPS como LNR-SR

Para detectar el ARN viral, mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR convencional) y en tiempo real (RT-PCR real time) se utilizaron las metodologías y los reactivos que se detallan a continuación:

En ese momento se cambia el protocolo de trabajo en base a reacciones de RT-PCR convencional por protocolos de trabajo de RT-PCR en tiempo real.

- A. Protocolos de técnicas de diagnóstico por RT-PCR convencional.
- B. Protocolos de técnicas de diagnóstico por RT-PCR en tiempo real.

### **3.7 Operaciones preliminares a la detección molecular del genoma viral.**

#### **3.7.1 Recepción de muestras clínicas para diagnóstico de Sarampión y Rubéola.**

**PROPÓSITO:** Describir los pasos a seguir para la recepción de muestras clínicas para el Diagnóstico de Sarampión y Rubéola.

**ALCANCE:** Aplicar este procedimiento a todas las muestras destinadas al diagnóstico de Sarampión y Rubéola.

**CONDICIONES DE SEGURIDAD:**

Ver las condiciones de seguridad en: ELISA de captura para detección de anticuerpos IgM específicos anti-rubéola.

**OPERACIONES PRELIMINARES:**

Las muestras se registraran en la base de datos del LNR-SR y se conservan a +4º C en la Heladera del LNR-SR.

Según el tipo de muestra se procede a su rotulación y fraccionamiento.

Tiempos para la toma de muestra:

Cuando se trata de un episodio de brote de EFE es recomendable realizar la toma dentro de los 3 a 4 días posteriores a la aparición de los síntomas y transportarla al laboratorio para su siembra dentro de las 48 horas de extraída en recipiente estéril con refrigerante.

Cuando se trata de un caso sospechoso de SRC se recomienda también la toma de muestra dentro de los 4 días de vida pero se puede intentar aislar el virus hasta el año de vida, con posibilidades de éxito decrecientes a lo largo del año.

**Sueros:** Se divide la muestra en tres alícuotas en tubos de eppendorf para ser almacenadas en los siguientes sitios:

- Alícuota Nº 1: en el freezer de -80ºC del LNR-SR, caja de sueros EFE.
- Alícuota Nº 2: en la heladera del LNR-SR, caja de sueros EFE.
- Alícuota Nº 3: en la heladera del LNR-SR

### Otras muestras:

Se almacenan las muestras a +4°C en la heladera del LNR-SR

El LNR-SR fracciona las muestras en dos alícuotas:

- Alícuota Nº 1 se destina al intento de aislamiento.
- Alícuota Nº 2 se destina para la extracción de ARN.

Los extractos de ARN de HNF/ANF/OR se distribuyen en tres alícuotas:

Muestras de casos sospechosos de SRC: Se procede según procedimiento operativo del LNR-SR.

### Transporte de muestras.

- Todas las muestras deben ser inoculadas dentro de las 48 horas de recogidas, almacenadas a 4° C y transportadas al laboratorio con refrigerante en los medios de transporte mencionados en el anexo. En el caso que la distancia de transporte sea corta, se sugiere heladera portátil de telgopor y sachets refrigerantes o cubos de hielo embolsados. En el caso de grandes distancias (que excedan las 24-48 horas de transporte) se aconseja la utilización de hielo seco.
- Si la muestra no es inoculada inmediatamente o en la semana de recibida, debe ser congelada a -80 ° C o por debajo de esa temperatura.
- Los tubos con muestras se deben precintar con tela adhesiva y rotular, indicando Nº /INEI/Tipo de muestra/AÑO, por ejemplo para una primer muestra de suero el rótulo sería Nº /INEI/1S/AÑO

Las muestras deben acompañarse de un resumen de historia clínica del paciente.

### MATERIALES:

- Tips con filtro, estériles, o nuevos autoclavados libres de RNAsas y DNAsas de volúmenes que comprendan entre 10 ul y 1000 ul.
- Tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, nuevos, estériles y libres de RNAsas y DNAsas
- Descartador de tips.
- Gradillas para tubos de 1.5ml y de 0.2ml.
- 3 juegos de micropipetas de diversos volúmenes: para el trabajo en cada área.
- Marcadores indelebles para el rotulado.
- Probetas de diversas capacidades.
- Guantes de látex descartables.

### EQUIPOS:

- Vórtex.
- Cabina para preparado de mezclas.
- 2 Freezers -20°C: uno para guardado de reactivos de mix y otro para guardado de muestras.
- Minicentrífuga para tubos de 0.2 ml.

### DROGAS, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO:

La composición del medio de transporte viral es la siguiente:

Por cada ml de DMEM adicionar:

Penicilina	400 U/ml
Estreptomina	400 µg/ml

Gentamicina	50 µg/ml
Anfotericina	50 µg/ml

Estabilizantes virales:

Albúmina bovina 0,5% o  
gelatina 1%.

También puede utilizarse medios de transporte tipo Virocult.

**MUESTRAS/CULTIVO:**

Orina: Recolectar aproximadamente 5 ml de orina en frasco estéril, preferentemente obtenida por medio de sonda vesical o punción supra púbica.

**Para casos de EFE:**

Secreciones respiratorias:

Hisopados:

Se deben obtener hisopados nasales y faríngeos, los cuales deben ser colocados inmediatamente en tubos con 1-2 ml de medio de transporte.

Los hisopos secos no son aptos para el intento de aislamiento.

**Para Casos de SRC:**

Aspirados:

- Introducir una sonda nasogástrica por las fosas nasales hasta la pared posterior de la faringe.
- Aspirar las secreciones y recoger en recipiente estéril. Con la misma sonda se aspiran 1-2 ml de medio de transporte para lavar dichas secreciones.

Líquidos corporales normalmente estériles (cefalorraquídeo, amniótico, pericardico, humor vítreo y otros):

- Recolectar la muestra en condiciones de asepsia, sin diluir la misma con ningún medio de transporte.

Tejidos en general:

- Los tejidos obtenidos de autopsia, placenta, líquido amniótico, cataratas y tejidos fetales obtenidos de abortos, deben recolectarse en recipientes estériles con solución salina o soluciones buffer de fosfatos (PBS) para evitar la desecación y transportar al laboratorio en recipiente refrigerado en un contenedor separado para cada muestra.

**PROCEDIMIENTO:**

Las muestras de primera elección son los exudados (hisopados) faríngeos o nasales en 2 a 4 ml de medio de transporte viral o PBS. Una muestra de orina también puede servir para el aislamiento viral. La orina debe ser previamente filtrada a través de un filtro esterilizante de jeringa con un poro de 0,22 micrones.

Procedimiento:

1. Agitar el hisopo durante 2 minutos contra la pared del tubo para remover todo el líquido. Descartar el hisopo (se puede partir el hisopo y dejarlo en el tubo). La muestra en medio de transporte se puede congelar o usarla inmediatamente para inocular.

2. Filtrar la muestra a través de un filtro de jeringa de 0,22 micrones e inocular directamente las células, reservar otras dos alícuotas a  $-80$  para estudios complementarios. Este es el método de elección en comparación con el agregado de antibióticos, ya que es más efectivo en la prevención de la contaminación y es más rápido. La desventaja es que algunas muestras no pasan a través del filtro.
3. Una alternativa, cuando la muestra no pasa a través del filtro consiste en: por cada ml de medio de transporte viral adicionar 0,1 ml de una solución con 1000  $\mu\text{g/ml}$  de Gentamicina, 0,1 ml de una solución con 100  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B y 5  $\mu\text{l}$  de una solución 1000X de penicilina / estreptomina. Incubar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e inocular las células.

Procedimiento para muestras de tejidos y biopsias:

1. Trozar con tijeras o bisturí estériles y homogeneizar.
2. Agregar suficiente medio de transporte viral como para obtener una suspensión al 5% P/V.
3. Remover la suspensión en un Vórtex vigorosamente para extraer la mayor cantidad de virus posible.
4. Centrifugar a 300-600 g.
5. Retire cuidadosamente (sin desprender el Pellet) 300  $\mu\text{l}$  para inocular en cultivo celular.

CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:

Los sobrenadantes se conservan a  $-70$  y a  $-190^{\circ}\text{C}$  en el freezer  $\text{N}^{\circ}$  y tanque de nitrógeno líquido  $\text{N}^{\circ}$  destinado para ello.

DESCARTE DE LAS MUESTRAS:

Las muestras, se deben descartar en bolsa roja.

### 3.7.2 Técnica de extracción del ARN viral.

Se aplica para ambas técnicas de RT-PCR y se describe a continuación:

**Instructivo para la extracción de ARN de muestras clínicas, lisados de cultivo celular, plasma y suero mediante el Mini Kit de Qiagen Viral RNA (QIAamp viral RNA Mini kit):**

PROPÓSITO: El siguiente instructivo sirve para extraer ARN que es utilizado en reacciones de RT-PCR.

ALCANCE: Este equipo está diseñado para purificar ARN viral mediante extracción por columnas a partir de plasma, suero y muestras clínicas, incluyendo orina, exudado faríngeo y lisado de cultivo celular.

INSTRUCCIONES:

Reactivos y Materiales.

- Guantes
- Bata desechable
- RNasa ZAP (Sigma, # R2020-250mL)
- Tubos para micro centrífuga de 1.5mL, libres de nucleasas (autoclavables)
- Mini Kit Qiagen Viral RNA (Qiagen,#52904) (Qiagen,#52906)
- Etanol del 95-100%
- Etanol al 70%
- PBS, libre de RNasa

Equipo requerido.

- Congeladores a  $-20^{\circ}\text{C}$

- Micro pipetas
- Contenedor con hielo
- Cabina de Bioseguridad (CBS) clase II con luz UV
- Micro centrífuga
- Micro pipetas y puntas estériles con filtros resistentes a aerosoles
- Agitador tipo Vórtex
- Baño María a 37°C

Recomendaciones para trabajar con RNA.

- Para los procedimientos de pre-PCR es necesario que asigne un laboratorio, con CBS y equipo adecuado. Los procesos de amplificación y post- análisis deben realizarse en laboratorios por separado. No debe mezclarse el equipo (incluyendo las batas desechables) entre pre-PCR y post-PCR. Utilizar guantes durante todo el procedimiento para prevenir la contaminación de RNAsas que se encuentran en sus manos.
- Cambiarse los guantes, cada vez que se toque la piel y las superficies comunes.
- Destine solo un juego de micro pipetas para ser usadas solo cuando trabaje con ARN.
- Use puntas con filtro y tubos que prueben y garanticen que están libres de RNAsas.
- Use químicos y reactivos libres de RNAsas.
- Para reducir la contaminación por RNAsas limpie las gradillas de tubos, micro pipetas y las superficies con etanol al 70% y seque con toallas con RNasa Zap.
- Reduzca la contaminación por DNA exponiendo por 15 min la CBS con luz UV

Controles:

Se recomienda incluir una muestra negativa (células sin infectar o medio de cultivo celular) como un control de extracción para monitorear que pueda haber contaminación durante el proceso de extracción.

Preparación de reactivos del Equipo:

Seguir las instrucciones del inserto del equipo para la reconstitución de los reactivos.

Procedimiento:

Seguir las instrucciones del inserto del equipo para el procedimiento de extracción del ARN por columnas.

Procesar inmediatamente el ARN o de lo contrario conservar el mismo en congelador de -80°C hasta su procesamiento en reacciones de RT-PCR convencional o de tiempo real.

### **3.8 Protocolo para la detección de ARN viral de RUB mediante técnicas de diagnóstico por RT-PCR convencional.**

Para la amplificación del ARN viral del virus de RUB, el ARN total fue extraído con buffer de lisis de 140 ul de muestra clínica o de sobrenadantes/lisados de cultivo celular Vero con IFI positiva para el virus de la RUB.

La técnica de RT-PCR convencional para diagnóstico de virus RUB consiste en una RT-PCR y una PCR nested o anidada de una región altamente conservada del gen que codifica para la gp E1 y está basada en la amplificación de pequeños fragmentos de ácido nucleico de 185 y 143 pares de bases, comprendidos entre los nucleótidos (nts) 8807-8891 para la 1er. PCR y entre los nts 8826-8968 para la nested PCR. [27, 28].

## PROCEDIMIENTO:

### RT-PCR convencional de diagnóstico:

#### 1. Síntesis de cDNA.

Una alícuota de ARN total purificado en presencia de la enzima MMLV transcriptasa reversa produce la primer cadena de cDNA.

#### Técnica:

- a) Mezclar 5 ul de ARN total purificado con 20 ul de MIX.

Composición de MIX: Para 4 ensayos.

20 ul de buffer para MMLV.	Cat. Nro. M531A *
0,5 ul de cada dNTPS	[1mM]
38,5 ul de oligo cebador directo 2	[3,85µM]
2,5 ul de RNAsin.	[1U] Cat. Nro. N211A
4 ul de MMLV.	[8 U] Cat. Nro. MHOA
13 ul de agua libre de RNAsas.	

\* El Buffer para MMLV contiene los siguientes componentes concentrados de manera de obtener concentraciones finales de: Cl<sub>2</sub>Mg [3mM]; KCl [75mM]; Tris- HCl [50mM]

- b) Fraccionar en cuatro tubos de 20 ul cada uno y agregar 5 ul de ARN total y mezclar.  
c) Programar el termociclador para las siguientes condiciones:

70° C 5 minutos, 4 ° C 5 minutos, 42°C 1 hora y 10 minutos a 95°C.

Como producto de este paso se obtiene ADNc.

Tiempo de proceso: 49 minutos.

#### 2. PCR 1er. Round.

Una alícuota de ADNc sintetizado en el paso anterior en presencia de la enzima Taq ADN polimerasa amplifica el ADN proveniente del ARN viral.

#### Técnicas:

- a) Mezclar 20 ul de ADNc con 80 ul de MIX.

Composición de MIX: Para 4 ensayos.

40 ul de buffer PCR	
16 ul de Cl <sub>2</sub> Mg	Cat. Nro. A351H [2mM]
2 ul Taq ADN	[2,5 U]
30,8 ul oligo cebador directo 2	[0,77µM]
30,8 ul oligo cebador inverso 1	[0,77µM]
0,8 ul de cada dNTPs	[0,2mM]
197,2 ul agua libre de RNAsas.	

- b) Fraccionar en cuatro tubos de 80 ul cada uno y agregar 20 ul de ADNc y mezclar.  
c) Programar el termo ciclador para:

95° C 3 minutos y  
40 ciclos de: 95° C 30 segundos,  
60° C 30 segundos,  
72° C 1 minuto.

Y 72° C 5 minutos.

Como producto de este paso se obtiene ADN de la primera amplificación.

Tiempo de proceso: 2 horas 20 minutos.

### 3. PCR 2º Round:

Una alícuota de producto amplificado del 1er. Round en presencia de la enzima Taq- DNA polimerasa amplifica el ADN complementario del ARN viral.

Técnicas:

- a) Mezclar 2 ul de producto amplificado del 1er. Round con 98 ul de MIX para nested PCR.

Composición de MIX: Para 4 ensayos.

12ul de Cl2Mg.	[1,5mM]
0,8 ul de cada dNTPs	[200 mM]
40 ul de buffer	(1X)
30,8 ul de cebador inverso 3	[0,77mM]
30,8 ul de cebador inverso 4	[0,77mM]
2 ul Taq ADN polimerasa	(2,5 U)

273,2 ul de agua libre de RNAsas

- b) Fraccionar en cuatro tubos de 98 ul cada uno y agregar 2 ul de ADN y mezclar.

- c) Programar ciclador para:

95° C 3 minutos y  
25 ciclos de: 95° C 30 segundos,  
60° C 30 segundos,  
72° C 1 minuto.

Y 72° C 5 minutos.

Como producto de este paso se obtiene ADN de la 2º amplificación.

Tiempo de proceso: 1 hora 30 minutos.

Tiempo Total de amplificado: 4 hs 49 minutos.

Las muestras se pueden revelar inmediatamente en gel de agarosa con un marcador de pesos moleculares de referencia o conservar a -20 °C para su revelado posterior.

### **3.9 Protocolos de uso de técnicas de diagnóstico por RT-PCR en tiempo real. (POE del LNR-SR).**

PROPÓSITO: Describir los pasos a seguir para realizar el ensayo para detectar el ARN del virus de RUB, por la técnica de RT-PCR Real-time (TaqMan) de la región E1 y de la región de la RNasaP (gen celular de referencia) usando el termociclador para real-time ABI 7500. [37].

ALCANCE: El procedimiento aplica a todas las muestras sospechosas de contener el virus de RUB.

FUNDAMENTO: Este protocolo es usado para detectar ARN del virus de rubéola, con propósitos diagnósticos. El ARN es extraído de la muestra clínica o de cultivos celulares infectados y amplificado por RT-PCR Real-Time.

CONDICIONES DE SEGURIDAD: Ver en *ELISA de captura para detección de anticuerpos IgM específicos anti-rubéola*.

OPERACIONES PRELIMINARES:

El laboratorio debe contar con áreas debidamente delimitadas para realizar las tareas de:

- Tratamiento y extracción de las muestras.
- Preparación de la mezcla de reacción: Área "Limpia" o de mezclas.
- Área de inoculación de la muestra en las placas de reacción.

Todos los materiales que se emplean en este proceso (pipetas automáticas, gradillas, etc.) deben ser de uso exclusivo de cada área.

MATERIALES:

- Tips con filtro, estériles, o nuevos autoclavados libres de RNAsas y DNAsas de volúmenes que comprendan entre 10 ul y 1000 ul.
- Cobertura para la placa (Applied Biosystems).
- Tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, nuevos, estériles y libres de RNAsas y DNAsas.
- Descartador de tips.
- Gradillas para tubos de 1.5ml y de 0.2ml.
- Marcadores indelebles para el rotulado.
- Guantes de látex descartables libres de talco.
- Papel Aluminio.
- Batas desechables.
- Placas de reacción de 96 pozos MicroAmp con el código de barras (Applied Biosystem #4306737)
- Tapas ópticas (Applied Biosystems).

EQUIPOS:

- Cabina para preparado de mezclas.
- Congeladores a -20°C y Ultracongeladores a -80°C.
- Termociclador ABI 7500.
- Contenedor con hielo.
- Centrifuga con camisas para placas de 96 pozos.
- CBS clase II con luz UV destinada para PCR.
- Microcentrifuga.
- Micro pipetas y puntas estériles con filtros resistentes a aerosoles.
- Agitador tipo Vórtex.
- Baño María.

## DROGAS, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, Y ESTÁNDARES:

- Equipo “SuperScript Platinum OneStep qRT-PCR” (Invitrogen # 11732-020).
- Inhibidor de RNasa 2000 Unidades (Applied Biosystems N-808-0119).
- Sondas marcadas en el extremo 5´ con un colorante fluorescente (6 carboxi fluoresceína, FAM) y en el extremo 3´ con uno no fluorescente.
- Agua libre de nucleasas (Ambion #9937).
- RNA humano total cuantificado (Stratagene).
- Soluciones madre de cebadores y sondas para amplificar el gen E1 de Rubeola. Almacenar en alícuotas de 100 ul a -20 C. Las soluciones de las sondas deben estar protegidas de la luz.
- Soluciones madre de cebadores y sondas para amplificar el gen humano de RNasa P y almacenarlas a -20 C en alícuotas de 100 ul. Las soluciones de las sondas deben estar protegidas de la luz.
- Etanol al 70%.
- RNasa ZAP (Sigma, # R2020-250mL).

## MUESTRAS

- Muestras de ARN extraído por columnas de aspirado o hisopado nasofaríngeo, orina, biopsia; líquido cefalorraquídeo; líquido amniótico.
- Las muestras deben ser almacenadas a -70° C y un control de extracción (medio de cultivo o PBS con 1% de SFB) debe ser incluido en cada muestra.
- Entrar la identificación de la muestra en el esquema de la pantalla del aparato de real time 7500 en la misma ubicación en que se las colocara en la placa.

## PROCEDIMIENTO:

### *Recomendaciones para trabajar con ARN*

- Utilizar guantes durante el desarrollo del procedimiento para evitar la contaminación por RNAsas que se encuentran en las manos.
- Cambiarse los guantes, cada vez que se toque la piel (ejemplo la cara), las perillas de las puertas y superficies comunes.
- Destine solo un juego de pipetas para ser usadas cuando trabaje ARN.
- Use puntas con filtro y tubos que prueben y garanticen que están libres de RNAsas.
- Use químicos y reactivos libres de RNAsas.
- Para reducir la contaminación por RNAsas limpie las gradillas de tubos, micro pipetas y las superficies con etanol al 70% y seque con toallas de RNasa Zap.
- Reduzca contaminación por ADN exponiendo por 15 min la cabina de bioseguridad a la luz UV.
- Antes y después del uso de las distintas áreas de trabajo descontaminar con un algodón bien húmedo en hipoclorito al 2% limpiando la mesada (sin pasar 2 veces por el mismo lugar con el algodón) y demás superficies así como las bandejas a utilizar y pipetas.

### **Preparado de mezclas de reacción:**

- Colocarse la bata y guantes descartables. Luego de descontaminar con etanol 70%, prender la luz UV de la cabina y del flujo laminar, dejar actuar durante 15 minutos.
- Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla del freezer de -20°C destinado para los mismos y dejarlos atemperar dentro de la cámara de mezclas.
- Determinar previamente la cantidad de tubos de reacción a preparar y el volumen total necesario de cada reactivo según la cantidad de muestras y controles que se vayan a utilizar.

- Preparar la solución madre de los cebadores y sondas.
- Contenido del equipo:
- Componentes del equipo de RT-PCR en tiempo-real para RUB.
- Mezcla de cebadores/sondas RUB.- Un tubo con 100 µl de una mezcla de cebador y sonda para RUB para reacciones en tiempo-real. El contenido debe ser diluido para ser utilizado después.
- Mezcla de cebadores/sondas RNasa P.- Un tubo con 100 µl de una mezcla de cebadores y sondas para RNasa P para reacciones en tiempo-real. El contenido debe ser diluido para ser utilizado después.
- Control alto de ARN de RUB.- Contiene ARN de RUB sintético y ARN humano total. El material viene liofilizado debe hidratarse y después diluirse antes de utilizarse. Este control puede utilizarse en las reacciones para RUB y RNasa P.
- Control bajo de ARN RUB.- Contiene ARN de RUB sintético y ARN humano total. El material viene liofilizado debe hidratarse y después diluirse antes de utilizarse. Este tubo contiene menos ARN de RUB sintético que el control alto, pero es igual para el RNasa humano total. Este control puede utilizarse en las reacciones para RUB y RNasa P.
- Un tubo con 2 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.0) para rehidratar los controles.
- Información acerca de los cebadores y las sondas.
- El stock de las soluciones de los cebadores y las sondas son almacenados a -20°C, las sondas deben protegerse de la luz.
- Las sondas son marcadas en la termino 5' con un reportero fluorescente 6-carboxy-fluoresceína (FAM) y en el término 3' con el quencher no fluorescente Black Hole Quencher-1 (BHQ-1).
- Concentración final de la reacción mix:  
Cebadores de RUB y RNasa P: 400 nM.  
Sondas de RUB y RNasa P: 200 nM .
- Secuencia de los cebadores para RUB.

Para la generación de un Amplicon de 185 pb de la región E1

Primer Sentido (RV11): 5' CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3'

Primer Antisentido (RV12): 5' CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC 3'

Primer Antisentido (RV12-2): 5' CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG 3'

Sonda (RUB): 5' FAM AG GTC CAG GTC CCG CCC GAC BHQ 3'

- Secuencia de los cebadores y sondas para RNasa P

Primer Sentido (HU RNASE-P-F): 5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3'

Primer Antisentido (HU RNASE-P-F): 5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT3'

Sonda (BHQ1 HURNASE-P): 5' FAM TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCGCG BHQ1 3'

### **Preparación de las soluciones de trabajo para la mezcla de cebadores/sondas.**

La mezcla de cebadores/sondas se suministra como un stock de concentración de 10X (10 veces). Preparar una solución de trabajo antes de iniciar la reacción de RT-PCR en tiempo real. Almacenar las sondas y los cebadores diluidos a -20°C, envolviendo los tubos con papel aluminio para protegerlos de la luz.

- Mezcla de primer/sonda RuV.- Mezclar 10 µl de solución stock con 90 µl de agua libre de RNasas. Agitar en el vórtex.

- Mezcla de primer/sonda de RNasa P.- Mezclar 10 µl de solución stock con 90 µl de agua libre de RNasas. Agitar en el vórtex.
- Preparación del stock de controles de ARN.

El control de ARN se suministra como ARN liofilizado. Es necesario hidratar este control antes de utilizarse por primera vez el equipo. Siempre debe trabajarse el ARN en hielo. No trabajar el control de ARNs en la misma estación de PCR donde se lleva a cabo la preparación del máster mix.

1. En cada tubo (control alto y bajo de ARN) adicionar 100 µl de buffer TE libre de nucleasas (suministrado en el equipo). Agitar en el vórtex por 15 segundos.
2. Calentar los tubos a 50°C por 10 minutos en baño maría, agitar en el vórtex por 15 segundos, dar un spin suave para recoger (colectar).
3. Preparar 10 alícuotas con 10 µl cada uno y almacenar a -70°C. Cada alícuota debe ser descongelada sólo una vez para preparar la solución de trabajo.

#### **Preparación de las soluciones de trabajo de control de ARNs.**

1. Descongelar cada una de las alícuotas de los tubos que contienen 10 µl de control alto del stock de ARN y 10 µl de control bajo del stock de ARN.
2. A cada tubo adicionar 90 µl de TE libre de nucleasas (suministrado en el equipo), agitar en el vórtex. Dar un spin para recoger (colectar).
3. Preparar 10 alícuotas con 10 µl cada una y almacenar -70°C.
4. Utilizar una alícuota para cada ensayo de RT-PCR en tiempo-real. Desechar la solución de trabajo sobrante.

#### **Preparación de la muestra.**

El ARN de las muestras (se extrae de la muestra clínica o del cultivo celular) se almacenan a -70°C. Para cada ensayo se requieren 2.5 µl por reacción. Si se adicionan diferentes volúmenes se requiere ajustar adicionando agua para obtener un volumen final de 25 µl.

#### **Controles del ensayo.**

- Cada muestra de ARN debe ser procesado en paralelo con la mezcla de cebador/sonda RUB y con la mezcla de cebador/sonda RNasa P. El propósito del control de RNasa P es para monitorear la integridad de la muestra clínica, la calidad del ARN extraído y asegurar de que se eliminaron los posibles inhibidores.
- Los siguientes estándares y controles deben correrse en cada placa como está indicado en la hoja de trabajo de tiempo-real 7500. Debe incluirse los cálculos de la solución de la mezcla maestra (máster mix) para cada juego de cebador/sonda.

#### **Controles Negativos.**

Control Negativo de Templado (NCT).-Adicionar 2.5 µl /pozo de agua libre de nucleasas como indicador de ARN para cada juego de cebadores/sondas tal como se indica en la hoja de trabajo.

Control de Extracción.- ARN extraído de una simulación obtenida por una extracción con agua o medio utilizando el método de extracción de Qiagen. En los cálculos para el número de reacciones (ver a continuación) el control de la extracción se prueba como una muestra adicional.

Controles de ARNs (control alto y bajo)

Hidratar y diluir cada uno por separado en el master mix.

Cada control debe ser utilizado como un control de RNasa P

Adicionar 2.5 µl /pozo de cada control como se indica en la hoja de trabajo.

**Reacción de amplificación.**

**Preparación para el ensayo.**

- Dar un spin a todos los reactivos (incluidas las enzimas) en la micro centrífuga y mantener en hielo hasta que estén listos para dispensarse.
- Descongele las muestras de ARN y manténgalas en hielo durante el ensayo.
- Anote la fecha de apertura de los reactivos en la hoja de trabajo de tiempo-real 7500.

**Protocolo de ensayo.**

- Determinar el número de reacciones (n) en función del número de muestras de ARN a ensayar y el formato de la hoja de trabajo de tiempo-real 7500. Cada muestra clínica y el control de extracción deben ser probados por triplicado con el juego de cebadores RUB y en un solo pozo para el juego de cebadores de RNasa P. Los controles para el juego de cebadores/ sonda RUB (control alto de RUB de alta, el control bajo de RUB, NTC-RUB) deben analizarse por duplicado. Los controles para el juego de cebadores/sondas RNasa (control positivo RNasa P, NTC RNasa P) se prueban en un solo pozo.
- Cualquiera de los controles alto o bajo de RUB se pueden utilizar como un control de RNasa P positivo.
- Preparar reacciones en exceso (n + 1) para cada juego de cebadores/sonda por los errores de pipeteo permitidos.
- Calcular el número de reacciones: Para el primer juego de cebadores RUB, el número de reacciones son por triplicado el número de muestras (que incluye el control de extracción), además 6 para los controles del tiempo real plus y uno más por las pérdidas de pipeteo.

Preparación de la master MIX para la reacción de Real time RT-PCR para el virus de rubéola.

Componentes	Vol/rxn (ul)	[Final] conc.	Total vol (ul)
Agua libre de RNasa	7.25		
2x SS buffer	12.5	1x	
Forward primer (20 uM)	0.5	0.4 uM	
Reverso primer 1 (20 uM)	0.5	0.4 uM	
Reverso primer 2 (20 uM)	0.5	0.4 uM	
Probe (10.0 uM)	0.5	0.2 uM	
SS III/Taq mix (5U/ul)	0.5	0.025 U/ul	
ROX reference	0.05	0.25 U/ul	
RNase inhibidor	0.25	0.4 U/ul	
RNA	2.5		
<b>Total</b>	<b>25</b>		

Para el juego de primer RNasa P, el número de reacciones es el número de muestras (que incluye el control de extracción), 2 más para los controles y 1 más por las pérdidas de pipeteo.

Ejemplo: Si tiene 4 muestras y un control de la extracción: hacer el máster mix para 22 reacciones con el primer juego de RUB:

- 5 muestras (muestras y control de extracción) medidos por triplicado = 15 reacciones.
- 2 NTC s.
- 2 controles de alto ARN.
- 2 controles de bajo ARN.
- 1 extra por las pérdidas de pipeteo.

Haga un máster mix de 8 reacciones con los cebadores para RNasa P:

- 5 muestras (muestras y control de la extracción).
- 1 NTC.
- 1 ya sea para el control alto o bajo de ARN.
- 1 extra por las pérdidas de pipeteo.
- Introduzca el número de identificación (ID#) de la muestra (s) en la sección de la hoja de control "Plate Layout".
- Introduzca el número de muestras y controles en la hoja "Máster Mix" para determinar los volúmenes que se añaden de cada reactivo. Hay hojas de cálculo por separado para los cebadores de rubéola y los cebadores de RNasa P.

Preparación de la master MIX para la RNasaP.

Componente	Vol./rxn (ul)	[Final] conc.	Total Vol. (ul)
Agua libre de RNasa	7.7		
2x SS buffer	12.5	1x	
Forward primer (15 uM)	0.5	300 nM	
Reverso primer (15 uM)	0.5	300 nM	
Probe (5 uM)	0.5	100 nM	
SS III/Taq mix (5U/ul)	0.5	0.025 U/ul	
ROX reference	0.05	0.25 U/ul	
RNase inhibidor	0.25	0.4 U/ul	
RNA	2.5		
<b>Total</b>	<b>25</b>		

- En la CBS destinada para la preparación del "Master Mix", el juego de cebadores/sondas para RUB, deben prepararse los reactivos en un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml en el mismo orden indicado en la hoja de trabajo a excepción del ARN. Invertir, centrifugar brevemente, y mantener en hielo.
- En otro tubo de micro centrifuga de 1.5 ml, añadir los reactivos para el master mix de RNasa P.

- Establecer una CBS por separado para la adición de los templados. Dispensar 1 volumen de reacción del master mix en los pozos apropiados de acuerdo a la hoja de control en tiempo-real de 7500, utilizar una punta nueva para cada master mix. El volumen de reacción es de 22.5 µl /pozo de RUB y RNasa P.
- Adicionar agua (NTC), el control de la extracción, la muestra de RNA o los controles positivos estándar como se indica en la hoja de control en tiempo-real, usando una punta nueva para cada pozo. El volumen de la muestra es siempre de 2.5 l µl /pozo. El volumen total en cada pozo debe ser de 25 µl.
- Cubrir la placa con la lámina óptica adherente.
- Centrifugar la placa cubierta a 1500 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

### **Ejecución de la reacción de amplificación.**

- Inicie el software haciendo doble clic en el icono del programa 7500 en el escritorio. Las siguientes instrucciones son para el software v2.0.4.
- Encienda el Termociclador 7500 - la conexión usualmente es automática.
- Seleccione Advanced Set-Up.
- Una vez abierta la pantalla seleccionar Experiment Properties. El nombre del experimento (por lo general se utilizan la fecha y las iniciales). La configuración debe ser 7500 (96 pozos), Quantitation-Standard Curve, TaqMan reagents, Standard Ramp Speed.
- Ira Plate Setup: Define Targets and Samples. Introduzca el nombre de cada muestra y el control de la extracción de la prueba, haga clic en Add New Sample. Cada muestra y el control de extracción debe aparecer dos veces: una para rubéola (por ejemplo, muestra N° 1 y una para la RNasa P (por ejemplo, muestra 1-R). Además, agregar nuevas muestras con nombre NTC, control alto, control bajo, positivo RNasa P y negativo RNasa P.
- Ir ahora a Define Targets. Debe haber una etiqueta para (FAM) y otra para el quencher (NFQ-MGB, Blackhole Quencher). Estas etiquetas pueden ser utilizadas en cada placa de reacción.
- Ir a Assign Targerts and Samples, utilizando el "Plate Layout" y la captura de pantalla de diseño (abajo) como guía, marque todos los pozos que contienen las muestras de ensayo, el control de la extracción y el control RNasa P positivo.
- Marque la caja de bajo de "Assign". Todos los pozos marcados mostraran una "U" de "desconocido".
- Para definir los estándares, señalar los pozos con el control alto. Debajo de "Assign Targets", haga clic en "S" para los estándares. Debajo de "Quantity", escribir 100000 (105). Repita el procedimiento para el control bajo, con 1000 (103) como cantidad.
- Para definir el NTC y el control negativo de RNasa P, señalar los pozos para estos controles. Debajo de "Assign Targets", haga clic en "N" para NTC.
- Para asignar las muestras, señalar los 3 pozos que contienen el master mix de RUB para la primera muestra (por ejemplo, muestra 1). En "Assign samples to the Selected Well" marque la casilla para la muestra 1. Repita el procedimiento para el pozo que contiene la muestra 1 y el master mix de RNasa P marque la casilla para la muestra 1-R. Repita este proceso para cada muestra. Cada pozo debe contener un objetivo, es decir una marca (NTC, estándar o desconocido) y un nombre de la muestra.
- Asegúrese de que ROX aparece como tinción (colorante) pasiva.
- Ir al "Run Method".

## **Parámetros de pasos (tiempo / temperatura) sobre el perfil térmico siguiente:**

Paso RT: 48°C / 30 minutos

Activación: 95 ° C / 5 minutos

PCR (40 ciclos): 95 ° C / 15 segundos, 60° C / minuto 1

Tiempo total: 2 horas.

- a) Seleccione File > Save as en la carpeta de usuario utilizando un formato estándar: (por ejemplo "Date\_initials.eds").
- b) Abra la compuerta del 7500 empujando la pestaña del frente.
- c) Colocar la placa en la bandeja del instrumento. Oriente el pozo A1 en la posición de la placa A1 y empuje la compuerta para cerrarla.
- d) Seleccione "Start Run", seleccionar "Run" y seleccionar "Amplification PLOT". En la pantalla de "Run" que debe ser completa en aproximadamente 2 horas. El tiempo que dura la corrida.
- e) Al final del ensayo, aparecerá un botón verde "Analyze".
- f) Haga clic en "Save" para guardar los datos.

## **CONDICIONES DE VALIDEZ:**

### ***Control de Calidad del ensayo***

- Después de que la corrida haya terminado, haga clic en "Analyze". El programa calculará el umbral en automático. Sin cambiar el umbral para el análisis de los controles.
- Los resultados aparecerán.
- Lista de verificación para el control de calidad: Un ensayo de RT-PCR en tiempo real es válida si:
  - a) Los NTCs de RUB y RNasa P y los controles de extracción son indeterminados (negativo).
  - b) El umbral automático se encuentra en fase exponencial para las curvas de amplificación estándar.
  - c) Los valores de Ct para los duplicados del control alta RUB están entre 22 y 27.
  - d) Los valores de Ct para los duplicados del control bajo RUB están entre 29 y 34.
  - e) El valor Ct para la única muestra de control de RNasa P es entre 26 y 30.
  - f) Si alguno de estos criterios no se cumplen, la prueba debe repetirse.
  - g) Si el control de extracción es positivo, la extracción de ARN se debe repetir.
- Monitorear todo el tiempo RT-PCR en tiempo real: los valores de Ct para los controles positivos deben registrarse en las siguientes corridas. Después de varios ensayos, un rango típico de valores de Ct para cada los controles positivos debe ser determinado y se utilizado para el análisis de las siguientes corridas. Cambios en estos valores es indicativo de problemas.
- Se debe realizar una carta de controles para evaluar si nuestro resultado presenta una diferencia significativa con los valores previamente obtenidos, en ese caso el ensayo debe repetirse.
- Importante: el rango de valores de Ct para los controles positivos pueden ser variable entre los diferentes lotes de los equipos de RT-PCR en tiempo real para rubéola. Por favor, revisar el inserto incluido en el equipo para actualizaciones.

### ***Análisis de datos de la muestra***

- Ver el icono de "Multicomponent Data Pane" con todas las muestras con valores Ct <40 para confirmar una amplificación correcta como se indica por un aumento en la fluorescencia FAM.
- Algunos pozos pueden ser resaltados por las banderas amarillas. Haga clic en "QC Summary Pane" para ver la razón por la cual los pozos fueron marcados con las banderas. Por ejemplo, si

una muestra no produce una señal, el programa va a marcar como No amplification. Sin embargo, si la muestra es negativa (por ejemplo el control de extracción), la falta de amplificación es el resultado esperado y no un problema de control de calidad.

- Ajuste del umbral (si es necesario): Resaltar los pozos que contienen las muestras y NTC y examinar las curvas de amplificación. Si una muestra tiene una curva exponencial que no cruza el umbral, es posible reducir el umbral para el análisis de muestras de pacientes. Sólo después de bajar el umbral los valores de Ct para los valores de los estándares pueden determinarse como se describe en Control de Calidad del ensayo.
- Haga clic en “Analysis Settings”. Haga clic en “Edit Default Settings”. Quite la marca de “Auto Threshold”. Haga clic en “Save Change” y “Apply Analysis Settings”.
- Cierre.
- En el gráfico de amplificación, haga clic en el Threshold y arrastre el umbral hasta la posición deseada. Cada vez que el umbral se mueve, los valores de Ct de las muestras se recalcula automáticamente.
- Importante: La señal para el NTC debe permanecer por debajo del valor umbral. El umbral debe estar situado en el tercio inferior de la fase exponencial de la gráfica. Ver figura N°18 (se muestran los 2 controles positivos y una muestra típica positiva para la prueba).
- Si se ha movido el valor del umbral, anote el valor de umbral, porque el programa no guarda esta información.

#### INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Gen Viral	Gen RNasa P	Resultado
< 40	< 40	Positivo
< 40	Indeterminado	Positivo
Indeterminado	< 40	Negativo
Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado

Si la PCR con los cebadores/sondas RUB producen un Ct por debajo de 40, la muestra es positiva para rubéola. No importa si la reacción RNasa P es positiva o negativa.

Si el resultado de PCR para la RUB es indeterminado, pero la PCR del RNasa P de PCR produce un Ct por debajo de 40, la muestra es negativa para la rubéola. El resultado positivo RNasa P indica que el ARN que se extrajo es suficiente para la muestra y permite que la amplificación ocurra.

Si el resultado de la PCR para RUB y la PCR RNasa P son indeterminado, la muestra se interpreta como indeterminada. Si no es posible determinar un resultado debido a que no era suficiente el ARN para permitir que la amplificación se produzca.

Las muestras clínicas con 2 o 3 reacciones positivas (fuera de las 3 repeticiones en la corrida por placa) se reporta como positivo.

#### **Exportación de datos.**

Para guardar los datos debe ser un archivo de Excel: Haga clic en “Export” y a continuación:

1. Debajo de: “Select Data to Export”, seleccione “Results”.

2. Debajo de: "Select one file or separate files", seleccione "One file".
3. Elegir un nombre de archivo y busque la ubicación donde se guardará el archivo.
4. Haga clic en "Open", haga clic en "Start Export".
5. Cierre la "Export Tool".

### **INFORME DE RESULTADOS.**

Se elabora un informe escrito y firmado por la Jefa del LNR-SR, luego el mismo es enviado por mail al PRONACE, al hospital que figure como remitente en la historia clínica del caso y al referente de epidemiología local. Se ingresan además digitalmente los resultados al Sistema de vigilancia Laboratorial (SIVILA).

Descarte de las muestras:

Una vez concluida la PCR Real time, las placas son eliminadas colocándose en bolsa rojas.

### **3.10 Aislamiento de virus RUB a partir de muestras clínicas (POE del LNR-SR)**

PROPÓSITO: Describir los pasos a seguir para el aislamiento del Virus RUB en muestras clínicas.

ALCANCE: Aplicar este procedimiento a todas las muestras destinadas al diagnóstico de RUB.

FUNDAMENTO: El aislamiento viral es la técnica de elección y necesaria a la hora de clasificar y conservar las cepas circulantes en nuestro país.

CONDICIONES DE SEGURIDAD:

*Ver condiciones de seguridad en: ELISA de captura para detección de anticuerpos IgM específicos anti-rubéola.*

Encender la CBS 10' antes de iniciar el procedimiento de trabajo con el encendido de la luz UV para descontaminar el área.

En todas las situaciones de exposición a la luz UV, debe usarse anteojos de protección UV ya que esta luz afecta la vista y la piel.

PROCEDIMIENTO:

Las muestras de primera elección son los exudados (hisopados) faríngeos o nasales en 2 a 4 ml de medio de transporte viral o PBS. Una muestra de orina también puede servir para el aislamiento viral. La orina debe ser previamente filtrada a través de un filtro esterilizante de jeringa con un poro de 0,22 micrones.

1. Agitar el hisopo durante 2 minutos contra la pared del tubo para remover todo el líquido. Descartar el hisopo (se puede partir el hisopo y dejarlo en el tubo). La muestra en medio de transporte se puede congelar o usarla inmediatamente para inocular.
2. Filtrar la muestra a través de un filtro de jeringa de 0,22 micrones e inocular directamente las células, reservar otras dos alícuotas a -80 para estudios complementarios. Este es el método de elección en comparación con el agregado de antibióticos, ya que es más efectivo en la prevención de la contaminación y es más rápido. La desventaja es que algunas muestras no pasan a través del filtro. En esas situaciones es recomendable realizar una clarificación mediante centrifugación a bajas velocidades y descartar el sedimento.
3. Una alternativa, cuando la muestra no pasa a través del filtro consiste en: por cada ml de medio de transporte viral adicionar 0,1 ml de una solución con 1000 µg/ml de Gentamicina, 0,1 ml de una solución con 100 µg/ml de anfotericina B y 5 µl de una solución 1000X de penicilina / estreptomicina. Incubar a 4º C durante 30 minutos e inocular las células.

## Procedimiento para muestras de tejidos y biopsias

1. Trozar con tijeras o bisturí estériles y homogeneizar.
2. Agregar suficiente medio de transporte viral como para obtener una suspensión al 5% P/V.
3. Remover la suspensión en un vórtex vigorosamente para extraer la mayor cantidad de virus posible.
4. Centrifugar a 300-600 g.
5. Retire cuidadosamente (sin desprender el Pellet) 300 µl para inocular en cultivo celular.

### 3.5.5. Inoculación de muestras para el aislamiento de Rub en cultivos celulares

Los sistemas celulares de elección para el intento de aislamiento de RUB son: VERO/RK-13 (o Vero/hSlam). [38]

#### Procedimiento

1. Inocular 0,5 ml de la muestra filtrada o tratada directamente sobre un tubo tipo Leighton con monocapa de células confluentes. (Lavar previamente la monocapa con PBS). Área del tubo = 10 cm<sup>2</sup>.
2. Incubar a 37<sup>o</sup> C durante 90 minutos en un agitador por balanceo. Remover el inoculo y adicionar 3 ml de DMEM + SFB al 5%. Incubar a 37<sup>o</sup> C en CO<sub>2</sub>.
3. Siete días después de inoculadas, transferir 0,5 ml de medio de cultivo (el sobrenadante) a un tubo con células Vero nuevas. Determinar la presencia viral por IFI y RT-PCR.
4. Repetir el paso 1.
5. Siete días después de inoculadas, transferir 0,5 ml de medio de cultivo (el sobrenadante) a un tubo con células RK-13 nuevas. Determinar la presencia viral por IFI y RT-PCR.
6. Repetir el paso 5.
7. Cosechar el sobrenadante viral al cabo de siete días. Determinar la presencia viral por IFI y RT-PCR.

NOTA: Los aislamientos clínicos no presentan ECP. Se recomienda realizar hasta 5 pasajes ciegos (sin ECP evidente).

### 3.11 Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección del virus de RUB en células de cultivo.

Esto es un ensayo indirecto de Inmunofluorescencia (IFI), usando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la glicoproteína E1 y la proteína de Cápside C del virus de RUB. Los reactivos son importantes ya que el virus de la RUB no produce el antígeno en grandes cantidades. El anticuerpo inmunofluorescente trabaja muy bien cuando tiene alta absorción cruzada (highly cross-adsorbed).

#### Equipos y reactivos

Ioduro de propidio (Conservar a 4 <sup>o</sup> C.)	Células Vero.
Antibióticos	Albúmina de suero bovino.
Tween 20	Metanol.
DMEM	2% Paraformaldehido.*
PBS	Medio de montar fluorescente**
Suero fetal bovino (SFB)	Tubos Leighton.
Pipetas estériles	Incubadora 37 <sup>o</sup> C con CO <sub>2</sub> .

Microscopio fluorescente.

\*El paraformaldehído puede ser comprado como una solución al 16%. Diluir 1:8 con PBS inmediatamente antes de usarlo.

\*\*Dako medio fluorescente medio de montar, #S3023. Conservar a 4º C.

#### *Anticuerpos*

Conjugado de IgG cabra anti-ratón (Goat anti-mouse IgG conjugate), Alexa Fluor 488 de Molecular Probes, Eugene, OR, USA.

Disponible en: <http://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/brands/molecular-probes.html>

Conservar a 4ºC.

#### *Anticuerpos monoclonales anti:*

Glicoproteína E1 de ratón anti-rubéola. Conservar a -20º C.

Proteína de Cápside C de ratón anti-rubéola. Conservar a -20º C.

#### **a. Fijación de las células.**

Fundamento: Las células se fijan con 2% de paraformaldehído en PBS enfriado a 4º C. Las células se permeabilizan con metanol a -20º C.

1. Colocar los tubos de Leighton en baño de hielo durante 10 minutos.
2. En una cabina de seguridad, remover el medio y lavar con PBS frío.
3. Añadir 500 µl de paraformaldehído al 2% en PBS frío durante 30 minutos en baño de hielo.
4. Remover el paraformaldehído y lavar una vez con PBS frío.
5. Hacer dos lavados de 5 minutos con metanol frío, a -20º C, para que las células se permeabilicen. (se pueden dejar en un freezer de -20).
6. Remover el metanol y lavar con PBS a temperatura ambiente.
7. Secar cuidadosamente el cubreobjeto y pegarlo sobre un portaobjeto
8. Delimitar con esmalte de uñas el área a estudiar.

#### **b. Técnica de Inmunofluorescencia.**

Nota: Los Bloqueos, incubaciones de anticuerpos, lavados y teñidos del núcleo con yoduro de propidio se hacen con buffer bloqueante. (Solución de PBS que contiene 1% de albúmina bovina, 0,5% SFB, 0,1% de Tween 20) a temperatura ambiente. Los lavados finales después del yoduro de propidio se hacen únicamente con PBS.

1. Agregar 50 µl de buffer bloqueante a cada área, para evitar reacciones de anticuerpos inespecíficos. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
2. Remover el buffer bloqueante y añadir 50 µl de una mezcla\* de anticuerpos monoclonales diluidos en buffer bloqueante. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
3. Lavar 2 veces con buffer bloqueante. Añadir 50 µl del \*\* segundo anticuerpo fluorescente diluido en buffer bloqueante.
4. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y cubrir con papel aluminio para mantenerlo en la oscuridad.
5. Lavar 2 veces con buffer bloqueante. Añadir 50 µl de yoduro de propidio a una concentración de 0,5 µg/ml diluido en buffer bloqueante. Incubar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
6. Lavar 2 veces con PBS y secar cuidadosamente.

7. Montar con líquido de montaje.
8. Observar en microscopio fluorescente con luz azul.

\*Diluir el anticuerpo monoclonal anti-E1 en una proporción 1:1000 y el anticuerpo monoclonal anti-C en una proporción 1:200. Para obtener esta dilución en 1 ml de buffer bloqueante añada 1 µl del E1 y 5 µl del C.

\*\*Alexa Fluor 488 en cabra anti-ratón IgG. Diluido 1: 500.

### **c. Interpretación de resultados:**

Un resultado es considerado positivo cuando:

Las células se tiñen de color verde manzana brillante y los núcleos teñidos con yoduro de propidio se verán rojos.

Nota: Se debe poder distinguir fácilmente una célula infectada de una no-infectada.

## **3.12 Protocolo de RT-PCR para la genotipificación de rubéola (Sistema de 2 Fragmentos). POE del LNR-SR.**

### **Propósito.**

Este protocolo aplica para la amplificación de 2 fragmentos del virus de RUB que codifican para la región de la proteína de la Envoltura 1 (E1). Las secuencias se derivan de 2 fragmentos de ADN que se combinan para generar la secuencia recomendada de 739 nt para determinar el genotipo del virus de la rubéola. Este protocolo no debe utilizarse para la detección diagnóstica de ARN de RUB, el protocolo de RT-PCR en tiempo real o el protocolo de RT-PCR para la detección del virus de rubéola son más sensibles y deben utilizarse en su lugar. Para estos procedimientos, el ARN es extraído de una muestra clínica o a partir de cultivo celular.

Esta es una reacción “one-tube”, por lo que existe un mínimo de manipulación de las muestras. Los cebadores y controles de ARN han sido suministrados por el CDC como un equipo.

Importante: Este es un protocolo general para utilizarse con el equipo de genotipificación de RUB suministrado por el CDC. Una copia del inserto se guarda en la carpeta de insertos del servicio VCP y otra copia junto con el equipo en congeladora de -20 °C.

Como resultado de la aplicación de este protocolo se generan dos productos de PCR que se describen a continuación:

Fragmento N° 1: El tamaño esperado del producto para el fragmento 5 '(fragmento 1) es de 480 nts.

Fragmento N° 2: El tamaño del producto para el fragmento 3' (fragmento 2) es de 633 nts.

Se analizaron los productos de PCR en geles de agarosa (Ver protocolo de electroforesis en gel de agarosa).

A los fines de clasificar los genotipos de los casos positivos aislados se hizo necesario establecer la secuencia del fragmento recomendado de 739 nts y para ello se purificaron y secuenciaron los productos de PCR (Ver Protocolo de Purificación de productos de PCR y Protocolo de reacciones de secuenciación para rubéola).

Los productos de PCR se deben conservar a -20 °C pero pueden permanecer estables a temperatura ambiente durante al menos un mes.

### **Reactivos y Materiales:**

- Etanol al 70%
- Batas desechables
- Guantes
- Inhibidor de RNasa de 2000 unidades (Applied Biosystems N-808-0119)
- RNaseZap (Sigma, # R2020-250ML)
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml estériles,
- Agua desionizada, libre de nucleasas (NF agua)
- QiagenKit One-stepparaRT-PCR (Qiagen CAT # 210210 o 210212)
- Tubos para PCR autoclavables (0.2 ml, de pared delgada)
- Equipo de Genotipificación para rubéola por RT-PCR (cebadores y controles de ARN)

### **Equipos requeridos:**

- Congeladores a -70°C y 20°C
- Recipiente con hielo
- CBS Clase II con luz UV (CBS)
- Micro pipetas y puntas para pipetas estériles con filtro resistentes a aerosoles
- Vórtex
- Gradilla metálica de enfriamiento para tubos de 0.2 ml
- Termociclador (AB GeneAmp PCR System 9700)
- Micro centrífuga , refrigerada a 4°C con rotor para tubos de 1.5 ml y 0.2 ml

### **Recomendaciones para trabajar con ARN.**

- Se debe utilizar equipo, áreas y CBS asignados para todos los procedimientos de pre-PCR. Los análisis post amplificación y el procesamiento debe realizarse en áreas separadas con equipo asignado. No compartir los equipos (incluyendo batas desechables) entre los procedimientos pre-PCR y post-PCR.
- Se deben utilizar guantes en todos los experimentos para prevenir la contaminación con RNasas que se encuentran en las manos.
- Se deben cambiar los guantes después de tocar la piel (por ejemplo, la cara), las perillas de las puertas, y las superficies comunes.
- Disponer de un juego de pipetas para utilizarse exclusivamente para el trabajo con ARN.
- Utilizar puntas con filtro y los tubos que han sido probados y garantizados para ser libre de RNasa.
- Utilizar productos químicos y reactivos libres de RNasa.
- Reducir la contaminación por RNasas limpiando las gradillas de tubos, micro pipetas y la superficie de trabajo de la estación para PCR con etanol al 70% de etanol y RNaseZap.
- Reducir la contaminación con ADN en la CBS exponiendo la luz ultravioleta durante 15 minutos.

### **Contenido del equipo:**

El equipo de genotipificación para RUB contiene:

- 50 ul de RUB 10X de primer sentido RV8633 RV8945. El contenido debe diluirse antes de usar.
- 50 ul de RUB 10X de primer antisentido RV9112 y RV9577. El contenido debe diluirse antes de usar.
- Controles de ARN de RUB liofilizado. El contenido se liofilizó y necesita ser rehidratado y diluido antes de utilizarse.

### **Información sobre los cebadores:**

La secuencia de los cebadores es:

- Primer sentido 1 (RV8633): 5 'GCG AGC GAC TGC TGG CCG GG 3'
- Primer sentido 2 (RV8945): 5 'TGG GCC TCC CCG GTT TG 3'
- Primer Antisentido 1 (RV9112): 5 'GCG CTG AGA CGC TAT GAC 3'
- Primer Antisentido 2 (RV9577): 5 'CGC CCA GGT CTG CCG GGT CTC 3'

El stock de los cebadores se almacena a -20°C.

La concentración final de los cebadores en la mezcla de reacción es de 600 nM.

### **Información sobre el control positivo:**

El control ARN de RUB es un transcrito de ARN de RUB que codifica para la región E1 que ha sido modificada para amplificar productos para ambos fragmentos que pueden ser aproximadamente de 80 nt menor que los productos de RT-PCR de muestras de pacientes. El uso de este control simplifica la identificación de contaminación.

### **Preparación de las soluciones de trabajo de los cebadores:**

Los cebadores se suministran en concentraciones stocks 10X (10 veces). La concentración del stock es de 200 uM. Es necesario preparar una solución de trabajo de cada cebador antes de iniciar una reacción de RT-PCR. La concentración de la dilución de trabajo es de 20 uM. Almacene los primeros diluidos a -20°C. No congelar y descongelar por más de 5 veces.

- RV8633: Mezclar 10 ul de solución stock con 90 ul de agua NF. Vórtex.
- 3RV8945: Mezclar 10 ul de solución stock con 90 ul de agua NF. Vórtex.
- RV9112: Mezclar 10 ul de solución stock con 90 ul de agua NF. Vórtex.
- RV9577: Mezclar 10 ul de solución stock con 90 ul de agua NF. Vórtex.

### **Preparación el stock de control ARN.**

El control ARN de RUB se suministra en forma de ARN liofilizado. Es necesario rehidratar antes utilizar el equipo por primera vez. Siempre se debe trabajar el ARN en el hielo. No trabaje con el control de ARN en la misma estación de PCR donde se lleva a cabo la preparación del master mix.

1. Añadir 100 ul agua libre de nucleasas o tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) y agitar durante 15 segundos.
2. Incubar el tubo a temperatura ambiente durante 10-15 minutos después agitar durante 15 segundos. De un spin breve para colectar.
3. Preparar alícuotas de 10 ul y almacenar a -70°C.

### **Preparación de la soluciones de trabajo de control ARN.**

1. Descongelar un tubo con 10 ul del stock de control ARN.
2. Añadir 90 ul de agua libre de nucleasas o tampón TE. Vórtex. Dar un spin breve y colecte.
3. Preparar alícuotas de 10 ul y almacenar a -70°C para tiempos de almacenamiento por largo plazo y a 20°C para almacenamientos a corto plazo.
4. Use 5 ul por RT-PCR.

### **Preparación de la muestra.**

Muestras de ARN (se extraen de una muestra clínica o de cultivo celular) se almacenan a -70°C.

Es recomendable que el ARN se extraiga de una botella de 25 cm<sup>2</sup> con células infectadas con 100 a 200 ul de material clínico.

La mayoría de los protocolos de extracción se obtienen de 50-60 ul de ARN. Para el ensayo, se utilizan 5 ul de muestra por reacción.

El volumen de ARN puede aumentarse, pero esto no mejorará significativamente la sensibilidad.

Adicionar diferentes volúmenes para una reacción requiere que se ajuste la cantidad de agua para obtener un volumen final de 50 ul.

### **Controles para incluir en el ensayo.**

Los siguientes controles deben incluirse en cada ensayo. Deben ser incluidos en los cálculos del Master Mix:

Controles negativos:

- Control de agua: añadir 5 ul de agua libre de nucleasas en lugar de ARN.
- Control de extracción: Simule un extracto de ARN obtenidos a partir de una extracción con agua o medio. En los cálculos para el número de reacciones el control de extracción debe considerarse como una muestra adicional.
- Control positivo (Control ARN de RUB).

La rehidratación y las diluciones deben hacerse por separado del master mix.

Añadir 5 ul.

### **Preparaciones para el ensayo.**

Nota: El virus de rubéola tiene un alto contenido de GC y la amplificación puede mejorarse adicionando un reactivo de fusión (melt) de GC como la solución Qiagen Q incluido en el equipo.

Siempre añadir este reactivo para la determinación del genotipo en reacciones contra la rubéola.

- Descongele los reactivos del equipo: tampón 5X, solución Q, mezcla dNTPs y los cebadores. Agitar brevemente.
- Dar un spin a todos los reactivos (incluyendo las enzimas) en micro centrífuga y mantener en hielo hasta que esté listo para añadirlos. Las enzimas se deben mantener en hielo en todo momento.
- Descongele las muestras de ARN y mantener en hielo durante el desarrollo del ensayo.
- Anote la fecha de apertura de los reactivos en la Hoja de Trabajo para la genotipificación de RUB por RT-PCR.

### **Procedimiento del ensayo.**

1. Para determinar el genotipo de RUB es necesario hacer 2 master mix cada una con su juego de cebadores. Para cada juego de cebadores se debe determinar el número de reacciones (n) en función del número de muestras de ARN a ser analizadas. Preparar volúmenes de exceso de reacción (n + 1) por los errores de pipeteo permitidos.

Calcular el número de reacciones: para cada master mix el número de reacciones es el número de muestras (incluir el control de extracción), más 2 para el control de agua y el control positivo y 1 más por los errores de pipeteo permitido.

Ejemplo: Si hay 4 muestras y un control de la extracción: hacer una mezcla maestra de 8 reacciones, a continuación, repita por 2 el master mix:

- 5 muestras (muestras y control de la extracción)
  - 1 control de agua
  - 1 control ARN de RUB
  - 1 adicional por la pérdidas de pipeteo permitido
2. Ingrese el número de muestras en la hoja de cálculo de Excel del Master Mix para Genotipificación y determine los volúmenes de cada reactivo que se añaden.
  3. En la CBS asignada para la preparación del master mix: Etiquete adecuadamente el número de tubos de 0.2 ml de pared fina por reacción y traslade en la gradilla de metal pre-enfriada. Mantenga la gradilla en hielo durante todo el procedimiento.
  4. Por cada master mix, añada el volumen adecuado (ver hoja de cálculo Excel para la genotipificación de rubéola por RT-PCR) de los primeros 6 reactivos (el agua NF a través del cebador antisentido) y pre-refrigerar los tubos para micro centrifuga de 1.5 ml. Para el master mix 1 utilice los cebadores RV8633/RV9112 y para el master mix 2RV8945/RV9577. Vórtex y mantener los tubos en hielo.
  5. Añadir el Inhibidor de RNasa, las enzimas y agitar los tubos del master mix. Vórtex y enfriar brevemente en hielo.
  6. Dar un spin a los tubos del master mix en la micro centrifuga. Dispensar 45 ul de master mix (ver hoja de trabajo) a cada tubo de reacción. Mantenga los tubos de reacción en hielo en la gradilla de metal y después dispensar la master mix.
  7. Proceder en una CBS por separado asignadas para preparar los templados. Usando una nueva punta para pipeta por cada transferencia, agregar la muestra de ARN (s) a analizar en el tubo correspondiente (s) y cerrar la tapa. El volumen final debe ser de 50 ul.
  8. Agregar controles negativos (agua NF y el control de extracción), seguido del control positivo (5 ul de control de ARN). Mezclar.
  9. Dar un spin de (10.000 rpm durante 1 minuto) en una micro centrifuga refrigerada y volver inmediatamente a colocar el tubo en la gradilla de metal refrigerada.
  10. Inicie el programa apropiado en el termociclador. Colocar las muestras en el bloque y empezar la corrida.

#### **Parámetros de los ciclos de RT-PCR para genotipificación de RUB.**

50°C durante 30 minutos

95°C durante 15 minutos

#### **40 ciclos de:**

95°C durante 30 segundos

60°C durante 30 segundos

72°C durante 1 minuto

Seguido de 72°C durante 10 minutos y final

### **3.13 Protocolo de Electroforesis en gel de agarosa.**

#### **Objetivo:**

El siguiente protocolo ha sido utilizado para la visualización de productos de PCR.

Este protocolo aplica tanto para los productos de la RT-PCR de genotipificación de RUB como para la RT-PCR convencional de diagnóstico de rubéola.

### **Reactivos y materiales requeridos.**

- Solución amortiguadora 1X de TBE o de TAE.
- Agarosa (por ejemplo Ultra-Pure marca Invitrogen, # catálogo 15510-027).
- Agua desionizada.
- Guantes.
- Bata de laboratorio.
- Bromuro de etidio a una concentración de 10µg/ml o GelRed (Biotium, # 41003).
- Colorante de carga que contenga azul de bromofenol (por ejemplo, Promega # catálogo G190A).
- Marcador del peso molecular (por ejemplo de 100 pares de bases. Marca Invitrogen # catálogo 15628-019).

### **Equipos requeridos.**

- Bandeja para preparación de geles de agarosa y peine(s).
- Caja de electroforesis para geles de agarosa.
- Cámara.
- Probeta o cilindro graduado.
- Guantes resistentes al calor.
- Micro pipetas y puntas para micro pipeta estériles con filtros para aerosoles.
- Vaso o frasco de vidrio apto para microondas.
- Parafilm.
- Fuente de poder.
- Escala.
- Transiluminador de luz UV.

### **Precauciones.**

- La electroforesis en gel es un procedimiento post-amplificación y no debe realizarse en la misma área (cuarto) donde se hace la preparación de reactivos para RT-PCR. No comparta equipos ni elementos (incluyendo las batas de laboratorio) entre las áreas de pre-PCR y las de post-PCR.
- El bromuro de etidio es un carcinógeno. Siempre use guantes al preparar y trabajar geles de agarosa con bromuro de etidio. Descarte todos los desechos y los geles que contengan bromuro de etidio en recipientes apropiados para desechos con este compuesto.
- Para no tener que trabajar con bromuro de etidio, se puede usar GelRed.
- Puede utilizarse en los mismos transiluminadores de luz UV y las mismas cámaras que se usan para geles coloreados con bromuro de etidio.

### **Protocolo.**

Dado que existen muchos tipos de sistemas para preparación de geles y cámaras de electroforesis. La cantidad de gel a preparar, así como el voltaje y el tiempo de corrida de la electroforesis debe determinarse basados en el equipo disponible.

### **Procedimiento:**

1. Pesar la cantidad apropiada de agarosa. Para productos tanto de la RT-PCR para genotipificación de RUB, como de la RT-PCR de diagnóstico de RUB, el gel de agarosa al 2% es apropiado. Añada solución TBE 1X (también se puede usar TAE).
2. Derrita la agarosa en un horno microondas de uso exclusivo para el laboratorio. Evite el sobrecalentamiento de la agarosa porque esta hervirá y salpicará todo el interior del microondas.

3. Agregue 1  $\mu\text{l}$  de solución de bromuro de etidio (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por cada 50 ml de agarosa líquida (o añada 0,5  $\mu\text{l}$  de GelRed) y mezcle suavemente.
4. Vierta en la bandeja o cubeta hasta que la agarosa llegue a la mitad de los dientes del peine y deje que el gel se solidifique.
5. Remueva el gel de la bandeja de preparación. Colóquelo en la cámara de electroforesis con suficiente solución TBE 1X (o TAE) para cubrir el gel. Retire suavemente el peine.
6. Sirva la cantidad apropiada de marcador de peso molecular en el primer pozo (por ejemplo, 5  $\mu\text{l}$  del marcador de peso molecular de 100 pares de bases de Invitrogen premezclado con colorante de carga)
7. Ponga 2  $\mu\text{l}$  de colorante de carga en papel Parafilm. Mezcle 5  $\mu\text{l}$  de la muestra con los 2  $\mu\text{l}$  de colorante de carga, pipeteando para que queden completamente mezclados. Coloque todo el volumen en un pozo vacío del gel. Repita esto con todas las muestras.
8. Realice la electroforesis a 5-10 V/cm si está usando TBE (1-5 V/cm para TAE). Deje correr el gel hasta que las bandas del marcador de peso se vean bien separadas cuando se observa el gel en el transiluminador.
9. Visualice el ADN con luz ultravioleta. Lo mejor es usar un transiluminador de luz ultravioleta. Tome una fotografía el gel para registrar los resultados.

#### **Análisis de resultados.**

- Las bandas del marcador deben ser claramente visibles.
- Los controles negativos (control de agua, ARN de células no infectadas) no deben mostrar ninguna banda de ADN. Si hay bandas en los controles negativos, esto indica una contaminación de los reactivos con ARN del virus de RUB. En este caso, la RT-PCR debe repetirse con reactivos nuevos.
- El control positivo debe mostrar una banda del tamaño esperado. Si no hay ninguna banda en el control positivo, la RT-PCR no funcionó y debe repetirse.
- Las muestras pueden no mostrar ninguna banda (resultado Negativo) o una banda del tamaño esperado (resultado positivo).
- Si hay productos esperados de la PCR, se deben purificar los productos a partir del volumen sobrante de la reacción.

#### **Ejemplo de gel para la genotipificación de RUB por RT-PCR.**

Gel de agarosa al 1,5% teñido con GelRed visualizado con luz ultravioleta. El control positivo es ARN sintético de rubéola. A continuación se muestran ejemplos de 2 fragmentos obtenidos de la RT-PCR para genotipificación y la RT-PCR para diagnóstico producidos a partir de virus salvaje y de ARN sintético. El tamaño del fragmento 1 para virus salvaje debe ser de 450 nucleótidos (nt) mientras que el producto a partir del ARN control debe ser de 370 nt. El tamaño del fragmento 2 para virus salvaje debe ser de 633 nucleótidos (nt) mientras que el producto del control debe ser de 553. El fragmento producido en la RT-PCR de diagnóstico a partir de virus salvaje debe ser de 185 nt, y a partir de ARN control debe ser 215 nt. (Figuras N° 21 y 22)

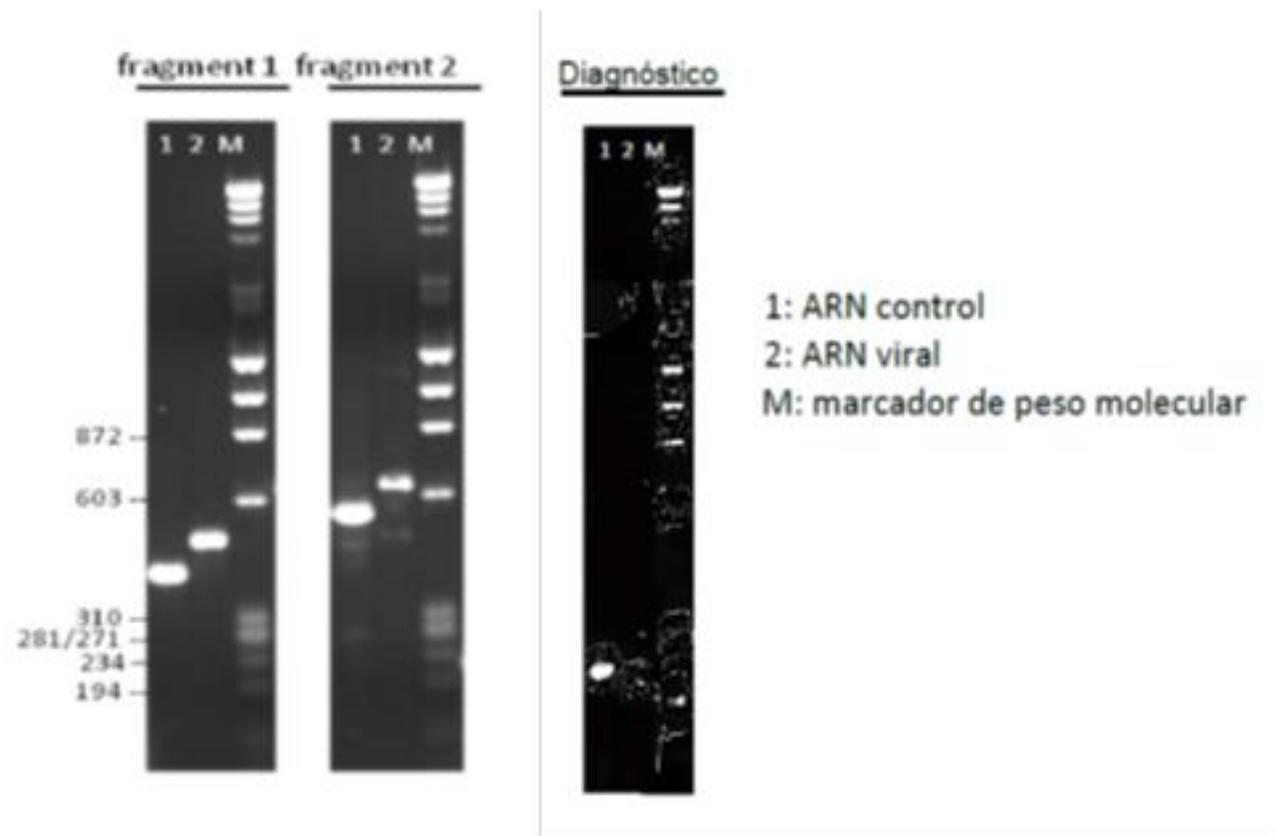


Figura N° 21. Ejemplo de resultados de las corridas electroforéticas para genotipificación (fragmentos 1 y 2) y de diagnóstico de RUB.

Fuente: CDC Protocols. Para el fragmento 1, el tamaño amplificado para ARN control debe ser de 370 nt. (calle 1) y para ARN salvaje debe ser de 450 nt. (calle 2). Para el fragmento 2, el tamaño del ARN control debe ser de 553 nt. (calle 1) y para ARN salvaje debe ser de 633 nt. (calle 2). Para la RT-PCR de diagnóstico el tamaño del ARN control debe ser de 215 nt. (calle 1) y para ARN salvaje debe ser de 185 nt. (calle 2).

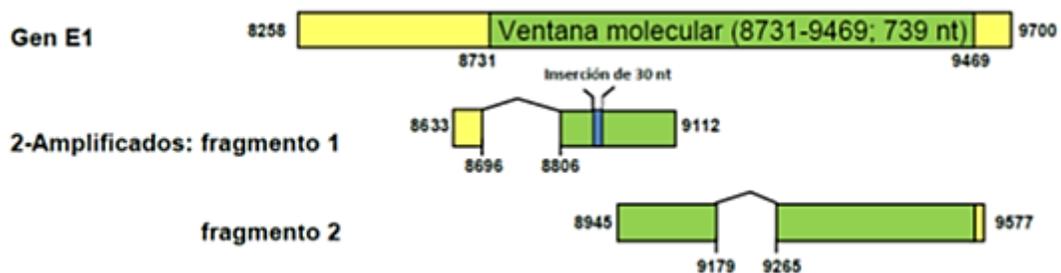


Figura N° 22. Esquema del ARN control (positivo) de rubéola con su inserción y deleción. ARN sintético del gen E1 de Rubéola con la ubicación de la inserción de 30 nucleótidos y 2 deleciones. Fuente: CDC Protocols.

### 3.14 Purificación de Productos de PCR.

Objetivo: Purificar fragmentos de ADN a partir de reacciones de PCR positivas. El exceso de nucleótidos, cebadores y enzimas debe removerse de la reacción. El ADN purificado puede utilizarse como una plantilla (templado) para la secuenciación.

Se utiliza equipo comercial:

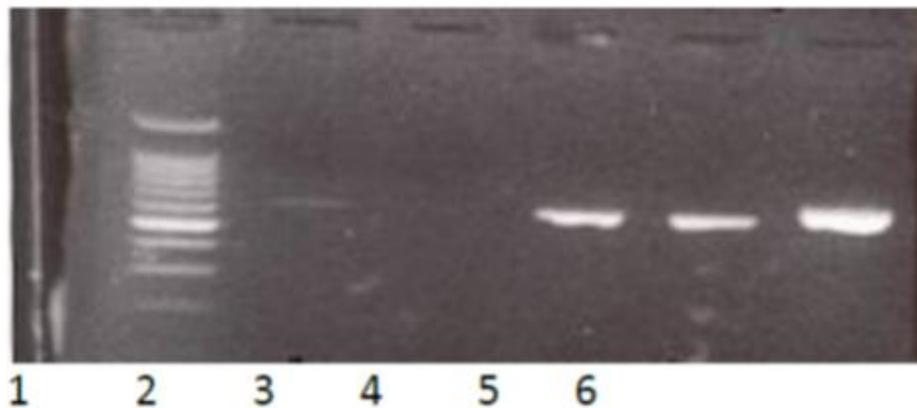
- QiaQuick PCR Purification kit (Qiagen, catalog # 28104).

El ADN purificado debe analizarse en una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la recuperación de ADN. Se debe correr un gel de agarosa tal como se describió en el protocolo para Electroforesis en Gel de Agarosa. Mezcle 2µl de producto de PCR purificado con 2 µl de colorante de carga, luego coloque esta mezcla en un pozo libre.

Después de la electroforesis las bandas deben ser fácilmente visibles. Si las bandas son tenues, la cantidad de templado para la secuenciación puede ser aumentada. Bandas muy tenues indican una cantidad insuficiente para secuenciación.

#### **Ejemplo de gel con productos de PCR purificados. Figura N° 23.**

Las bandas en las calles 4, 5 y 6 muestran cantidades suficientes para hacer la secuenciación de ADN.



**Carril 1: Marcador de peso molecular**  
**Carriles 2-6: productos de PCR purificados**

**Figura N° 23. Ejemplo de plantilla de gel con productos de PCR purificados. Foto: CDC.**

Las bandas en los carriles 4, 5 y 6 muestran cantidades suficientes para hacer la reacción de secuenciación de ADN. Imagen: CDC Protocols.

### **3.15 Protocolo de secuenciación para la genotipificación de rubéola.**

#### **Propósito.**

El siguiente protocolo se ha sido utilizado para secuenciar los 739 nucleótidos que codifican para la región E1 utilizando fragmentos de ADN generados de la reacción de genotipificación por RT-PCR. Los cebadores son suministrados en el equipo de genotipificación de RUB utilizado para secuenciar. Este protocolo describe la secuencia de reacciones, la limpieza de las reacciones de secuenciación y control de calidad de los cromatogramas. Para el análisis de los cromatogramas, se recomienda ver el protocolo de Análisis de Secuencia para la Genotipificación de RUB.

#### **Nota importante.**

Este protocolo ha sido desarrollado para el Analizador Genético ABI Prism 3100. El uso de otros instrumentos de secuenciación puede requerir cambios significativos en el protocolo.

#### **Reactivos y materiales.**

- Guantes.

- Batas desechables.
- Tubos estériles para micro centrifuga de 1.5 ml.
- Tubos de PCR de 0.2 ml de pared delgada autoclavables.
- BigDye Terminator V1.1 (ABI part No.4336774).
- Cebadores para secuenciar, diluidos a 3.2 (del equipo de genotipificación del CDC).
- Agua libre de nucleasa (NF).
- Buffer de secuencia de reacción 5X suministrada en el equipo de BigDye versión 1.1.
- Placas de 96 pozos para el termociclador (Placas de reacción ópticas de 96 pozos AB MicroAmp N-0801-0561).
- Tapas de 96 pozos (AB 4319533).

#### **Equipo requerido.**

- Congeladores a -70°C y -20°C.
- Analizador Genético ABI Prism 3100.
- Recipiente con hielo.
- Soporte frío para placa de 96 pozos.
- Micro centrifuga con rotor para tubos de 1.5ml y 0.2ml.
- Micro pipetas y puntas para pipetas estériles con filtros resistentes a aerosoles.
- Vórtex.
- Termociclador (ABI Gene Amp PCR System 9700).

#### **Preparación de las soluciones de trabajo para los cebadores.**

Los cebadores son suministrados en stocks concentrados de 200 uM en los equipos de Genotipificación para rubéola. Información adicional sobre los cebadores se pueden encontrar en el inserto del equipo. Es necesario preparar una solución de trabajo de cada cebador antes de hacer una reacción de secuenciación.

En la reacción de secuenciación los cebadores se utilizan a una concentración de 3.2 uM. No se debe utilizar 20 uM de la solución de trabajo para las reacciones de secuenciación. Guarde los cebadores diluidos a -20°C.

RV8633: Mezclar 1.6 ul de solución stock con 98.4 ul de agua libre de nucleasas. Vórtex. RV9112: Mezclar 1.6 ul de solución stock con 98.4 ul de agua libre de nucleasas. Vórtex.

RV8945: Mezclar 1.6 ul de solución stock con 98.4 ul de agua libre de nucleasas. Vórtex. RV9577: Mezclar 1.6 ul de solución stock con 98.4 ul de agua libre de nucleasas. Vórtex.

#### **Concentración de los templados.**

Generalmente se utiliza 1 ul del producto de PCR purificado. El templado del gel debe correrse después de verificar su pureza y después de haber limpiado el producto de PCR. Si la banda del templado es difícil de observar, la cantidad de templado en la reacción de la secuencia puede incrementarse a 5 ul. El volumen total de la secuencia de reacción es de 20 ul. Adicione diferentes volúmenes de los templados y ajusta adicionando agua libre de nucleasas hasta obtener un volumen de 20 ul.

#### **Preparaciones para el ensayo.**

- Descongelar el buffer de la secuencia de reacción 5X y los cebadores y agitar suavemente. Descongelar el Big Dye Terminator en hielo, agitar invirtiendo el tubo.
- Dar un spin a todos los reactivos en una micro centrifuga colocar en hielo hasta que se dispense.
- Descongelar los templados y mantener en hielo durante el ensayo.

## **Procedimiento del ensayo.**

1. Si inicia la secuencia para una muestra, no es necesario preparar un master mix. Utilice 4 tubos de PCR de pared delgada de 0.2 ml. A cada tubo adicionar 12 ul de agua NF, 2 ul de buffer de secuencia de reacción 5X y 4 ul de Big Dye, Adicionar en cada tubo 1 ul de los 4 cebadores. En los tubos que contienen los cebadores RV8633 y RV9112 adicionar 1 ul del templado purificado del fragmento 1, en el tubo que contiene los cebadores RV8945 y RV9577, adicionar 1 ul del templado purificado del fragmento 2. Continuar con el paso 9 descrito más adelante. Si más de una muestra es secuenciada seguir los pasos para la preparación del master mix. Determinar el número de reacciones (n) basándose en el número de templados que van hacer secuenciados utilizando la hoja de Excel para el Master Mix de Secuencia, cada templado se secuencia con el primer sentido y antisentido. Las secuencias se realizan por duplicado, con 2 reacciones sentido y 2 reacciones antisentido resultando 4 reacciones de secuencia por cada templado. Preparar volúmenes de reacción en exceso (n+1) por cada master mix por los errores de pipeteo permitidos.
2. Ejemplo: Si se tienen 4 templados hacer un Master Mix para 9 reacciones para cada cebador de RUB.
3. Determinar el número de muestras en la hoja de Excel para el Master Mix de Secuencia, para determinar el volumen de cada reactivo que se va a adicionar.
4. Etiquetar los tubos para PCR de 0.2mL de pared delgada autoclavables y colocar la placa de 96 pozos en hielo. Se requieren de 4 tubos por cada templado.
5. Adicionar los primeros 3 reactivos (agua, buffer y Big Dye) dentro de los 4 tubos para micro centrifuga de 1.5ml fríos.
6. Adicionar los 4 cebadores RUB, uno en cada tubo que contiene el master mix, mezclar, agitar suavemente y colocar en hielo.
7. Dispensar 19 ul del master mix en tubos de 0.2 ml apropiados. Transportar los tubos de reacción en una gradilla de metal congelada después de dispensar el master mix.
8. Adicionar 1 ul del templado del fragmento 1 en el tubo que contiene los cebadores RV8633 y RV9112 y 1 ul del templado del fragmento 2 que contiene los cebadores RV8945 y RV9577.
9. Cerrar los tubos, mezclar y dar un spin.
10. Iniciar el programa adecuado en el termociclador y dejar que el bloque alcance una temperatura a 90°C. Pause la corrida
11. Adicionar los tubos en el termociclador y continuar la corrida.
12. Después de completarse el programa proceder a limpiar. Alternativamente las reacciones pueden ser almacenadas a 4°C en la oscuridad

## **Parámetros de Ciclaje.**

### **25 ciclos:**

96°C por 30 segundos

50°C por 15 segundos

60°C por 4 minutos

Final: mantener a 4°C

### **Limpieza de las reacciones de secuenciación.**

Los productos de las secuencias de reacción deben ser purificados antes de ser cargados en el Analizador Genético ABI Prism 3100, La purificación elimina el exceso de nucleótidos, cebadores y enzimas. Se recomienda el uso del equipo comercial de precipitación con etanol que otros métodos, porque la concentración de ADN que se recupera es mayor y es reproducible utilizando este equipo. Se pueden obtener buenos resultados con los siguientes equipos.

- CleanSeq Kit (Agencourt, catálogo # A29150).
- CentriSep Dye Terminator Removal (Princeton Separation, catalogo # CS-900).

Otros equipos son aceptables si se producen los productos de PCR purificados adecuados para la secuenciación. Por favor, consulte el manual del equipo disponible para obtener instrucciones.

*Importante:* Para colocar las muestras en el Analizador Genético Abi Prism 3100, los productos de reacción deben purificarse en las placas de reacción óptica MicroAmp de 96 pozos y cubrir con su tapa. Es posible llevar a cabo la secuenciación en el termociclador MicroAmp para placas de 96 pozos. Alternativamente, las muestras pueden ser transferidas antes o después de la limpieza, dependiendo del equipo de limpieza que esté utilizando.

### **Uso del equipo secuenciador.**

Para ello se requiere entrar en contacto con la persona responsable de secuenciación en su institución para solicitar turno y discutir los detalles del procedimiento.

*Importante:* Recuerde guardar copias de seguridad de los cromatogramas.

### **Control de Calidad.**

Para determinar el control de calidad, los cromatogramas deben ser importados en el programa de Análisis de Secuencias incluido en el paquete programas ABI.

Este programa muestra el control de calidad de cada base de forma individual y se colorea por encima de la secuencia de nucleótidos (ver figura N° 24), Las barras azules indican que la base es de calidad aceptable, mientras que las barras amarillas o rojas indican que no son de calidad aceptable. Hay secuencias sentido y antisentido por cada templado. Ambas secuencias deben ser de calidad aceptable en la posición de cada nucleótido en la ventana de secuencia. Para más detalles, favor de leer el archivo de ayuda del Programa de Análisis de Secuencias.

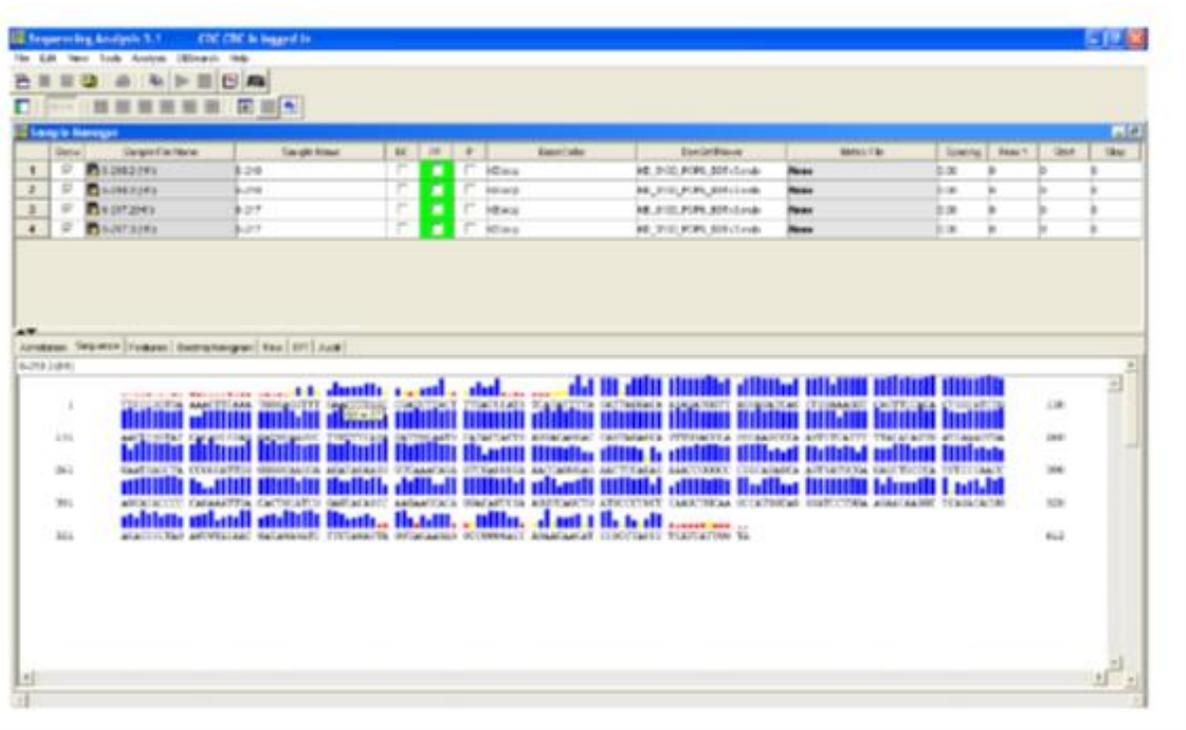


Figura N° 24. Imagen de un análisis de calidad de un archivo de secuencias ABI utilizando el Programa de Análisis de Secuencias.

### 3.16 Análisis de secuencias para la genotipificación de rubéola.

#### Propósito.

El siguiente protocolo se utiliza para el análisis de los cromatogramas que determinan el genotipo de la muestra que se secuenció. Los cromatogramas se generan mediante la secuenciación de los productos de PCR (ver protocolo de secuenciación para la genotipificación de RUB).

**Importante:** Este protocolo está basado en un software libre que se puede descargar desde Internet.

#### Equipo requerido.

- Computadora.
- Software Mega Versión 5.05. [39] Este programa gratuito puede utilizarse para ver y editar archivos del cromatograma, crear una secuencia final, crear un alineación con las secuencias de referencia y determinar el genotipo por análisis filogenético.
- Microsoft Office PowerPoint.
- El archivo de texto con las 32 secuencias actualizadas de referencia contra la rubéola. (este archivo puede ser solicitado por e-mail a Emily Abernathy (efa9@cdc.gov)).

#### Organización de archivos.

- Antes de comenzar el análisis de la secuencia, debe crear una carpeta en el escritorio. Copie los archivos de cromatograma (.abi) en una carpeta y copie el archivo con las 32 cepas de referencia de la OMS.
- A medida que avance con el análisis, escribir los archivos de salida en esta carpeta para encontrar todo fácilmente.
- Modificar o editar una plantilla a la vez.

## **Importación de archivos de cromatogramas (archivos .abi desde el secuenciador).**

1. Abra el programa de MEGA.
2. Haga clic en Align. A continuación, seleccione Edit/Build Alignment.
3. Elige create a new alignment, a continuación, haga clic en Ok.
4. Haga clic en el DNA para ¿Are you building a DNA or Protein sequence? Se abrirá una ventana para la alineación.
5. Vaya a Edit, elija Insert Sequence from File (o haga clic en el icono de "insert sequence").
6. Vaya a la carpeta que contiene las secuencias .abi y haga clic en el fragmento 1 cebador sentido archivo .abi. Haga clic en File Name para seleccionar la secuencia.
7. Utilizar este procedimiento para insertar los archivos de Fragmento 1 (cebadores 8633 y 9112).

## **Edición de secuencias para Fragmento 1.**

La secuencia derivada del cebador antisentido debe ser complementado inversamente para alinearse con la secuencia sentido. Las secuencias sentido y antisentido deben estar alineados.

Ambos extremos de las secuencias debe ser recortada para obtener una secuencia de 350 nt. El objetivo de la alineación es tener una secuencia que cubra la ventana 350 nucleótidos en el que todos los nucleótidos coinciden.

1. El primer complementario antisentido RV9112 es la secuencia invertida. Haga clic a la izquierda para elegir Sequence Name, y luego ir a los Data> Reverse Complement.
2. Para alinear las 2 secuencias, seleccione haciendo clic en el nombre de la secuencia de ambos cebadores mientras mantiene la tecla Shift. Ir a Alignment>Align by Clustal W. Se abrirá una ventana. Haga clic en Ok.
3. Para encontrar el inicio del fragmento 1 de la secuencia de rubéola ir a Search>Find Motif.
4. Escriba GTTYCAYAC (GTT es el trinucleótido de inicio para genotipificar una ventana a partir de 739-nt, Y puede ser una T o una C). Haga clic en Ok.
5. La secuencia de consulta resaltará en color amarillo. Utilice el mouse para seleccionar los nucleótidos al inicio de la secuencia, para ambas secuencias la G en el GTT (alternativamente, resalte el primer nucleótido, mantenga pulsada la tecla Shift y haga clic en el anterior nucleótido de GTT. Esto le permitirá poner en relieve la región que debe cortarse). Haga clic en X para eliminar los nucleótidos seleccionados.

Los primeros 3 nucleótidos debe ser ahora GTT para ambas secuencias.

6. La secuencia para este fragmento debe ser 350-nt de longitud. Busque en el botón de la ventana donde dice Site # y escriba "350" y luego presione la tecla Enter. Nucleótido 350 se destaca en blanco en el centro de la ventana. Haga clic en la barra de color gris por encima de los nucleótidos para verificar el nucleótido #.
7. Recortar las secuencias a la longitud adecuada, haga clic en el nt 351 para las dos secuencias. Desplácese hasta el final. Manteniendo pulsada la tecla Shift, haga clic en la última nt. Las nts que se corta, para ambas secuencias ahora debe marcarse de color azul. Haga clic en la X para eliminar los nucleótidos seleccionados. Los últimos 6-nt del Fragmento 1 ahora deben ser AGGTGT.
8. La ventana de alineación ahora debe mostrar ahora 2 secuencias, de 350-nt de longitud. Si no hay errores o artefactos, las secuencias deben ser idénticas. Utilice la barra para deslizarse sobre

la pantalla a través de las secuencias señalando las posiciones donde 2 nucleótidos no son idénticos.

Observar la barra de color gris por encima de los nucleótidos. Habrá un asterisco en cada residuo si hay similitud entre los nucleótidos de las 2 secuencias.

9. Compruebe que ambas secuencias se inicien y terminen con los nucleótidos correctos (errores, tales como inserciones o deleciones en una de las secuencias pueden afectar la longitud del fragmento).

### **Resolver los desajustes.**

Si hay discrepancias, observar los cromatogramas para resolver el problema:

1. Para abrir los cromatogramas, vaya a Sequencer>Edit Sequence File. Vaya a la carpeta con los archivos. abi, seleccionar y abrir el archivo correspondiente. abi.
2. El pico de altura se puede ajustar con las barras de desplazamiento a la derecha del cromatograma.
3. Si está viendo un cromatograma de uno de los cebadores antisentido, es necesario invertirlo para completar el cromatograma. Elija Edit>Reverse Complement para cada primer antisentido.
4. Advertencia: El número de nucleótidos en el cromatograma no corresponden a los números en la ventana de alineación debido a las secuencias en la ventana de alineación tiende a ser recortada. Para localizar el desajuste en el cromatograma, elija la ventana de alineación. Resalte 8-10 nucleótidos antes del desajuste y haga right-click para copiar la secuencia. Cambie al cromatograma, haga clic en "find motif" y haga right-click para pegar la secuencia copiada. Comparar la secuencia que precede al área resaltada para asegurarse de que se han alineado en la posición correcta.
5. Comparar la posición de desajuste respecto a las 2 secuencias. Si al menos una secuencia tiene un máximo pico de calidad, usted puede editar la otra secuencia. No cambie el cromatograma. Si usted observa que es necesario hacer cambios, regrese a la ventana de alineación y haga la corrección.
6. En Edit asegúrese de allow base editing está marcada. Puede hacer clic después de un nucleótido y con backspace para borrar, a continuación, escriba en la posición correcta de nucleótidos.
7. Después de corregir todos los desajustes de nucleótidos, seleccionar una de las secuencias que utilizará para su posterior análisis y borre las otras tres secuencias utilizando Edit > Cut. Esto deja una sola secuencia para la muestra.
8. Ir a Data>Export Alignment y guarde la secuencia como un archivo. fas (FASTA) (por ejemplo, "nombre del virus \_frag1.fas"). Este fragmento debe ser exactamente 350 nt de longitud. El archivo .fas se puede abrir con el editor de texto de Microsoft, si usted necesita verificarlo.

### **Edición de secuencias para Fragmento 2.**

El proceso anterior debe repetirse con el fragmento 2 para completar la ventana 739 nt.

1. Abra una ventana nueva alineación, a continuación, busque y seleccione el fragmento 2 para los cebadores RV8945y la RV9577.
2. Invierta la secuencia complementaria del primer antisentido RV9577. Haga clic en Sequence Name en la izquierda para elegir una secuencia, y luego ir a Data>Reverse Complement.
3. Para alinear las 2 secuencias, seleccione haciendo clic en el nombre de la secuencia de los dos cebadores mientras mantiene la tecla Shift. Ir a Alignment >Align by Clustal W. Se abrirá una ventana. Haga clic en Ok.

4. Para encontrar el inicio del fragmento 1 de la secuencia de RUB ir a Search > Find Motif.  
Escriba GGGTSACSCC donde S puede ser una C o G. Este será el inicio del fragmento 2. Haga clic en Ok.
5. La secuencia de la consulta se resaltará en amarillo. Usa el mouse para seleccionar los Nucleótidos al inicio de la secuencia de las dos secuencias a la G de la GGG(O bien, poner de relieve el primer nucleótido, mantenga pulsada la tecla Shift y haga clic en el nucleótido antes de GGG. Esto le permitirá poner de relieve la región a cortar. Haga clic en la X para eliminar los nucleótidos seleccionados.
6. Los primeros 3 nucleótidos ahora deben ser GGG para ambas secuencias.
7. La secuencia para este fragmento debe ser 350-nt de longitud. Busque en el botón de la ventana donde dice Site # y escriba "350" y luego presione la tecla Enter. Nucleótido 350 se destaca en blanco en el centro de la ventana. Haga clic en la barra de color gris por encima de los nucleótidos para verificar el nucleótido #.
8. Para recortar las secuencias a la longitud adecuada, haga clic en el nt 390 para ambas secuencias. Desplácese hasta el final. Manteniendo pulsada la tecla Shift, haga clic en el último nt. Corte los nts, tanto para secuencias ahora debe ser de color azul. Haga clic en la X para eliminar los nucleótidos seleccionados. Los últimos 6 nts deben ser ahora GGGYGAG donde Y puede ser un C o T.
9. La ventana de alineación ahora debe mostrar las 2 secuencias, de 389 nt de longitud. Si no hay errores o artefactos, las secuencias deben ser idénticas. Utilice la barra para deslizarse la pantalla a través de las secuencias señalando las posiciones donde 2 nucleótidos no son idénticos.  
  
Observar la barra de color gris por encima de los nucleótidos. Habrá un asterisco en cada residuo si hay similitud entre los nucleótidos de las 2 secuencias.
10. Compruebe que las dos secuencias se inician y terminan con los nucleótidos correctos.
11. Resolver todas las discrepancias como se hace para el fragmento 1. Cortar una de las secuencias como ya sucedió fragmento 1. Ir a Data>Export Alignment y guardar la secuencia como un archivo de Fasta (nombre del virus \_frag2.fas).

### **Combinación de los 2 fragmentos para una ventana total de 739 nt.**

1. Ahora debe haber una secuencia para los dos fragmentos en la ventana de alineación. Haga clic en Insert. Vaya a la carpeta que contiene el fragmento 1 .fas hecho anteriormente; seleccione el archivo. fas para el fragmento 1 y abrirlo.
2. Haga clic en el primer nucleótido de la secuencia del fragmento 2. Ir hasta el final de la
3. secuencia del fragmento 2, mantenga pulsada la tecla Shift y hacer clic en el último nucleótido de la secuencia del fragmento 2.Vaya a Edit > Copy.
4. Haga clic en el espacio después del último nucleótido de la secuencia del fragmento 1. Vaya a Edit >Paste.
5. La secuencia completa de nucleótidos debe ser 739 de largo. Ir hasta el final de ambos fragmentos para comprobar que la longitud es adecuada.
6. Seleccione la secuencia del fragmento 2 y bórralo, dejando una sola secuencia completa en la ventana.
7. Cambiar el nombre de la secuencia con un doble clic en el cuadro nombre de la secuencia (el nombre del virus\_739).
8. Exportación de la secuencia de 739 como un archivo. fas (nombre del virus\_739.fas).

De esta manera se obtuvo la secuencia de cada cepa positiva para RUB y están listas para ser alineadas con las 32 cepas de referencia que recomienda la OMS y clasificar a nuestros casos aislados por genotipo según resulte la cercanía con las cepas de referencia.

### **Metodología para el alineamiento de las secuencias.**

#### **Alineación de las secuencias de muestras con secuencias de referencia y análisis filogenético.**

1. Si la secuencia completa del 739 no está en la ventana de alineación, busque el archivo y ábralo. Si más de un producto de PCR fue secuenciado, todas las secuencias editadas pueden ser importados para ser analizadas en un árbol. Alternativamente, cada muestra se puede analizar en un árbol independiente.
2. Ir a Import Sequence y busque el archivo que contiene las 32 secuencias de referencia de la OMS contra la RUB en FASTA. Resaltar e importar. Compruebe la alineación con cuidado para asegurarse de que la nueva secuencia se alinea con las secuencias de referencia. Si hay un problema con la alineación, verifique los cromatogramas de nuevo.
3. Ir a Data>Phylogenetic Analysis. Cuando se preguntó si la secuencia es protein-coding
4. nucleotide data, haga clic en Yes.
5. La ventana de alineación puede ser minimizada (si desea guardar el archivo de la alineación, elija Export>Fasta Format or MEGA format).
6. Haga clic en la ventana de MEGA 5.05. Los arboles square se muestran en la ventana, una etiqueta de TA, una etiqueta de Close Data y una serie de líneas (representa el archivo de alineación). Al hacer clic sobre el TA muestra los datos exportados, que muestran las posiciones variables de nucleótidos. Minimizar esta ventana.
7. Continúe con el análisis filogenético. Elija: Phylogeny>Construct Test /Neighbor Joining Tree (s). Usar la configuración predeterminada. Haga clic en Compute. Una nueva ventana se abrirá mostrando el árbol.

#### ***Impresión de un árbol filogenético.***

En la ventana de árbol, vaya a File>Print in a Sheet en las 3 ventanas haga clic en Caption. Aparecerá una ventana con una leyenda de la figura. Para las referencias y publicación se abrirá. Usted puede utilizar esta información para las publicaciones y sus registros. Para imprimir la leyenda, haga clic ir al icono de impresión.

#### ***Guardar un árbol filogenético en PowerPoint.***

En la ventana de árbol, seleccione Image, luego Copy to Clipboard, luego Paste en PowerPoint. En PowerPoint, seleccione el árbol y luego usar el comando Ungroup dos veces para generar un árbol que se puede editar. Las etiquetas de los diferentes taxa se pueden editar. Después de importar el árbol en Powerpoint, cerrar la ventana. Haga clic en Ok para descartar los resultados.

#### ***Interpretación de un árbol filogenético.***

Las líneas horizontales representan las diferencias de nucleótidos entre las cepas como se indica por la escala en la parte inferior del árbol. Las diferencias entre las dos cepas se puede calcular mediante la suma de la longitud de las barras horizontales que los conectan. Las barras verticales se agregan por el programa para facilitar la visualización, pero no indican diferencias en los nucleótidos. Los nodos muestran que los diferentes genotipos se ramifican. Si una secuencia desconocida fuera del nodo mismo es una cepa de referencia, que pertenece al mismo genotipo. Debido a que varias cepas de referencia fueron aisladas desde hace muchos años, las cepas más recientes del mismo genotipo pueden mostrar una considerable variación en la secuencia. Compruebe siempre que la topología del

árbol esté intacta. Por ejemplo, las secuencias de genotipo 2B deben ramificar en el mismo nodo central.

### **Análisis filogenético preliminar utilizando el programa BLAST.**

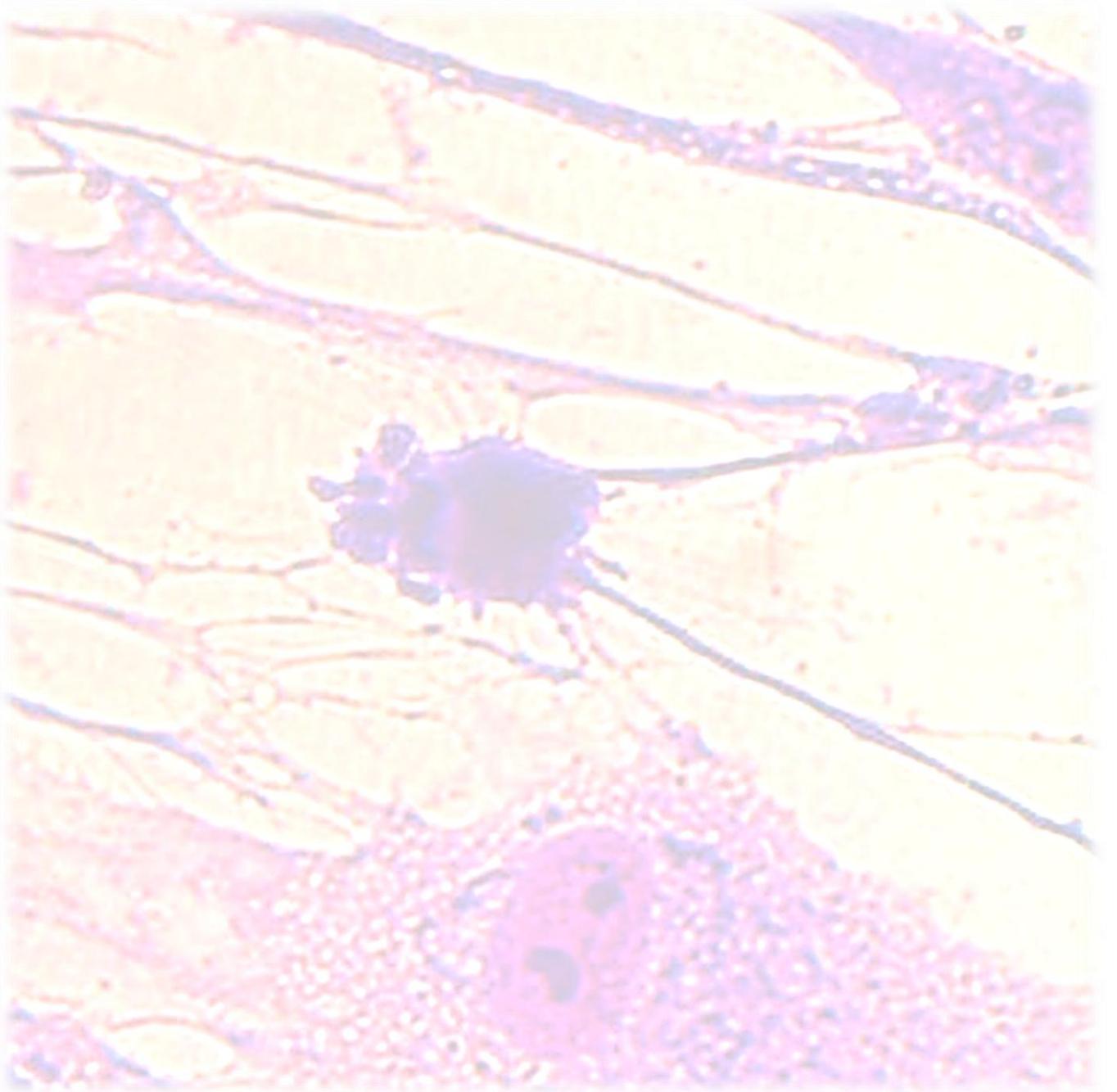
El objetivo de una búsqueda BLAST es encontrar secuencias en el GenBank, que están estrechamente relacionados con las secuencias de la muestra. Esto puede proporcionar información adicional más allá de lo que se obtiene comparando una secuencia desconocida con secuencias de virus de referencia. Por ejemplo, si la nueva secuencia es idéntica a una secuencia de virus de la rubéola que ha sido recientemente depositada en GenBank, una búsqueda de BLAST, la encontrará. Sin embargo, el conjunto de secuencias de virus de rubéola en GenBank es actualmente mucho menos robusto que el conjunto de secuencias del virus de sarampión depositadas allí. Por ejemplo, hay secuencias de virus de la rubéola en el GenBank, que contienen errores o se ha asignado mal el genotipo, por lo tanto los resultados de BLAST deben ser interpretados con precaución.

### **Con el fin de llevar a cabo una búsqueda BLAST, su computadora debe tener acceso a Internet.**

1. Abra un navegador de Internet y escriba la dirección [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).
2. Abra el archivo .fas de la nueva secuencia y copie la secuencia utilizando el editor de texto de Microsoft, seleccione la única secuencia y copie.
3. En la página web de BLAST, pegue la secuencia en el campo Enter accession numbers.
4. Seleccione Nucleotide Blast.
5. En la base de datos, haga clic en Others y elegir The Nucleotide Collection (nr/nt), que incluye secuencias de sarampión.
6. En la parte inferior de la página, haga clic en "BLAST". Después de una breve espera, la página de resultados aparecerá.
7. Desplácese hacia abajo hasta la tabla. Observe las columnas Query Coverage y Max Identity. La Query Coverage debe ser de 100%, indicando que las secuencias recuperadas cubren toda la ventana de secuenciación de 450 nucleótidos. La Max identity debe ser lo más cercano al 100% como sea posible.
8. Observe la columna Description. No todas las descripciones que incluyen un genotipo, pero los que sí debe mostrar el mismo genotipo que ha identificado en su análisis filogenético. Las secuencias estrechamente más relacionadas se mostrarán en la parte superior.
9. Se puede verificar si hay diferencias entre el número de nucleótidos de la secuencia de consulta y las secuencias recuperadas. Haga clic en el botón cuadrado en la parte superior de cada comparación para seleccionar la secuencia recuperada para su posterior análisis.
10. Haga clic en Get Selected Sequences en la parte superior de la comparación de secuencias en primer lugar. Las secuencias a continuación se enlistan.
11. Haga clic en Display Settings en la parte superior izquierda y seleccione FASTA (txt) y haga clic en Apply. El archivo FASTA se muestra en la pantalla.
12. En el escritorio, abra el editor de texto de Microsoft. Copie el archivo FASTA del sitio web de BLAST y péguelo en el archivo de texto abierto. Guarde el archivo con la extensión .fas.
13. Este archivo puede ser editado para agregar más secuencias o cambiar los nombres de la secuencia. El archivo también se puede importarse al editor de la alineación en MEGA para generar un árbol filogenético como se describió anteriormente.

NOTA: Los protocolos aquí descritos han sido adaptados de Protocolos del CDC para la epidemiología molecular de los virus de sarampión y rubéola; versión 03/02/2012. [40]

# 4 Resultados



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de la muestra

(n= 481)

PERIODO DE ESTUDIO: AÑOS 2003 a 2012

**Tabla N° 1. Distribución de pacientes para estudio de EFE y SRC por Institución de Salud**

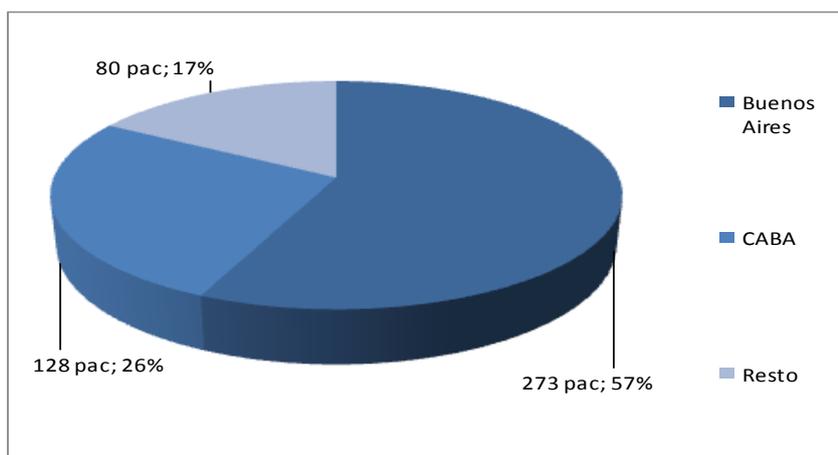
Instituciones	Ciudad/ Provincia	N° Pacientes	Pacientes (%)
CENAGEM	CABA/CABA	44	9
H. N. LOPEZ	LANÚS/B. AIRES	38	8
H DE NIÑOS SAN JUSTO	MATANZA/B. AIRES	30	6
SARDA	CABA/CABA	24	5
H. EVITA	LANÚS/B. AIRES	18	4
H. GANDULFO	L. ZAMORA/B. AIRES	16	4
H. RIVADAVIA	CABA/CABA	14	3
M. STA ROSA	V. LÓPEZ/B. AIRES	14	3
H. FIORITO	AVELLANEDA/B. AIRES	12	2
H. CURA	OLAVARRIA/B. AIRES	11	2
EPI. LA PAMPA	STA. ROSA/LA PAMPA	10	2
H. ARGERICH	CABA/CABA	10	2
OTRAS INSTITUCIONES *	TODO EL PAIS	240	50
<b>TOTAL</b>		<b>481</b>	<b>100</b>

**Mediana:** 2 pacientes/Institución. \* Incluye 100 instituciones que aportaron de menos de 8 pacientes cada una al estudio y de ellas 67 instituciones aportaron menos de 3 pacientes.

**Tabla N° 2. Distribución de pacientes para estudio de EFE y SRC por distritos o localidades.**

Distritos	Provincias	N° Pacientes	% Pacientes
CABA	CABA	128	26
LANUS	BUENOS AIRES	57	12
LA MATANZA	BUENOS AIRES	32	7
AVELLANEDA	BUENOS AIRES	20	5
L.ZAMORA	BUENOS AIRES	18	3
Otros distritos de Buenos Aires	BUENOS AIRES	146	30
Otros *	TODO EL PAIS	80	17
<b>TOTAL</b>		<b>481</b>	<b>100</b>

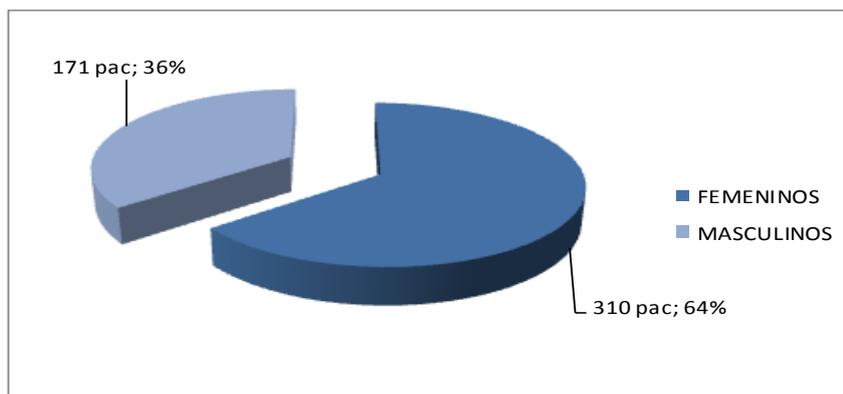
**Mediana:** 2 pacientes/distrito. \* Incluye 67 distritos que aportaron menos de 16 pacientes al estudio, de los cuales 37 aportaron menos de 3 pacientes.



**Gráfico N° 1 Distribución de pacientes por provincias estudiados para EFE y SRC. (n= 481)**

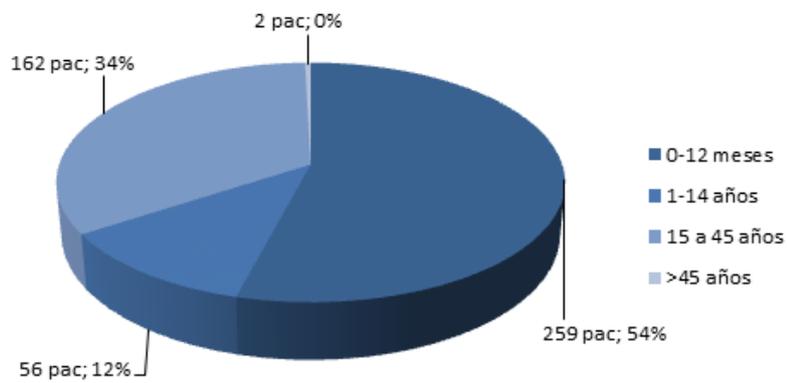
Pac: Pacientes

**Mediana:** 3 pacientes/provincia. \* Incluye 19 provincias que aportaron al estudio menos de 13 pacientes cada una y de ellas 11 aportaron menos de 4 pacientes cada una.



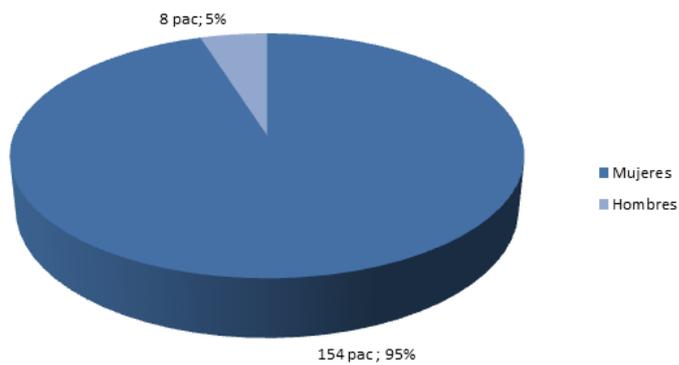
**Gráfico N° 2 . Distribución de la muestra según sexo de pacientes para estudio de EFE y SRC (n= 481)**

Pac: Pacientes



**Gráfico N° 3 . Distribución etaria de la muestra para estudio de EFE y SRC (n= 481)**

Pac: Pacientes



**Gráfico N° 4 Distribución por sexo de los pacientes de 15 a 45 años de edad para estudio de EFE y SRC (n= 162)**

Pac: Pacientes

**Tabla N° 3. Distribución etaria de Mujeres en edad fértil para estudio de EFE.**

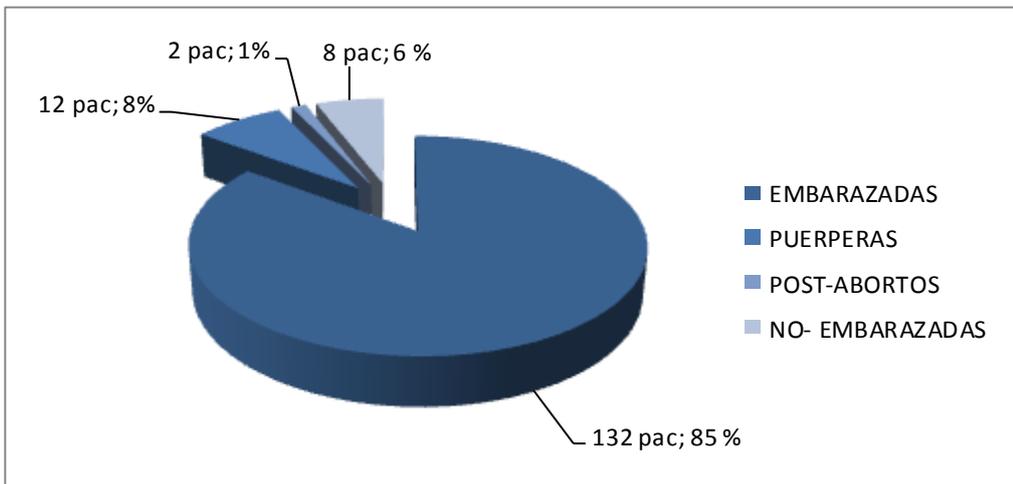
n= 154 Rango: 14 – 45 años

Rangos de edades	Nº Mujeres	% mujeres
15	1	1
15-19	30	19
20-24	42	27
25-29	31	20
30-34	28	18
35-39	18	12

40-44	3	2
45-49	1	1
<b>Totales</b>	<b>154</b>	<b>100</b>

**Media:** 26,2 años.

**Mediana:** 26 años.



**Gráfico N° 5 Distribución de Mujeres en edad fértil según estados fisiológicos especiales (embarazo). (n=154)**

Pac: pacientes.

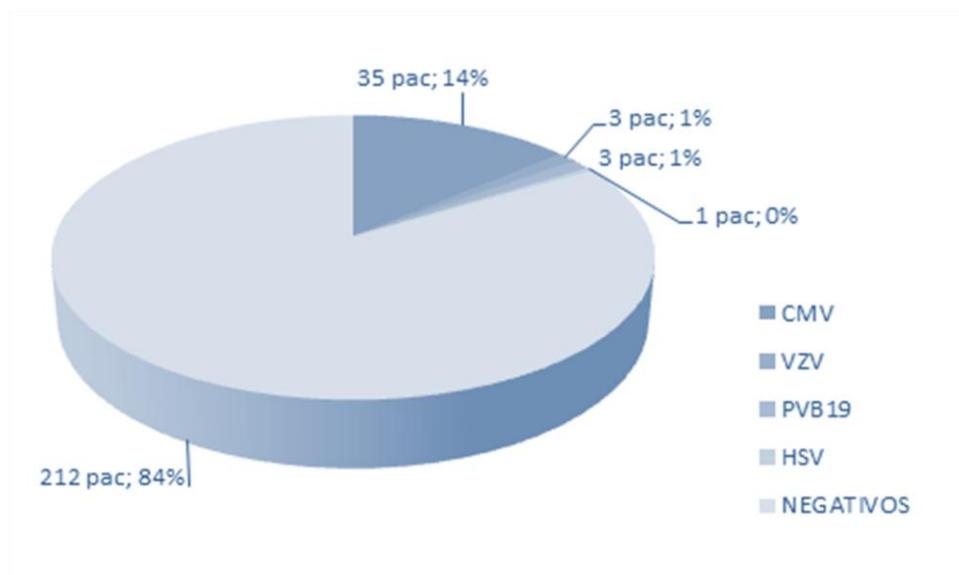
## 4.2 Resultados de los diferentes ensayos para diagnóstico de infección por virus RUB.

### A. Infantes y neonatos (0 a 12 meses).

**Tabla N° 4. Resultados de las pruebas diagnósticas para Rub en Infantes y neonatos (0 a 12 meses).**  
n=259

Pacientes	IgM	RT-PCR O	RT-PCR HNF
<b>Positivos</b>	5	4	4
<b>Negativos</b>	254	61	61
<b>Totales</b>	<b>259</b>	<b>65</b>	<b>65</b>

RT-PCR O: Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcripción en orina; RT-PCR H: Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcripción en hisopado nasofaríngeo



**Gráfico N° 6 Diagnóstico diferencial en infantes (0 a 12 meses) que presentaron diagnósticos negativos para RUB.**  
(n=254)

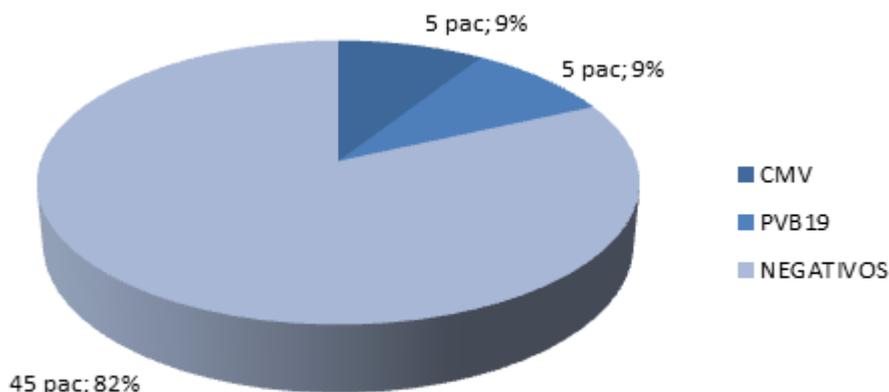
Pac: pacientes; CMV: Citomegalovirus; VZV: Varicela Zoster Virus; PVB19: Parvovirus B-19; HSV: Herpes virus; Negativos: con resultado negativos para rubéola sin diagnóstico diferencial.

### B. Niños (1 a 14 años)

**Tabla N° 5. Resultados de las pruebas diagnósticas para Rub en Niños (1 a 14 años).**  
n= 56

Pacientes	IgM	RT-PCR O	RT-PCR HNF
<b>Positivos</b>	1	0	1
<b>Negativos</b>	55	19	12
<b>Totales</b>	<b>56</b>	<b>19</b>	<b>13</b>

RT-PCR O: Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcripción en orina; RT-PCR H: Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcripción en hisopado nasofaríngeo.



**Gráfico N° 7 Diagnóstico diferencial en Niños (1 a 14 años) que presentaron diagnósticos negativos. (n= 55)**

CMV: Citomegalovirus; PVB19: Parvovirus B-19; Negativos: con resultado negativos para rubéola sin diagnóstico diferencial.

### C. Embarazadas

#### Resultados de las pruebas diagnósticas para RUB en embarazadas.

De las 154 mujeres en edad fértil (gráfico N° 4) se seleccionaron para su estudio aquellas con embarazo en curso (n= 132).

En 10 pacientes los médicos no solicitaron test de IgM por tratarse de controles de embarazo y el interés era evaluar estado inmunológico. En todos los casos la IgG para RUB dio positiva indicando que las pacientes presentaban protección inmunológica. (Pacientes inmunes) Estas pacientes se excluyeron del análisis posterior.

En el resto de las pacientes embarazadas (n= 122) se determinaron los niveles de anticuerpos IgM para evaluar posible reacción primaria por rubéola. (Ver tabla N° 6)

**Tabla N° 6. Resultados de las pruebas diagnósticas para Rub en pacientes embarazadas.**

n = 122

Pacientes	IgM
<b>Positivos</b>	9*
<b>Negativos</b>	108
<b>Indeterminados</b>	5**
<b>Totales</b>	<b>122</b>

\*Dos pacientes presentaron IgM + con IgG + de alta avidéz estimando que pueden tratarse de reinfecciones o resultados falsos positivos de IgM, además no se detectó ARN viral en muestras de orina y exudado nasofaríngeos, por lo cual no se los considera reacciones primarias a RUB.

\*\*Estos casos indeterminados se reclasificaron según su valor de avidéz (ver tabla N° 7)

**Tabla N° 7. Clasificación de casos con resultado de IgM indeterminadas mediante pruebas adicionales (Seroconversión y avidéz en 1° y 2° muestra serológica; RT-PCR en Orina e Hisopado de exudado nasofaríngeo).**

N° Caso	ID Pac/año	IgG	Avidéz 1°muestra%	Avidéz 2°muestra%	PCR O	PCR H	VAC	Interpretación de resultado
1	9534/06	P**	NR	NR	NR	NR	SI*	RP
2	10208/07	P	71,0	NR	NR	NR	SI*	I
3	10211/07	P	32,0	NR	NR	NR	SI*	RP
4	55/12	P	71,5	63,4	N	N	NO	I
5	38402/12	P	96,6	95,7	NR	NR	SI*	I

\*Vacunadas inadvertidamente durante el embarazo, sin presentación de síntomas; \*\*Paciente que duplica sus títulos en 2 muestras serológicas pareadas; RP: Reacción Primaria a RUB; I: Inmune a RUB; P: Positivo N: Negativo; NR: No realizado.

#### Valores e interpretación del test de Avidéz

Avidéz Baja (< 50 %) y se considera que la infección es reciente.

Avidéz Indeterminada (entre 50 y 60 %) No se puede asegurar que se trata de una infección primaria o pasada.

Avidéz Elevada (> 60 %) Se considera que se trata de una infección antigua, ya sea producto de una infección natural o de la vacunación.

**Tabla N° 8. Interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas adicionales para Rub en pacientes embarazadas. (Incluye aquellas con IgM indeterminadas)**

n = 122

Estado inmune	Pacientes	Avidéz Baja	Avidéz intermedia	Avidéz alta
<b>Infección aguda</b>	9	8*	1**	0
<b>Inmunoprottegidos</b>	113	0	1**	9
<b>Totales</b>	<b>122</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>9</b>

\*Estos casos se detallan en la Tabla N° 10 donde se puede observar que 7 casos son reacción primaria a la cepa vacunal y el caso N° 8 (ID 41402/12) presentó en 4 oportunidades resultados de IgM + con valores de baja avidéz (entre 40 y 50%), resultados de RT-PCR negativos para rubéola y diferenciales negativos para SAR, Parvo B19 y Dengue. El recién nacido de esta paciente presentó resultado de IgM Negativa y no presentó malformaciones propias de SRC.

\*\*Estos casos con valor de avidéz intermedio o indeterminado no se pudieron clasificar por falta de muestras alternativas para su estudio.

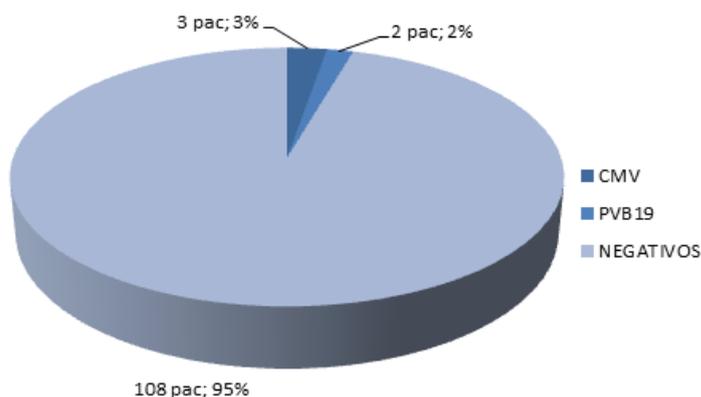


Gráfico N° 8 Diagnóstico diferencial en mujeres embarazadas que presentaron resultados negativos para RUB. n = 113

Pac: pacientes

### 4.3 Estudio de casos con diagnóstico positivo para RUB por subgrupos etarios y especiales (embarzadas).

#### A. Infantes y neonatos.

n =5

Rango de edades: 9 a 25 días Sexo: 3 mujeres y 2 varones

Todos los casos cumplen criterios clínicos compatibles con SRC.

Tabla N° 9. Casos de neonatos con diagnóstico positivo para RUB.

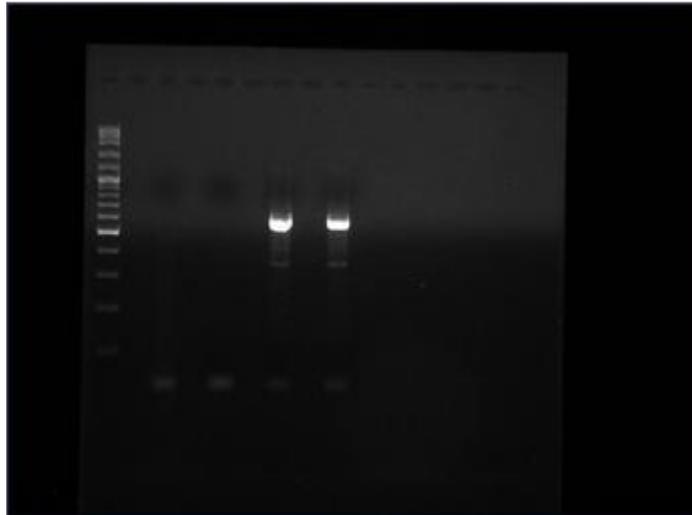
Caso	ID Pac/año	Procedencia	RT-PCR (orina)	RT-PCR (Nasof)	T. Cereb	T. Card	T. Oftalm	T. Transit
1	12135/03	BA	p*	p*			X	X
2	8410/06	MISIONES	NR	NR		X		X
3	21869/09	BA	N	p**	X	X		X
4	21887/09	CABA	p**	p**	X	X	X	X
5	22355/09	BA	p**	p**	X	X		X

X: Presencia de síntoma; BA: Buenos Aires; P: Positivo; N: Negativo NR: No realizado; T. Cereb: trastornos cerebrales; T. Card: trastornos cardíacos; T. Oftalm: Trastornos oftalmológicos; T. Transit: Trastornos transitorios.

\* Figura N° 25. Gel que revela la RT-PCR de orina e Hisopado nasofaríngeo del caso ID 12135.

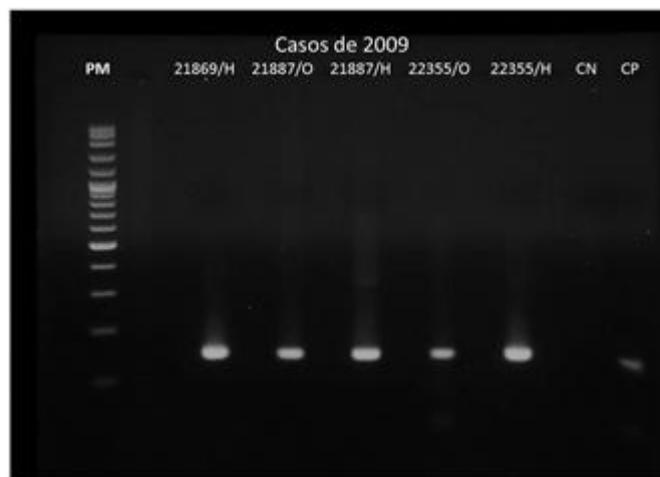
\*\* Figura N° 26. Gel que revela la RT-PCR de orina e Hisopado nasofaríngeo de los casos aislados en 2009.

Paciente ID 12135  
CN CN O HNF



**Figura N° 25. Gel que revela el resultado de RT-PCR de diagnóstico del paciente ID 12135.**

O: orina; H: Hisopado nasofaríngeo. Protocolo modificado que amplifica para un fragmento de 552 pb. Laboratorio de Virosis Congénitas y Perinatales



**Figura N° 26. Gel que revela el resultado de la RT-PCR para los casos aislados en 2009**

*El gel de agarosa revela los fragmentos amplificados de 143 pares de bases, mediante RT-PCR anidada para la región estable del gen que codifica para la glicoproteína E1 del virus de RUB. Se utilizó un marcador de pares de base (PM) de 100 pb y se observa amplificación en las muestras indicadas en la tabla N° 9. CN: Control negativo; CP: Control positivo; O: muestra de orina; H: Muestra de Hisopado de exudado nasofaríngeo.*

### **B. Niños de 1 a 14 años.**

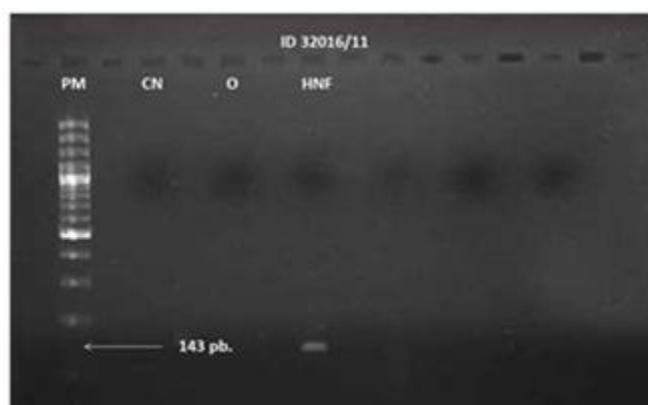
n =1 ID Paciente/año: 32016/11

Se le realizaron las siguientes determinaciones:

Anticuerpos IgM anti rubeola: Reactivo.

RT-PCR para rubéola en:

Orina: No detectable. Hisopado Nasofaríngeo: Detectable. (Figura N° 27)



**Figura N° 27. Gel que revela el resultado de la RT-PCR del caso ID 32016.**

El gel de agarosa revela el fragmento amplificado de 143 pares de bases, mediante RT-PCR anidada para la región estable del gen que codifica para la glicoproteína E1 del virus de RUB. Se utilizó un marcador de pares de base (PM) de 100 pb y se observa amplificación solo en la línea de corrida de la muestra correspondiente a hisopado de exudado nasofaríngeo (HNF). CN: Control negativo; O: muestra de orina.

### C. Embarazadas

n= 9 Rango de edades: 17 a 33 años

**Tabla N° 10. Casos de embarazadas con diagnóstico presunto positivo para RUB.**

N° Caso	ID Pac/año	Procedencia	Avidez	Vacunada	Interpretación	IgM neonato	Tipo de caso
1	118/06	BA	5,0	SI	Seroconversión	No reactiva	Vacunal
2	9021/06	SANTA CRUZ	14,0	SI	Seroconversión	No reactiva	Vacunal
3	9023/06	BA	12,0	SI	Seroconversión	No reactiva	Vacunal
4	9191/06	CABA	11,0	SI	Seroconversión	No reactiva	Vacunal
5	9534/06	SANTA CRUZ	ND*	SI	Seroconversión	No reactiva	Vacunal
6	10210/07	BA	29,0	SI	Seroconversión	NR	Vacunal
7	10211/07	BA	32,0	SI	Seroconversión	NR	Vacunal
8	41402/12**	BA	44,5	NO	Seroconversión	No reactiva	Negativo**
9	41660/12	CABA	68,9	NO	ALTA	NR	Negativo

CABA: Ciudad de Buenos Aires; BA: Buenos Aires; NR: No realizada.

\*Paciente que evidencia reacción primaria mediante duplicación de títulos de IgG (seroconversión)

\*\* Ver Tabla N° 8. Caso sin determinar.

**Tabla N° 11. Detección del ARN viral, mediante técnicas moleculares en el total de muestras estudiadas.**

Resultados	RT-PCR O	RT-PCR H	RT-PCR O (RT)	RT-PCR H (RT)	TOTALES
<b>Positivos*</b>	4	5	0	0	9
<b>Negativos</b>	47	52	39	26	164
<b>TOTALES</b>	<b>51</b>	<b>57</b>	<b>39</b>	<b>26</b>	<b>173</b>

\*Las 4 orinas e hisopados pertenecen a los 4 casos de neonatos confirmados con aislamiento en cultivos celulares y el 5° Hisopado pertenece al caso del niño de 1 año de edad.

\*\* Se inicia con RT-PCR-Real Time en septiembre de 2011

### Tabla N° 12. Estimación del valor predictivo positivo y negativo del test de IgM (VPP y VPN)

#### VPP para test de IgM:

Resultados IgM	
<b>Positivos</b>	12
<b>Negativos</b>	448
<b>Indeterminados</b>	1
<b>Resultado real</b>	Positivos
<b>(Pruebas combinadas)</b>	Negativos

De la Tabla N° 12 se extraen los siguientes valores:

Verdaderos Positivos (VP) = 12

Falsos Positivos (FP) = 3

Falsos Negativos (FN) = 1

Verdaderos Negativos (VN) = 448

Indeterminados Positivos (IP) = 4

Indeterminados Negativos (IN) = 1

Para un total de 469 casos.

Sensibilidad =  $(VP / (VP + FN + IP)) \times 100 = 70,59\%$

Especificidad =  $(VN / (VN + FP + IN)) \times 100 = 99,12\%$

También se puede obtener la Tasa de Predicción Correcta que nos ofrece una idea de la exactitud de la prueba:

Tasa de Predicción Correcta =  $(VP + VN / (VP + VN + FP + FN + IP + IN)) \times 100 = 98,08\%$

Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) se calculan de la siguiente manera utilizando el Teorema de Bayes con las métricas previamente calculadas. Esta fórmula tiene en cuenta los valores indeterminados utilizados para calcular la Sensibilidad y la Especificidad.

$$\text{VPP} = [\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia} / \text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia} + (1 - \text{Especificidad}) \times (1 - \text{Prevalencia})] \times 100 = 75,00 \%$$

$$\text{VPN} = [\text{Especificidad} \times (1 - \text{Prevalencia}) / \text{Especificidad} \times (1 - \text{Prevalencia}) + (1 - \text{Sensibilidad}) \times \text{Prevalencia}] \times 100 = 98,90\%$$

NOTA IMPORTANTE: Estos valores obtenidos son útiles para la evaluación de los equipos utilizados para la determinación de IgM pero incluyen resultados de elevación de IgM en respuesta tanto a cepas salvajes como vacunales por lo cual las tasas de prevalencia deben tener en cuenta eso y se deben calcular en base a resultados positivos para cepas salvajes, como se desarrolla a continuación:

#### 4.4 Cálculo de la Prevalencia de SRC en la población estudiada para los 10 años de búsqueda.

La **tasa de prevalencia** aparente de Periodo (PAP) para los 10 años de búsqueda para casos de SRC se calcula de la siguiente forma:

<b>Positivo</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>Negativo</b>	<b>0</b>	<b>254</b>
	Positivo	Negativo

De la cual se pueden extraer los siguientes valores:

Verdaderos Positivos (VP) = 5

Falsos Positivos (FP) = 0

Falsos Negativos (FN) = 0

Verdaderos Negativos (VN) = 254

Prevalencia = (Casos Positivos/Total Población) \* 100 = (5/259) \* 100 = 1,93 % (0,34%; 3,52%) con un nivel de confianza del 95%.

Como en todos casos la predicción no se equivocó, es decir fue perfecta los valores de todas las métricas dan 100 %.

La **tasa de prevalencia real** de período (PRP) para SRC, dados los niveles de sensibilidad (70,59%) y especificidad (99,12%) del test de diagnóstico de IgM, es:

PRP = 1,22% (0,00%, 2,49%) con un nivel de confianza del 95%.

Para el tratamiento estadístico se consultó la bibliografía citada bajo el número [41]

#### 4.5 Clasificación filogenética de los casos diagnosticados.

Se aislaron y clasificaron los siguientes casos diagnosticados:

- Neonatos con SRC: 4
- Niño de 1 año de edad con exantema postvacunal: 1.

No se obtuvieron muestras para genotipificar de uno de los neonatos con SRC ni de las 7 embarazadas con reacción primaria a la vacuna.

**El análisis filogenético permitió clasificar los casos como se describe a continuación:**

- Neonato ID 12135/03 se clasificó según se observa en las figuras N° 28 a; b; c y d.
- Neonato ID 21869/09 se clasificó según se observa en la figura N° 29.

Se incorporó a la base de datos de GENBANK con el N° JN582035

- Neonato ID 21887/09 se clasificó según se observa en la figura N° 29.

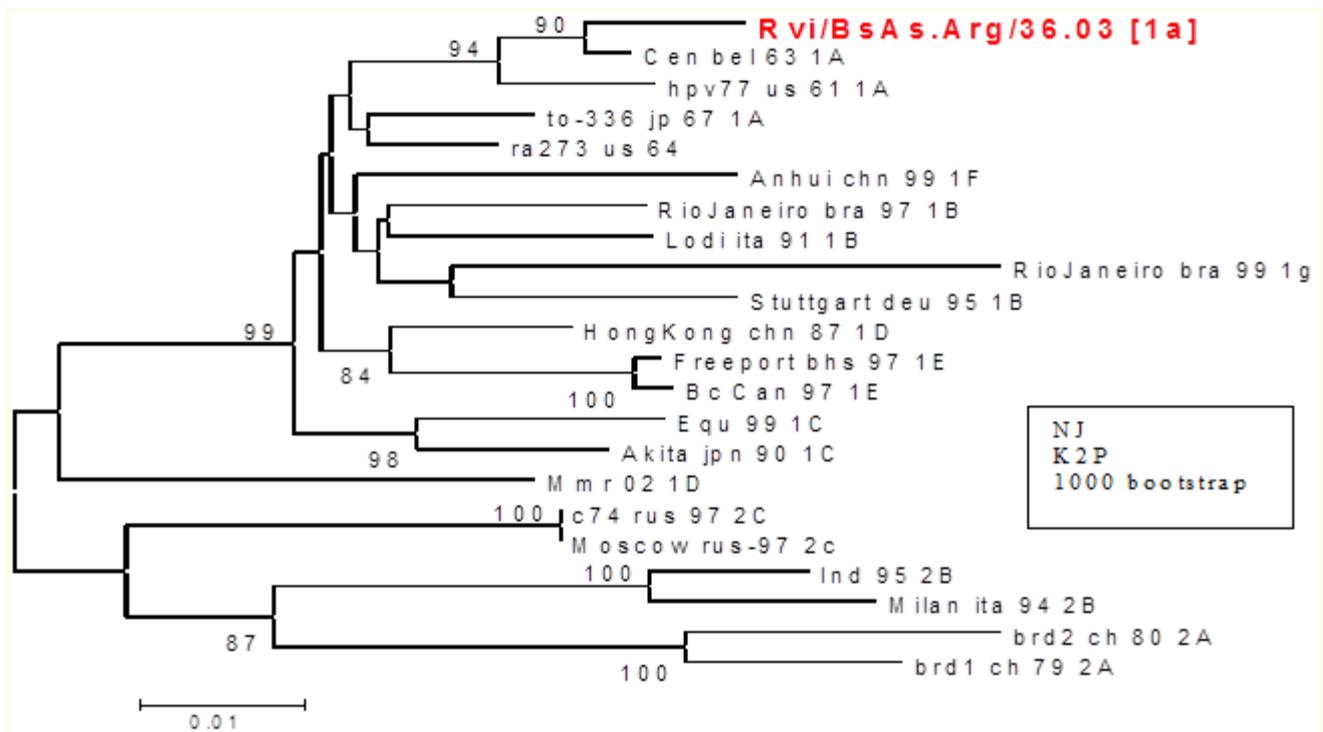
Se incorporó a la base de datos de GENBANK con el N° JN582036

- Neonato ID 22355/09 se clasificó según se observa en la figura N° 29.

Se incorporó a la base de datos de GENBANK con el N° JN582037

- Niño ID 32016/11 se clasificó según se observa en la figura N° 29.

El árbol filogenético que incluye los 5 virus clasificados junto a las 32 secuencias de referencia se puede observar en la figura N° 30.



**Figura N° 28a. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135.**

WHO 26 refs and Argentina  
CRS case from 2003  
739 nts  
MP

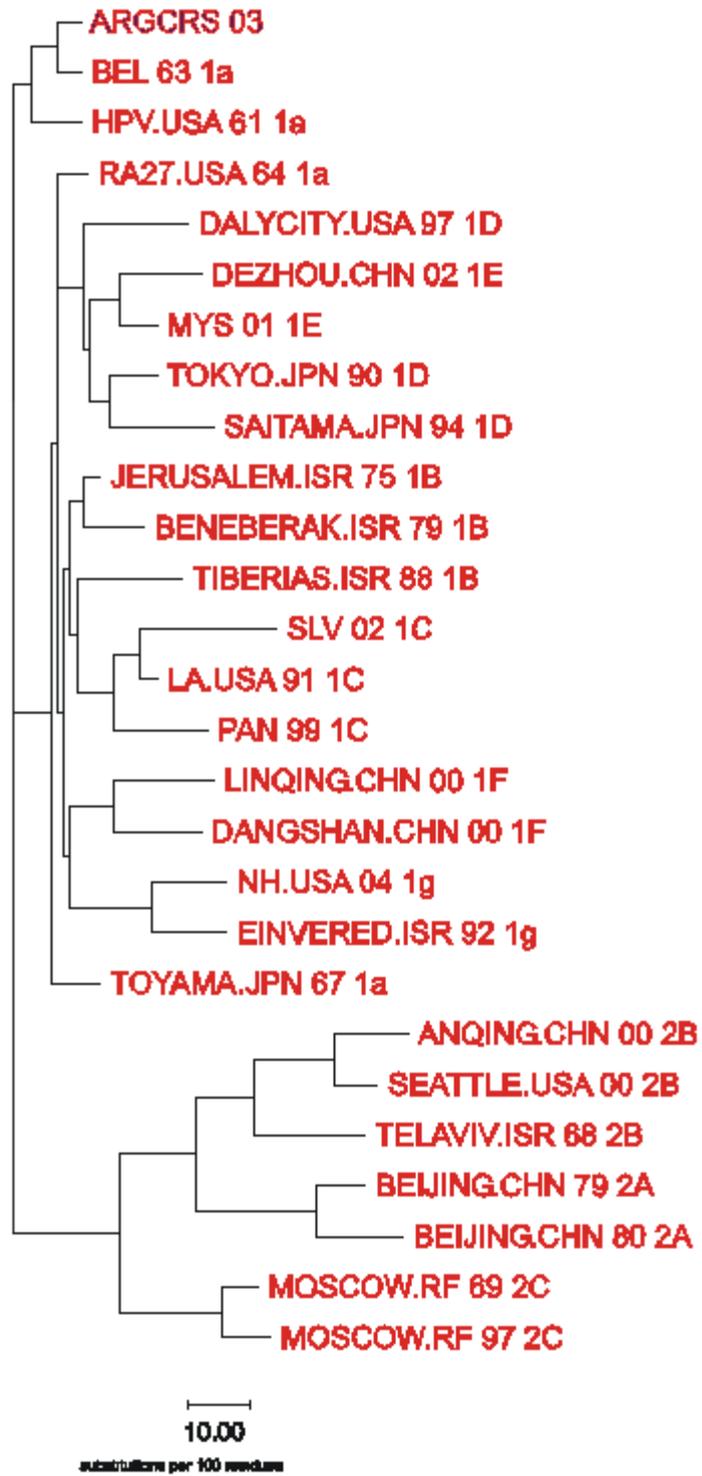


Figura N° 28 b. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135

El árbol muestra la clasificación correspondiente al virus aislado de muestras del paciente ID 12135 (ARGCRS03) en comparación con 26 cepas virales de referencia. Parámetros: NJ. K2P. (1000 repeticiones)

1a Rubella viruses 1961-2003  
601 nts  
MP

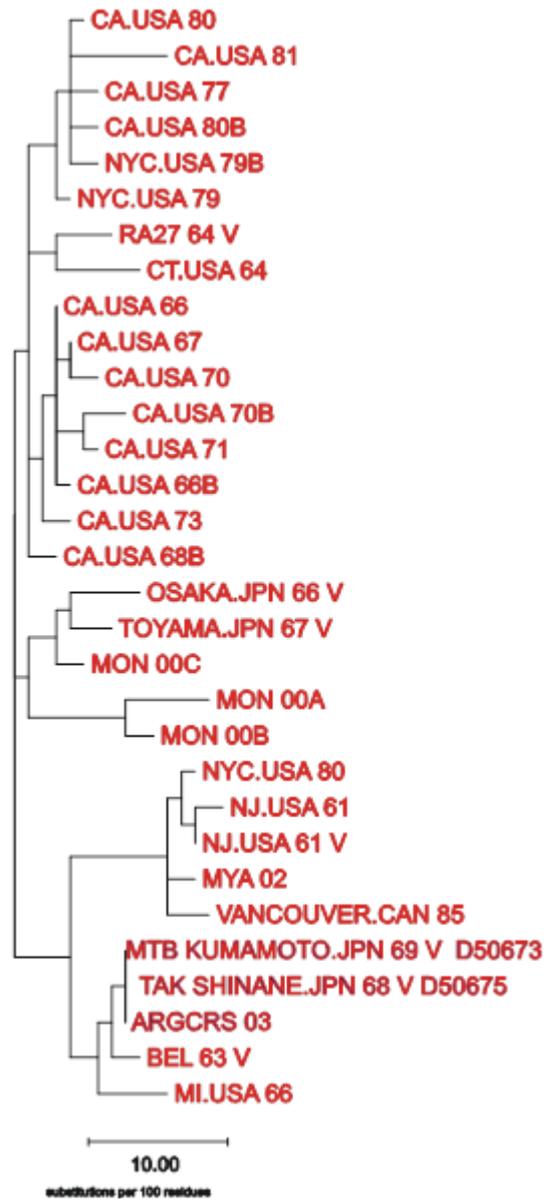
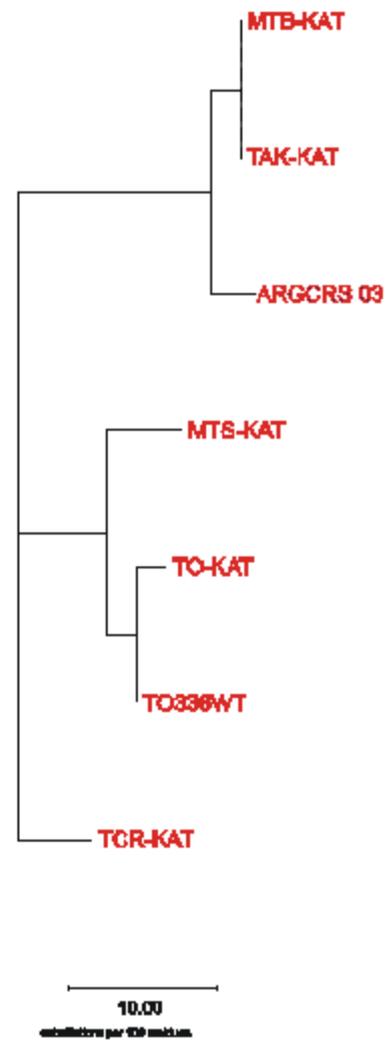


Figura N° 28 c. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135.

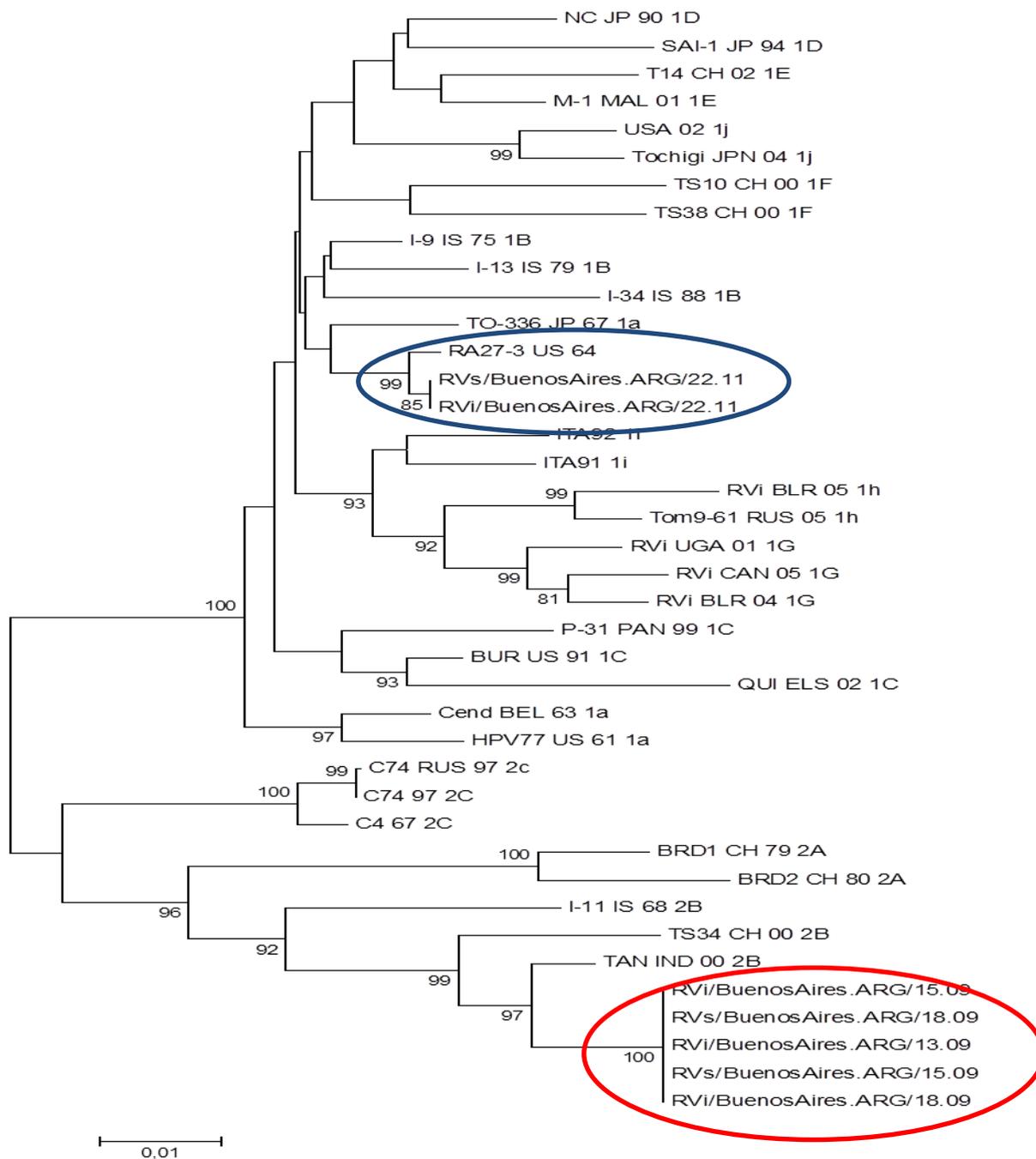
Este árbol muestra el virus aislado del paciente ID 12135 (ARGCRS03) frente a varios de los virus de genotipo 1a presentes en la base de datos del CDC. Parámetros: NJ. K2P. (1000 repeticiones)

Arg CRS and 6 Japan old  
viruses  
750 nts  
8721-9470



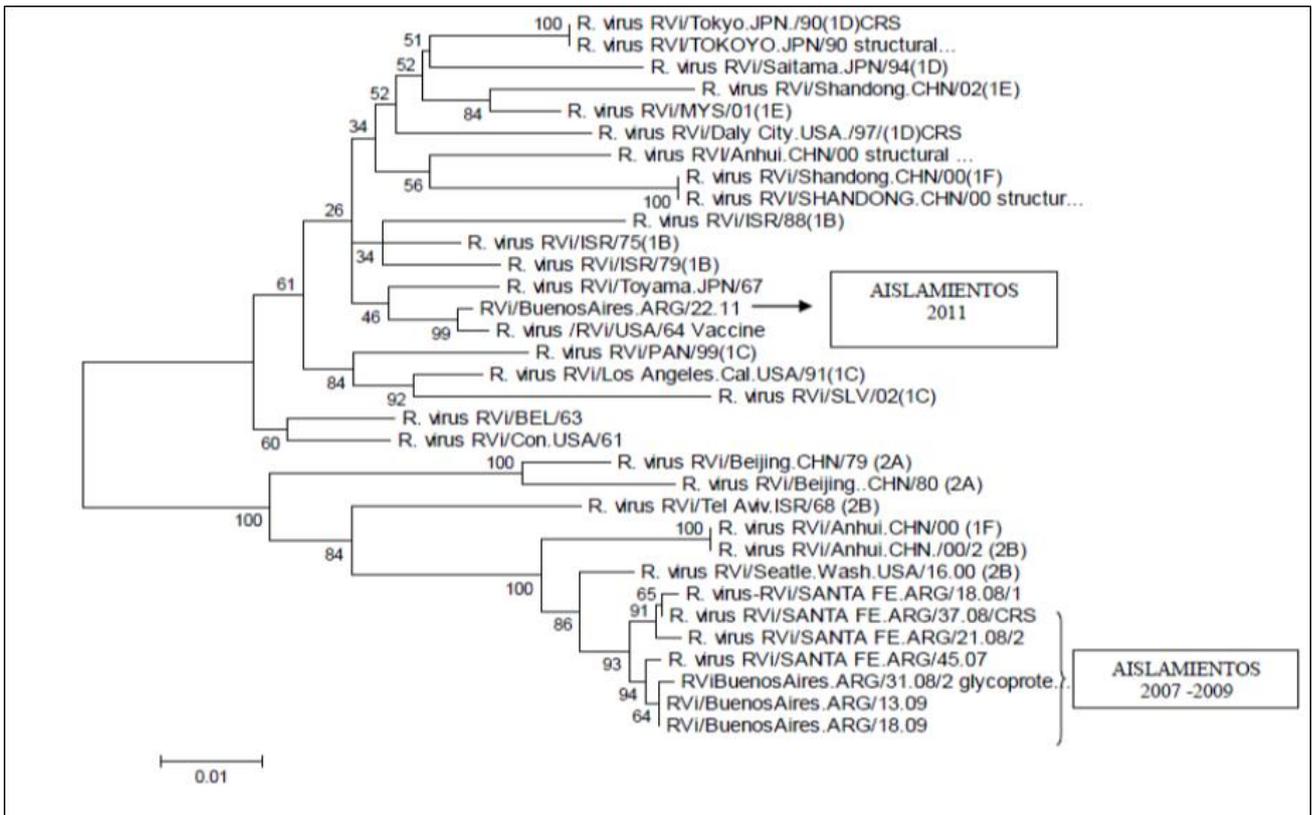
**Figura N° 28 d. Clasificación filogenética del virus aislado del caso ID 12135**

Este árbol muestra el virus aislado del paciente ID 12135 (ARGCRS03) frente a varios virus japoneses presentes en la base de datos de CDC. Parámetros: NJ. K2P. (1000 repeticiones)



**Figura N° 29 Casos aislados en Argentina**

El árbol filogenético fue construido mediante el algoritmo N-J (Neighbor-Joining) con el programa MEGA 4. La distancia fue calculada mediante el método de dos parámetros de Kimura (bootstrap 1000)



**Figura N° 30. Árbol filogenético de los aislamientos de virus de rubéola producidos en distintos años y eventos Argentina 2007-2011.**

El árbol filogenético fue construido mediante el algoritmo N-J (Neighbor-Joining) con el programa MEGA 4. La distancia fue calculada mediante el método de dos parámetros de Kimura (bootstrap 1000).

The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining (N-J) algorithm of MEGA 4 program. The distance was calculated using Kimura's two-parameter method, bootstrap 1000.



Figura N° 31. Árbol filogenético de los aislamientos de virus de rubéola producidos en Argentina en 2009 y su relación con aislamientos acaecidos en otras regiones de Sudamérica.

#### 4.6 Descripción clínica de los casos con SRC.

Figura N° 32 . Neonato ID 12135/03



Fecha de nacimiento: 18/08/03	Lugar de nacimiento: Gran Buenos Aires.
Sexo: Masculino.	Edad gestacional: 38 semanas
Peso al nacer: 1.740 g	Retardo de crecimiento Intrauterino armónico.
<b>Embriopatías: Microoftalmia izquierda.</b>	Trastornos transitorios: Ictericia.
<b>Papila pálida</b>	Anemia.
Datos maternos:	
Edad materna: 17 años.	
Primípara.	Infección maternal subclínica (en 1er mes).
Contacto con el padre con rubéola.	En seguimiento
No- vacunada	

Figura N° 33. Neonato ID 21869/09

Fecha de nacimiento: 17/03/2009	Lugar de nacimiento: Gran Buenos Aires.
Sexo: Femenino.	Edad gestacional: 33 semanas
Peso al nacer: 2940 g.	Hepato-esplenomegalia
Exantema del neonato.	Anemia
Síndrome de distress respiratorio (SDR)	Plaquetopenia
	Petequias
Datos maternos:	<b>Trast. cardíacos: Hipertensión pulmonar severa</b>
Edad materna: 39 años.	<b>Ductus arterioso permeable</b>
Embarazo controlado.	<b>Trast. cerebrales: micro calcificaciones</b>
No- vacunada.	<b>Trast. oculares: Vascularización ocular incompleta</b>
Exantema al 1° mes de embarazo.	Fallece por compromiso respiratorio y general a los 18 ddv



Figura N° 34. Neonato ID 21887/09



Fecha de nacimiento: 28/03/2009.	Lugar de nacimiento: Ciudad de Buenos Aires
Sexo: Femenino.	Edad gestacional: 37 semanas.
Peso al nacer: 1.440 g	Retardo de crecimiento intrauterino armónico.
Anemia	Plaquetopenia
	Petequias
Datos maternos:	<b>Trast. cardíacos: Estenosis de la arteria pulmonar</b>
Edad materna: 31 años	<b>Trast. cerebrales: Ventriculomegalia leve</b>
Embarazo controlado	<b>Trast. oculares: cataratas.</b>
No- vacunada	<b>Fallece por insuficiencia cardíaca a los 2 meses y 1/2 de vida.</b>

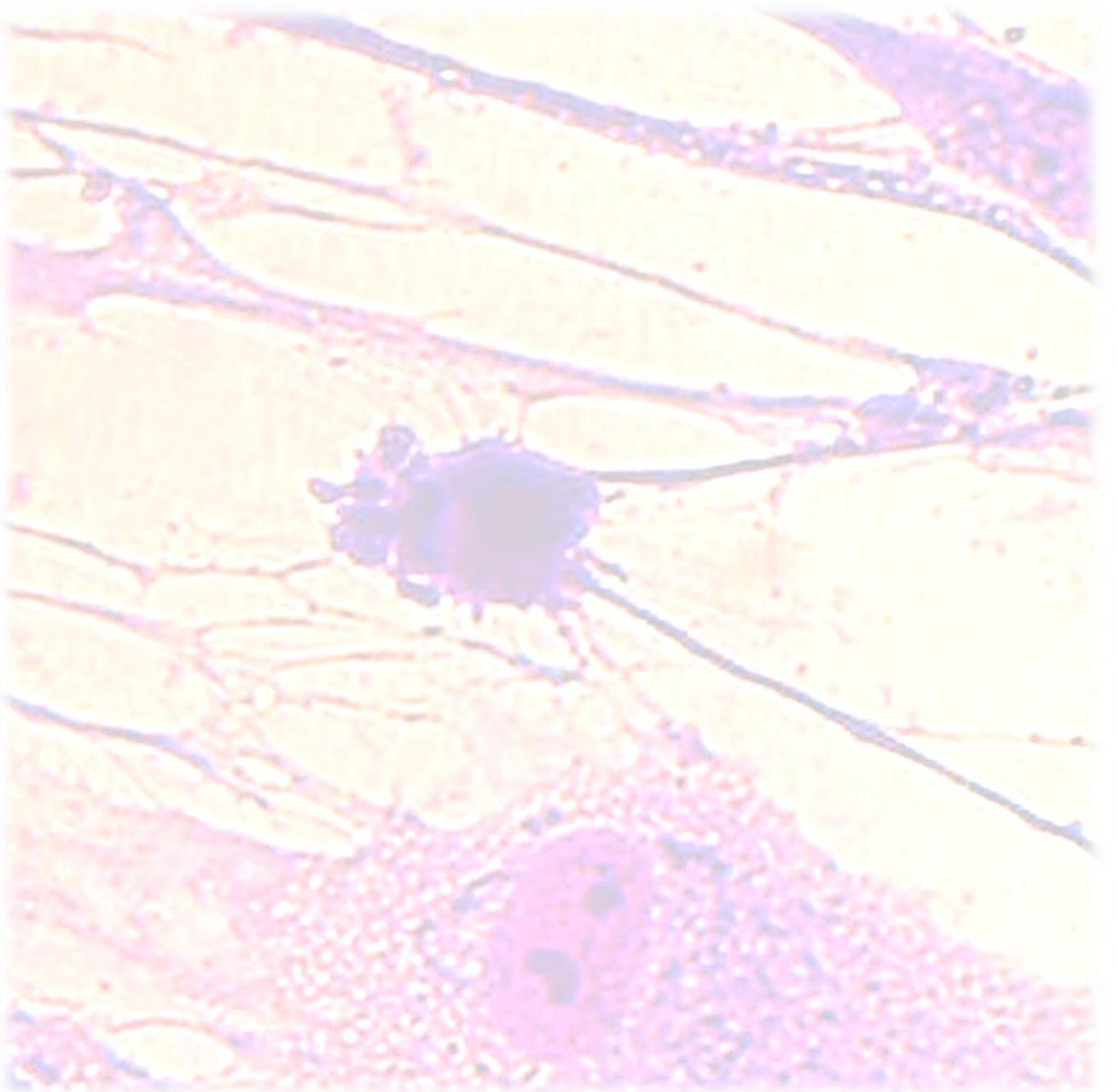
**Figura N° 35. Neonato ID 22355/09**



EXANTEMA DESDE NACIMIENTO. DESAPARECE HACIA EL 5º DÍA DE VIDA POSTNATAL.

Fecha de nacimiento: 25/04/2009.	Lugar de nacimiento: Gran Buenos Aires.
Sexo: Masculino.	Edad gestacional: 36 semanas
Peso al nacer: 1900 g.	Retardo de crecimiento intrauterino armónico.
Exantema del neonato que desaparece al 5° día	Plaquetopenia (144.000/ul)
Petequias	<b>Trast. cerebrales: Ventriculomegalia leve</b>
Datos maternos:	<b>Trast. Cardíacos: ductus arterioso permeable leve.</b>
Edad materna: 17 años.	<b>Trast. oculares: cataratas</b>
Con escaso control de embarazo (2 consultas).	
No- vacunada.	.
Exantema al 2° mes de embarazo.	En seguimiento

# 5 Discusión



## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de la muestra

*Período de estudio:* Años 2003 a 2012

La población estuvo conformada por 2670 pacientes que acudieron al servicio de Virosis Congénitas, Perinatales y de Trasmisión Sexual, por sospecha de infección viral congénita, donde se seleccionaron según los criterios de inclusión para caso sospechoso de infección viral por RUB y SRC 481 pacientes a los cuales se le tomaron diferentes muestras clínicas de fluidos biológicos como: sangre (suero), orina y exudado nasofaríngeo.

Las instituciones reflejadas en la Tabla N° 1 representan el 50 % de los pacientes estudiados, el 50% restante se conformó con pacientes pertenecientes a más de 100 instituciones de salud de todo el país, que aportaron individualmente menos de 10 pacientes cada una. La muestra presentó un valor de mediana de 2 pacientes por institución, demostrando ser una muestra muy heterogénea.

El Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM) de la Ciudad de Buenos Aires (CABA) fue la institución que remitió el mayor número de pacientes (44) para su estudio, seguido de los Hospitales Provinciales de Agudos “Dr. Narciso López” (38) y el Hospital de Niños de San Justo (30) de las localidades de Lanús y La Matanza respectivamente, ambas de la Provincia de Buenos Aires.

En un estudio publicado en 2011 sobre Embarazadas vacunadas inadvertidamente contra RUB durante la Campaña Masiva de 2006 en Argentina, el CENAGEM constituyó la principal institución que monitorizó los casos estudiados. [21]

El 54 % de los pacientes procedieron de los 5 distritos principales que se observan en la tabla N° 2 y el restante 46 % se conformó con pacientes pertenecientes a más de 100 distritos de todo el país, que aportaron individualmente menos de 15 pacientes cada una. La mediana de la muestra presentó un valor de 2 pacientes por distrito. Siendo la Ciudad de Buenos Aires el principal aportante al estudio con 128 pacientes.

*Principales Provincias involucradas en el estudio:* Buenos Aires (273 pacientes; 57%) y la ciudad de Buenos Aires (128 pacientes; 26%), siendo 23 pacientes por provincia la media de la muestra, con una mediana de 3 pacientes/provincia. Ver el Gráfico N° 1.

La necesidad de diagnosticar precozmente la infección en embarazadas para prevenir la ocurrencia del SRC ha llevado a incorporar al estudio un número elevado de mujeres embarazadas que cumplan con el criterio de inclusión, lo que conlleva como consecuencia las diferencias entre sexos que se observan en el Gráfico N° 2.

En el grafico N° 3 referente a la distribución etaria prevalece el rango de edad de 0 a 12 meses (54%) seguido del rango de 15 a 45 años (34%). Los grupos etarios que estudiamos están relacionados con el objetivo del Servicio de Virosis Congénitas, perinatales y de Trasmisión sexual del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” que está orientado a la pesquisa de posibles casos de RN con infecciones virales congénitas y en particular con el SRC, investigación que a partir 2011 paso a ser responsabilidad del LNR-SR.

Estas infecciones denominadas congénitas deben diagnosticarse en las primeras semanas de vida con la finalidad de iniciar un tratamiento integral que incluya la estimulación temprana y/o la terapia de rehabilitación para limitar las secuelas. [42, 43]

Por ejemplo cuando la discapacidad auditiva se detecta y se trata a tiempo se obtiene una mejora significativa en el desarrollo del lenguaje y eventualmente en un mejor aprovechamiento escolar. [42, 43]

En el segundo grupo predominante (15 – 45) las mujeres ocupan el mayor porcentaje (95 %; 154) y solo encontramos 8 hombres para un (5 %). Ver gráfico N° 4. A pesar que la RUB era considerada un trastorno “propio de la niñez”, algunas encuestas serológicas internacionales han mostrado una elevada susceptibilidad en mujeres en edad fértil; este hecho favorece el desplazamiento de la edad promedio de adquisición de la infección a grupos de mayor edad, lo que aumenta el riesgo de presentar SRC [18]. Por lo expuesto anteriormente, nuestro servicio ha dirigido sus esfuerzos hacia la búsqueda de infección por rubéola en este grupo etario, como se representa en la tabla N° 3. “Distribución etaria de Mujeres en edad fértil”. En esta tabla se puede observar que la media de edades es de 26,2 años, con un valor de mediana de 26 años.

En el gráfico N°5 se observa la importancia brindada al estudio de la RUB en el embarazo dado que del total de mujeres en edad fértil (n: 154) se prestó especial atención a aquellas que se hallasen con su embarazo en curso (132 casos, 85 %).

En 2° lugar se priorizaron las puérperas y pacientes que hayan cursado con abortos (12 casos; 8 %) a los fines de identificar posibles casos de SRC y en caso de detectar ausencia de anticuerpos de tipo IgG (pacientes susceptibles de infección), para recomendar la vacunación posterior al evento (nacimiento o aborto).

Por último se registraron un número menor de mujeres en edad fértil que no estaban cursando embarazo (8 casos; 6 %) con la finalidad de evaluar el status serológico y determinar la necesidad o no de vacunación.

## **5.2 Análisis y discusión de los resultados de las pruebas diagnósticas para RUB en neonatos y niños de 1 a 14 años.**

En primer lugar se analizaron los resultados obtenidos sobre el grupo etario de infantes y neonatos (0 a 12 meses), hallándose que sobre un total de 259 pacientes se detectaron anticuerpos de clase IgM en 5 de ellos, indicando en principio este resultado que estos pacientes se hallarían en una etapa aguda de la infección por el virus de la RUB. (Tabla N° 4)

En segundo lugar se realizaron estudios moleculares de búsqueda directa de genoma viral en 65 pacientes que enviaron muestras clínicas de orina y exudados de nasofaringe, detectándose por RT-PCR la presencia de genoma de RUB en 4 de los 5 pacientes que presentaron IgM positiva, confirmando de esta manera estos 4 casos como pacientes con resultado de infección actual por RUB.

El 5° caso que presentó IgM positiva no remitió muestras para diagnóstico molecular debiendo ser evaluado solo por estudios serológicos y datos clínicos. (Tabla N° 4)

Estos 5 casos presentaron alta sospecha de tratarse de neonatos con SRC pero para su confirmación es necesario analizar los datos clínicos de cada uno de ellos e intentar el aislamiento, la detección de genoma viral y la genotipificación mediante técnicas moleculares.

Se realizó diagnóstico diferencial sobre los pacientes con resultado negativo para RUB, a los fines de establecer la frecuencia de otras patologías con capacidad de generar cuadros de infección congénita similares al SRC. (Gráfico N° 6).

En 254 neonatos con resultado de RUB negativo se observó que el patógeno viral de mayor prevalencia en neonatos es el Citomegalovirus ya que se diagnosticaron 35 pacientes (14%) con Citomegalovirus; 3 (1%) pacientes con Varicela, 3 (1%) pacientes con Parvovirus B-19 y 1 paciente (<1%) con Herpes.

En el subgrupo etario inmediatamente superior (niños y niñas de 1 a 14 años de edad), con un número de individuos o pacientes de n= 56, una media de edades de 4 años y un valor de mediana de 3 años y medio, se detectó un caso con resultado positivo para RUB en un paciente de 1 año de edad.

El diagnóstico diferencial en este subgrupo demostró un 9 % (5 casos) de pacientes con CMV y otro 9 % (5 casos) de pacientes con diagnóstico de Parvovirus B-19. (Gráfico N° 7)

### **5.3 Análisis y discusión de los resultados de las pruebas diagnósticas para RUB en el subgrupo de pacientes embarazadas.**

Según puede observarse en el gráfico N°5 las pacientes embarazadas fueron 132, de las cuales se excluyeron 10 pacientes por tratarse de pacientes con pedido de control serológico sin sospecha de infección primaria por RUB, quedando finalmente el número de embarazadas a estudiar en 122. Con una edad promedio de 26 años y una mediana de 26 años demostrando una distribución homogénea de edades.

Primeramente se observó en la tabla N° 6 un número de casos con resultado de IgM indeterminado siendo necesario para su confirmación la realización de ensayos adicionales de avidéz de anticuerpos de tipo IgG y pruebas de RT-PCR en orina y exudado nasofaríngeo como se muestra en la tabla N° 7, se consideró además la ocurrencia de vacunación cercana a la fecha de las determinaciones diagnósticas. En dos casos con resultado de avidéz intermedia o indeterminada no se pudo concluir el diagnóstico por falta de muestras adecuadas. Ver tabla N° 8.

En el gráfico N° 8 se analizaron los casos negativos para diagnosticar otras patologías de similar sintomatología observándose un 3% de embarazadas con Citomegalovirus y un 2% de casos con parvovirus B-19.

Como resultado de todas las pruebas diagnósticas adicionales se estableció el número definitivo de casos de embarazadas con diagnóstico positivo para RUB, según se observa en la tabla N°10 en 7 pacientes confirmadas, con un rango de edades de 17 a 33 años.

Todos los casos de embarazadas positivas se trataron de casos relacionados con la aplicación de la vacuna triple viral durante la campaña masiva de vacunación de mujeres en edad fértil que se desarrolló en Argentina durante 2006/2007. Las pacientes recibieron la vacuna desconociendo su estado de gravidez y evidenciaron una reacción primaria con producción de anticuerpos de clase IgM e IgG en respuesta a la cepa vacunal de RUB. En cinco de las 7 madres se pudo realizar un seguimiento hasta el nacimiento con la determinación de anticuerpos IgM en los neonatos y la búsqueda de manifestaciones clínicas compatibles con SRC, resultando todos los neonatos con IgM negativa y totalmente asintomáticos. El detalle de estos casos se publicó en [21].

### **5.4 Valores Predictivos Positivos y Negativos de los equipos comerciales de determinación de anticuerpos IgM.**

Algunas consideraciones sobre estas pruebas diagnósticas en la etapa de eliminación con baja incidencia de enfermedad por RUB.

Estos indicadores nos dan idea de la certeza de los hallazgos.

Los **valores predictivos** (positivo y negativo) miden la eficacia real de una prueba diagnóstica. Son probabilidades del resultado, es decir, dan la probabilidad de padecer o no una enfermedad una vez conocido el resultado de la prueba diagnóstica. Se trata de valores post-test y dependen de la prevalencia de una enfermedad, es decir, del porcentaje de una población que está afectada por esa determinada patología.

En líneas generales:

- Si la prevalencia de una determinada enfermedad en una población es baja, el valor predictivo positivo (PV+) tiende a ser bajo ya que, al haber una mayor número de personas sanas, se incrementa el número de falsos positivos. Es decir, si solo un porcentaje bajo de la población está afectado, un resultado positivo en una prueba no es concluyente por lo que había que reconfirmar el resultado con una segunda prueba independiente.
- Si la prevalencia de una enfermedad es muy elevada (por ejemplo, en poblaciones de alto riesgo) el valor predictivo negativo tiende a bajar pues, al haber un mayor número de personas enfermas, aumenta el número de falsos negativos.

En nuestro caso se observa una disminución del valor predictivo positivo para los equipos de determinación de IgM con una probabilidad de 75,00 % que los casos positivos determinados por estos equipos sean verdaderos casos positivos, lo cual justifica la implementación de métodos moleculares de diagnóstico para una etapa como la actual de eliminación con baja incidencia.

### **5.5 Estudio de los casos positivos confirmados.**

Los casos positivos para RUB se estudiaron separadamente, en primer lugar se estudiaron los neonatos con RUB positiva, obteniéndose lo observado en la Tabla N° 9, los cinco neonatos presentaron un rango de edades de 9 a 25 días, siendo 3 de ellos mujeres y 2 varones y según se observa en la tabla todos presentaron criterios compatibles con SRC.

Fue posible identificar genoma viral en 4 neonatos y 1 niño mediante reacción de RT-PCR de tipo convencional, técnica que fue reemplazada a partir de septiembre de 2011 por la reacción de RT-PCR en tiempo real, una metodología más rápida y sencilla. Esto favoreció la toma de decisiones a nivel Salud Pública (acciones de bloqueo, búsqueda de contactos y medidas de aislamiento).

Hasta la fecha de finalización del estudio (31/12/12) no se detectaron casos positivos para RUB mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. En la figura N° 18 se puede observar la imagen de una corrida de RT-PCR en tiempo real con las curvas correspondientes a los controles de RNAsa P humana y los controles positivos (altos y bajos) de RUB con concentraciones respectivas de  $10^5$  y  $10^3$  copias.

La tasa de PAP ajustada para casos de SRC en un periodo de 10 años de búsqueda es de 1,93 % con una probabilidad de un 95 % de que el valor de PP resultase entre 0,34% y 3,52% y con una Tasa de Prevalencia Real de Período (PRP) de 1,22% de casos de SRC reales en la población, dados una sensibilidad (93,4%) y especificidad (99,2%) de los equipos comerciales de IgM utilizados y con un nivel de confianza de un 95% de probabilidad que la PRP de SRC se encuentre entre los valores de 0,00% y 2,49%.

El análisis de las historias clínicas de los 5 neonatos (incluido el caso que no pudo aislarse por falta de muestras adecuadas) con diagnóstico positivo para RUB, demuestra en todos los casos la ocurrencia de manifestaciones o criterios compatibles con el síndrome (SRC), tanto de tipo estructurales o permanentes (criterios mayores), como por ejemplo: malformaciones cardíacas, como las

manifestaciones de tipo transitorias o criterios menores, como por ejemplo plaquetopenia o anemia. Ver Tabla N° 9 en Resultados.

## **5.6 Clasificación filogenética de los casos diagnosticados.**

Al comparar la muestra del caso aislado en 2003 en Argentina con las cepas de referencias se han obtenido valores de p-distancias que van desde 0,01 a 0,09, siendo los mayores puntajes de divergencia (0,08 a 0,09) en comparación con los obtenidos del clado 2, lo que indica la relación estrecha con el clado 1. El análisis de nucleótidos entre la muestra argentina y la cepa vacunal (RA27 / 3) mostró una p-distancia de 0,03. Dentro del clado 1, la muestra argentina estaba estrechamente relacionada con la cepa Cendehill, asociada al genotipo 1a, uno de los genotipos con mayor heterogeneidad, con presentación de un 99% de identidad de nucleótidos. Figuras N° 28 a y b.

Se realizó un análisis más detallado para un mayor conocimiento de las relaciones filogenéticas de este virus, mediante la alineación de nuestro caso con dos secuencias japonesas MTB-Kat y TAK-Kat, es decir, las cepas Matsuba y Takahashi, ambas son cepas de vacunas atenuadas (Figura N° 28 c). Las tres cepas analizadas presentaron 13 nucleótidos que son únicos para los tres virus, nuestra cepa difería de las cepas japonesas porque presentaba 3 nucleótidos distintivos; el análisis permite suponer que la cepa aislada fue probablemente proveniente de Japón. La posibilidad de que sea una cepa de la vacuna que acumuló mutaciones mientras circuló es altamente improbable. Figura N° 28 d.

El genotipo 1a está considerado provisional porque la filogenia de este grupo de virus es compleja y mal conocida. Las propuestas de nuevos genotipos se deben presentar a la consideración de los bancos de cepas de la OMS del Organismo de Protección Sanitaria en Londres y de los Centros para el Control de Enfermedades y Protección en Atlanta.

El genotipo 1a era el genotipo hallado con más frecuencia en todo el mundo antes de 1984 y ahora ha desaparecido casi completamente, excepto en Mongolia y Myanmar.

Los últimos casos de genotipo 1a fueron detectados en Canadá en 1985 y en Argentina en 2003.

No se han hallado en Argentina genotipos 1B, 1C, 1D y 1F que tienen una distribución limitada: 1B se encontró en Europa y a lo largo de la costa oriental de América del Sur, 1C en Centroamérica y a lo largo de la costa occidental de América del Sur; 1D en países asiáticos y se encontró un virus del genotipo 1D en Etiopía; el genotipo 1F se encontró en China.

El genotipo 1C se observó en un brote epidémico único en el Japón y se pensó que había sido importado de un brote simultáneo presente en América, aunque no existen datos epidemiológicos directos que respalden esta afirmación.

El genotipo 1D se encontró anteriormente en Canadá y los Estados Unidos, pero su última notificación data de 1987 en Canadá y de 1988 en los Estados Unidos. El genotipo 1E, se identificó por primera vez en 1997 y ahora parece ser un genotipo con distribución mundial.

Dentro del clado 2 el genotipo 2A se aisló sólo en China en 1979 y en 1980 y no ha reaparecido desde entonces. El genotipo 2B (circulante en la región sudamericana) se distribuye más ampliamente que los demás genotipos del clado 2. El genotipo 2C se ha hallado sólo en la Federación de Rusia.

## **5.7 Situación regional: En Argentina y Sudamérica.**

El análisis filogenético de la región variable del gen que codifica para la glicoproteína E1 de las tres cepas de Buenos Aires (Argentina) aisladas entre las semanas epidemiológicas (SE) 13 y 18/2009,

demonstró que las mismas agruparon en un mismo genotipo perteneciente al clado 2: el genotipo 2B. (Figura N° 29)

Las cepas de Buenos Aires (Argentina) agruparon cercanamente con las cepas de Santa Fe (Argentina) detectadas a partir de la SE 45/2007 hasta la SE 37/2008 en ocasión de los brotes extendidos de 2007-2009 con 2218 casos reportados. Asimismo estas cepas guardan gran similitud con las cepas que circularon en Ceara (Brasil) desde la SE 13/2007 hasta la SE 42/2009 en Maranhao (Brasil).

En tanto, la secuencia de los genes de la gp E1 de las cepas argentinas agruparon, con altos valores de bootstraps, junto al de las cepas brasileras que circularon durante el mismo periodo de tiempo, sugiriendo una circulación regional de esta cepa entre estos países de la región sudamericana (Figuras N° 30 y 31).

Los genotipos del Clado 2 serían por tanto considerados importados en las Américas, de acuerdo con lo que se plantea en el informe redactado por el Ministerio de Salud del vecino país de Chile en ocasión de la emisión de Certificados de la eliminación de SAR y RUB en Las Américas [45]. En este documento se analiza la distribución de los genotipos detectados en Las Américas de 1997 a 2010.

En 2007 se produjo un resurgimiento de los casos de RUB debido a la importación de virus en países donde inicialmente se había vacunado sólo a las mujeres en campañas de vacunación masiva. Los casos confirmados aumentaron de 2.919 en 2006 a 13.187 en 2007, como resultado de la aparición de brotes en Argentina, Brasil y Chile.

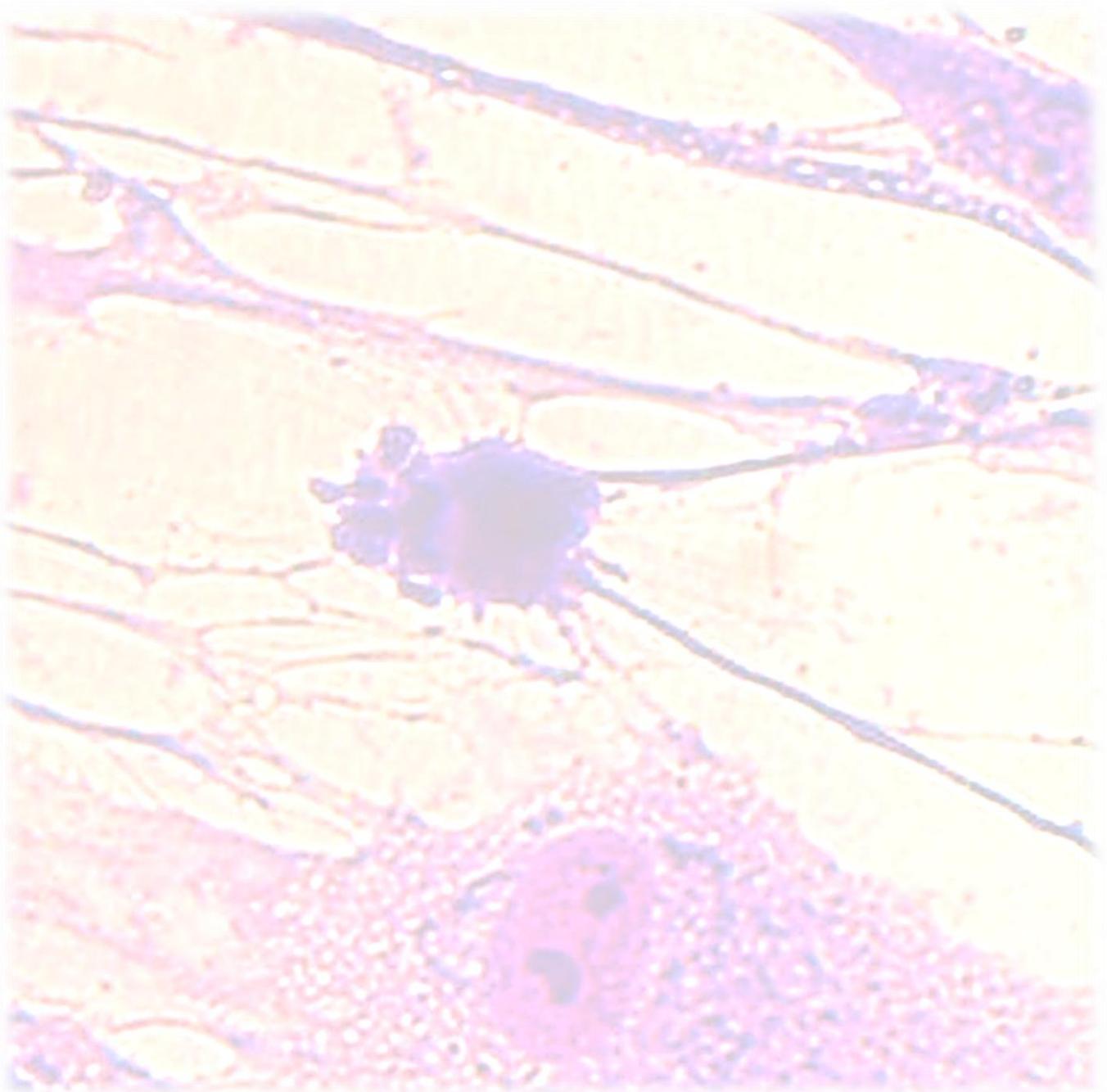
En el 2008 se notificaron 4.536 casos confirmados de rubéola en la Región, de los cuales Argentina y Brasil representaban al 98% de los casos. Argentina reportó el último caso confirmado de rubéola endémica en la semana epidemiológica 5 de 2009. Canadá y Estados Unidos han reportado 7 y 4 casos de rubéola asociados a importación (genotipo 2B en los Estados Unidos), respectivamente.

En 2009, en América se reportaron 20 casos de SRC en: de los cuales en Argentina (3), Brasil (7), Canadá (1), Estados Unidos (2) y otros.

Además, Brasil reportó 8 casos de infección de rubéola congénita (IRC).

A pesar de la limitada información sobre epidemiología molecular del virus rubéola, el genotipo 1C se considera endémico en América y no ha sido identificado en otras regiones del mundo. Una de las últimas transmisiones ocurridas en Chile y Perú ha sido por ese genotipo (2005).

# 6 Conclusiones

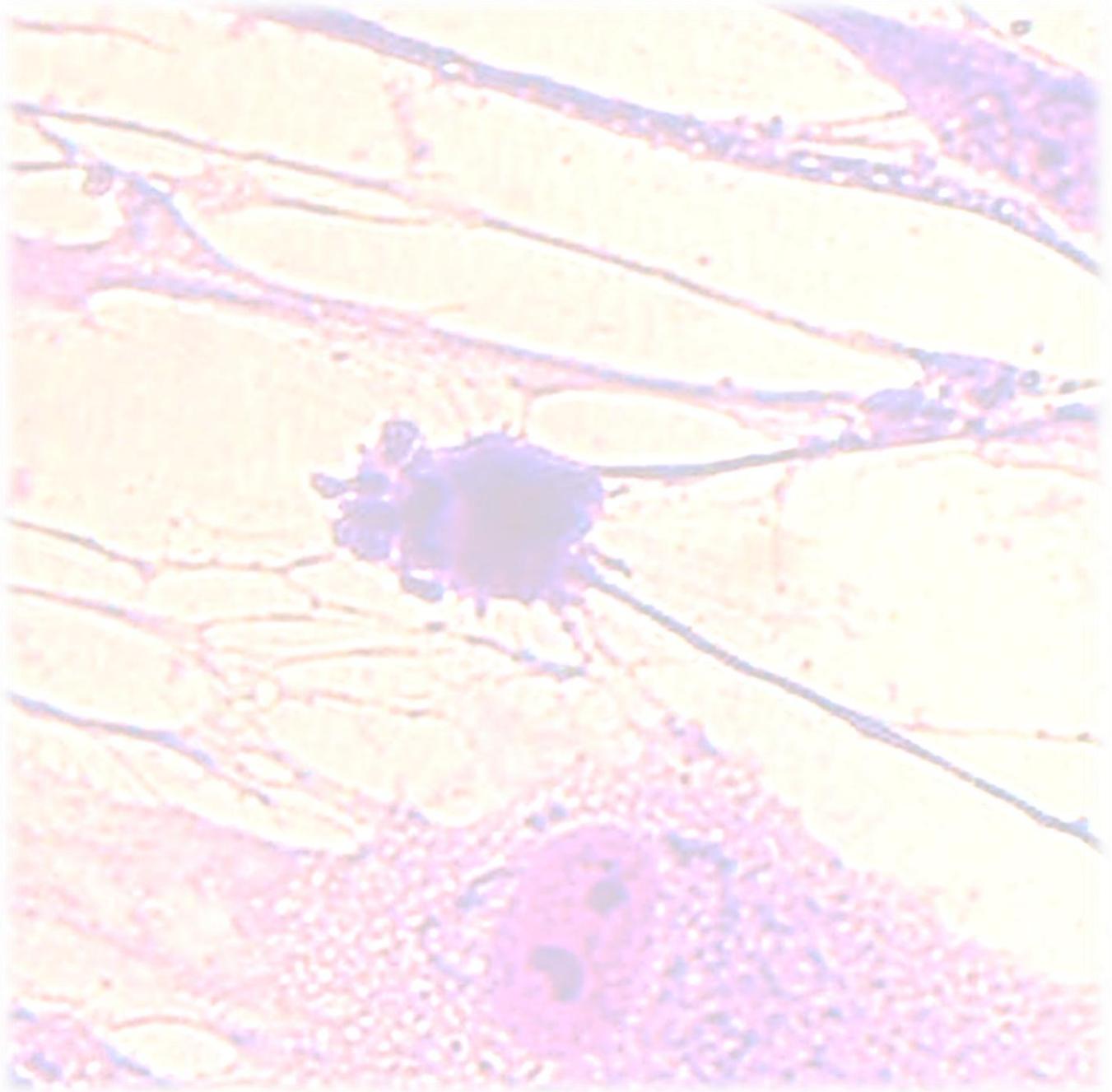


## 6 CONCLUSIONES

Para cumplir con el objetivo general de esta investigación se dio respuesta a los objetivos específicos, se obtuvieron resultados y con ellos se establecieron las siguientes conclusiones:

1. Los resultados de los estudios moleculares demostraron la presencia de genoma de virus rubéola en muestras clínicas de 4 neonatos previamente confirmados por serología.
2. Se detectó también genoma de virus rubéola en un niño de 1 año con antecedente cercano de vacunación con vacuna triple viral.
3. Del análisis filogenético de las mismas se observa que el primero de los casos aislados en 2003 se clasificó como perteneciente al genotipo 1 a.
4. Los otros tres casos se clasificaron como pertenecientes al genotipo 2B.
5. El caso del paciente de 1 año con antecedente de vacunación se clasificó como caso vacunal y se estableció su relación estrecha con la actual cepa vacunal RA 27/3.
6. En el presente estudio se determinaron y se confirmaron por métodos serológicos complementarios 7 casos de embarazadas con resultado de IgM positiva que se establecieron como casos de reacción primaria a la vacuna.
7. En 5 de ellas se pudo realizar seguimiento hasta el nacimiento de sus niños, presentando todos ellos resultado de IgM negativa y ausencia de síntomas compatibles con SRC.
8. Los resultados obtenidos en su conjunto responden al objetivo general de suministrar información al programa PRONACEI a los fines de contribuir con las metas de eliminación de la rubéola y la prevención del SRC.

# 7 Recomendaciones



## **7 RECOMENDACIONES**

El problema que la vigilancia de rubéola plantea, está dado por el hecho de que las manifestaciones del SRC se asocian con una amplia variedad de causas. Por ello es indispensable el abordaje integral de esta problemática como patología viral congénita.

El diagnóstico de esta enfermedad exige que el médico evalúe cada caso de forma integral, con un diagnóstico diferencial preciso y completo.

La misma complejidad de estas patologías exige un diagnóstico de laboratorio cada vez más sensible y preciso.

El programa PRONACEI apunta hacia ese objetivo pero aún falta mucho en materia de información epidemiológica completa y en la mejora de la logística relacionada con la toma de muestra.

Introducir mejoras en la recolección de la información epidemiológica.

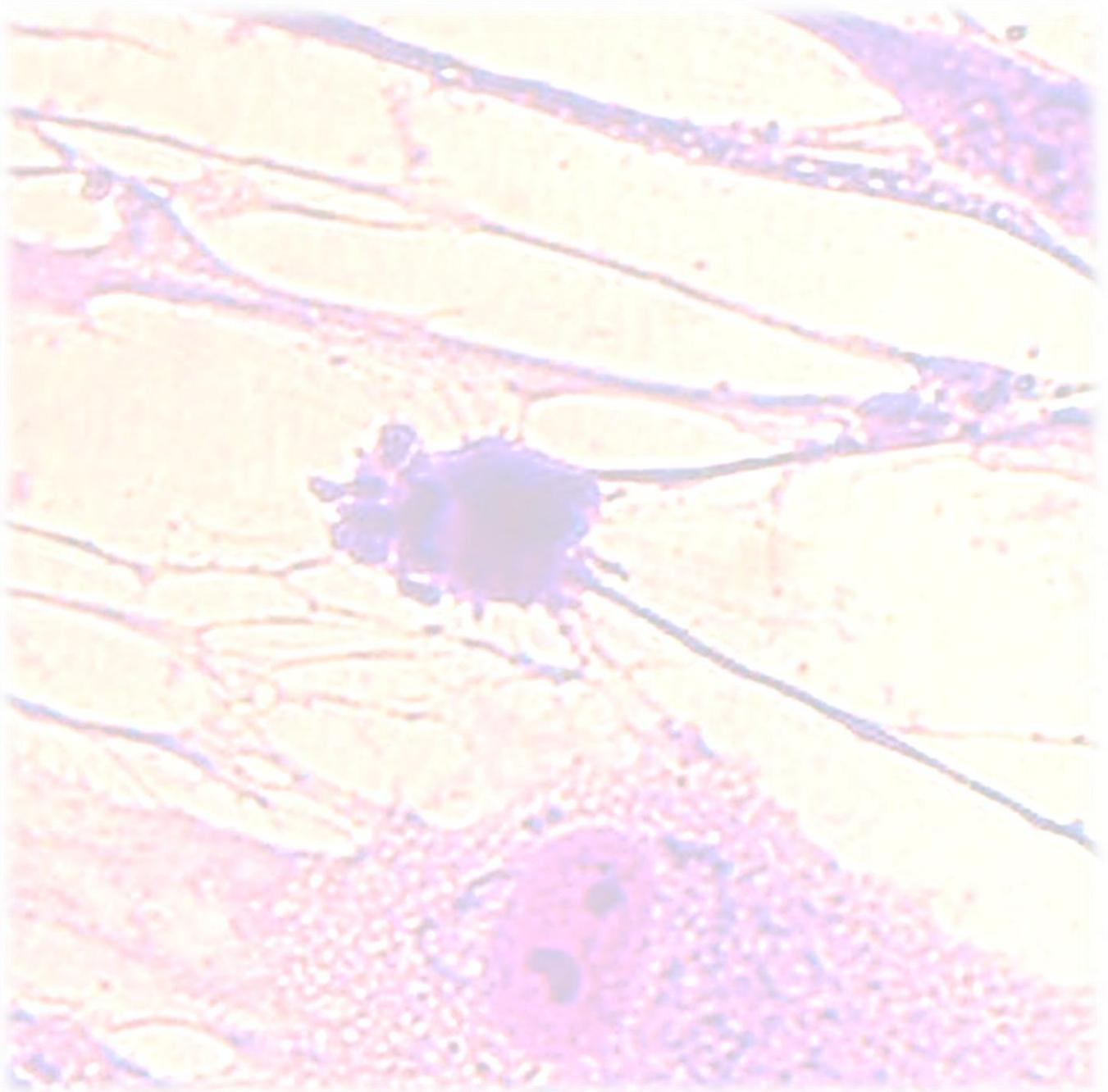
Una mayor difusión de los métodos de pesquisa y control de rubéola evitando el uso de técnicas inadecuadas.

A nivel laboratorio hay que seguir incorporando mejoras con técnicas más sensibles y precisas (RT-PCR Real Time).

Esta tesis demuestra que establecer tipos virales circulantes es de gran ayuda a la hora de evaluar estrategias de eliminación de estas patologías.

Aprender de los cambios en la epidemiología molecular de los virus, obtener información molecular del laboratorio, evaluar el por qué de la aparición de brotes ocasionados con genotipos importados y su diseminación regional en países que realizaron estrategias segmentadas de vacunación.

# 8 Bibliografía



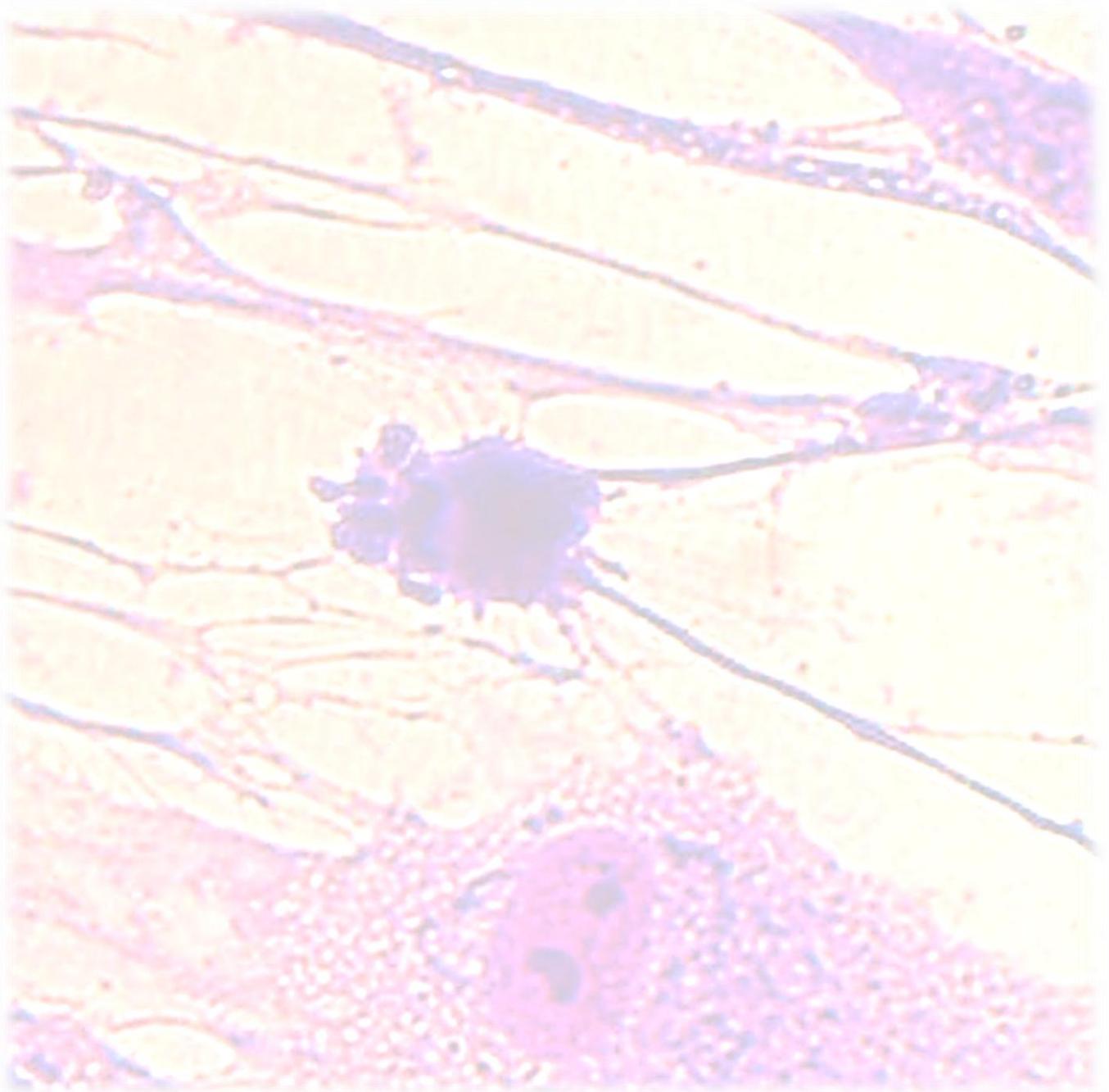
## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Webster W. S. Teratogen Update: Congenital Rubella. *Teratology* 58:13-23 (1998).
2. Rubéola. Epidemiología y situación mundial, Asociación de Médicos de Sanidad Exterior. 2012. Disponible en:  
[http://www.amse.es/index.php?option=com\\_content&view=article&id=128:rubeola-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50](http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=128:rubeola-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50)
3. Organización Mundial de la Salud. Rubéola Nota descriptiva N° 367 Julio de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs367/es/>
4. Guidelines for surveillance of CRS and rubella. WHO. V&B. Año 1999. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO\\_V&B\\_99.22.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_V&B_99.22.pdf)
5. Documentación para la Verificación de la Eliminación de Sarampión, Rubéola y Síndrome de Rubéola Congénita (SRC).Informe Final. Diciembre de 2013. Disponible en: [https://pftp.paho.org/Public/FCH/IM/Elimination/Informes%20de%20países/INFORME%20FINAL%20DE%20CERTIFICACION%20ELMINACION%20SR-SRC\\_Dic%202013.pdf](https://pftp.paho.org/Public/FCH/IM/Elimination/Informes%20de%20países/INFORME%20FINAL%20DE%20CERTIFICACION%20ELMINACION%20SR-SRC_Dic%202013.pdf)
6. Alerta epidemiológico del Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/inmunizaciones/alerta-sarampion/alerta-rubeola-n-c2-ba-11-2011.pdf>
7. Informe Anual de Vigilancia basada en laboratorio del Sarampión y la Rubéola Período: enero a diciembre, 2013 Volumen 1, Número 1, 2014 Fecha: 05-02-14. INCIENSA. Disponible en: [http://www.inciensa.sa.cr/vigilancia\\_epidemiologica/informes\\_vigilancia/2013/Virologia/Informe%20anual%20de%20vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20del%20sarampion%20y%20la%20rubeola,%20Enero%20a%20Dic%202013.pdf](http://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2013/Virologia/Informe%20anual%20de%20vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20del%20sarampion%20y%20la%20rubeola,%20Enero%20a%20Dic%202013.pdf)
8. Sarampión y rubéola: implementarán plan de acción de emergencia para mantener libre a las Américas. OPS/OMS. Disponible en: [http://www.paho.org/arg/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1087&Itemid=226](http://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=1087&Itemid=226)
9. Guías de Procedimientos en Ginecología. 2009. Disponible en: <http://www.colmed3.com.ar/frp/ginecologia>
10. Guía Perinatal. CEDIP. Disponible en: <http://biblioceop.files.wordpress.com/2011/02/guc3ada-perinatal-cedip.pdf>
11. Parkman PD. Togaviruses: Rubella Virus. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8200/>
12. Garcia AG, Marques RL, Lobato YY, Fonseca ME, Wigg MD. Placental pathology in congenital rubella. *Placenta*. 1985 Jul-Aug; 6(4):281-95.
13. Zheng DP, Frey TK, Icenogle J, Katow S, Abernathy ES, Song KJ, et al. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 1523- 1530.
14. Gillam S. The Jeanne Manery Fisher Memorial Lecture 1994. Molecular biology of rubella virus structural proteins. *Biochem Cell Biol.* 1994 Sep-Oct; 72(9-10):349-56.
15. Jia-Yee Lee\* and D. Scott Bowden. Rubella Virus Replication and Links to Teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev.* October 2000 vol. 13 no. 4 571-587

16. Adamo MP<sup>1</sup>, León Monzón M, Cuffini C, Pedranti M, Zapata M. Detection of rubella-virus-induced apoptosis in Vero cell cultures with hematoxylin and eosin staining. *Rev Argent Microbiol.* 2002 Oct-Dec; 34(4):177-85.
17. Adamo M P, Pedranti M, Zapata M, Frey T. Participación de vías celulares de supervivencia y proliferación en la infección por virus Rubéola. XXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Córdoba, Argentina, 2-5 Dic. 2007. Libro de Actas p19, resumen 22462.
18. Pérez Camacho, P. M. MD. Infecciones perinatales. Disponible en: [http://www.scp.com.co/precop/precop\\_files/ano12/TERCERO/infecciones\\_perinatales.pdf](http://www.scp.com.co/precop/precop_files/ano12/TERCERO/infecciones_perinatales.pdf)
19. Protocolo de vigilancia de la rubéola y del síndrome de rubéola congénita en la fase de eliminación. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/Protocoloeliminacionrubeola.pdf>
20. Picazo J. J. Diagnóstico serológico de la rubéola. Disponible en: <http://consensos.org/protocol/sero03.htm>
21. Pardon F, Distefano A, et al. Rubella Vaccination of Unknowingly Pregnant Women During 2006 Mass Campaign in Argentina. *J Infect Dis.* (2011) 204 (suppl 2): S745-S747.
22. Andrus J. K. Rubella and Congenital Rubella Syndrome Elimination in the Americas *J. Infect Dis.* (2011) 204 (suppl 2).
23. Lineamientos Técnicos Sarampión y Rubéola (PRONACEI) Disponible en: [http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000532cnt-2014-08\\_lineamientos-sarampion.pdf](http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000532cnt-2014-08_lineamientos-sarampion.pdf)
24. Pardon F, Martín F, Mallimaci M, Leguina M, Rodríguez C, Fousal M, et al. Relevamiento de anticuerpos anti-rubéola en mujeres en edad fértil y embarazadas. XXIV Jornadas Científicas de la Sociedad Argentina de Virología, 2004, Resumen 8, p.8, Vaquerías, Córdoba, Argentina.
25. Man C, Umido V, Bakir J, Caparelli M, Copiz A, Castillo C, et al. Evaluación del impacto de la epidemiología de la rubéola y el síndrome de rubéola congénita en la Argentina. *RevHosp Niños Buenos Aires* 2005; 47 (214):205-10.
26. Bar-Oz B, Levichek Z, Moretti ME, Mah C, Andreou S, Koren G. Pregnancy outcome following rubella vaccination: a prospective controlled study. *Am J Med Gen* 2004; 130A:52-54.
27. Bosma, T. J., K. M. Corbett, S. O'Shea, J. E. Banatvala, and J. M. Best. 1995. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1075-1079.
28. Bosma, T. J., K. M. Corbett, M. B. Eckstein, S. O'Shea, J. E. Banatvala, K. Morton, and J. M. Best. 1995. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2881-2887.
29. Braun, C, D. Kampa, R. Fressle, E. Willke, M. Stahl, and O. Haller. 1994. Congenital rubella síndrome despite repeated vaccination of the mother: a coincidence of vaccine failure with failure to vaccinate. *Acta Paediatr.* 83: 674-677.
30. Weber, B., G. Enders, R. Schlosser, B. Wegerich, R. Koenig, H. Rabenau, and H. W. Doerr. 1993. Congenital rubella síndrome after maternal reinfection. *Infection* 21: 118-121.
31. Manual de la OMS para los procedimientos diagnósticos de laboratorio para infecciones por los virus del sarampión y de la rubéola. Disponible en: [http://www.who.int/ihr/elibrary/manual\\_diagn\\_lab\\_mea\\_rub\\_sp.pdf](http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_sp.pdf)
32. World Health Organization. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Weekly Epidemiological Record.* 2005 Apr 8; 80(14):126-32.
33. World Health Organization. Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007. *Weekly Epidemiological Record.* 2007; 82:216–222.

34. World Health Organization. Rubella virus nomenclature update: 2013. Weekly Epidemiological Record. No. 32,2013,88, 337–348.
35. Pan American Health Organization. Elimination of rubella and congenital rubella syndrome: field guide. 2nd ed. Washington, DC: Scientific and Technical; 2005. Publication N° 606.p.40-43. [Recuperado el 12 de enero de 2014]. Disponible en:  
<http://www.measlesrubellainitiative.org/wp-content/uploads/2013/06/Measles-Elimination-Field-guide-2-edition.pdf>
36. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ra edición, año 2005 de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en:  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
37. Real-time (Taqman) RT-PCR Assays for the detection of Rubella Virus RNA in the rubella E1 coding region and human RNase P mRNA using the ABI 7500 real-time thermocycler (CDC Protocols) Disponible en:  
[http://www.wpro.who.int/immunization/meetings/2012/mr\\_lab\\_workshop\\_2012\\_meeting\\_report\\_annex5.pdf?ua=1](http://www.wpro.who.int/immunization/meetings/2012/mr_lab_workshop_2012_meeting_report_annex5.pdf?ua=1)
38. Vero/hSLAM Cells for Isolation of Measles Virus. (CDC Protocols) Disponible en:  
<http://www.cdc.gov/measles/lab-tools/vero-slam.html>
39. Software Mega Versión 5.05. El manual completo del Mega v5.05 se puede descargar desde:  
<http://www.megasoftware.net/>
40. Protocolos del CDC para la epidemiología molecular de los virus de sarampión y rubéola; versión 03/02/2012.
41. Guías de estudio para Salud Pública II. UNAM (México) Disponible en:  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spiii/spiii/guia6.htm>
42. Guías de Prácticas clínicas: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de Rubéola en el Primer Nivel de Atención. Disponible en:  
[http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/138\\_GPC\\_RUBEOLA/IMSS\\_138\\_08\\_EyR\\_RUBEOLA\\_1N.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/138_GPC_RUBEOLA/IMSS_138_08_EyR_RUBEOLA_1N.pdf)
43. Yoshinaga-Itano, C. (1995, May). Efficacy of early identification and early intervention. In Seminars in hearing (Vol. 16, No. 02, pp. 115-122). Copyright© 1995 by Thieme Medical Publishers, Inc. Glover B. 1994.
44. Díaz-Ortega, J. L., Meneses-Reyes, C. D., & Palacios-Martínez, M. (2007). Incidencia y patrones de transmisión de rubeola en México. salud pública de México, 49(5), 337-344.
45. Certificación de la eliminación de sarampión, rubéola y SRC en Chile. Disponible en:  
[http://epi.minsal.cl/epi/0notransmisibles/revista/vigia27/articulo\\_13.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/0notransmisibles/revista/vigia27/articulo_13.pdf)
46. Garcia, J. J. G. (2010). Differential diagnosis of viral exanthemas. Open Vaccine Journal, 3, 65-68.
47. PARDÓN F; FERNÁNDEZ C; CALLONI SAPPAG M; PEDRANTI M; DISTEFANO A; ADAMO M. P. Caracterización biológica de una cepa salvaje de Virus Rubeola aislada en Buenos Aires en cultivos de células BHK-21. Huerta Grande. Encuentro; XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología; 2009.

# 9 Anexos



## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1. Fichas epidemiológicas de embarazada y de recién nacido.

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA.

SERVICIO DE VIROSIS CONGÉNITAS, PERINATALES Y DE TRANSMISIÓN SEXUAL.

TE: 4301-7428/4302-5064 Interno 216 FAX: 4301-7428/4302-5064 interno 200 E-mail: cypvirus@anlis.gov.ar

#### FICHA CLINICA DE EMBARAZADAS

FECHA: ...../...../.....

Las muestras deben enviarse rotuladas, refrigeradas, con la solicitud de análisis y con este resumen de historia clínica completo.

Apellido y Nombres:	Nacionalidad:
Dirección:	Educación: Primaria Secundaria Universitaria
TE:	Profesión /Ocupación:
Edad:	Edad del cónyuge:

#### DATOS DE LA INSTITUCIÓN

Institución solicitante:	H.C. Nº:
Servicio y/o sala:	Médico:
Dirección:	TE y FAX:
	E-mail:

#### ANTECEDENTES CLINICOS MATERNOS

FUM: .....	Semanas de Gesta: .....
Fecha de comienzo de síntomas: ...../...../.....	Fecha probable de parto: .....
Diagnóstico presuntivo: .....	Gesta: .....
Tiempo de evolución: .....	Paridad: .....
Patología de base: .....	Consanguinidad: .....
Diabetes:	Hijos con cardiopatías: .....
Lupus:	Abortos espontáneos: .....
Colagenopatías	Vaginitis: .....
HIV                      Hipertensión                      Otras:	

#### MANIFESTACIONES CLINICAS (describirlas)

FIEBRE: .....°C Duración: .....	Duración: .....
EXANTEMA TIPO Y DISTRIBUCIÓN: .....	
LESIONES HERPETICAS CERVICOVAGINALES	ANEMIA
POLIHIDRANMIOS	APLASIA DE CELULAS
HIDROPESÍA FETAL	ADENOPATIAS
TROMBOCITOPENIA	MIALGIAS
HEPATOMEGALIA	
ESPLENOMEGALIA	
ARTRALGIASEN: .....	
OTRAS:.....	

#### ESTUDIOS REALIZADOS

Fecha:...../...../.....

Grupo Sanguíneo: .....	Factor: .....	Coombs indirecta: .....
Hemograma: Bcos: ..... /mm <sup>3</sup>	Neut: .....%	Eos: .....%
	Bas: .....%	Linf: .....%
	Plaq:..... /mm <sup>3</sup>	
Hematíes: ..... /mm <sup>3</sup>	Hto.: %	Hb: g%
Bb: ..... TGP: ..... mU/ml	TGO: ..... mU/ml	γ-GT: ..... mU/ml
FOH:..... mU/ml		
MO: .....		

Incompatibilidad sanguínea: NO SI Fecha: ...../...../.....

Resultados:.....

Otros estudios hematológicos:..... Fecha:...../...../.....

Ecografía fetal: NO SI Fecha: ...../...../..... Resultado: RCIU , Microcefalia , Hidrocefalia , calcificaciones periventriculares , polihidramnios, hidropesía fetal, Otros: .....

Ecocardiograma fetal: NO SI Fecha: ...../...../..... Resultado: .....

Estudios Genéticos: NO SI Fecha: ..../...../..... Resultados:.....

Estudios Microbiológicos maternos (IgM): Fecha: ...../...../..... Rubéola: ..... CMV:..... HIV:.....

VZV: ..... EBV: ..... Toxo: ..... Sífilis: ..... HBV: .....

Sarampión..... Listeria..... Estreptococo B: .....

Otros datos: .....

### EPIDEMIOLOGÍA

Contacto con enfermos con exantema: NO SI Lugar:..... Fecha:...../...../.....

Recibió transfusiones: NO SI ..... Fecha:...../...../.....

Recibió Inmunoglobulinas: NO SI..... Fecha:...../...../.....

Vacunas en el último: NO SI Cuáles? ..... Fecha:...../...../.....

Inmunosuprimido: NO SI Causa: ..... Fecha:...../...../.....

Ingesta de: Tabaco NO SI Alcohol: NO SI Drogas SI NO Cuál? ..... Vía? .....

Ingesta de medicamentos: NO SI Cuál? .....

Desde.....Hasta:.....

Número de Parejas: .....

### TRATAMIENTO

Gammaglobulinas: NO SI Cuál? ..... Fecha: ...../...../.....

Nº dosis ..... Última dosis: ...../...../.....

Transfusiones: NO SI Cuántas? ..... Fecha de última: ...../...../.....

Transfusiones intrauterinas: NO SI Cuántas? : ..... Fecha: ...../...../.....

Antivirales: No SI Cual?: ..... Fecha: ...../...../.....

Otra medicación: ..... Desde.....Hasta .....

Observaciones: .....

### EVOLUCIÓN

**NACIMIENTO**

Fecha:..... Lugar: ..... Vivo/Muerto: ..... Edad Gestacional: .....

Peso: ..... pgar: ..... Examen Físico: .....

Autopsia:.....

Estudios Complementarios: .....

**ABORTO**

Edad Gestacional:.....Anatomía Patológica: .....

Firma y sello Medico Responsable

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA.  
 SERVICIO DE VIROSIS CONGÉNITAS, PERINATALES Y DE TRANSMISIÓN SEXUAL.  
 TE: 4301-7428/4302-5064 Interno 216 FAX: 4301-7428/4302-5064 interno 200 E-mail: cypvirus@anlis.gov.ar

**FICHA CLINICA DE RECIEN NACIDOS**

FECHA: ...../...../.....

Las muestras deben enviarse rotuladas, refrigeradas, con la solicitud de análisis y con este resumen de historia clínica completo.

Apellido y Nombres:	Sexo: F M	Lugar de nacimiento:
Fecha de nacimiento: ...../...../.....edad actual 2 años.		
Nº Tarjeta de Screening Neonatal (FEI) : .....		
Dirección:	TE:	

**DATOS DE LA INSTITUCIÓN**

Institución solicitante: Laboratorio de neuroquímica	H.C. Nº:
Servicio y/o sala:	Médico:
Dirección:	TE y FAX:
	E-mail:

**ANTECEDENTES CLINICOS**

Fecha de comienzo de síntomas: ...../...../.....	Nació con .....semanas de Gestación
Patología de base: .....	Cesárea: SI NO
Diagnóstico presuntivo: .....	Peso: .....
	APGAR: .....

**MANIFESTACIONES CLINICAS (marcar lo que corresponde)**

FIEBRE: .....°C	Duración: .....
EXANTEMA TIPO Y DISTRIBUCIÓN: .....	Duración:.....
APLASIA DE CÉLULAS ROJAS:	FARINGITIS
ANEMIA	CATARATAS
TROMBOCITOPENIA	GLAUCOMA:
MICROCEFALIA SEPTISEMIA	SORDERA
BEBE HIGROPICO	CALCIFICACIONES CEREBRALES
HEPATOMEGALIA	TRANS. RESPIRATORIOS
ESPLENOMEGALIA	TRANS. NEUROLOGICOS
ASCITIS	TRANS. CARDIACOS
ADENOPATÍAS	PETEQUIAS
RCIU	ICTERICIA
ATRESIA BILIAR	RETINOPATÍA PIGMENTARIA
MICROOFTALMIA	
OTRAS:	

ANTECEDENTES MATERNOS

Gesta: .....	Hidrops fetal: .....
Paridad: .....	Consanguinidad: .....
Patología de base: .....	Hijos con cardiopatías: .....
Antecedentes de adicciones: .....	Hijos con malformaciones: .....
Vaginitis .....	Abortos espontáneos: .....
Transfusiones : NO SI Cuantas?.....	Fecha:...../...../.....
Transfusiones intrauterinas: NO SI Cuántas?.....	Fecha:...../...../.....
Contacto con personas con exantema. ....	Presentó fiebre y/o exantema durante el embarazo?.....
Edad Materna: .....	Edad Paterna: .....
Domicilio materno durante el embarazo.....	Viajes durante el embarazo.....A dónde?.....
Recibió vacunación anti rubeólica?.....	Cuándo?.....

ESTUDIOS REALIZADOS AL RN

Fecha: ...../...../.....

Hemograma: Bcos: /mm <sup>3</sup>	Neut: %	Eos: %	Bas: %	Linf: %	Plaq: /mm <sup>3</sup>
Hematíes: /mm <sup>3</sup>	Hto.: %	Hb: g%			
Bb: .....	TGP: ..... mU/ml	TGO: ..... mU/ml	γGT: ..... mU/ml	FOH: ..... mU/ml	
MO: .....					
Incompatibilidad sanguínea: NOSI	Fecha:...../...../.....	Resultados: .....			
Otros estudios hematológicos: .....					
Ecografías : NO SI	Fecha: ...../...../.....	Resultado: .....			
Ecocardiograma : NO SI	Fecha: ...../...../.....	Resultado: .....			
Estudios Genéticos:NO SI	Fecha: ...../...../.....	Resultados: .....			
Estudios Microbiológicos: NO SI	Fecha: ...../...../.....	Rubéola: .....	CMV: .....	HIV: .....	
VZV: .....	EBV: .....	Toxo: .....	Sífilis: .....	Sarampión: .....	HBV : .....
Otros datos: .....					

EPIDEMIOLOGIA DEL RN

Contacto con enfermos con exantema: NO SI	Lugar: .....	Fecha: ...../...../.....
Recibió transfusiones: NO SI.....		Fecha: .. /...../.....
Recibió Inmunoglobulinas: NO SI .....		Fecha: .. /...../.....
Vacunas : NO SI Cuáles? .....		Fecha: .. /...../.....
Inmunosuprimido: NO SI Causa:.....		Fecha: .. /...../.....
Otras Observaciones: .....		Fecha: .. /...../.....
Otros datos de interés: .....		

TRATAMIENTO DEL RN

Gammaglobulinas: NO SI Cuál? .....	Fecha: ...../...../.....
Nº dosis: .....	Última dosis: ...../...../.....
Transfusiones: NO SI Cuantas? .....	Fecha de Última: ...../...../.....
Antivirales: No SI Cual? .....	Fecha: ...../...../.....
Otra medicación: .....	
Desde: ...../...../.....	Hasta: ...../...../.....
Observaciones: .....	

Firma y sello de Médico responsable

9.2 Anexo 2. Modelo de Informe.



"2012-Año de Homenaje al Dr. D. Manuel Belgrano"

**Ministerio de Salud**  
 Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos  
 ADMINISTRACION NACIONAL  
 DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD  
 "DR. CARLOS G. MALBRAN"

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

FECHA DE RECEPCION:	PROCOLO NRO:
SOLICITADO POR:	NOMBRE Y APELLIDO DEL PACIENTE:
Dr/a/s :	
Hospital:	EDAD: SEXO: TEL:
Servicio:	DOMICILIO:
Tel/Fax:	MATERIAL DE ESTUDIO:
Ciudad:	REMITIDO
ESTUDIO PARA:	Nro DE ESTUDIO(1ro, 2do, ETC):

RESULTADOS OBTENIDOS:

<p><b><u>E.L.I.S.A.- Detección de anticuerpos.</u></b>                  anti-CMV-IgM:                  anti-CMV-IgG:                  anti-Rubéola-IgM:                  anti-Rubéola-IgG:                  anti-Parvovirus Humano B19-IgM:                  anti-Parvovirus Humano B19-IgG:</p>	<p><b><u>PCR-Reacción en cadena de la polimerasa.</u></b>                  Material:                  •n-RT-PCR-Rubéola:                  •n-PCR-CMV:                  •n-PCR-VZV:                  •n-PCR-HHV-6:                  •n-PCR-HSV1:                  •n-PCR-HSV2:                  •n-PCR-Parvovirus Humano B19:</p>
<p><b><u>PCR-Reacción en cadena de la polimerasa.</u></b>                  Material:                  •n-RT-PCR-Rubéola:                  •n-PCR-CMV:                  •n-PCR-VZV:                  •n-PCR-HHV-6:                  •n-PCR-HSV1:                  •n-PCR-HSV2:                  •n-PCR-Parvovirus Humano B19:</p>	<p><b><u>Intento de aislamiento.</u></b>                  Material:                  Línea celular: Fibroblastos humanos de prepucio (PTP).                  Resultado:                   Virus aislado:                  Confirmado por:</p>

OBSERVACIONES:

FIRMA Y SELLO

SERVICIO DE VIROSIS CONGENITAS PERINATALES Y DE TRANSMISION SEXUAL

### 9.3 Anexo 3. Cuaderno de ELISAS.

Es un cuaderno rubricado para registrar todos los ELISAS que se realizan en el laboratorio de VP.

Se anota la fecha, el nombre del Operador, el anticuerpo que se va a detectar con el ELISA, el equipo que se usa.

El análisis requiere que se registre el estado de los sueros: Hemolizado, ligeramente hemolizado, icterico, etc.

Cada tira tiene 8 pocillos y se enumera del 1-8 del 9-16, etc., según la cantidad de tiras que se usen. Los primeros 2 Controles se hacen en la primera tira y el duplicado del Control Positivo se hace después de la última muestra siembra.

Pocillo	Nombre de la Muestra	Estado del Suero *	Resultado
1	Control Positivo		
2	Control Negativo		
3	Muestra 1		
4	Muestra 2		
5	Muestra 3		
6	Muestra		
7	Muestra 5		
8	Control Positivo (duplicado)		

\* Ligeramente hemolizado/ Hemolizado/ Ictérico/ Normal

Los resultados impresos que da el lector de placas se adjuntan en la hoja.

