



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN CONTROL
POSITIVO AL GEN *NSP3* PARA EL
DIAGNÓSTICO DE ROTAVIRUS GRUPO A**

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A

Yessica Berenice López Vázquez

ASESOR DE TESIS

D. en C. Sergio Isaac de la Cruz Hernández

COASESOR DE TESIS

D. en C. María Eugenia Aranda Barradas



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



UNAM
CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Diseño y aplicación de un control positivo al gen NSP3 para el diagnóstico de Rotavirus Grupo A.

Que presenta la pasante: **Yessica Berenice López Vázquez**

Con número de cuenta: 312057563 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Agosto de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Bertha Ortiz Vázquez	
VOCAL	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	
SECRETARIO	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Rubén Roberto González Fernández	
2do. SUPLENTE	Dr. Samuel Álvarez Almazán	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

DEDICATORIAS

A mis padres Bertha y Javier por su apoyo, amor, dedicación, esfuerzo, educación y confianza, porque todo lo que soy y todo lo que he logrado ha sido gracias a ellos, gracias por creer en mí y en que lograría esto, espero que cuando vean esto se sientan tan orgullosos de mí como yo me siento de ustedes.

A mi hermana Brenda, por ser mi compañera porque juntas hemos enfrentado los buenos y los malos momentos, por creer en mí y por animarme todos los días a creer en mí, eres mi inspiración más grande y estoy muy orgullosa de ti y de todo lo que haz logrado, confía siempre en ti y en tus conocimientos, estoy segura de que serás la mejor ingeniera civil y que destacarás en cualquier ámbito porque eres inteligente y determinada.

A mis abuelos Teresa y Gregorio por su apoyo y amor, por cuidar de mí, por los consejos y por las palabras de ánimo en los momentos difíciles. Tere eres una segunda mamá para mí, gracias por todo el tiempo y amor que haz invertido en mí, nunca podre agradecértelo lo suficiente.

A mis amigas Sulem y Montserrat por brindarme su increíble e incondicional amistad, por su apoyo, esfuerzo y dedicación, por motivarme y creer en mí porque todas esas pequeñas cosas que hicieron por mí durante la carrera contribuyeron de una u otra forma a que pudiera terminarla, estoy muy orgullosa de ustedes y estoy muy feliz de haber concluido esta etapa junto a ustedes, confío en que cada una lograra cualquier reto que se proponga porque son mujeres inteligentes y capaces, jamás duden de ustedes.

A mi asesor, el D en C. Sergio Isaac De la Cruz Hernández por confiar en mí para realizar este trabajo, por la paciencia y las enseñanzas, por sus consejos y su apoyo, agradezco profundamente el tiempo y el conocimiento que compartió conmigo, porque eso me permitió concluir con este trabajo y me hizo confiar en mí misma como profesionalista.

A mi asesora, la D en C. María Eugenia Aranda Barradas por su tiempo, sus consejos y recomendaciones para mejorar este trabajo, así como por ser parte de mi formación como profesional

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme realizar mis estudios de licenciatura en sus instalaciones y a mis profesores por formarme.

A todos los que estuvieron de alguna u otra manera presentes durante este camino, gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la D en C. Herlinda García Lozano por permitir que este trabajo se realizara en las instalaciones del Laboratorio de Virus Gastrointestinales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) bajo la dirección del D en C. Sergio Isaac de La Cruz Hernández.

Al D en C. Fabian Gómez Santiago por todo el apoyo recibido, no solo durante la realización de este trabajo, también durante la realización de mi servicio social, por sus consejos y recomendaciones, por compartir su experiencia y conocimiento conmigo.

Al personal del laboratorio de virus gastrointestinales; a la M en C. Atenea , la QFB. Lizbeth, la D en C. Yazmin, así como a los TL. Héctor y Angelina por permitirme aprender de ellos, por los consejos y conocimientos que me dieron para mi formación profesional, y por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia muy agradable.

Al personal del Laboratorio de Transferencia de Métodos Moleculares y al Laboratorio de Genoma de Patógenos del InDRE por los servicios prestados para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.2. ROTAVIRUS (HRVs)	3
2.2.1. ESTRUCTURA Y GENOMA VIRAL	4
2.2.1.1. PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 3 (NSP3)	5
2.2.2. CLASIFICACIÓN.....	6
2.3. EPIDEMIOLOGÍA	7
2.3.1. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA EDA POR ROTAVIRUS A NIVEL MUNDIAL	7
2.3.2. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA POR ROTAVIRUS EN MÉXICO.....	8
2.4. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL ROTAVIRUS EN MÉXICO	9
2.4.1. SISTEMA ESPECIAL DE VIGILANCIA CENTINELA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA CAUSADA POR ROTAVIRUS A TRAVÉS DE LOS NÚCLEOS TRAZADORES DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (NuTraVe)	10
2.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	11
2.5.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)	12
2.5.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	13
2.5.3. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	14
2.5.4. RETROTRANSCRIPCIÓN ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE PUNTO FINAL (RT-PCR).....	16
2.5.5. RETROTRANSCRIPCIÓN ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR).....	19
2.6. CONTROLES EN LOS ENSAYOS DE RT-PCR.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. OBJETIVO GENERAL	24
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	24

4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	25
4.2. SELECCIÓN DE MUESTRAS	25
4.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	25
4.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	25
4.3. DISEÑO Y OBTENCIÓN DEL CONTROL POSITIVO AL GEN <i>NSP3</i> DE ROTAVIRUS GRUPO A 26	
4.3.1. ENSAYO DE COMBINACIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y SONDAS DE LOS PROTOCOLOS DE JOTHIKUMAR ET AL. Y FREEMAN ET AL. PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs DEL GRUPO A AL GEN <i>NSP3</i> POR RT-qPCR CON LA SECUENCIA DEL GEN <i>NSP3</i>	26
4.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR DE PUNTO FINAL AL GEN <i>NSP3</i> PARA LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN QUE CONTIENE LA SECUENCIA SELECCIONADA PARA SER UTILIZADA COMO CONTROL POSITIVO	27
4.3.2.1. INICIADORES Y CONDICIONES DE REACCIÓN	27
4.3.3. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO CON LA SECUENCIA DEL GEN <i>NSP3</i> PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO.....	29
4.4. VERIFICACIÓN DE LA RT-qPCR AL GEN <i>NSP3</i> PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs DEL GRUPO A USANDO EL CONTROL POSITIVO OBTENIDO.....	31
4.4.1. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MATERIA FECAL.....	31
4.4.2. INICIADORES, SONDAS Y CONDICIONES DE REACCIÓN	31
4.4.3. APLICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO EN LA VERIFICACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE JOTHIKUMAR ET AL. (2009) Y FREEMAN ET AL. (2008) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs GRUPO A POR RT-qPCR AL GEN <i>NSP3</i>	33
4.4.3.1. LINEALIDAD Y EFICIENCIA	33
4.4.3.2. SENSIBILIDAD ANALÍTICA.....	34
4.4.3.3. INTERVALO REPORTABLE Y LÍMITE DE DETECCIÓN	34
4.4.3.4. PRECISIÓN.....	34
4.4.3.5. PRUEBA DE <i>t</i> PAREADA.....	35
4.4.3.6. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA.....	35
4.4.3.7. EXACTITUD DIAGNÓSTICA	36
4.4.3.8. VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN)	37
4.4.3.9. TASAS DE FALSOS POSITIVOS Y TASA DE FALSOS NEGATIVOS	37
4.4.3.10. ÍNDICE KAPPA	37
4.4.3.11. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA.....	38
5. RESULTADOS	38

5.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	38
5.2.	ENSAYO DE COMBINACIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y LAS SONDAS DE LOS PROTOCOLOS DE JOTHIKUMAR Y FREEMAN CON LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN <i>NSP3</i>	40
5.3.	ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR DE PUNTO FINAL AL GEN <i>NSP3</i> PARA LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN QUE CONTIENE LA SECUENCIA SELECCIONADA PARA SER UTILIZADA COMO CONTROL POSITIVO	42
5.3.1.	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2%	42
5.4.	OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO CON LA SECUENCIA SELECCIONADA PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO.....	43
5.5.	EVALUACIÓN DEL CONTROL POSITIVO EN LA VERIFICACIÓN DE LA RT-qPCR AL GEN <i>NSP3</i> PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs GRUPO A	45
5.5.1.	LINEALIDAD Y PORCENTAJE DE EFICIENCIA.....	50
5.5.2.	SENSIBILIDAD ANÁLITICA	50
5.5.3.	INTERVALO REPORTABLE Y LÍMITE DE DETECCIÓN	50
5.5.4.	PRECISIÓN	53
5.5.5.	PRUEBA DE <i>t</i> PAREADA	54
5.5.6.	SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA	55
5.5.7.	VALOR PREDICTIVOS POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	56
5.5.8.	TASAS DE FALSOS POSITIVOS Y TASA DE FALSOS NEGATIVOS	56
5.5.9.	EXACTITUD DIAGNÓSTICA.....	56
5.5.10.	ÍNDICE KAPPA	56
5.5.11.	ESPECIFICIDAD ANALÍTICA	56
6.	DISCUSIÓN	60
7.	CONCLUSIONES	69
8.	LIMITACIONES DEL TRABAJO	70
9.	PERSPECTIVAS	70
	REFERENCIAS	72
	ANEXOS	82
1.	DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA.....	82
2.	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	82
3.	SECUENCIA FASTA DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN CON LA SECUENCIA A UTILIZAR COMO CONTROL POSITIVO PROPORCIONADA POR EL LABORATORIO DE GENOMA DE PATOGENOS PREVIO A LA CLONACIÓN.....	83
4.	NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO EN LA BASE DE DATOS GenBanK ..	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apariencia al microscopio electrónico del rotavirus	4
Figura 2. Estructura del rotavirus	5
Figura 3. Casos e incidencias de la diarrea por rotavirus, México 2000-2020	9
Figura 4. Procedimientos de vigilancia centinela de diarrea por rotavirus	11
Figura 5. Partículas virales de rotavirus observadas a través de microscopía electrónica	12
Figura 6. Patrones de migración electroforética de los 11 segmentos del genoma de rotavirus en gel de poliacrilamida al 5% teñido con nitrato de plata	13
Figura 7. Imagen de un gel de PAGR que muestra los diferentes patrones de migración de los segmentos de los grupos A, B y C de rotavirus.....	14
Figura 8. Esquema de un ELISA tipo sandwich	15
Figura 9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
Figura 10. Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	18
Figura 11. Ejemplo de un gráfico de amplificación.....	21
Figura 12. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores y las sondas descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) con la secuencia del gen NSP3	40
Figura 13. Alineamiento de las secuencias de los iniciadores JVKF y NVP3-R1, y las sondas JVKP y NVP3-Probe descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) con la secuencia del gen NSP3	41
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.....	43
Figura 15. Mapa del vector de clonación pDrive de Qiagen	45
Figura 16. Curva estándar para el protocolo de Jothikumar et al. (2009)	47
Figura 17. Curva estándar para el protocolo de Freeman et al. (2008).....	49

Figura 18. Gráfico de amplificación de la curva estándar del protocolo de Jothikumar et al. (2009)	51
Figura 19. Gráfico de amplificación de la curva estándar del protocolo de Freeman et al. (2008)	52
Figura 20. Gráfico de amplificación del ensayo de especificidad analítica del protocolo de Jothikumar et al. (2009)	57
Figura 21. Gráfico de amplificación del ensayo de especificidad analítica del protocolo de Freeman et al. (2008)	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores y sondas para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen NSP3 de los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008)	26
Tabla 2. Protocolo de amplificación propuesto para RT-PCR de punto final al gen NSP3 para la obtención del producto con la secuencia a utilizar como control positivo.....	28
Tabla 3. Mezclas de reacción propuestas para realizar la RT-PCR de punto final al gen NSP3 para la obtención del producto de amplificación con la secuencia a usar como control positivo.	28
Tabla 4. Protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen NSP3.	32
Tabla 5. Mezclas de reacción de los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen NSP3.	32
Tabla 6. Tabla de contingencia para la evaluación del método de prueba con los resultados obtenidos por el método de referencia.	35
Tabla 7. Muestras positivas y negativas empleadas en este trabajo.	39
Tabla 8. Resultados de los CT de las diluciones seriadas del control positivo de la curva estándar para el protocolo de Jothikumar et al. (2009).....	46
Tabla 9. Resultados de los CT de las diluciones seriadas del control positivo de la curva estándar para el protocolo de Freeman et al. (2008)	48
Tabla 10. Intervalos en concentración de copias de genoma de rotavirus y ecuación de la curva estándar de los protocolos de Jothikumar et al.(2009) y Freeman et al. (2008).....	50
Tabla 11. Valores de CT obtenidos de control positivo en la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) en los ensayos de repetibilidad.	52

Tabla 12. Valores de CT obtenidos del control positivo en la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) en los ensayos de reproducibilidad.	53
Tabla 13. Muestras positivas y negativas a HRVs grupo A detectadas por RT-PCR de punto final al gen VP6 y por RT-qPCR al gen NSP3 por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008)	54
Tabla 14. Tabla de contingencia para el protocolo de Jothikumar et al. (2009)	55
Tabla 15. Tabla de contingencia para el protocolo de Freeman et al. (2008).....	55
Tabla 16. Parámetros de verificación de la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la evaluación del desempeño del control positivo	59
Tabla 17. Parámetros de verificación de la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la aplicación del control positivo obtenido.....	60

ABREVIATURAS

AdV: Adenovirus

DGE: Dirección General de Epidemiología

DNA: Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)

dNTP: Nucleosído trifosfato

EDA: Enfermedad diarreica aguda

eIF4G: Factor de iniciación de la traducción

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ídem)

ema: entidad mexicana de acreditación a.c.

GastroLab: Laboratorio de Investigación de Enfermedades Gastrointestinales

HAstrV: Astrovirus

HRVs: Rotavirus humano

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (ídem)

LVGI: Laboratorio de Virus Gastrointestinales

ME: Microscopia electrónica

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (idem)

NoV: Norovirus

NSP: Proteína viral no estructural (ídem)

NuTraVe: Núcleos Trazadores de Vigilancia Epidemiológica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PABP: Proteína de unión a poli(A)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (ídem)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (ídem)

RNA: Ácido ribonucleico (ídem)

RNLSP: Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

RT-PCR: Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (ídem)

RT-qPCR: Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
(ídem)

SaV: Sapovirus

SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

TAMM: Laboratorio de Transferencia de Métodos Moleculares

TRO: Terapia de rehidratación oral

VP: Proteína viral estructural (ídem)

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Los rotavirus humanos (HRVs) del grupo A son los principales agentes virales asociados a la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años en todo el mundo. Aunque la vacunación ha reducido la mortalidad asociada a la EDA, esta sigue siendo un problema importante de salud pública. Actualmente, el diagnóstico de HRVs se realiza mediante técnicas como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y la retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa de punto final (RT-PCR, por sus siglas en inglés) y en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés); ésta última proporciona los mismos resultados que la RT-PCR de punto final, pero en un menor tiempo (Buesa et al, s.f; Sociedad Española de Epidemiología, 2007; Balasobre y Alarcón, 2017).

Los controles son un componente esencial en las reacciones de RT-PCR, ya que garantizan la interpretación de los resultados. En ensayos de RT-qPCR, también permiten la cuantificación de la carga viral de la muestra. Se pueden utilizar controles comerciales u obtener controles a partir de la caracterización y secuenciación de muestras clínicas, a través del cultivo celular y de la clonación en plásmido. La clonación en plásmidos ofrece algunas ventajas en comparación con las otras técnicas. Por un lado, permite obtener un control para un gen específico y una vez realizada la clonación, es posible obtener alícuotas de este control cuando sea necesario; además, resulta más económico que adquirir un control comercial (Rodríguez et al, 2008; Acevedo et al, 2009).

Por lo que en este trabajo se planteó el diseño y la obtención de un control positivo para el gen *NSP3* mediante la clonación en plásmido para el diagnóstico de HRVs grupo A por RT-qPCR utilizando los protocolos descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008).

Para la obtención del control positivo, se llevaron a cabo ensayos de combinación y alineamiento de las secuencias de los iniciadores descritos en los protocolos mencionados con la

secuencia del gen *NSP3*. Se estandarizó una reacción de RT-PCR de punto final para obtener el producto de amplificación con la secuencia a utilizar como control, el cual fue enviado al Laboratorio de Transferencia de Métodos Moleculares (TAMM) del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”(InDRE) para su clonación.

El control positivo obtenido, se probó en la verificación de la RT-qPCR para la identificación de HRVs grupo A utilizando los dos protocolos mencionados. Se compararon los resultados obtenidos por RT-qPCR al gen *NSP3* con los resultados obtenidos por RT-PCR de punto final al gen *VP6*.

Los resultados demostraron que el control positivo amplificó en ambos protocolos de RT-qPCR, con valores de ciclo umbral (CT, por sus siglas en inglés) dentro del intervalo de 7.0 a 7.68. Además, los resultados obtenidos por RT-qPCR al gen *NSP3* fueron concordantes con los resultados obtenidos por RT-PCR de punto final al gen *VP6*.

En conclusión, el control positivo resulta útil para el diagnóstico de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen *NSP3* siguiendo cualquiera de los dos protocolos mencionados, obteniéndose resultados similares. Además, se encontró que la RT-qPCR al gen *NSP3* es tan sensible y específica como la RT-PCR de punto final al gen *VP6* para la identificación de HRVs grupo A, demostrando que es un método que podría implementarse en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública en México (RNLSP).

1. INTRODUCCIÓN

Los rotavirus (HRVs) del grupo A son los principales agentes virales asociados a la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años en todo el mundo (Sociedad Española de Epidemiología, 2007).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se reportan millones de casos de EDA alrededor del mundo asociados a los rotavirus y la mayoría de las muertes ocurren en países en vías de desarrollo. Si bien, la implementación de la vacuna ha disminuido la mortalidad asociada a la EDA. Esta sigue representando un problema importante de salud pública; por lo que es crucial contar con métodos de diagnóstico que sean confiables y seguros pero que también generen la información necesaria de manera oportuna y confiable (Sadiq et al, 2018; Meier, 2021).

Actualmente, el diagnóstico de HRVs se hace mediante técnicas antígeno anticuerpo como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y mediante métodos moleculares como la retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), ya sea de punto final o en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés). Esta última ha resultado ser una metodología tan sensible y específica como la RT-PCR de punto final, con la ventaja de que proporciona la información en un menor tiempo (Tamay de Dios et al, 2013; De La Cruz et al, 2018).

Los controles son esenciales en los ensayos de RT-PCR, debido a que garantizan la interpretación de los resultados. Si bien, los controles positivos pueden comprarse o pueden obtenerse por técnicas como el cultivo celular, la caracterización y secuenciación de muestras clínicas y la clonación a través de un plásmido. Esta última posee ventajas sobre las técnicas anteriores, debido a que es más económico que comprar un control comercial; además, se puede obtener un control positivo para un gen en específico si así se desea y en ensayos de RT-qPCR, permite la cuantificación de la muestra (Rodríguez et al, 2008; Acevedo et al, 2009; Tamay de Dios, 2013).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA (EDA)

La enfermedad diarreica aguda (EDA) se define como la disminución en la consistencia de las heces y/o el aumento en la frecuencia de evacuaciones. La enfermedad suele durar en promedio siete días y no más de catorce (Reyes et al, 2018).

El principal agente involucrado en casos de EDA de origen vírico es el rotavirus (HRVs), siendo la ruta fecal-oral su principal ruta de transmisión. También se ha especulado que el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión directa, dado que el virus es estable en el medio ambiente. De manera indirecta la transmisión puede ser a través de alimentos, agua, utensilios, etc. (López y Arias, 2001; Nates, 2015; Enfermedades, 2021).

Las infecciones por HRVs son generalmente asintomáticas en pacientes neonatos y adultos, posiblemente por la inmunidad adquirida pasiva y activa, respectivamente. Sin embargo, estos dos grupos de la población son importantes reservorios para la transmisión del virus a hospedadores que sean susceptibles, que en su mayoría son niños menores de cinco años, en los que la infección es en general, sintomática (Nates, 2015).

Entre los principales síntomas que ocasiona la infección por HRVs se encuentra el vómito, seguido de diarrea mucoide con presencia de restos de leche, con más de ocho evacuaciones al día en las que puede o no haber fiebre ($37.8^{\circ}\text{C} - 39^{\circ}\text{C}$), dolor abdominal y deshidratación (Reyes et al, 2018).

Debido a que la deshidratación severa es el principal síntoma asociado a la gran mortalidad de la EDA, la recomendación principal en el tratamiento de este padecimiento es rehidratar al menor. El término deshidratación se emplea para designar a la pérdida consecutiva de agua y solutos. Para la deshidratación leve y moderada se recomienda la terapia de rehidratación oral, también llamada TRO; y para la

deshidratación severa se recomienda la hidratación intravenosa. A más de cinco décadas de los primeros reportes del uso de la TRO en México por Larracilla en el Hospital Infantil de México, esta sigue siendo el tratamiento principal para el manejo de la EDA (Revilla, 2009; Centros para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2023).

La distribución de esta virosis es universal. La incidencia de la EDA por rotavirus es similar en los países desarrollados y en los que están en desarrollo, donde aproximadamente un tercio de las gastroenteritis severas son atribuibles al rotavirus, sin embargo, el 80% de las muertes por EDA suelen ocurrir en estos últimos (Revilla, 2009).

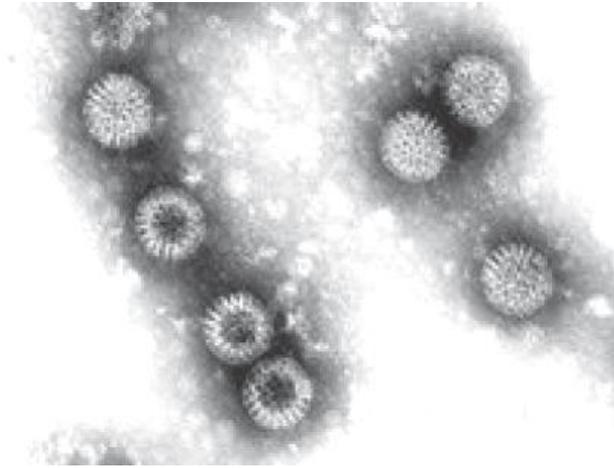
En países de clima templado, las infecciones por rotavirus predominan en invierno, mientras que en los países tropicales los casos suelen ocurrir durante todo el año, aunque pueden detectarse picos más altos en invierno (Revilla, 2009).

2.2. ROTAVIRUS (HRVs)

El rotavirus fue inicialmente descrito en 1973 por Ruth Bishop y sus colaboradores en Australia, quienes describieron “partículas virales” al observar al microscopio electrónico biopsias del intestino delgado de niños con diarrea severa de origen no bacteriano. Con base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico era de una rueda de carreta antigua (Figura 1), fueron nombrados rotavirus, del latín *rota*, que quiere decir rueda (Tamayo y Moreno, 2007).

Figura 1

Apariencia al microscopio electrónico del rotavirus



Nota. Se puede observar la forma de “rueda de carreta” característica del virus. Tomada de Tamayo y Moreno (2007) (http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1652-67762007000100017&lng=es&tlng=es.)

2.2.1. ESTRUCTURA Y GENOMA VIRAL

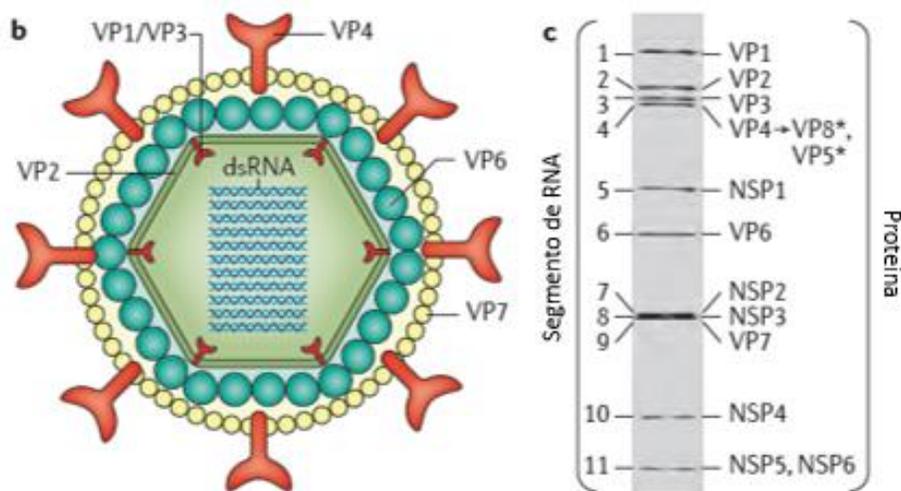
El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y es un virus desnudo de doble cadena de RNA (dsRNA) que tiene una arquitectura compleja de tres cápsides concéntricas que rodean un genoma de 11 segmentos de dsRNA. Los segmentos codifican seis proteínas virales estructurales o VP, por sus siglas en inglés, (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales o NSP, por sus siglas en inglés, (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) (Crawford et al, 2017).

Las proteínas no estructurales están involucradas en la replicación del genoma viral (NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 y NSP6) y en antagonizar la respuesta inmune innata (NSP4), mientras que las proteínas estructurales determinan la especificidad del hospedero y la entrada a la célula. La capa más interna del virón está formada por la proteína VP2 y por pequeñas cantidades de las proteínas VP1 (la RNA polimerasa) y VP3 (la guanililmetil transferasa). En conjunto, el RNA del virus y las proteínas VP1, VP2 y VP3 forman el núcleo o *core* viral; alrededor de este se localiza la proteína VP6, que forma la capa intermedia del virus, y

sobre esta se ensambla la capa más externa del virión, formada por la glicoproteína VP7, de la cual se proyectan 60 espículas constituidas por VP4, la proteína de unión a la célula. Esta proteína se escide con tripsina, lo que da como resultado dos polipéptidos de menor peso molecular, VP5 y VP8, que forman parte de la partícula infecciosa. Las proteínas VP4 y VP7 contienen determinantes antigénicos que inducen la formación de anticuerpos neutralizantes (Figura 2) (López y Arias, 2019).

Figura 2

Estructura del rotavirus



Nota. A la izquierda, se observa el corte transversal del rotavirus donde se pueden apreciar las tres capas que lo conforman y las proteínas. A la derecha, se puede observar el patrón de migración electroforética de los 11 segmentos del genoma y que proteína codifica cada uno. Tomada y modificada de Crawford et al. (2017) (<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>)

2.2.1.1. PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 3 (NSP3)

La proteína no estructural 3 (NSP3, por sus siglas en inglés) esta codificada por el segmento 8 de los HRVs. Tiene una longitud de 1066 pares de bases (pb) con regiones no traducidas de 25 y 131

nucleótidos en 5' y 3', respectivamente y codifica para una proteína de 315 aminoácidos (Contreras y Padilla, 2018).

La proteína NSP3 está involucrada en los procesos de replicación viral. Se ha propuesto a la proteína NSP3 como un regulador a nivel traduccional de la expresión génica de los HRVs, debido a su capacidad para estimular la traducción viral e inhibir la síntesis de proteínas (Contreras y Padilla, 2018).

Durante el ciclo replicativo de los HRVs, que ocurre en el citoplasma celular; los RNA mensajeros virales son sintetizados dentro de la partícula viral por la proteína VP1. Los transcritos de los HRVs poseen en el extremo 5' una estructura tipo *cap* similar a la de los mensajeros celulares, mientras que en el extremo 3' no tiene poliadenilación y en su lugar posee una secuencia conservada (UGACC) en todos los genes de HRVs que es reconocida por NSP3 (Contreras y Padilla, 2018).

El extremo amino terminal de NSP3 (NSP3-N) reconoce la secuencia conservada UGACC presente en la región 3' terminal de los RNA mensajeros de HRVs. Mientras que, el extremo carboxilo terminal de NSP3 (NSP3-C) interactúa con el factor de iniciación de la traducción (eIF4G) evitando así que la proteína de unión a poli(A) (PABP) sea reclutada en los complejos traduccionales (Contreras y Padilla, 2018).

Esta unión de eIF4G hacia NSP3 favorece la traducción de RNA mensajeros virales y al mismo tiempo inhibe la traducción celular debido a que inhibe la circularización de los extremos 5'-3' de los RNA mensajeros celulares que esta mediada por eIF4G-PABP (Contreras y Padilla, 2018).

2.2.2. CLASIFICACIÓN

El rotavirus incluye diez grupos (especies) designadas con letra mayúscula de la A a la J, clasificados con base en diferencias antigénicas en la proteína VP6, la cual es la más abundante del virus. Los rotavirus del grupo A, B y C infectan a los humanos, siendo los del grupo A los agentes etiológicos más importantes de diarrea aguda en niños menores de 5 años en todo el mundo, ya que son responsables de un tercio de los casos de diarrea severa que requieren hospitalización. Se ha reportado que los rotavirus del grupo B

han producido brotes epidemiológicos de diarrea en adultos en China, e infecciones esporádicas en países asiáticos; mientras que los del grupo C, rara vez están implicados en la etiología de la diarrea (Nates, 2015; Bautista et al, 2020).

A su vez, el grupo A se subclasifica en genotipos G y P, con base en la secuencia de los genes que codifican para la glicoproteína VP7 (para genotipos G) y la proteína sensible a la proteasa VP4 (para genotipos P), lo que ha dado lugar a un sistema de clasificación dual. Hasta ahora, se han identificado 27 genotipos G y 37 genotipos P; aunque las combinaciones más prevalentes en el mundo son G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8] (López y Arias, 2019; Mousavi-Nasab, et al, 2020).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

En países industrializados la EDA viral es una de las enfermedades más comunes en todos los grupos de edad, y una causa importante de morbilidad; prácticamente cada habitante padecerá uno o más episodios de EDA viral al año (Sociedad Española de Epidemiología, 2007.).

Además de los rotavirus, la EDA de origen viral es causada por otros virus gastrointestinales tales como calicivirus, como norovirus (NoV) y sapovirus (SaV), astrovirus (HAstrV), adenovirus (AdV), etc. En la actualidad, como ya se ha mencionado, el agente viral más frecuentemente encontrado en niños menores de 5 años con EDA son los HRVs del grupo A, el segundo agente son calicivirus (NoV y SaV) y el tercer lugar son HAstrV y AdV (Sociedad Española de Epidemiología, 2007).

2.3.1. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA EDA POR ROTAVIRUS A NIVEL MUNDIAL

La infección por HRVs es a nivel mundial, la primera causa de morbilidad en países desarrollados y la segunda causa de muerte, donde la mayoría de las muertes ocurren en países en vías de desarrollo, debido a que no se cuenta con los recursos y la atención médica adecuada para mitigar los síntomas asociados a la mortalidad, como lo son la deshidratación y la malnutrición (Gómez et al, 2020; Meier, 2021).

Cada año, la infección por rotavirus causa aproximadamente 450 000 muertes, más de 2 millones de hospitalizaciones y 25 millones de casos ambulatorios, según reportes de la OMS (Sadiq et al, 2018).

Desde que se implementó la vacuna contra rotavirus en el 2006 en más de 100 países, se han disminuido un 36% los casos de mortalidad y un 60% las hospitalizaciones de EDA asociada a HRVs; sin embargo, sigue siendo una de las principales causas de enfermedad asociada, principalmente, a niños menores de cinco años en todo el mundo (Meier, 2021).

2.3.2. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA POR ROTAVIRUS EN MÉXICO

En México, la EDA por HRVs sigue siendo una de las principales causas de enfermedad y defunción en niños menores de cinco años, sobre todo en menores de un año donde se presentan las tasas de infección más altas. Sin embargo, gracias a la aplicación de la vacuna contra HRVs, se ha reducido la morbilidad y la mortalidad, así como las hospitalizaciones por esta infección; aunque, como se ha mencionado, sigue siendo una de las principales causas de enfermedad, por lo que la vigilancia epidemiológica resulta importante (López et al; 2021).

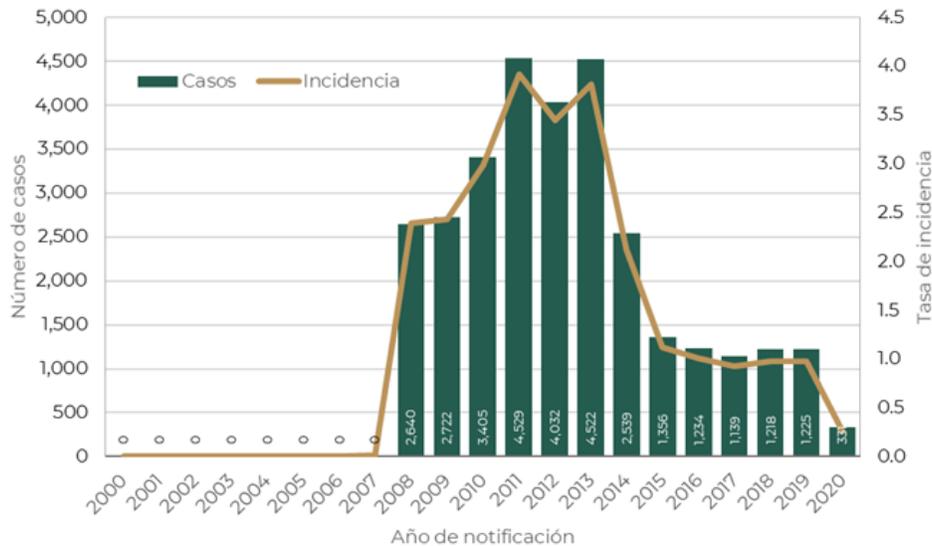
La vigilancia de HRVs se inició a partir del año 2008 y para el 2011 hubo un incremento del 71% en los reportes, lo que representó una tasa de incidencia de 3.9 por cada 100 000 habitantes (Dirección General de Epidemiología [DGE], 2022).

De 2013 a 2019 disminuyó la notificación de casos en un 73.1% en comparación con lo que se reportó en 2011, año en el que se alcanzó el pico máximo. La incidencia en 2019 fue de 1 caso por cada 100 000 habitantes (Figura 3) (DGE, 2022).

En 2020 se reportaron únicamente 331 casos, quizás porque la vigilancia se enfocó en la pandemia por COVID19 que apareció en México a inicios del año (DGE, 2022).

Figura 3

Casos e incidencias de la diarrea por rotavirus, México 2000-2020



Nota. Tomada de manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la EDA (2022).

(https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/44_Manual_EDA_2022.pdf)

2.4. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL ROTAVIRUS EN MÉXICO

La vigilancia epidemiológica de la EDA tiene la finalidad de obtener datos sobre la morbilidad, mortalidad y los factores de riesgo asociados. Dichos datos se recopilan y se analizan para producir información relevante para la población. La vigilancia de la EDA resulta útil a la hora de tomar decisiones oportunas y adecuadas relacionadas con la prevención y el control de esta enfermedad. La vigilancia epidemiológica del HRVs en México se realiza a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), desarrollado por la Dirección General de Epidemiología (DGE) y el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), mediante la vigilancia centinela, a través de los Núcleos Trazadores de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVe). La vigilancia centinela es una vigilancia basada en instituciones o sitios designados que han sido seleccionados, ya sea por su ubicación geográfica, su especialidad médica o su capacidad para diagnosticar con precisión y reportar datos de alta calidad (Revilla, 2009; DGE, 2022).

Un componente esencial de la vigilancia epidemiológica es la identificación mediante pruebas de laboratorio de los agentes infecciosos asociados a enfermedades, que representan un riesgo a la población. Para ello, el SINAVE cuenta con el InDRE y la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP). La RNLSP es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que unifican los métodos diagnósticos, los criterios para la interpretación de resultados, la transferencia de técnicas y metodologías, la generación de conocimiento y la formación de recursos humanos que garanticen que los procedimientos técnicos y administrativos produzcan información útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos (DGE, 2022)

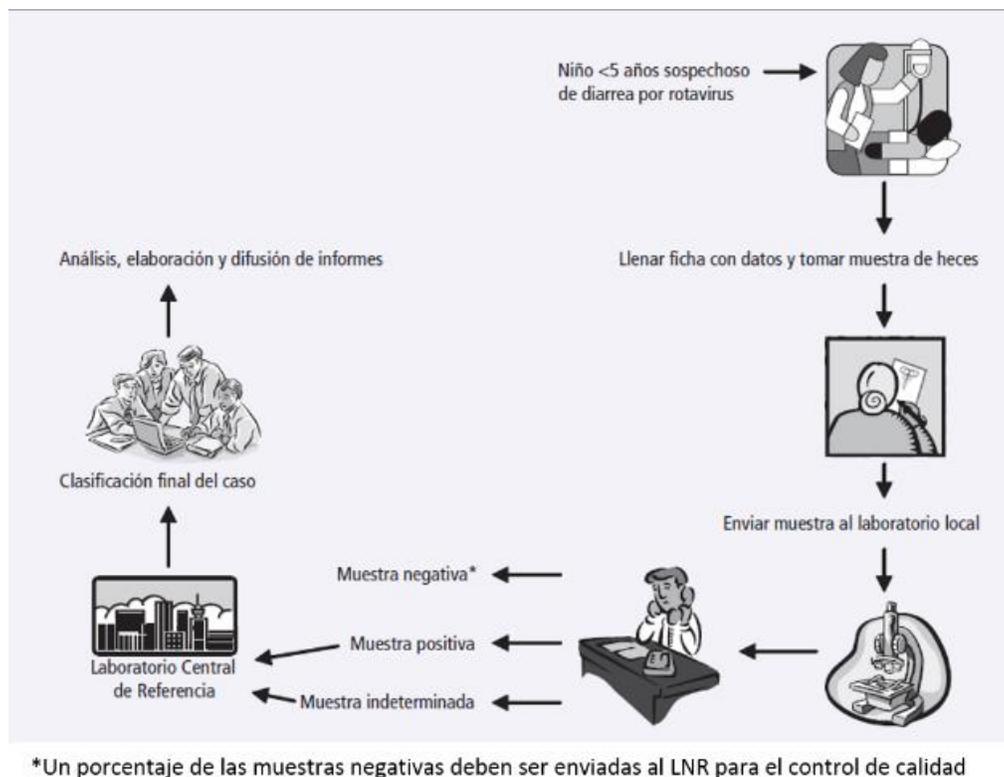
2.4.1. SISTEMA ESPECIAL DE VIGILANCIA CENTINELA DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA CAUSADA POR ROTAVIRUS A TRAVÉS DE LOS NÚCLEOS TRAZADORES DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (NuTraVe)

Los Núcleos Trazadores de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVe) constituye una estrategia de vigilancia epidemiológica centinela. Se realiza través de un enfoque sindromático y con la participación del laboratorio se identifica la circulación de agentes causales, en este caso, rotavirus. El NuTraVe, está conformado por conglomerados de unidades médicas centinela del segundo y tercer nivel de atención, un laboratorio de diagnóstico y una unidad coordinadora, que es la jurisdicción sanitaria. Estos están conectados mediante un sistema informático en tiempo real (SINAVE), que detecta, identifica y caracteriza oportunamente eventos de riesgo para la salud de la población, lo cual permite orientar las acciones de prevención y control (DGE, 2022).

El NuTraVe a través de este conjunto de unidades médicas, permite el diagnóstico y el reporte de datos, mediante métodos de recolección estandarizados que garantizan el intercambio de información que se genera (Figura 4) (DGE, 2022).

Figura 4

Procedimientos de vigilancia centinela de diarrea por rotavirus



Nota. Tomada de vigilancia de rotavirus de la Organización Panamericana de la Salud (2009). (<https://www.paho.org/es/temas/rotavirus>)

2.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

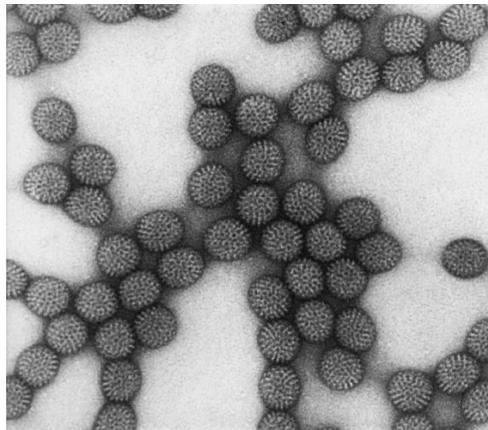
Actualmente, el diagnóstico de la EDA causada por HRVs se realiza principalmente mediante la detección de antígenos virales o por métodos moleculares basados en la detección de genes específicos. Entre los métodos más utilizados para el diagnóstico de rotavirus se encuentran la microscopía electrónica (ME), la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), el ELISA y la retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), ya sea de punto final o en tiempo real (RT-qPCR) (Buesa et al; s.f; Balasobre y Alarcón, 2017).

2.5.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

El HRVs puede ser fácilmente detectado por microscopia electrónica (ME) (Figura 5) cuando se encuentra en elevadas concentraciones en las heces, lo que con frecuencia ocurre en las personas infectadas que presentan sintomatología; aunque se estima que se requiere de 10^6 partículas virales por gramo de muestra para poder ser observadas. El procesamiento de la muestra no es complejo ni laborioso, en pocos minutos se puede realizar una tinción negativa y fácilmente se puede identificar al HRVs, debido a su morfología característica de “rueda de carreta”. Por esta razón, su principal ventaja radica en la facilidad para detectar al virus. No obstante, adquirir un microscopio electrónico resulta costoso y su mantenimiento implica un gasto económico significativo. Adicionalmente, se requiere de un espacio adecuado para su almacenamiento. Lo anterior, además de la necesidad de una carga viral alta para su detección, constituyen importantes desventajas en comparación con otras técnicas de diagnóstico (Buesa et al; s.f.).

Figura 5

Partículas virales de rotavirus observadas a través de microscopia electrónica



Nota. Se puede apreciar la morfología característica de “rueda de carreta”. Tomada de rotavirus y otros agentes virales de gastroenteritis (2008). (<https://www.microbiologybook.org/Spanish-Virology/spanish-chapter17.htm>)

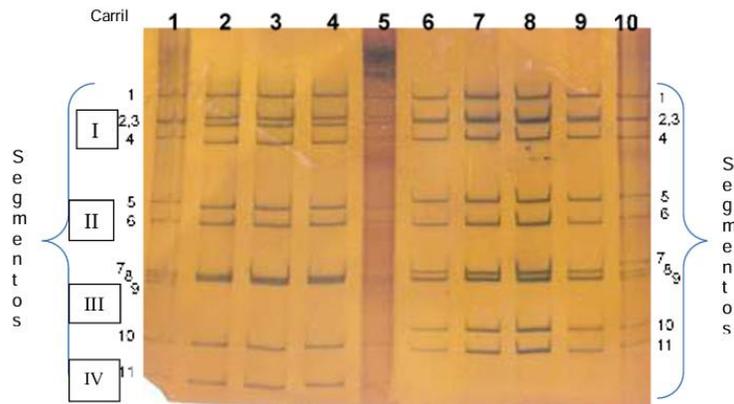
2.5.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Esta técnica tiene como propósito determinar la presencia del genoma de doble cadena de RNA (dsRNA) del rotavirus a partir de muestras fecales, debido a que es un método que permite separar los 11 segmentos de dsRNA bajo la influencia de un campo eléctrico utilizando como soporte al gel de poliacrilamida. Estos 11 segmentos migran a través del gel del ánodo al cátodo dependiendo de su carga y peso molecular (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos [InDRE], 2023).

La muestra se considera positiva si se observa la presencia de los 11 segmentos de RNA (Figura 6) o cualquiera de los segmentos que conforman el primer bloque (que posee 4 bandas), y se considera negativa cuando hay ausencia de los 11 segmentos de RNA o bien, la observación de segmentos inespecíficos no correspondientes al genoma de rotavirus (InDRE, 2023).

Figura 6

Patrones de migración electroforética de los 11 segmentos del genoma de rotavirus en gel de poliacrilamida al 5% teñido con nitrato de plata

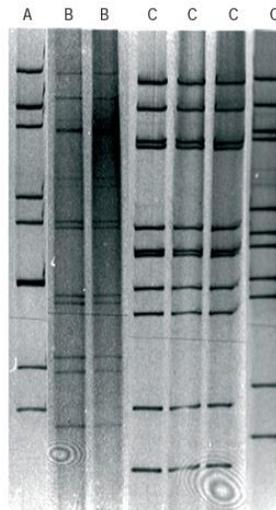


Nota. De los carriles 1-5 se observan electroferotipo largo, carriles 6-10 electroferotipo corto. Tomada del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) (2023) (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/811052/Lineamientos_V_L_Rotavirus-0323.pdf)

La técnica de PAGE permite fácilmente la identificación de los grupos de relevancia médica (A, B y C) a través a su patrón de migración electroforética (Figura 7); sin embargo, es una técnica que posee baja sensibilidad con respecto a otras técnicas como los inmunoensayos o las técnicas moleculares, debido a que para que el electroferotipo sea fácilmente observado, se debe contar con una carga viral alta, lo que aumenta las posibilidades de reportar falsos negativos si no se tiene mucha experiencia (Buesa et al, s.f).

Figura 7

Imagen de un gel de PAGE que muestra los diferentes patrones de migración de los segmentos de los grupos A, B y C de rotavirus



Nota. Tomada de Organización Mundial de la Salud (2009) (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/70122>).

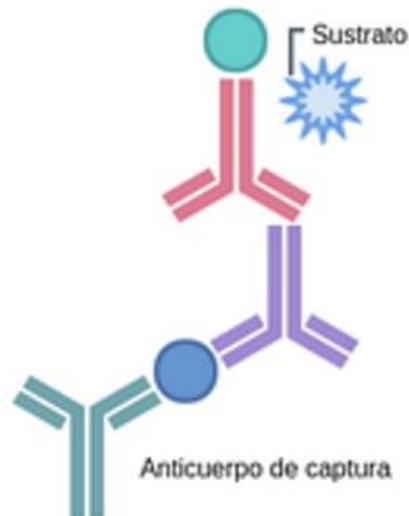
2.5.3. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA, es una técnica que detecta la proteína VP6 presente en los rotavirus. La prueba utiliza anticuerpos en un ELISA tipo sándwich en fase sólida que detecta al antígeno del HRVs grupo A; para ello, los micropocillos están recubiertos con un anticuerpo específico de HRVs, al que se le añade suspensión fecal y se incuba simultáneamente con un anticuerpo policlonal específico de HRVs que esta conjugado con la enzima peroxidasa. El antígeno presente en la

muestra fecal queda capturado entre el anticuerpo que está en la fase sólida y el anticuerpo conjugado con la enzima (Figura 8) (Meridian Bioscience, 2008).

Figura 8

Esquema de un ELISA tipo sándwich



Nota. Tomada de Labster Theory (2021) ([https://www.gastrolabperu.com/examenes/rotavirus-antigeno-fecal-\(elisa\)-.html](https://www.gastrolabperu.com/examenes/rotavirus-antigeno-fecal-(elisa)-.html)).

La prueba se reporta como positiva si se produce un cambio de color de incoloro a azul en los micropocillos. Una intensidad de color muy por encima de los niveles de fondo indica la presencia de antígeno de HRVs; por el contrario, se reporta como negativa si no se produce ningún cambio de color (Meridian Bioscience, 2008).

Comparado con las técnicas de microscopía electrónica y PAGE, el ELISA posee una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97%, por lo que un resultado positivo confirma la existencia de una infección por rotavirus. Sin embargo, existe la posibilidad de que se presente un falso negativo, lo cual puede deberse a que la muestra se colectó cuando la excreción fecal del virus había declinado a niveles

por debajo del nivel de detección del ELISA (Meridian Bioscience, 2008; Laboratorio de Investigación de Enfermedades Gastrointestinales [GastroLab], 2014)

Si bien, el ELISA es una técnica rápida, muy sencilla y fácil de interpretar, posee una menor sensibilidad con respecto a las técnicas moleculares como la RT-PCR (Buesa et al, s.f.).

2.5.4. RETROTRANSCRIPCIÓN ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE PUNTO FINAL (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1986 y su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA (Diaz et al, 2013).

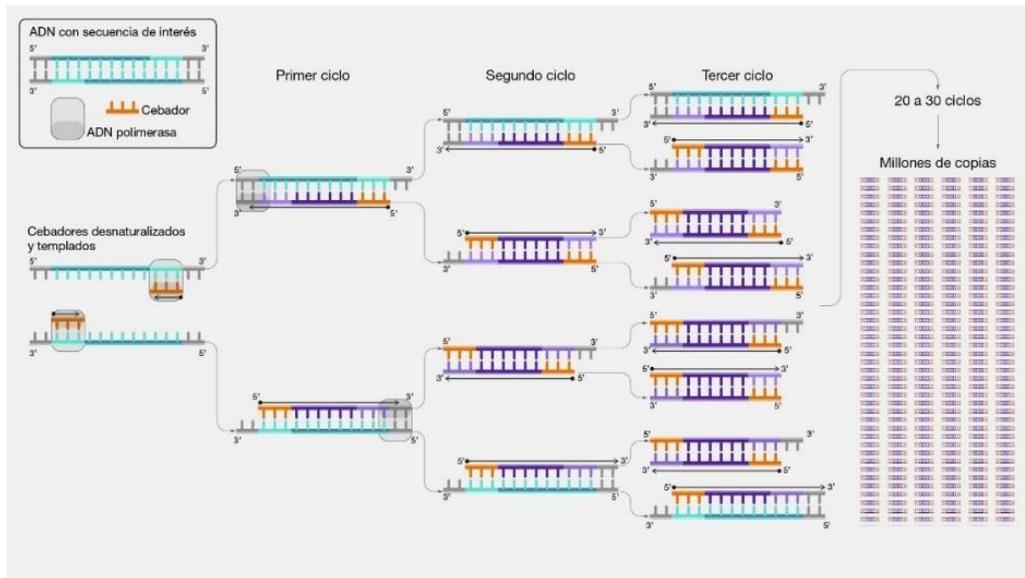
La PCR se fundamenta en la propiedad de la DNA polimerasa para replicar hebras de DNA. Mediante esta reacción se logra multiplicar el número de copias de un fragmento específico de DNA. Como cada fragmento sintetizado sirve como base para sintetizar otros fragmentos en el siguiente ciclo, el número de copias aumenta en forma exponencial (Díaz, C. et al, 2013; Espinosa, 2007)

Con una sola molécula de DNA, se producen dos nuevos fragmentos de DNA en cada ciclo de PCR. Así que, con 30 ciclos de PCR se producirán 2^{30} , esto es, 1 073 741 824 nuevos fragmentos de DNA (Espinosa, 2007).

La PCR se lleva a cabo en tres pasos; el primero es la desnaturalización o separación de las hebras de DNA, el segundo es la unión de los oligonucleótidos o cebadores a las cadenas simples de DNA y, el tercero, la extensión o polimerización, donde la DNA polimerasa cataliza la formación de una doble cadena de DNA (Figura 9). La reacción es altamente específica debido a que los oligonucleótidos son complementarios a los extremos del fragmento que se requiere amplificar (Díaz, C. et al, 2013).

Figura 9

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

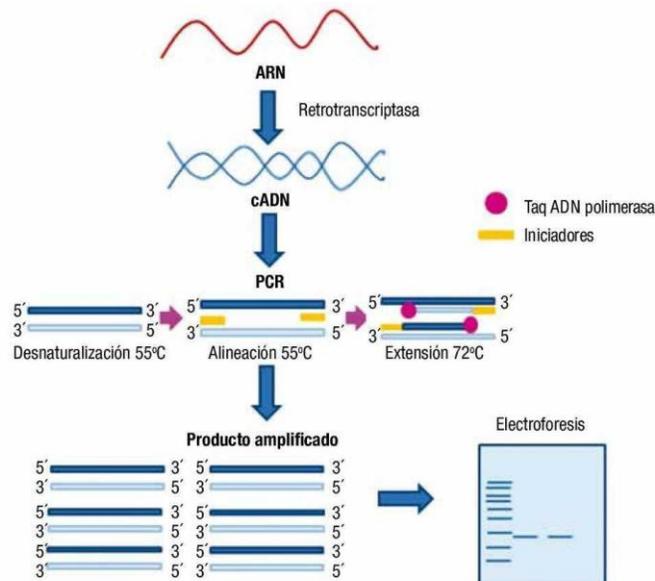


Nota. Tomada de reacción en cadena de la polimerasa (s.f.). (<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>)

Múltiples aplicaciones y modificaciones de esta técnica han sido descritas, entre las que se encuentra la retrotranscripción acoplada a la PCR o RT-PCR. La RT-PCR comprende a grandes rasgos dos procesos, el primero, una transcripción inversa, en donde a partir de RNA se sintetiza DNA complementario o cDNA, y el segundo, con el cDNA sintetizado se realiza posteriormente la PCR correspondiente (Figura 10) (Díaz, C. et al, 2013).

Figura 10

Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)



Nota. Tomada de Ramírez Pacheco et al. (2013). (<https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-herramientas-moleculares-su-utilidad-el-X1665920113270127>).

La RT-PCR posee una mayor sensibilidad y especificidad con respecto a otras técnicas, por ejemplo, las antígeno-anticuerpo como el ELISA, debido al uso de cebadores o primers que son complementarios al DNA, lo que la hace más específica. Además, la propiedad de la DNA polimerasa en la que se fundamenta la técnica, la hace mucho más sensible debido a que solo se necesita una pequeña cantidad de material genético para obtener una gran cantidad de copias de genoma (Espinosa, 2007; Díaz, C. et al, 2013).

Debido a lo mencionado anteriormente, la técnica de RT-PCR se utiliza ampliamente como método de referencia en la vigilancia epidemiológica. Sin embargo, presenta algunas limitaciones. En primer lugar, es semicuantitativa. Además, existen diversos factores asociados a la electroforesis en gel de agarosa que pueden influir en la sensibilidad y la resolución para la visualización de las bandas (Freeman et al, 2008; Luchs y Tavares Timenetsky, 2016).

2.5.5. RETROTRANSCRIPCIÓN ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y sus colaboradores entre 1992 y 1993, basados en el principio de la fluorescencia del bromuro de etidio cuando se intercala con el DNA. Para ello, Higuchi y sus colaboradores realizaban un ciclo de la PCR y tomaban una foto con luz UV (Tamay de Dios et al, 2013).

El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción; además, también es posible cuantificar el producto de PCR (Tamay de Dios, et al, 2013).

El principio de la técnica se basa en el mismo que para la PCR punto final, solo que la forma en cómo se detectan y se analizan los productos de amplificación es a través del uso de moléculas que absorben energía cuando son excitadas por una fuente de energía a una longitud de onda específica, y emiten esta energía en forma de fluorescencia a otra determinada longitud de onda; estas moléculas son llamadas fluoróforos (Aguilera et al, 2014)

Además de los fluoróforos, se necesita de un sistema fluorométrico para detectar los productos de amplificación que consiste en una fuente de energía que excite a estos fluoróforos y un sistema de detección que permita monitorear la señal emitida (Aguilera et al, 2014)

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción puede ocurrir por dos métodos: los primeros son métodos no específicos, que se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el DNA de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada durante la extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama SYBR Green; esta molécula no unida al DNA prácticamente no emite fluorescencia, sin embargo, al unirse al surco

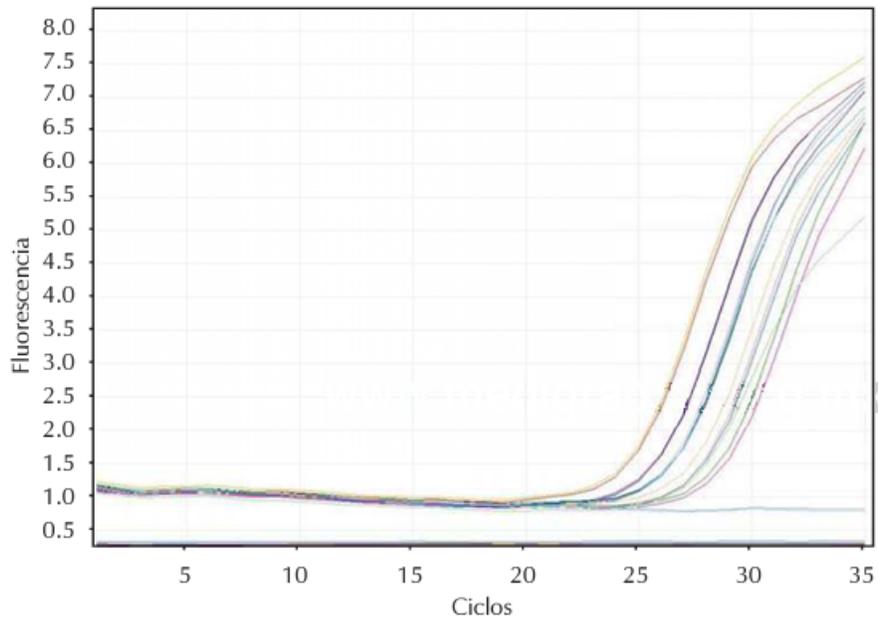
menor del DNA incrementa 1000 veces su fluorescencia . Aunque el SBYR Green es uno de los reporteros más utilizados debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de DNA de doble cadena, incluyendo dímeros de primers, por lo que la señal emitida puede no ser específica (Tamay de Dios et al, 2013).

Por otro lado, están los métodos específicos que siguen el principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente” o FRET. Este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente, a un aceptor o “quencher”. Ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco; cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el aceptor, lo cual permite la actividad exonucleasa 5’- 3’ de la Taq polimerasa para que rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el sistema de detección del termociclador. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan (Tamay de Dios et al, 2013).

Sin embargo, no es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra, el análisis es el paso final. Para ello, los termocicladores están provistos de una PC con un software que genera una serie de gráficas en donde se muestran los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la curva de amplificación (Figura 11) que muestra el curso y el progreso de la reacción (Tamay de Dios et al, 2013).

Figura 11

Ejemplo de un gráfico de amplificación



Nota. En el eje “Y” se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje “X” los ciclos de reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de DNA. Tomada de Tamay de Dios et al. (2013) (<https://www.medigraphic.com/pdfs/invis/ir-2013/ir132d.pdf>).

De acuerdo con De la Cruz et al (2018), la RT-PCR en tiempo real es de 1000 a 10000 veces más sensible que la RT-PCR de punto final en la identificación de HRVs debido a que puede identificar las muestras que tiene una muy baja carga viral. Se estima que puede detectar de 1 a 10^7 equivalentes genómicos (Aguilera et al, 2014).

Además de su alta especificidad y sensibilidad sobre otras técnicas de diagnóstico; en la RT-PCR en tiempo real se puede monitorear el producto de amplificación conforme ocurre la reacción, por lo que no es necesario el uso de geles de agarosa para conocer si la reacción se llevó de manera exitosa. Asimismo, la facilidad con la que se pueden leer los resultados hace que esta técnica pueda reemplazar a la RT-PCR de punto final como el método de referencia en la vigilancia epidemiológica (Díaz, O; 2020).

Si bien, es una técnica que puede resultar costosa al principio debido a la adquisición del termociclador en tiempo real, posee características que la hacen una herramienta muy útil en la vigilancia epidemiológica; ya que, como se mencionó antes, la amplificación y la detección se realizan en un solo paso; por lo que es más rápida, y no solo se puede detectar al HRVs, también se puede cuantificar la carga viral (Tamay de Dios, 2013; Díaz, O; 2020).

2.6. CONTROLES EN LOS ENSAYOS DE RT-PCR

Los controles son un elemento esencial en cualquier ensayo de PCR, ya que garantizan el desarrollo del ensayo y la interpretación de los resultados, debido a que permiten evaluar posibles falsos positivos y negativos (Acevedo et al, 2009).

Si bien, la forma más fácil de implementar controles positivos para los ensayos de PCR es a través de la compra de kits comerciales, existen algunas desventajas con respecto a estos como el costo, pues estos kits no son baratos y están limitados a un número de reacciones. Además, dependiendo de la marca, este control puede contener el genoma completo del rotavirus y muchas veces son fabricados para utilizarse con los insumos de la misma marca para PCR. (Vircell, s.f; Acevedo et al, 2009).

Debido a esto, se ha recurrido a diversas metodologías para la obtención de controles positivos en el laboratorio como, el uso de una muestra clínica, el cultivo celular y la clonación mediante un plásmido. Sin embargo, el uso de una muestra clínica no resulta muy conveniente debido a la poca disponibilidad de esta, ya que la cantidad de materia fecal de la que se dispone es limitada, lo que no permite mantener a una sola muestra como control positivo fijo. Por otro lado, el aislamiento en cultivo celular de rotavirus requiere de condiciones especiales para su crecimiento, es una técnica muy laboriosa y también es muy cara (Rodríguez et al, 2008).

Por lo anterior, la clonación mediante el uso de un plásmido resulta en una estrategia viable para la obtención de controles, debido a que se puede obtener un control positivo para un gen en específico y

una vez realizada la clonación se puede tener alícuotas de este cuando se necesiten. Además, para ensayos de PCR en tiempo real (qPCR), contar con el DNA clonado de un plásmido, constituye una gran ventaja, ya que no solo garantiza el control de amplificación para falsos positivos, sino que permite la detección por número de copias con lo cual, se puede conocer la concentración de una muestra (Acevedo et al, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La EDA representa un problema de salud importante a nivel mundial; cada año se reportan millones de casos de EDA en todo el mundo y un gran número de estos terminan en la muerte del paciente, siendo los niños menores de cinco años los principales afectados y el HRVs grupo A, uno de los principales agentes involucrados.

Debido a esto, la vigilancia epidemiológica de la EDA ha resultado en una estrategia de gran importancia para generar información que permita establecer medidas de prevención y control, por lo que es necesario contar con métodos de diagnóstico que sean sensibles y específicos, y que generen información confiable y oportuna para la toma de decisiones.

La RT-qPCR al gen *NSP3* ha demostrado ser una herramienta de laboratorio altamente sensible y específica para la identificación de HRVs grupo A, la cual se ha utilizado de forma comparativa con otras metodologías de diagnóstico en el laboratorio de virus gastrointestinales del InDRE, proporcionando información epidemiológica relevante. Por lo anterior, sería de gran importancia la implementación de esta metodología en la RNLSP para fortalecer la vigilancia epidemiológica del HRVs en México.

Sin embargo, para la implementación de esta metodología en la RNLSP, la acreditación y verificación son requisitos indispensables y el uso de un control positivo ayudaría en el cumplimiento de los parámetros de verificación. No obstante, para la obtención de un control positivo, el cultivo celular es una técnica difícil de llevar a cabo para HRVs, debido a la diversidad de genotipos existentes; y el uso de una muestra clínica no resulta viable, debido a que en ocasiones no se cuenta con un volumen suficiente

para mantener esa muestra clínica como un control positivo fijo. Por lo tanto, en este trabajo, se planteó la obtención de un control positivo a partir de la clonación del gen *NSP3* en un plásmido, para su posterior uso en el método de RT-qPCR para la identificación de HRVs grupo A. Dicho control serviría para la verificación de este método para su posible implementación en la RNLSP a futuro.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Diseñar y obtener un control positivo para el gen *NSP3* de HRVs y evaluar su aplicación en el método de RT-qPCR para la identificación de HRVs grupo A.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar ensayos de alineamiento de la secuencia del gen *NSP3* con las secuencias de los iniciadores utilizados para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR descritos en los protocolos de Jothikumar y Freeman para seleccionar la secuencia que servirá como control positivo.
- Estandarizar una RT-PCR de punto final para la obtención del producto de amplificación a partir de la secuencia seleccionada del gen *NSP3* a través de los ensayos de alineamiento.
- Purificar el producto de amplificación obtenido para su posterior clonación y secuenciación por el Laboratorio de Métodos Moleculares (TAMM) del InDRE.
- Obtener el plásmido con la secuencia seleccionada del gen *NSP3* que servirá como control positivo.
- Evaluar el uso del control positivo en la verificación del método de RT-qPCR para la identificación de HRVs grupo A a través de los protocolos de Jothikumar y Freeman.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Un total de 33 muestras de materia fecal provenientes del banco de muestras del Laboratorio de Virus Gastrointestinales (LVGI) del INBRE fueron proporcionadas para este estudio.

4.2. SELECCIÓN DE MUESTRAS

4.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes menores de 5 años con un diagnóstico de gastroenteritis viral.
- Muestras que contengan más de 2 ml.
- Muestras previamente identificadas y caracterizadas por el LVGI mediante RT-PCR de punto final al gen *VP6* tanto positivas como negativas a HRVs.
- Muestras identificadas por el LVGI como positivas a NoV, HAstrV y AdV de pacientes menores de 5 años para el ensayo de especificidad analítica.

4.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 5 años.
- Pacientes con un diagnóstico de gastroenteritis bacteriana o parasitaria.
- Muestras que contengan menos de 2 ml.

4.3. DISEÑO Y OBTENCIÓN DEL CONTROL POSITIVO AL GEN *NSP3* DE ROTAVIRUS GRUPO A

4.3.1. ENSAYO DE COMBINACIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y SONDAS DE LOS PROTOCOLOS DE JOTHIKUMAR ET AL. Y FREEMAN ET AL. PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs DEL GRUPO A AL GEN *NSP3* POR RT-qPCR CON LA SECUENCIA DEL GEN *NSP3*

Realizar un ensayo de combinación y alineamiento de las secuencias, tomando la secuencia completa del gen *NSP3* de HRVs grupo A con número de identificación DQ146697 en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y las secuencias de los iniciadores para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) (Tabla 1).

Tabla 1

Secuencias de los iniciadores y sondas para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen NSP3 de los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008)

Protocolo	Iniciador/sonda	Secuencia (5´-3´)	Posición
Jothikumar	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	19 – 39
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA	123 – 147
	JVKP	FAM-ACAACTGCAGCTTCAAAGAAGWGT	72 – 96
Freeman	NVP3-FDeg	ACCATCTW ^a CACRTR ^b ACCCTC	963 – 982
	NVP3-R1	GGTCACATAACGCCCTATA	1034 – 1053
	NVP3-Probe	A ^{CT} GAGCACAATAGTT ^d AAAAGCTAACACTGTCAA	984 – 1026

Nota. FAM = Reportero; BHQ = Quencher; ^aW = T, U o A (código IUPAC); ^bR = A o G (código IUPAC); ^cNucleótido marcado con el reportero FAM ; ^dNucleótido marcado con el quencher BHQ1

Las secuencias de los iniciadores y sondas se alinean con la secuencia completa del gen *NSP3* en el software BioEdit Sequence Alignment Editor con la finalidad de elegir el par de iniciadores que se utilizan

en la RT-PCR de punto final al gen *NSP3* para la obtención del producto de amplificación que se utilizara como control positivo; el cual tiene que tener el tamaño suficiente para ser clonado y contener la secuencia blanco para los iniciadores y las sondas empleados en los dos protocolos de RT-qPCR.

4.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR DE PUNTO FINAL AL GEN *NSP3* PARA LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN QUE CONTIENE LA SECUENCIA SELECCIONADA PARA SER UTILIZADA COMO CONTROL POSITIVO

4.3.2.1. INICIADORES Y CONDICIONES DE REACCIÓN

Para obtener el producto de amplificación con la secuencia a usar como control positivo; se emplean los iniciadores seleccionados a partir de los ensayos de alineamiento y combinación de secuencias, que son el iniciador JVKE, del protocolo de Jothikumar et al. (2009) y NVP3-R1, del protocolo de Freeman et al. (2008) (Tabla 1). Al ser iniciadores de dos protocolos diferentes, no se cuenta con un protocolo de RT-PCR de punto final para obtener este producto de amplificación.

Por lo que primero se estandariza una RT-PCR de punto final al gen *NSP3* para la obtención de este producto de amplificación. Por lo que, se realizó una RT-PCR de gradiente de temperaturas para elegir la temperatura óptima de alineamiento, así como ensayos de RT-PCR de punto final con diferentes cantidades de los iniciadores, dNTP's, enzima y catión magnesio para determinar las condiciones óptimas con las que se obtiene un producto de amplificación sin bandas inespecíficas.

Con los resultados de estos ensayos se propone el protocolo descrito en la tabla 2 y las mezclas de reacción descritas en la tabla 3 para llevar a cabo la reacción.

Tabla 2

Protocolo de amplificación propuesto para RT-PCR de punto final al gen NSP3 para la obtención del producto con la secuencia a utilizar como control positivo

Evento	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	2 min, 30 seg
Síntesis de cDNA	50°C	30 min
	94°C	2 min
30 ciclos de PCR	95°C	30 seg
	61°C	30 seg
	72°C	1 min
Extensión final	72°C	7 min
Refrigeración	4°C	∞

Tabla 3

Mezclas de reacción propuestas para realizar la RT-PCR de punto final al gen NSP3 para la obtención del producto de amplificación con la secuencia a usar como control positivo

	Reactivo	Volumen (µL)
Mezcla de reacción 1	Agua	9.5
	Iniciador JVKF	0.25
	Iniciador NVP3-R1	0.25
	RNA	4
Mezcla de reacción 2	Regulador 2X	12.5
	Enzima	0.5
	dNTP's	1.5
	Mg ²⁺	1.5
Volumen final		30

La reacción se realiza en un termociclador Mastercycler ep de Eppendorf y la mezcla de reacción 1 con los iniciadores y las muestras, se lleva a una desnaturalización inicial a 95°C por 2.5 minutos descrita

por De La Cruz et al (2018). Una vez que se desnaturaliza, se pausa el programa de ciclado para agregar la mezcla de reacción 2, que contiene la enzima, el buffer de reacción, los dNTP's y el catión magnesio, y posteriormente se reanuda el programa.

Una vez terminada la reacción, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para visualizar los productos de amplificación.

4.3.3. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO CON LA SECUENCIA DEL GEN *NSP3* PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO

La obtención del control positivo se realiza con ayuda del Laboratorio de Transferencia de Métodos Moleculares (TAMM) del InDRE.

Para ello, una vez que se selecciona la muestra y se obtiene el producto de amplificación, este se envía al Laboratorio de Genoma de Patógenos para que sea secuenciado con la finalidad de verificar que la secuencia de este producto de amplificación corresponde a la secuencia del gen *NSP3*.

Una vez que se verifica dicha secuencia, este producto de amplificación se envía junto con los iniciadores JVKF y NVP3-R1, que es con los que se obtiene, al laboratorio de TAMM para su clonación.

El procedimiento de clonación requiere que se genere un producto de RT-PCR que contenga extremos cohesivos para que estos sean insertados en el plásmido pDrive, que es el vector de clonación.

Para obtener el producto con el extremo cohesivo se emplea una DNA polimerasa sin actividad correctora para generar un extremo 3' con un nucleótido de adenina sin aparear. Este extremo es complementario al extremo del vector pDrive, que posee un nucleótido de timina.

Una vez que se obtiene el inserto, se purifica y se visualiza por electroforesis en gel de agarosa para verificar el tamaño en pares de bases y la ausencia de bandas inespecíficas.

Después de que se purifica, el producto se añade a la mezcla de ligación que se prepara con el estuche de clonación PCR Cloning Kit de Qiagen. Esta mezcla contiene la master mix de ligación 2X y el pDrive Cloning Vector, y se incuba por 30 minutos a una temperatura de entre 4 a 16°C.

Una vez transcurrido este tiempo, se hace la introducción del vector que contiene el inserto en la cepa hospedera de *Escherichia Coli* para la propagación de las clonas. Por lo que se descongelan las células competentes de *E. Coli*; para ello se les añade 2 µl de la mezcla de ligación y se incuba en hielo por 30 minutos.

Posteriormente, el tubo se incuba a 42°C por 30 segundos sin agitación, se sumerge inmediatamente en hielo por 2 minutos, se le añade 250 µl del medio de recuperación que contiene el kit y se incuba de nuevo, en agitación por 1 hora.

Una vez hecho esto, se colocan 100 µl de esta mezcla a dos cajas Petri que contienen medio de selección LB agar que esta adicionado con ampicilina, kanamicina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido (X-gal) e isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incuba a 37°C por 20 horas. Pasada la incubación, se identifican las colonias blancas porque son las colonias que contiene al vector con el inserto.

De estas colonias, se seleccionan dos para sembrarlas en el medio de selección para verificar que crezcan bajo la presión selectiva de los antibióticos y se incuban a 37°C por 18 horas y posteriormente se pasan a 4°C.

Una vez que se tiene estas colonias, se hace la extracción del DNA plasmídico y se cuantifica el extracto por espectrofotometría para determinar la concentración.

Finalmente, se realiza la verificación de la clonación mediante una reacción de PCR utilizando los iniciadores JVKF y NVP3-R1, de los cuales se obtiene el inserto, y se hace una electroforesis en gel de

agarosa con bromuro de etidio para verificar la presencia y el tamaño del producto. Posteriormente, se hace la secuenciación nucleotídica por el Laboratorio de Genoma de Patógenos del InDRE.

4.4. VERIFICACIÓN DE LA RT-qPCR AL GEN *NSP3* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs DEL GRUPO A USANDO EL CONTROL POSITIVO OBTENIDO

4.4.1. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MATERIA FECAL

La extracción de RNA se hace de manera automatizada en el robot de extracción de ácidos nucleicos MagNA Pure 24 System (Roche).

Para ello, se hace un pretratamiento de las muestras colocando 500 µl de materia fecal de cada muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml a los que se le agrega 500 µl de solución salina, se agita en vórtex y se centrifuga a 14800 rpm por 15 minutos.

Posteriormente, se toman 200 µl de cada sobrenadante y se colocan en la placa de procesamiento de muestras, las cuales se colocan en el robot MagNA Pure 24 System y se continua con el protocolo de extracción.

4.4.2. INICIADORES, SONDAS Y CONDICIONES DE REACCIÓN

Se utilizan los iniciadores JVKF, JVKR y la sonda JVKP descritos por Jothikumar et al. (2009) y los iniciadores NVP3-FDeg, NVP3-R1 y la sonda NVP3-Probe descritos por Freeman et al. (2008) (Tabla 1). Las reacciones se llevan a cabo siguiendo las indicaciones descritas en estos protocolos (Tabla 4).

Tabla 4

Protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen NSP3

Termociclador	Evento	Temperatura y tiempo	
Eppendorf Mastercycler ep	Desnaturalización inicial	95°C por 2.5 min	
	Transcripción reversa	50°C por 30 min	
	Inactivación de la RT	95°C por 2 min	
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR		Protocolo Jothikumar	Protocolo Freeman
	40 ciclos de desnaturalización	94°C por 10 seg	95°C por 15 seg
	Alineamiento	55°C por 60 seg	60°C por 60 seg
	Extensión final	72°C por 20 seg	

Para cada uno de los protocolos de RT-qPCR se hacen dos mezclas de reacción y se llevan a un volumen final de 25 µl (Tabla 5).

Tabla 5

Mezclas de reacción de los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen NSP3

	Reactivo	Volumen (µL)
Mezcla de reacción 1	Agua	8.5
	Iniciador Forward*	0.5
	Iniciador Reverse*	0.5
	Sonda*	0.5
	RNA	2
Mezcla de reacción 2	Mezcla de reacción 2X	12.5
	Enzima	0.5
	Volumen final	25

Nota. *De acuerdo con el protocolo, se utilizaron los iniciadores y la sonda descritos en la tabla 1 para la mezcla de reacción 1.

Mediante el uso de un termociclador Mastercycler ep de Eppendorf para reacciones de RT-PCR de punto final, la mezcla de reacción 1, que incluye los iniciadores, la sondas y las muestras de RNA, se lleva a una desnaturalización inicial a 95°C por 2.5 minutos descrita por De la Cruz et al (2018), una vez terminado el proceso de desnaturalización, se agrega la mezcla de reacción 2, que contiene a la enzima y el buffer, y se termina el protocolo en el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR para reacciones de RT-qPCR.

4.4.3. APLICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO EN LA VERIFICACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE JOTHIKUMAR ET AL. (2009) Y FREEMAN ET AL. (2008) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs GRUPO A POR RT-qPCR AL GEN *NSP3*

El control positivo se prueba realizando la verificación de los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen *NSP3*.

Los parámetros de linealidad, eficiencia, sensibilidad analítica, precisión y prueba de *t* pareada se emplearon para evaluar propiamente al control positivo; mientras que los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnóstica, exactitud diagnóstica, tasa de falsos positivos, tasa de falsos negativos, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, índice kappa y especificidad analítica se utilizaron para verificar el método de RT-qPCR.

4.4.3.1. LINEALIDAD Y EFICIENCIA

Para la evaluación de la linealidad, la eficiencia, la sensibilidad analítica, el intervalo reportable y el límite de detección se construye una curva estándar a partir del control positivo para cada uno de los protocolos mencionados.

Se hacen diluciones seriadas en base 10 (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) del control positivo; estas diluciones se utilizan en las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para realizar la curva estándar con la que se obtiene la ecuación de la recta.

La linealidad se reporta con base en el valor obtenido por el coeficiente de correlación (r^2) y el porcentaje de eficiencia se reporta con base en el valor obtenido de la pendiente (m) de la ecuación de la recta a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eficiencia} = \left[\left[10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}} \right)} \right] - 1 \right] \times 100\%$$

4.4.3.2. SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Este parámetro se reporta con el valor de la pendiente de la recta (m) que se obtiene de la curva estándar para cada uno de los protocolos mencionados.

4.4.3.3. INTERVALO REPORTABLE Y LÍMITE DE DETECCIÓN

A través de la curva estándar se identifican las muestras con la mayor y la menor concentración de copias de genoma de HRVs, por lo que el intervalo reportable es el rango que existe entre la menor y la mayor concentración de copias de genoma de HRVs, mientras que el límite de detección se refiere a la última dilución que contiene la menor cantidad de copias de genoma de rotavirus y que puede ser detectada por el termociclador.

4.4.3.4. PRECISIÓN

La precisión y la prueba de t pareada se reportan con los resultados de CT del control positivo que se obtienen a partir de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se evalúa a través de los ensayos de RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A con las mismas muestras y condiciones de reacción en diferentes días por el mismo analista para los dos protocolos mencionados.

Por otro lado, la reproducibilidad se evalúa haciendo que otro analista realice la RT-qPCR al gen *NSP3* utilizando las mismas muestras y condiciones de reacción en diferentes días para los dos protocolos.

Para la precisión se calcula el coeficiente de variación (%CV) con los valores de CT del control positivo tanto para los ensayos de repetibilidad, como para los de reproducibilidad para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) y para el de Freeman et al. (2008) a través de la siguiente fórmula:

$$\%CV = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Media}} \times 100\%$$

4.4.3.5. PRUEBA DE *t* PAREADA

La prueba *t* pareada se realiza a través del software Microsoft Excel con la herramienta análisis de datos con un grado de confiabilidad del 95% ($\alpha= 0.05$) para comparar los valores de CT obtenidos por el protocolo de Jothikumar et al. (2009) con los obtenidos por el protocolo de Freeman et al. (2009).

4.4.3.6. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Para evaluar la sensibilidad y la especificidad diagnóstica se realiza una tabla de contingencia (Tabla 6) para cada protocolo mencionado de RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A.

En ellas se analizan los resultados obtenidos por RT-qPCR al gen *NSP3*, que es el método de prueba, con los resultados obtenidos por RT-PCR de punto final al gen *VP6*, que es el método de referencia o “estándar de oro” para este trabajo, debido a que es una técnica molecular.

Tabla 6

Tabla de contingencia para la evaluación del método de prueba con los resultados obtenidos por el método de referencia

		Método de referencia (RT-PCR de punto final)		
		Positivos	Negativos	Totales
Método de prueba (RT-qPCR)	Positivos	VP	FP	VP + FP
	Negativo	FN	VN	FN + VN
	Total	VP + FN	FP + VN	VP+FP+FN+VN

Donde:

VP = Verdaderos positivos: Muestras positivas por RT-qPCR al gen *NSP3* que también son positivas por RT-PCR de punto final al gen VP6

FN = Falsos negativos: Muestras negativas por RT-qPCR al gen *NSP3* que son positivas por RT-PCR de punto final al gen VP6; es decir, son positivas

FP = Falsos positivos: Muestras positivas por RT-qPCR al gen *NSP3* que son negativas por RT-PCR de punto final al gen VP6; es decir, son negativas

VN = Verdaderos negativos: Muestras negativas por RT-qPCR al gen *NSP3* y que también son negativas por RT-PCR de punto final al gen VP6

Una vez realizadas las tablas de contingencia, se puede calcular la sensibilidad y la especificidad diagnóstica a través de las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100\%$$

4.4.3.7. EXACTITUD DIAGNÓSTICA

La exactitud diagnóstica se obtiene a partir de los datos de la tabla de contingencia (Tabla 6) con la siguiente fórmula:

$$\text{Exactitud} = \frac{VP + FN}{VP + FP + FN + VN}$$

4.4.3.8. VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP) Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN)

El VPP y el VPN también se obtiene con los valores de las tablas de contingencia (Tabla 6) mediante las siguientes ecuaciones:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \times 100\%$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} \times 100\%$$

4.4.3.9. TASAS DE FALSOS POSITIVOS Y TASA DE FALSOS NEGATIVOS

Las tasas de falsos positivos y de falsos negativos son complementarias a la especificidad y la sensibilidad por lo que, se obtiene a partir de los valores calculados de la especificidad y la sensibilidad (calculados en el punto 4.6.4.1.) y mediante el uso de las siguientes fórmulas:

$$\text{Tasa de falsos positivos} = 1 - \text{especificidad}$$

$$\text{Tasa de falsos negativos} = 1 - \text{sensibilidad}$$

4.4.3.10. ÍNDICE KAPPA

Para el cálculo del índice Kappa se utilizan los datos obtenidos en la tabla de contingencia (Tabla 6) de la siguiente manera:

Primero se calcula la concordancia observada y la concordancia esperada mediante las siguientes fórmulas:

$$Co = \frac{a + d}{n}$$

$$Ce = \frac{[(a + b)(a + c)] + [(c + d)(b + d)]}{n^2}$$

Donde:

Co = Concordancia observada; Ce = Concordancia esperada; a = Verdaderos positivos; b = Falsos negativos;
c = Falsos positivos; d = Verdaderos negativos; n = a+b+c+d

Segundo, una vez que se obtiene los valores de las concordancias, se calcula el índice Kappa usando la siguiente fórmula:

$$k = \frac{Co - Ce}{1 - Ce}$$

Donde:

Co = Concordancia observada; Ce = Concordancia esperada

4.4.3.11. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica se evalúa realizando una reacción de RT-qPCR al gen *NSP3* para cada protocolo mencionado con muestras de materia fecal positivas a otros virus gastrointestinales como NoV, AdV y HAstrV, así como muestras positivas a HRVs y muestras negativas, para verificar que estas no amplifiquen en ninguno de los protocolos.

5. RESULTADOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 33 muestras de materia fecal provenientes del banco de materia fecal del LVGI del InDRE, de pacientes menores de 5 años durante los años 2008, 2009, 2012, 2021 y 2022. De estas muestras, que fueron previamente caracterizadas por el LVGI: 19 fueron positivas a HRVs por RT-PCR de punto final al gen VP6.

Además, se utilizaron muestras positivas a otros virus gastrointestinales asociados a la EDA, de las cuales 3 muestras fueron positivas a NoV, 3 fueron positivas a AdV, 3 fueron positivas a HAstrV; asimismo,

8 de estas muestras fueron negativas a todos las técnicas. Las muestras de los años 2008, 2009 y 2012 se utilizaron para la obtención del control positivo (Tabla 7).

Tabla 7

Muestras positivas y negativas utilizadas

Año	Muestras positivas a HRVs	Muestras positivas a NoV	Muestras positivas a AdV	Muestras positivas a HAstrV	Muestras negativas
2008	1				
2009	1				
2012	1				
2021	10				4
2022	3	3	3	3	4

Nota. Las muestras de los años 2008, 2009 y 2012 se utilizaron para seleccionar la muestra candidata para la obtención del control positivo, las muestras de los años 2021 y 2022 positivas y negativas a HRVs se utilizaron para probar el control positivo por RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A y las muestras del año 2022 positivas a otros virus gastrointestinales asociados a la EDA (NoV, AdV y HAstrV) se utilizaron para realizar el ensayo de especificidad analítica.

Para los ensayos de métodos validados, la guía “La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos” de Eurachem (2016) recomienda que, para asegurar que se logre un desempeño aceptable, cada analista debe hacer una evaluación de cuántas muestras puede manipular convenientemente a la vez. Lo anterior, debido a que, como se menciona es mejor analizar pocas muestras a analizar un número mayor y que se tengan que repetir la mayoría de estas.

Por lo que para la realización de este trabajo se utilizaron 21 muestras en la verificación de la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A considerando que, los paneles de evaluación que se le envían a la RNLSP constan de 20 muestras, entre las que se encuentran muestras tanto positivas como negativas.

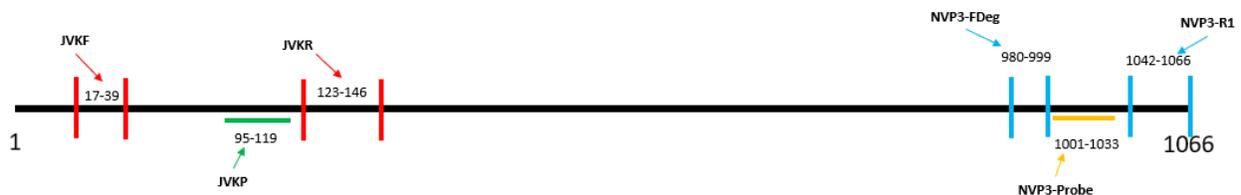
5.2. ENSAYO DE COMBINACIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y LAS SONDAS DE LOS PROTOCOLOS DE JOTHIKUMAR Y FREEMAN CON LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *NSP3*

Para el diseño del control se realizó un ensayo de combinación y alineamiento de secuencias de los iniciadores y las sondas descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs grupo A al gen *NSP3* por RT-qPCR (Tabla 1), con la secuencia completa del gen *NSP3* de HRVs grupo A. El alineamiento se realizó en el software BioEdit Sequence Alignment Editor.

Una vez hecho el alineamiento, se obtuvieron las posiciones en las que cada iniciador y sonda se alinean en la secuencia del gen *NSP3* y se hizo un diagrama para visualizar fácilmente los iniciadores que, en el producto de amplificación, contengan las secuencias de ambas sondas (Figura 12).

Figura 12

Alineamiento de las secuencias de los iniciadores y las sondas descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) con la secuencia del gen NSP3



Nota. En la figura se puede observar las posiciones en las que se alinean en la secuencia del gen *NSP3*. A la izquierda, los iniciadores JVKF y JVKR (rojo) y la sonda JVKP (verde) descritos por Jothikumar et al. (2009). A la derecha, los iniciadores NVP3-FDeg y NVP3-R1 (azul) y la sonda NVP3-Probe (amarillo) descritos por Freeman et al. (2008).

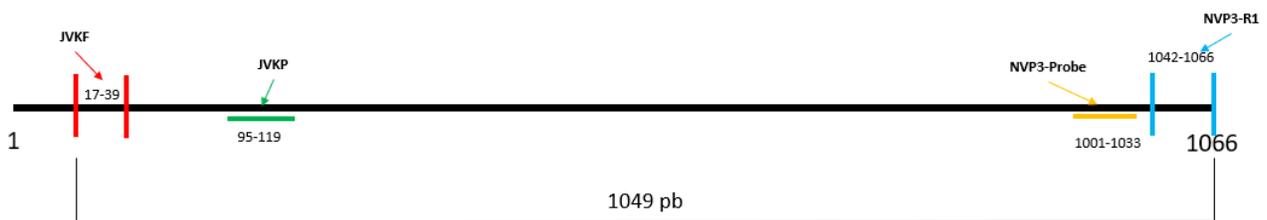
Los iniciadores elegidos fueron el iniciador forward JVKF, del protocolo de Jothikumar et al. (2009) y el iniciador reverse NVP3-R1 del protocolo de Freeman et al. (2008) debido a que, el producto de

amplificación que se obtiene con estos iniciadores es de 1049 pb y contiene las secuencias donde se pueden alinear las sondas de ambos protocolos (Figura 13).

Esto es importante debido a que, las sondas descritas por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) son sondas TaqMan; las cuales son sondas de hidrólisis que en el extremo 5' de su secuencia contienen un reportero fluorescente y próximo a la secuencia se encuentra un quencher o apagador, por lo que la fluorescencia que emite el reportero es captada por el quencher y por lo tanto, el termociclador no puede detectarla; sin embargo, a medida que la DNA polimerasa empieza a sintetizar el nuevo fragmento de DNA y avanza sobre la cadena sencilla, desplaza al apagador y posteriormente hidroliza a la sonda por su actividad 5'-3' exonucleasa. Al desplazar al apagador, el reportero emite la fluorescencia y esta es captada por el sistema óptico en el termociclador para las reacciones en tiempo real, por lo que, si el producto de amplificación no contiene dentro de su secuencia la región para que las sondas puedan alinearse, no se podría detectar la amplificación (Tamay de Dios et al, 2013).

Figura 13

Alineamiento de las secuencias de los iniciadores JVKF y NVP3-R1, y las sondas JVKP y NVP3-Probe descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) con la secuencia del gen NSP3



Nota. Los iniciadores elegidos son JVKF (rojo) del protocolo de Jothikumar et al. (2009) y el NVP3-R1 (azul) del protocolo de Freeman et al. (2008). El tamaño de pares de bases (pb) esperado del producto de amplificación es de 1049 pb y contiene las secuencias blanco en donde las sondas JVKP y NVP3-Probe (verde y amarillo, respectivamente) se alinean en la secuencia del gen NSP3.

5.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR DE PUNTO FINAL AL GEN *NSP3* PARA LA OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN QUE CONTIENE LA SECUENCIA SELECCIONADA PARA SER UTILIZADA COMO CONTROL POSITIVO

Se utilizó el iniciador forward JVKF, del protocolo de Jothikumar et al. (2009) y el iniciador reverse NVP3-R1, del protocolo de Freeman et al. (2008) (Tabla 1).

Al ser iniciadores de dos protocolos diferentes, primero se estandarizó la RT-PCR de punto final al gen *NSP3* para obtener las condiciones óptimas para la amplificación del producto. Con los resultados obtenidos de estas pruebas, se propuso el protocolo de amplificación descrito en la tabla 2 y las mezclas de reacción mencionadas en la tabla 3 para llevar a cabo la reacción.

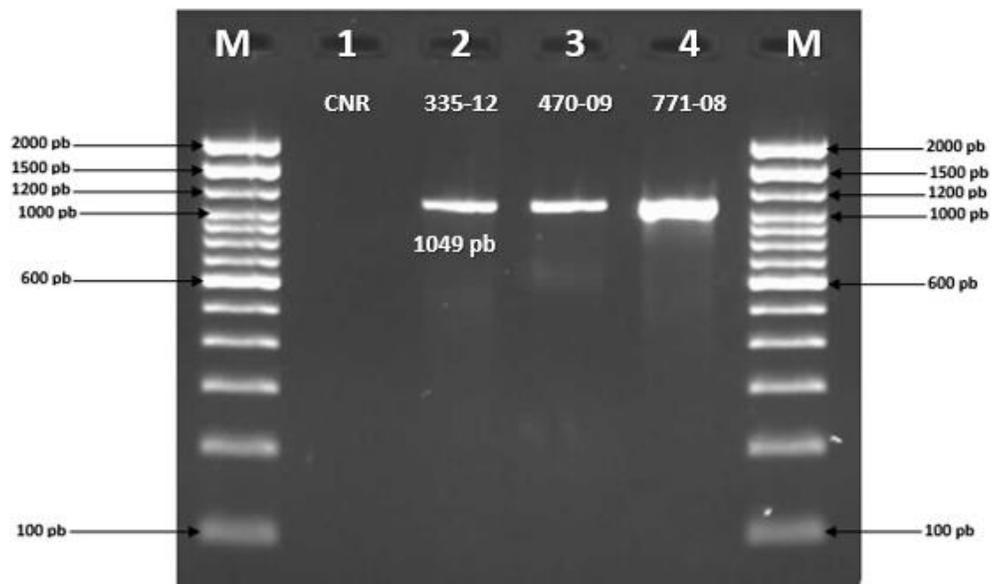
Esta reacción se realizó en el termociclador Mastercycler ep de Eppendorf. La mezcla de reacción 1 se llevó a una desnaturalización inicial descrita por De La Cruz et al (2018), posteriormente se pausó el programa de ciclado para agregar la mezcla de reacción 2 y se continuó con el programa.

5.3.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2%

Una vez terminada la reacción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para visualizar y verificar la existencia del producto de amplificación esperado, el cual fue de 1049 pb, además de verificar que no existan bandas inespecíficas en el producto (Figura 14).

Figura 14

Electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio



Nota. En el carril 1 está el control negativo de reactivo (CNR), en los carriles 2, 3 y 4 están las muestras probadas para la obtención del producto de amplificación con la secuencia que se utilizaría como control positivo. Marcador de tamaño molecular 100 pb (M).

La muestra seleccionada para enviarse al laboratorio de TAMM fue la 771-08 (Figura 14), debido a que, además de que no hay presencia de bandas inespecíficas, con esta muestra se obtuvo una mayor cantidad de producto de amplificación.

5.4. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO CON LA SECUENCIA SELECCIONADA PARA SU USO COMO CONTROL POSITIVO

Antes de ser clonado, el producto de amplificación de la muestra 771-08 fue enviado al laboratorio de Genoma de Patógenos para que fuera su secuenciada y así corroborar que el producto de amplificación obtenido correspondiera a la secuencia del gen *NSP3* (Anexo 3)

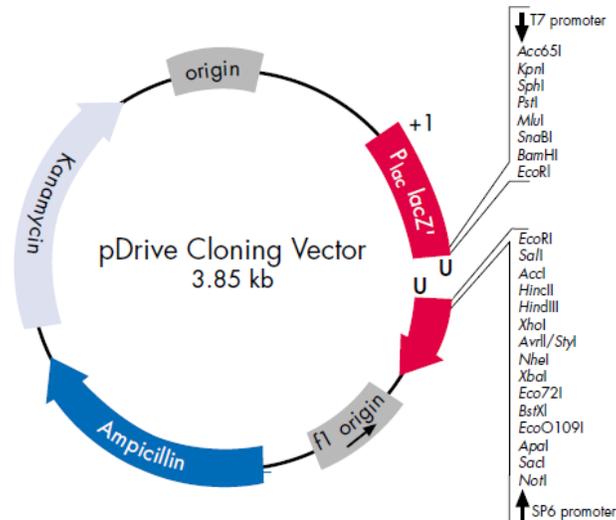
Una vez verificado que el producto de amplificación correspondiera a la secuencia del gen *NSP3*, fue enviado junto con los iniciadores JVKF y NVP3-R1, con los que se obtuvo el producto, al laboratorio de TAMM para que se realizara su clonación en el plásmido.

La clonación se realizó con el kit PCR Cloning Kit de Qiagen siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.5.

El vector de clonación utilizado fue el pDrive con un tamaño de 3851 pb que contiene los genes de resistencia a los antibióticos kanamicina y ampicilina, el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa y que actúa como marcador de selección, el origen de replicación que es una secuencia en el DNA del vector que proporciona un sitio de reconocimiento para iniciar la replicación y un sitio de clonación que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción muy cercanos entre sí que permiten una amplia gama de posibilidades para que se pueda insertar el fragmento de DNA de interés (Figura 15).

Figura 15

Mapa del vector de clonación pDrive de Qiagen



Nota. Tomada de: <https://www.qiagen.com>

El plásmido obtenido se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y se obtuvo una concentración de 81.4 ng/μl, con esta concentración se realizó la conversión a copias de genoma por el laboratorio de TAMM para obtener las 1.58×10^{10} copias de genoma y posteriormente se hizo la secuenciación nucleotídica por el Laboratorio de Genoma de Patógenos; dicha secuencia se publicó en la base GenBank de la NCBI donde tiene el número de acceso OQ238709 (Anexo 4).

5.5. EVALUACIÓN DEL CONTROL POSITIVO EN LA VERIFICACIÓN DE LA RT-qPCR AL GEN *NSP3* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HRVs GRUPO A

Para determinar los parámetros que se emplearon para evaluar propiamente al control se construyó una curva estándar a partir del control positivo con una concentración de 1.58×10^{10} copias de genoma de rotavirus tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009), como para el de Freeman et al.

(2008). Estas diluciones se llevaron por duplicado en las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para cada protocolo mencionado (Tablas 8 y 9).

Se calculó el promedio de ambos valores de CT en cada caso y se graficó el logaritmo de la concentración contra el promedio del CT en Excel (Figuras 16 y 17).

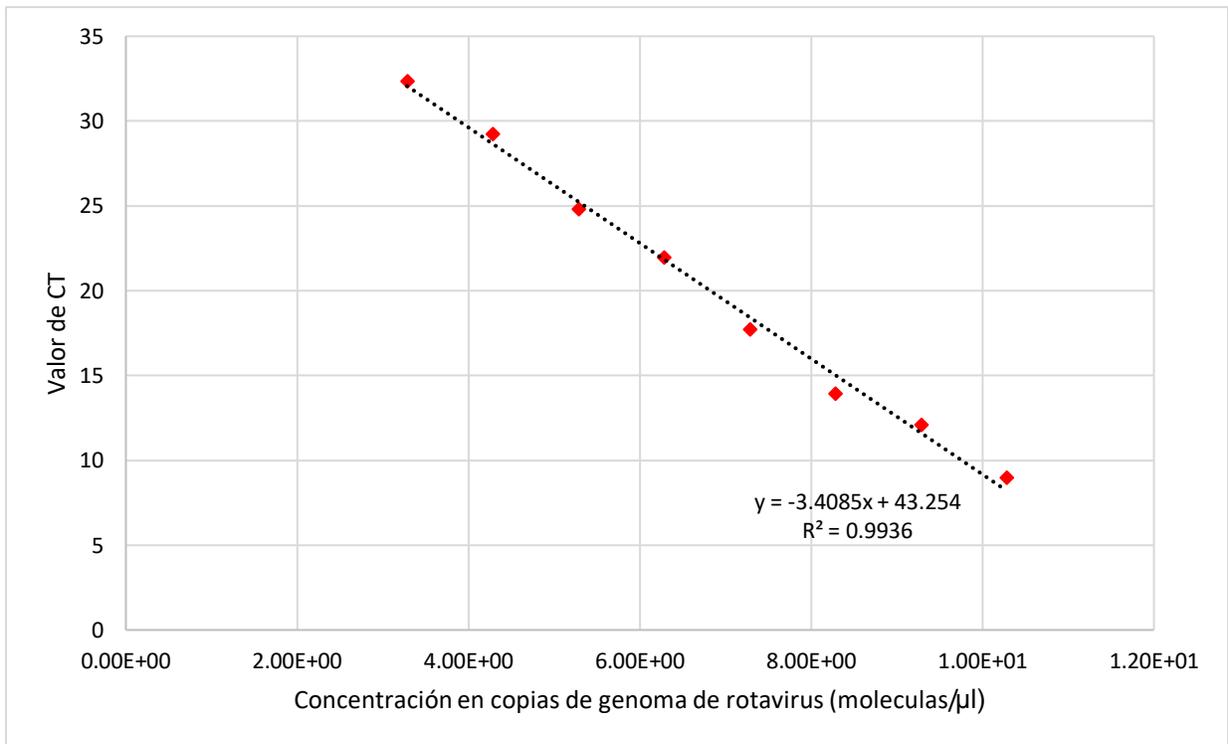
Tabla 8

Resultados de los CT de las diluciones seriadas del control positivo de la curva estándar para el protocolo de Jothikumar et al. (2009).

Dilución	Concentración en copias de genoma	Log de la concentración	CT 1	CT 2	CT Promedio
	1.58×10^{10}	10.20	6.01	11.96	8.985
1	1.58×10^9	9.20	13.34	10.83	12.085
2	1.58×10^8	8.20	13.25	14.61	13.93
3	1.58×10^7	7.20	18.16	17.33	17.745
4	1.58×10^6	6.20	22.39	21.55	21.97
5	1.58×10^5	5.20	25.13	24.49	24.81
6	1.58×10^4	4.20	29.77	28.70	29.235
7	1.58×10^3	3.20	32.20	32.54	32.37

Figura 16

Curva estándar para el protocolo de Jothikumar et al. (2009)



Nota. Se graficó el logaritmo de la concentración contra el promedio del valor de CT y se hizo regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

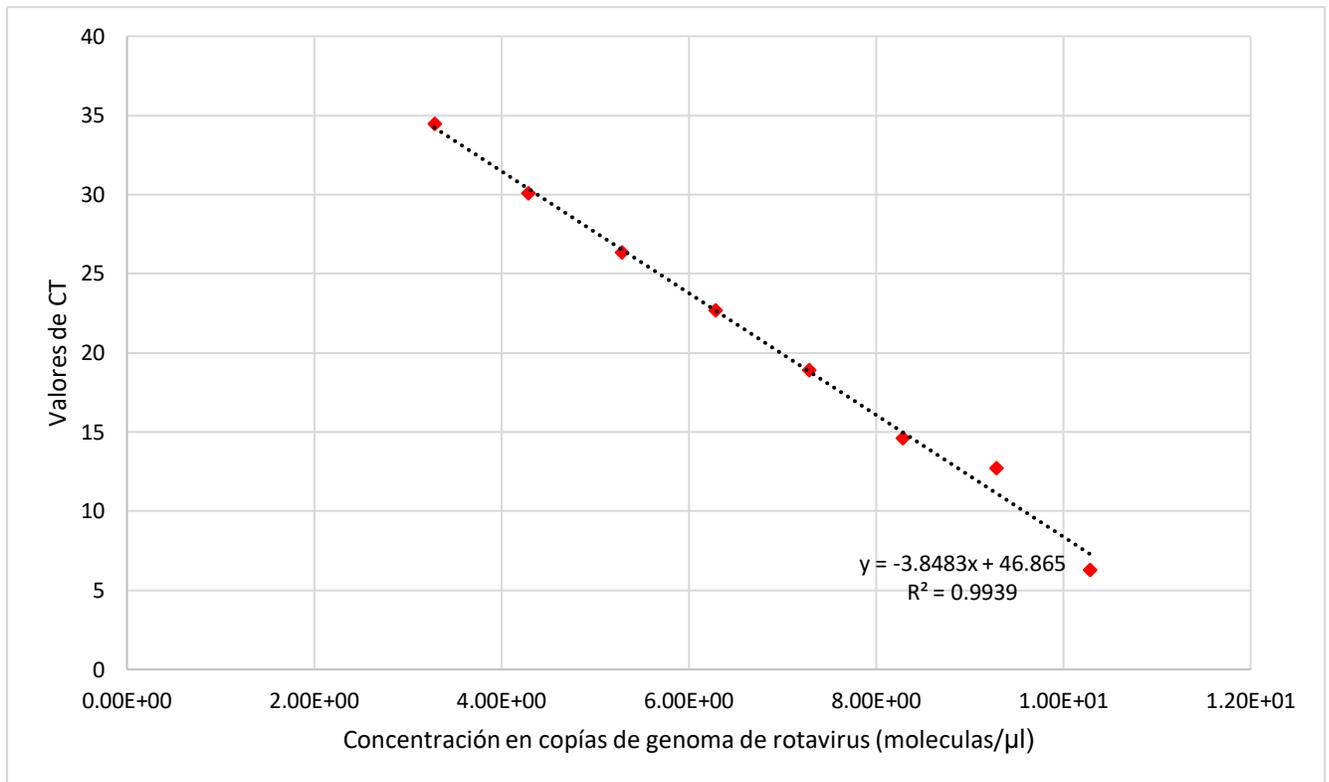
Tabla 9

Resultados de los CT de las diluciones seriadas del control positivo de la curva estándar para el protocolo de Freeman et al. (2008)

Dilución	Concentración en copias de genoma	Log de la concentración	CT 1	CT 2	CT Promedio
	1.58x10 ¹⁰	10.20	5.91	6.67	6.29
1	1.58x10 ⁹	9.20	13.82	11.61	12.715
2	1.58x10 ⁸	8.20	13.64	15.56	14.60
3	1.58x10 ⁷	7.20	19.61	18.23	18.92
4	1.58x10 ⁶	6.20	22.89	22.49	22.69
5	1.58x10 ⁵	5.20	26.71	26.02	26.365
6	1.58x10 ⁴	4.20	30.39	29.84	30.115
7	1.58x10 ³	3.20	34.1	34.82	34.46

Figura 17

Curva estándar para el protocolo de Freeman et al. (2008)



Nota. Se graficó el logaritmo de la concentración contra el promedio del valor de CT y se hizo regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

Se obtuvo la ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación (r^2) para cada curva estándar (Tabla 10).

Tabla 10

Intervalos en concentración de copias de genoma de rotavirus y ecuación de la curva estándar de los protocolos de Jothikumar et al.(2009) y Freeman et al. (2008)

Protocolo	Intervalos de la curva	Ecuación de la recta y valor de r²
Jothikumar	1.58x10 ¹⁰ – 1.58x10 ³ copias de genoma	Y = -3.4085x + 43.254 R ² = 0.9936
Freeman	1.58x10 ¹⁰ – 1.58x10 ³ copias de genoma	Y = -3.8483x + 46.865 R ² = 0.9939

5.5.1. LINEALIDAD Y PORCENTAJE DE EFICIENCIA

Para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) el valor de r² es de 0.9936, mientras que para el protocolo de Freeman et al. (2008) el valor de r² es de 0.9939 (Tabla 10).

El porcentaje de eficiencia para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) fue del 95%, mientras que el porcentaje de eficiencia para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue del 81.9%.

5.5.2. SENSIBILIDAD ANÁLITICA

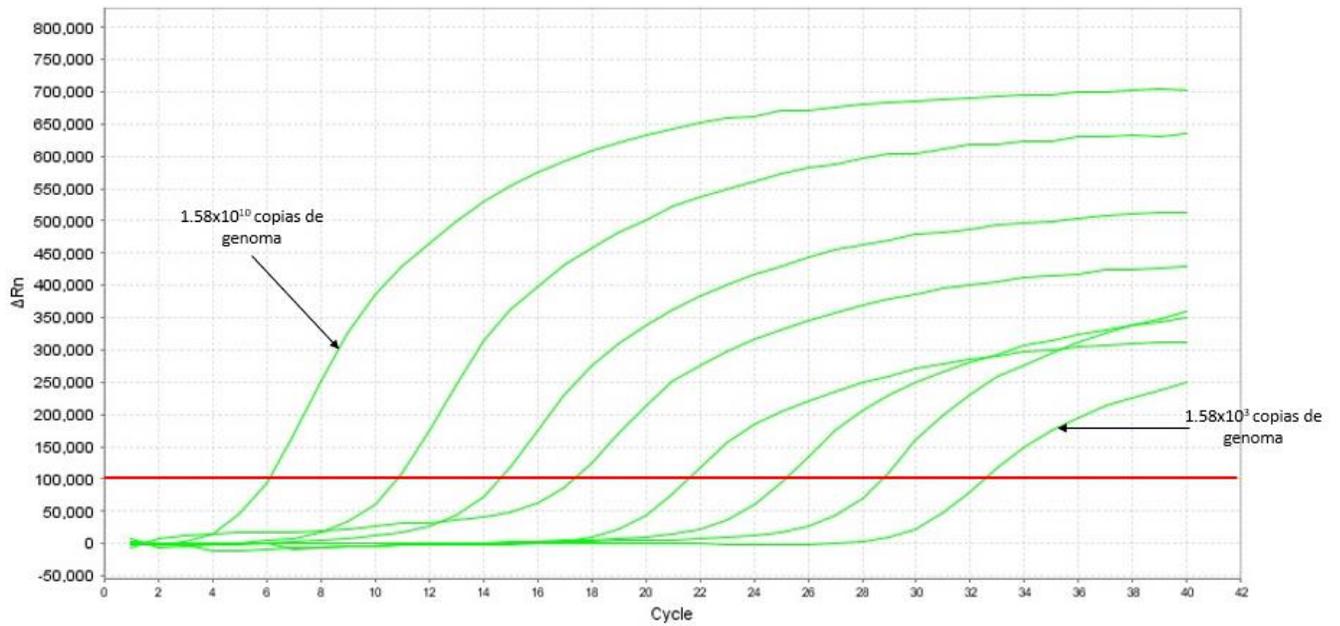
El valor de la pendiente para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) fue de -3.40, mientras que para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue de -3.84 (Tabla 10).

5.5.3. INTERVALO REPORTABLE Y LÍMITE DE DETECCIÓN

Para ambos protocolos, el intervalo reportable fue de 1.58 x 10¹⁰ a 1.58 x 10³ copias de genoma de HRVs y el límite de detección fue de 1.58 x 10³ copias de HRVs. La última dilución detectada por el termociclador ocurrió en el ciclo 34 para el protocolo de Jothikumar et al. (2009), mientras que en el protocolo de Freeman et al. (2008) fue en el ciclo 35 (Figuras 18 y 19).

Figura 18

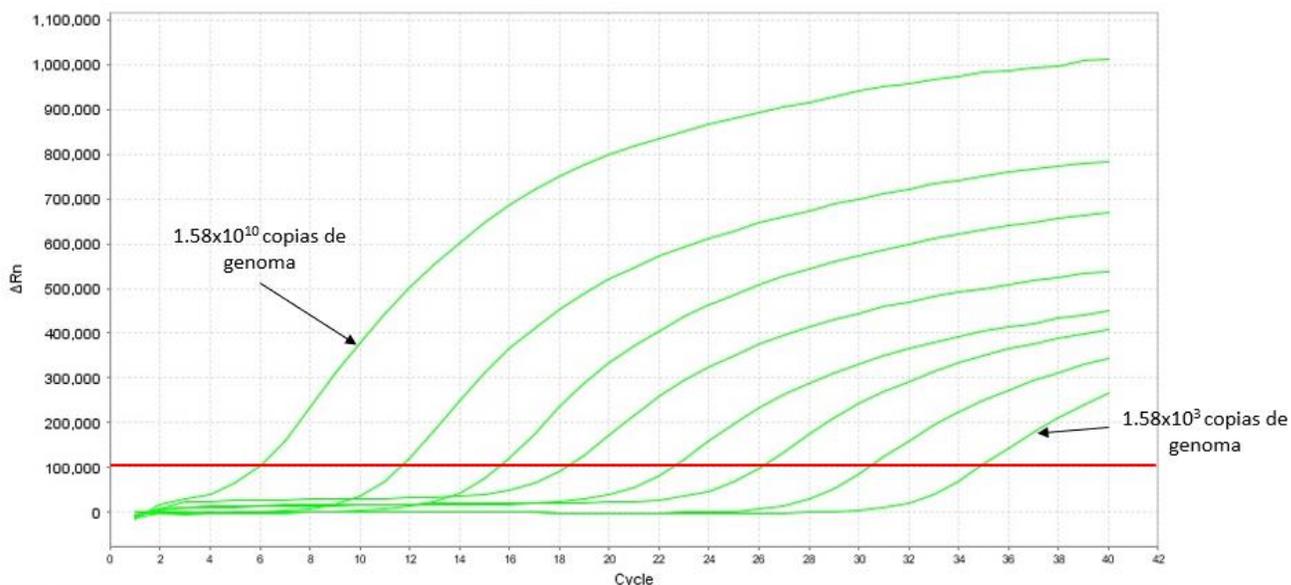
Gráfico de amplificación de la curva estándar del protocolo de Jothikumar et al. (2009)



Nota. El eje "X" corresponde al número de ciclos, mientras que el eje "Y" corresponde a la fluorescencia. El valor de corte fue de 100 000.

Figura 19

Gráfico de amplificación de la curva estándar del protocolo de Freeman et al. (2008)



Nota. El eje “X” corresponde al número de ciclos, mientras que el eje “Y” corresponde a la fluorescencia. El valor de corte fue de 100 000

Para evaluar los parámetros de precisión y la prueba *t* pareada se emplearon los valores de CT del control positivo de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad realizados para los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) en la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen *NSP3*.

Tabla 11

Valores de CT obtenidos de control positivo en la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) en los ensayos de repetibilidad.

Protocolo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Jothikumar	7.03	7.33	7.22	7.36
Freeman	7.73	7.73	6.59	7.11

Tabla 12

Valores de CT obtenidos del control positivo en la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) en los ensayos de reproducibilidad.

Protocolo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Jothikumar	10.71	9.93	13.08	9.89
Freeman	7.28	7.54	7.55	7.68

En los ensayos de repetibilidad, los valores de CT del control positivo obtenidos durante los ensayos de repetibilidad no variaron significativamente entre protocolos (Tabla 11).

Por el contrario, los valores de CT del control positivo obtenidos durante los ensayos de reproducibilidad, se observa una variación significativa entre los valores de CT obtenidos por el protocolo de Jothikumar et al. (2009) y los valores de CT obtenidos por el protocolo de Freeman et al. (2008) (Tabla 12).

Esto se debe a que los ensayos de reproducibilidad para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) se realizaron al final y la cantidad de alícuota del control positivo que proporcionó por primera vez el laboratorio de TAMM no fue suficiente para la realización de todo el trabajo, debido a esto y para no afectar los ensayos que ya se habían hecho previamente con esta alícuota, se acordó utilizar una dilución 1:10 del control positivo para llevar a cabo los ensayos de reproducibilidad para el protocolo mencionado.

5.5.4. PRECISIÓN

El % CV del control positivo a partir de los ensayos de repetibilidad para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) fue de 2.06% y para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue de 7.55%.

Mientras que, para los ensayos de reproducibilidad, el % CV del control positivo para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) fue de 13.75% y para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue de 2.23%.

El %CV elevado para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) se debe a que, como ya se mencionó, se utilizó una dilución 1:10 del control positivo.

5.5.5. PRUEBA DE t PAREADA

Para la repetibilidad, el valor obtenido para t fue de 0.8672, mientras que para la reproducibilidad el valor obtenido de t fue de 0.0211. En ambos casos, el valor crítico que se obtuvo fue de 3.1824.

Para la verificación de la RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) se realizaron reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* utilizando 21 muestras, así como el control negativo de reactivo (agua grado biología molecular), el control positivo obtenido en este trabajo, además de los controles positivo y negativo de muestra utilizados de forma rutinaria por el LVGI.

Tanto en el protocolo de Jothikumar et al. (2009), como en el protocolo de Freeman et al. (2008), los resultados obtenidos para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR al gen *NSP3* fueron concordantes con los resultados obtenidos por RT-PCR de punto final al gen *VP6* (Tabla 13).

Tabla 13

Muestras positivas y negativas a HRVs grupo A detectadas por RT-PCR de punto final al gen VP6 y por RT-qPCR al gen NSP3 por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008)

Método		Muestras positivas	Muestras negativas
	RT-PCR de punto final al gen VP6	13	8
RT-PCR en tiempo real al gen <i>NSP3</i>	Protocolo de Jothikumar	13	8
	Protocolo de Freeman	13	8

Para la evaluación de los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnóstica, los valores predictivos positivo y negativo, las tasas de falsos positivos y de falsos negativos, exactitud diagnóstica y el índice kappa se realizó una tabla de contingencia para cada uno de los protocolos ya mencionados, donde se compararon los resultados obtenidos por RT-qPCR al gen *NSP3* con los obtenidos por RT-PCR en de punto final al gen *VP6* (Tablas 14 y 15).

Tabla 14

Tabla de contingencia para el protocolo de Jothikumar et al. (2009)

		RT-PCR de punto final al gen VP6		
		Positivos	Negativos	Total
RT-PCR en tiempo real al gen <i>NSP3</i> (Protocolo de Jothikumar et al.)	Positivo	13	0	13
	Negativo	0	8	8
	Total	13	8	21

Tabla 15

Tabla de contingencia para el protocolo de Freeman et al. (2008)

		RT- PCR de punto final al gen VP6		
		Positivos	Negativos	Total
RT-PCR en tiempo real al gen <i>NSP3</i> (Protocolo de Freeman et al.)	Positivo	13	0	13
	Negativo	0	8	8
	Total	13	8	21

5.5.6. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

La sensibilidad y la especificidad diagnóstica fue del 100% tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el protocolo de Freeman et al. (2008).

5.5.7. VALOR PREDICTIVOS POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo fue de 100% tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el de Freeman et al. (2008).

5.5.8. TASAS DE FALSOS POSITIVOS Y TASA DE FALSOS NEGATIVOS

Tanto la tasa de falsos positivos como de falsos negativos para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) y para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue de 0.

5.5.9. EXACTITUD DIAGNÓSTICA

La exactitud fue de 1 tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el protocolo de Freeman et al. (2008).

5.5.10. ÍNDICE KAPPA

El índice kappa fue de 1 tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el protocolo de Freeman et al. (2008); es decir, se obtendrán los mismos resultados por RT-PCR al gen VP6 que por RT-qPCR.

5.5.11. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

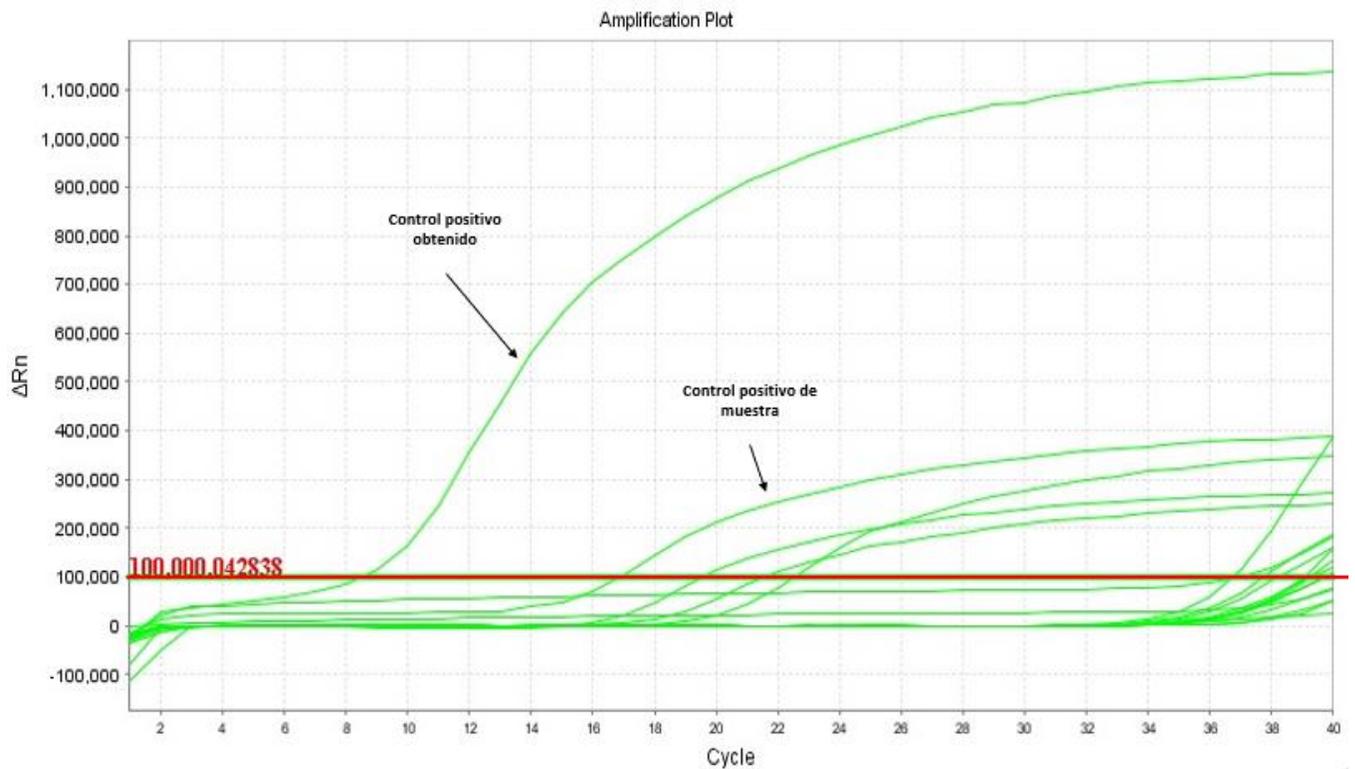
La especificidad analítica se evaluó a través de 12 muestras positivas y 3 muestras negativas provenientes del banco de materia fecal del LVGI del InDRE durante el año 2022. De las muestras, 3 fueron positivas a AdV, 3 fueron positivas a NoV, 3 fueron positivas a HAstrV y 3 son positivas a HRVs, las otras 3 fueron muestras negativas (Tabla 7).

Además de estas muestras, se utilizaron los controles negativos de reactivo (agua grado biología molecular), los controles positivo y negativo de muestra que son utilizados de manera rutinaria en el LVGI y el control positivo obtenido en este trabajo.

De las 15 muestras empleadas, solo las tres muestras positivas a HRVs y los controles positivos amplificaron en ambos protocolos (Figuras 20 y 21).

Figura 20

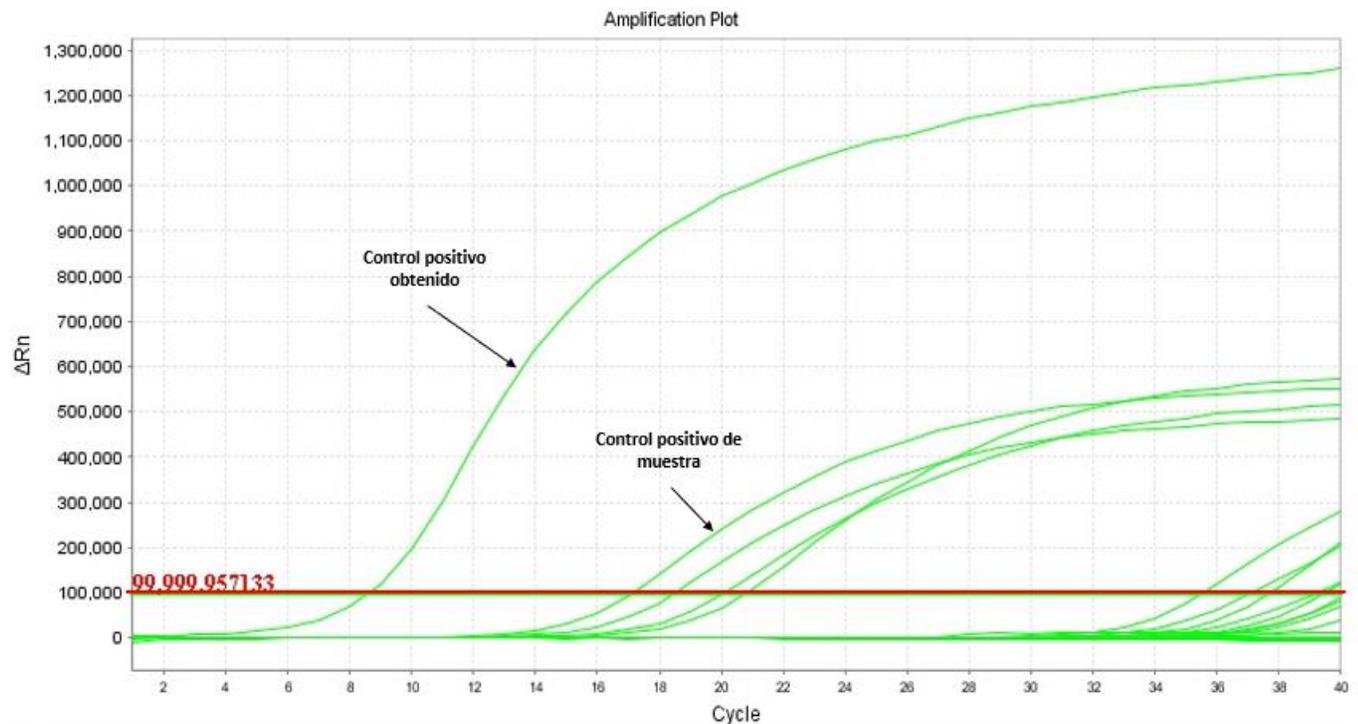
Gráfico de amplificación del ensayo de especificidad analítica del protocolo de Jothikumar et al. (2009)



Nota. En el gráfico se puede observar que solo los controles positivos y las muestras previamente identificadas como positivas a HRVs amplificaron por RT-PCR en tiempo real al gen NSP3; mientras que el control negativo de muestra, las muestras positivas a AdV, NoV y HAstrV, así como las muestras negativas no amplificaron o tuvieron un CT arriba de 35, por lo tanto, son negativas.

Figura 21

Gráfico de amplificación del ensayo de especificidad analítica del protocolo de Freeman et al. (2008)



Nota. En el gráfico se puede observar que solo los controles positivos y las muestras previamente identificadas como positivas a HRVs amplificaron por RT-qPCR al gen NSP3; mientras que el control negativo de muestra, las muestras positivas a AdV, NoV y HAstrV, así como las muestras negativas no amplificaron o tuvieron un CT arriba de 35, por lo tanto, son negativas.

Los valores de CT del control positivo obtenidos a partir de las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para evaluar los parámetros de verificación propios del método se mantuvieron muy similares entre protocolos, dentro de un intervalo de 7.0 a 7.68, coincidiendo con los valores de CT obtenidos durante los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad para la evaluación del control positivo.

A continuación, se hace un resumen de los resultados obtenidos de los parámetros evaluados para el análisis del control positivo, así como de los parámetros para la verificación del método de RT-qPCR para

la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) (Tablas 16 y 17).

Tabla 16

Parámetros de verificación de la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la evaluación del desempeño del control positivo

Parámetro	Valor obtenido		Criterio aceptable
	Protocolo Jothikumar	Protocolo Freeman	
Linealidad	0.9936	0.9939	0.99
% de eficiencia	95%	81.9%	90% - 110%
Sensibilidad analítica	-3.40	-3.84	-3.0 a -3.6
Intervalo reportable	CT < 34	CT < 35	CT < 35
Precisión de la repetibilidad (%CV)	2.06%	7.55%	< 14%
Precisión de la reproducibilidad (%CV)	13.75%	2.23%	
Prueba de t para la repetibilidad	0.8672		< 3.1824
Prueba de t para la reproducibilidad	0.0211		

Nota. En la tabla se hace un resumen de los resultados obtenidos de los parámetros calculados para cada protocolo, así como el criterio aceptable para cada uno.

Tabla 17

Parámetros de verificación de la RT-qPCR al gen NSP3 para la identificación de HRVs grupo A por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la aplicación del control positivo obtenido

Parámetro	Valor obtenido		Criterio aceptable
	Protocolo Jothikumar	Protocolo Freeman	
Sensibilidad diagnóstica	100%	100%	> 95%
Especificidad diagnóstica	100%	100%	> 95%
Exactitud diagnóstica	1	1	> 0.85
Valor predictivo positivo (VPP)	100%	100%	> 95%
Valor predictivo negativo (VPN)	100%	100%	> 95%
Tasa de falsos positivos	1	1	> 0.8
Tasa de falsos negativos	1	1	> 0.8
Índice kappa	1	1	> 0.8
Especificidad analítica	Sin amplificación	Sin amplificación	Sin amplificación

Nota. En la tabla se hace un resumen de los resultados obtenidos de los parámetros calculados para cada protocolo, así como el criterio aceptable para cada uno.

6. DISCUSIÓN

Los HRVs del grupo A son la principal causa de enfermedad diarreica aguda de origen viral en niños menores de cinco años en todo el mundo. Actualmente, el diagnóstico se hace a través de técnicas como el ELISA, la RT-PCR y la RT-qPCR. Los controles son esenciales en los ensayos de PCR para detectar falsos positivos y negativos (Buesa et al, s.f.; Acevedo et al, 2009; Reyes et al, 2018).

Se pueden emplear como controles los kits comerciales, muestras clínicas caracterizadas y secuenciadas. También se pueden obtener controles positivos a través de técnicas como el cultivo celular y la clonación en plásmidos. La clonación en plásmidos ha resultado en una alternativa ventajosa para la

obtención de controles debido a que permiten la obtención de controles para genes específicos y, en ensayos de RT-qPCR, permite la cuantificación de la muestra, además de ser más económica (Vircell, s.f; Acevedo et al, 2009; Rodríguez et al, 2008).

Por lo anterior, en este trabajo se planteó la obtención de un control positivo al gen *NSP3* de HRVs mediante la clonación en plásmido que sirviera para el diagnóstico de HRVs grupo A por RT-qPCR utilizando dos protocolos, el protocolo descrito por Jothikumar et al. (2009) y el descrito por Freeman et al. (2008). Se probó que el control positivo obtenido amplificara por ambos protocolos a través de la verificación de la RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A.

El diseño y la obtención del control positivo al gen *NSP3* se realizó, de manera general, en tres pasos: Primero se realizaron los ensayos de alineamiento de las secuencias de los iniciadores y las sondas descritos por Jothikumar et al. (2009), y Freeman et al. (2008) utilizados para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR con la secuencia del gen *NSP3*. Los ensayos de alineamiento de secuencias se hicieron con la finalidad de conocer las posiciones en las que, tanto las secuencias de estos iniciadores como las de las sondas, de cada protocolo, se alinean en la secuencia del gen y determinar qué par de iniciadores se utilizarían para la obtención del producto de amplificación de la secuencia a utilizar como control positivo, así como su tamaño en pares de bases.

Ya conociendo estas posiciones, se determinó que los iniciadores a utilizar serían el iniciador forward JVKE, del protocolo de Jothikumar et al. (2009) y el iniciador reverse NVP3-R1, del protocolo de Freeman et al. (2008), y que el tamaño en pares de bases del producto de amplificación de la secuencia a usar como control positivo era de 1049 pb (Figura 13).

Se eligieron estos iniciadores debido a que, como se mencionó antes, la forma en la que se detecta la amplificación de un producto por RT-qPCR es a través de la fluorescencia que emiten las sondas TaqMan, que contienen en su extremo 5' un reportero fluorescente y próximo a este un apagador, cuando la DNA

polimerasa comienza a sintetizar este fragmento de DNA y desplaza al apagador, este no puede absorber la fluorescencia del reportero y es captada por el sistema óptico del termociclador para reacciones en tiempo real; si el producto de amplificación no contiene dentro de su secuencia la región para que estas sondas se alineen no se podría detectar la amplificación (Tamay de Dios et al, 2013).

Segundo, se estandarizó una reacción de RT-PCR de punto final al gen *NSP3* para la obtención del producto de amplificación, debido a que, como se utilizaron iniciadores de dos protocolos diferentes para la identificación de HRVs grupo A por RT-qPCR, no se tenía un protocolo de amplificación para esta reacción. Se realizó una RT-PCR de gradiente de temperaturas, para saber la temperatura óptima de alineamiento y se realizaron diferentes ensayos de RT-PCR con diferentes cantidades de iniciadores, dNTP's, enzima y magnesio hasta llegar al protocolo propuesto en la tabla 2. Este protocolo se probó con tres muestras diferentes para saber con cuál se obtendría suficiente producto de amplificación y que, además, no presentara bandas inespecíficas (Figura 14).

El producto de amplificación elegido fue el de la muestra 771-08 (Figura 14) debido a que a partir de esta muestra se obtuvo un producto limpio con una buena intensidad de banda, además de no presentar bandas inespecíficas.

Tercero, este producto se envió al laboratorio de TAMM para su clonación en el plásmido. La clonación se realizó utilizando el kit PCR Cloning Kit de Qiagen que contiene al plásmido pDrive y se obtuvo un control positivo con una concentración de 84.1 ng/μl que equivale a 1.58×10^{10} copias de genoma de rotavirus. Posteriormente, el laboratorio de genoma de patógenos realizó la secuenciación nucleotídica y dicha secuencia se subió en la base de datos GenBank de la NCBI donde se puede encontrar a través del número de acceso OQ238709 (Anexo 4).

Se confirmó que la secuencia del control positivo correspondiera al gen *NSP3* de HRVs grupo A tomando la secuencia FASTA del control en GenBank, y a través de la herramienta BLAST, que encuentra

alineamientos significativos con otras secuencias que están en la base de datos se confirmó que la secuencia del control positivo corresponde con la secuencia del gen *NSP3*.

Se evaluó el desempeño del control positivo a través de los parámetros de linealidad, sensibilidad analítica, porcentaje de eficiencia, intervalo reportable, límite de cuantificación, precisión y prueba de *t* pareada. Para la linealidad, la sensibilidad analítica, el porcentaje de eficiencia, el intervalo reportable y el límite de cuantificación se realizó una curva estándar a partir de diluciones seriadas del control positivo para los protocolos de Jothikumar et al. (2009), y Freeman et al. (2008) y se obtuvo la ecuación de la recta; mientras que, para la precisión y la prueba de *t* pareada se realizaron ensayos de repetibilidad y reproducibilidad.

La linealidad se obtuvo a partir del valor del r^2 . Para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) el coeficiente de correlación fue de 0.9936, mientras que para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue de 0.9939. La EMA (2017) menciona que para que un método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser de por lo menos 0.99; por lo tanto, el método es lineal para ambos protocolos.

El porcentaje de eficiencia para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) fue de 95%, y para el de Freeman et al. (2008) fue de 81.9%. Taylor et al (2010) establece que el porcentaje aceptable de eficiencia debe estar entre el 90 y el 110%, sin embargo, la eficiencia en el protocolo de Freeman et al. (2008) fue mucho menor, esto pudo deberse, principalmente, a errores en el pipeteo; así como a la presencia de artefactos en la mezcla de reacción que pudieron intervenir en las mediciones de fluorescencia asociadas a los valores de CT y por consecuencia afectar la pendiente de la ecuación de la recta de la curva estándar con la cual se calcula el porcentaje de eficiencia (Thermo Fisher Scientific, s.f.).

La sensibilidad analítica se refiere a la relación que existe en la señal obtenida y la concentración viral por lo que debe ser constante en todo el intervalo de medida. Este parámetro se reportó con el valor obtenido de la pendiente de la recta. Para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) la pendiente fue de -

3.40, mientras que la pendiente para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue de -3.84. Bustin et al (2009) mencionan que valores de pendiente entre -3.1 y -3.6 son aceptados, debido a que, en este intervalo, la eficiencia se encuentra dentro del intervalo aceptable.

Por otro lado, el valor obtenido de la pendiente de la recta para el protocolo de Freeman et al. (2008) se encuentra por encima del límite aceptable, pero al estar relacionada la pendiente con la eficiencia de la reacción, esto puede deberse, como ya se mencionó, a factores como el pipeteo o la presencia de artefactos en la mezcla de reacción que hayan interferido con la fluorescencia asociada a los valores de CT.

El intervalo reportable es el intervalo de medición de los valores obtenidos de los ensayos en los que el laboratorio puede establecer o verificar la exactitud del instrumento de medición. Mientras que el límite de detección es la mayor concentración de copias de material genético que el instrumento puede detectar con una precisión aceptable bajo las condiciones de rutina del laboratorio. El intervalo reportable tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009), como para el de Freeman et al. (2008) fue de 1.58×10^{10} a 1.58×10^3 copias de genoma de rotavirus y el límite de detección fue de 1.58×10^3 copias de genoma (Figuras 18 y 19). El valor del ciclo umbral fue de 100,000.

De La Cruz et al (2018) mencionan que la RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs detecta hasta 10 diluciones del estándar de RNA Amplirun Rotavirus RNA Control de Vircell y la última dilución se detectó antes del ciclo 39, por lo que todas las muestras con un CT menor a 38.5 se consideran positivas a HRVs; sin embargo, actualmente en el laboratorio de virus gastrointestinales, el valor de CT establecido para determinar si una muestra es positiva a HRVs o no por RT-qPCR al gen *NSP3*, es un CT menor a 35 debido a que a ciclos mayores, el método no es reproducible.

Con respecto al límite de detección, la última dilución que se detectó tanto por el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el protocolo de Freeman et al. (2008) fue la dilución 7, con una

concentración de 1.58×10^3 copias de genoma de rotavirus; la cual se detectó antes del ciclo 34 utilizando el protocolo de Jothikumar et al. (2009) (Figura 18) y antes del ciclo 35 utilizando el protocolo de Freeman et al. (2008) (Figura 19).

Como se mencionó anteriormente, la precisión y la prueba de *t* pareada se evaluaron a través de los CT del control positivo en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad para cada uno de los protocolos mencionados.

Se calculó el %CV para reportar la precisión del control positivo tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el protocolo de Freeman et al. (2008). Para la repetibilidad, el %CV para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) fue de 2.06% y para el de Freeman et al. (2008) fue de 7.05%; mientras que, para la reproducibilidad, el %CV para fue de 13.75% y de 2.23% respectivamente.

Posada (2016) refiere que un %CV menor o igual al 7% indica una muy alta precisión, mientras que % CV entre el 8% y el 14% indica una precisión aceptable, por lo que los valores de CT del control positivo obtenidos tanto por el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como por el protocolo de Freeman et al. (2008) en los ensayos de repetibilidad tienen una muy alta precisión.

En los ensayos de reproducibilidad, de acuerdo con Posada (2016), la precisión se encuentra dentro de un rango aceptable a pesar de que el %CV para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) está muy elevado en comparación con el % CV obtenido para el protocolo de Freeman et al. (2008), debido a que se utilizó una dilución 1:10 del control positivo.

La prueba de *t* pareada se emplea para comprobar si la media entre pares de medidas es o no igual a cero, es decir, si existe o no diferencia significativa entre las medias de un grupo de medidas. La prueba de *t* pareada se realizó a través de la herramienta análisis de datos de Excel para comparar los valores de CT del control positivo obtenidos por el protocolo de Jothikumar et al. (2009), con los obtenidos por el

protocolo de Freeman et al. (2008). Esta prueba también se realizó tanto para los ensayos de repetibilidad como para los ensayos de reproducibilidad.

Romero (2013) explica que para determinar si existe o no una diferencia significativa entre los grupos de medida se parte de la idea de una hipótesis nula, es decir, que no existe diferencia entre un grupo y otro. Por lo tanto, esta hipótesis se acepta si el valor de t es menor al valor crítico, lo que quiere decir que no existe diferencia significativa entre un grupo de medidas y otro; y, por el contrario, se rechaza la hipótesis si el valor de t es mayor al valor crítico, es decir, existe una diferencia significativa entre un grupo de medidas y otro.

Para los ensayos de repetibilidad el valor de t que se obtuvo fue de 0.8672 mientras que el valor de t obtenido para los ensayos de reproducibilidad fue de 0.0211. En ambos casos el valor crítico fue de 3.1824; así que, no existen diferencias significativas entre los valores de CT del control positivo obtenidos por el protocolo de Jothikumar et al. (2009) y los CT obtenidos por el protocolo de Freeman et al. (2008) ni para el caso de la repetibilidad ni para la reproducibilidad.

Por otro lado, se utilizó el control positivo en las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A para cada uno de los protocolos mencionados. Esto se realizó a través de los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnóstica, exactitud diagnóstica, los valores predictivos positivo y negativo, las tasas de falsos positivos y de falsos negativos, el índice kappa y la especificidad analítica.

Para evaluar todos los parámetros previamente mencionados, excepto la especificidad analítica, se realizaron tablas de contingencia con los resultados obtenidos a partir de estas reacciones. En estos ensayos se utilizaron 21 muestras clínicas tanto positivas como negativas a HRVs (Tabla 7), así como el control negativo de reactivo (agua grado biología molecular), los controles positivo y negativo de muestra utilizados de manera rutinaria por el LVGI y el control positivo obtenido.

Los resultados obtenidos por RT-qPCR al gen *NSP3* se compararon con los resultados obtenidos por RT-PCR de punto final al gen *VP6*, que fue el método de referencia para los fines de este trabajo debido a que, al igual que la RT-qPCR, es un método molecular. En ambas reacciones de RT-PCR, los resultados que se obtuvieron por RT-qPCR al gen *NSP3* fueron concordantes con los resultados que se obtuvieron por RT-PCR de punto final al gen *VP6* (Tabla 13).

La sensibilidad diagnóstica se refiere la probabilidad de que el resultado de la prueba sea positivo en una persona que se ve afectada por la enfermedad, es decir, que está enferma, por lo que representa la fracción de los verdaderos positivos. Mientras que la especificidad diagnóstica, se define como la probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativo en una persona sana, es decir, que no padece la enfermedad; por lo tanto, representa la fracción de los verdaderos negativos (Segura Egea, 2002).

Por otro lado, los valores predictivos determinan si el paciente tiene la enfermedad, después de haber obtenido los resultados de las pruebas. El valor predictivo positivo (VPP) representa la probabilidad de que un individuo con prueba positiva tenga la enfermedad, es decir, corresponde a los enfermos con pruebas positivas de entre todas las pruebas positivas. El valor predictivo negativo (VPN) representa la probabilidad de que un individuo con prueba negativa no tenga la enfermedad, es decir, que realmente este sano, por lo que corresponde a los pacientes sanos con prueba negativa de entre todas las pruebas negativas (Gómez y Pérez, 2007).

Tanto la sensibilidad y la especificidad diagnósticas para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el protocolo de Freeman et al. (2008) fueron del 100%. Asimismo, los valores predictivos positivo y negativo para ambos protocolos fue del 100%. Vizcaíno (2017) menciona que la sensibilidad y la especificidad diagnóstica representan la validez de la prueba diagnóstica y los valores predictivos positivo y negativo representan la seguridad de la prueba diagnóstica, por lo que en este sentido se puede calificar a la prueba en estos parámetros como excelente si es mayor al 95%. Por lo tanto, la RT-qPCR al gen *NSP3*,

por el protocolo de Jothikumar et al. (2009) y por el protocolo de Freeman et al. (2008) es válida y segura para el diagnóstico de HRVs grupo A.

Por otro lado, las tasas de falsos positivos y de falsos negativos para ambos protocolos fue de 0. De acuerdo con Díaz, C. et al. (2019), las tasas de falsos positivos y de falsos negativos son complementarios a los parámetros de sensibilidad y especificidad, por lo que, si el método tiene una alta sensibilidad y especificidad, las tasas de falsos positivos y de falsos negativos es baja, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

La exactitud diagnóstica permite conocer si la prueba que se está evaluando distingue a las personas que padecen o no una enfermedad de entre todas las personas de quienes se sospecha dicha enfermedad (Díaz, C. et al, 2019). La exactitud diagnóstica tanto para el protocolo de Jothikumar et al. (2009) como para el de Freeman et al. (2008) fue de 1. Álvarez y Pérez (2009) mencionan que a medida que el valor de este índice se acerque a 1 la prueba se considera más exacta, por lo que la RT-qPCR al gen *NSP3* es tan exacta como la RT-PCR de punto final al gen *VP6* para la identificación de HRVs grupo A.

El índice Kappa se utiliza para evaluar la concordancia de los instrumentos de medida. El término “instrumento de medida” hace referencia al conjunto formado tanto por el aparato, como por el analista que interpreta dicha medición (Abraira, 2002). El índice kappa calculado para ambos protocolos fue de 1. Abraira (2002) establece que un índice kappa de entre 0.81 a 1 es un grado de concordancia casi perfecto, por lo que la concordancia entre la RT-PCR de punto final al gen *VP6* y la RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A es casi perfecta, es decir, se obtienen los mismos resultados para la identificación de HRVs grupo A con cualquiera de las reacciones de RT-PCR, ya sea la de punto final o la de tiempo real.

Finalmente, la especificidad analítica se evaluó a través de un ensayo de RT-qPCR al gen *NSP3* para cada uno de los protocolos mencionados previamente, donde se utilizaron muestras positivas a otros virus

gastrointestinales como NoV, AdV y HAstrV; además, se incluyeron muestras positivas a HRVs, así como muestras negativas y se utilizaron los mismos controles que en las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para la construcción de las tablas de contingencia. La especificidad analítica es la capacidad de un ensayo para detectar un agente o analito en particular, sin que este sea interferido por otros componentes presentes en la muestra. Representa la proporción de muestras que no contiene al HRVs y responden negativamente al método (Camaró et al, 2013).

Solo las muestras positivas a HRVs y los controles positivos fueron detectadas por RT-qPCR al gen *NSP3* por los protocolos de Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008); mientras que las muestras que fueron positivas a los otros virus gastrointestinales, así como las muestras negativas, no fueron detectadas por la reacción, por lo que la RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs por ambos protocolos es 100% específica para la detección de HRVs grupo A (Figuras 20 y 21).

7. CONCLUSIONES

Se diseñó un control positivo a partir de la combinación y el alineamiento de las secuencias de los iniciadores descritos por Jothikumar et al. (2009) y Freeman et al. (2008) para la identificación de HRVs por RT-qPCR con la secuencia del gen *NSP3* de HRVs grupo A. Los iniciadores utilizados para la obtención del producto de amplificación con la secuencia a utilizar como control positivo fueron JVKF del protocolo de Jothikumar et al. (2009) y NVP3-R1 del protocolo de Freeman et al. (2008).

Se obtuvo un control positivo al gen *NSP3* de HRVs grupo A a través de la clonación en un plásmido. Este control positivo tuvo una concentración de 84.1 ng/ μ l (1.58×10^{10} copias de genoma) y su secuencia se encuentra en la base de datos GenBank de la NCBI con el número de identificación OQ238709.

Se evaluó el control positivo en las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A y se determinó que no existe diferencia significativa entre los valores de CT del control

positivo obtenidos mediante el protocolo de Jothikumar et al. (2009) y el de Freeman et al. (2008) ni entre un analista y otro.

Se analizó la aplicación del control positivo en la verificación de los métodos de RT-qPCR al gen *NSP3* para la identificación de HRVs grupo A. El control obtenido amplificó por ambos protocolos y los valores de CT obtenidos a partir de las reacciones de RT-qPCR al gen *NSP3* para evaluar los parámetros de verificación del método se mantuvieron muy similares entre protocolos, dentro de un rango de 7.0 a 7.68, coincidiendo con los valores de CT obtenidos durante los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad utilizados para la verificación del control propiamente.

La RT-qPCR al gen *NSP3* resultó ser tan sensible y específica como la RT-PCR de punto final al gen VP6 para la identificación de HRVs grupo A; además de ser válida y segura para su diagnóstico, por lo que en el futuro podría implementarse en la RNLSP como técnica para la identificación de HRVs en apoyo a la vigilancia epidemiológica.

8. LIMITACIONES DEL TRABAJO

Una de las limitantes que se presentaron en la realización de este trabajo fue la cantidad de muestras disponibles debido a que, durante la pandemia de COVID-19 que se presentó a principios del año 2020 en nuestro país; las muestras que el InDRE recibía en su mayoría, eran muestras para la identificación de SARS-CoV2.

9. PERSPECTIVAS

Utilizar el control positivo al gen *NSP3* obtenido en este trabajo para el procedimiento de rutina del laboratorio de virus gastrointestinales.

Obtener controles positivos para otros genes de HRVs a través de la clonación en plásmido.

A largo plazo, poder implementar la RT-qPCR al gen *NSP3* para el diagnóstico de HRVs grupo A en la RNLSP en apoyo a la vigilancia epidemiológica.

REFERENCIAS

- Abraira, V. (2001). El índice kappa. *SEMERGEN*, 27(5), 247–249. [https://doi.org/10.1016/s1138-3593\(01\)73955-x](https://doi.org/10.1016/s1138-3593(01)73955-x)
- Acevedo, A. M., Santana, E., Díaz de Arce, H., Pérez, L. J., Caballero, A., Suárez, L., & Sánchez, O. (2009). Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. *Revista de salud animal*, 31(1), 50–54. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2009000100010
- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México DF: SEMARNAT, INECC, UAM-I, 175-201.
- Álvarez-Martínez, H., & Pérez-Campos, E. (2009). Utilidad clínica de la tabla 2x2. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 2(1), 22–27. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=40761>
- Anaya-Molina, Y., De La Cruz Hernández, S. I., Andrés-Dionicio, A. E., Terán-Vega, H. L., Méndez-Pérez, H., Castro-Escarpulli, G., & García-Lozano, H. (2018). A one-step real-time RT-PCR helps to identify mixed rotavirus infections in Mexico. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 92(4), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.023>
- Balsalobre-Arenas, L., & Alarcón-Cavero, T. (2017). Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(6), 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.002>

Buesa Gómez, J., López-Andújar, P., & Rodríguez Díaz, J. (s/f). Diagnóstico de las infecciones víricas gastrointestinales. Seimc.org. Recuperado de <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/viromicromol/rotavir.pdf>

Bustin, S. A., Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C., & Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(7), e31–e36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>

Castelazo Sinecio, I. (s/f). INCERTIDUMBRE EN LAS MEDICIONES: IMPACTOS ECONÓMICOS Y SOCIALES. Cenam.mx. Recuperado de <https://www.cenam.mx/memorias/descarga/simposio%202002/doctos/sp001.pdf>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2022). Rotavirus. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado de <https://www.cdc.gov/rotavirus/index.html>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2023, marzo 14). Información clínica acerca del rotavirus. Cdc.gov. Recuperado de <https://www.cdc.gov/rotavirus/clinical-sp.html>

Contreras-Treviño, H. I., & Padilla-Noriega, L. (2018). Regulación de la traducción mediada por la proteína NSP3 de rotavirus. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.152>

Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>

De La Cruz Hernández, S. I., Anaya Molina, Y., Gómez Santiago, F., Terán Vega, H. L., Monroy Leyva, E., Méndez Pérez, H., & García Lozano, H. (2018). Real-time RT-PCR, a necessary tool to support the diagnosis and surveillance of rotavirus in Mexico. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(4), 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.12.005>

Díaz Mellado, O. M. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Técnicas de Biología Molecular en el Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas*, 100(100), 1–100. <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>

Díaz-Alonso, C., Garrote-Santana, H., Amor-Vigil, A. M., Suárez-González, Y., & González-Mugica Romero, R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, 29(3), 298–303. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402892013000300010&lng=es&tlng=es.

Díaz-García, L., Medina-Vera, I., González-Garay, A., & Murata, C. (2019). Estudios de exactitud diagnóstica. *Acta Pediátrica de México*, 342–357.

Dirección General de Epidemiología. (2022). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). Gob.mx. https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/44_Manual_EDA_2022.pdf

Egea, S., & José, J. (2002). Sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos convencionales de la caries oclusal según la evidencia científica disponible. *RCOE*, 7(5), 491–501. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138123X2002000600004&lng=es&nrm=iso

entidad mexicana de acreditación, a.c. (2017). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Org.mx. https://www.ema.org.mx/descargas_portalV2/guias_tecnicas/Guias_Tecnicas_CLINICOS/CLINICOS_Validacion-Verificacion.pdf

Espinosa Asuar Laura. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (ed) *Ecología molecular*. INE, CONABIO y UNAM

Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed.). Disponible en www.eurachem.org

Freeman, M. M., Kerin, T., Hull, J., McCaustland, K., & Gentsch, J. (2008). Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1489–1496. <https://doi.org/10.1002/jmv.21228>

Gómez González, C., & Pérez Castán, J. F. (2007). Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. SEMERGEN, 33(10), 509–519. [https://doi.org/10.1016/s1138-3593\(07\)73955-2](https://doi.org/10.1016/s1138-3593(07)73955-2)

Gómez-Rial, J., Rivero-Calle, I., Salas, A., & Martín-Torres, F. (2020). Rotavirus and autoimmunity. The Journal of Infection, 81(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.041>

Gutierrez, M. B., Fialho, A. M., Maranhão, A. G., Malta, F. C., Andrade, J. da S. R. de, Assis, R. M. S. de, Mouta, S. da S. e., Miagostovich, M. P., Leite, J. P. G., & Machado Fumian, T. (2020). Rotavirus A in Brazil: Molecular Epidemiology and Surveillance during 2018–2019. Pathogens, 9(7), 515. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070515>

Herrera M., J. (2020). Validación y estimación de incertidumbre de un método analítico para cuantificar hierro total por el método colorimétrico de la fenantrolina en agua potable y natural. Revista Científica de FAREM-Estelí, 34, 154–168. <https://doi.org/10.5377/farem.v0i34.10014>

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. (2023). Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la gastroenteritis viral: Rotavirus, Norovirus, Astrovirus y Adenovirus entéricos. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/811052/Lineamientos_V_L_Rotavirus-0323.pdf

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2020). Instructivo de confirmación o validación de métodos analíticos. Recuperado de <http://sgi.ideam.gov.co/documents/412030/35488871/M-S-LC-I038+INSTRUCTIVO+DE+CONFIRMACIÓN+O+VALIDACIÓN+DE+MÉTODOS+ANALÍTICOS+v3.pdf/cd82e785-16f2-4ffa-b965-4614a9808f38?version=1.0>

JMP. (s/f). Prueba t pareada. jmp.com. Recuperado de https://www.jmp.com/es_mx/statistics-knowledge-portal/t-test/paired-t-test.html

Jothikumar, N., Kang, G., & Hill, V. R. (2009). Broadly reactive TaqMan® assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. *Journal of Virological Methods*, 155(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.025>

Laboratorio de Investigación de Enfermedades Gastrointestinales. (2014). Rotavirus antígeno fecal (ELISA). *Gastrolabperu.com*. Recuperado de [https://www.gastrolabperu.com/examenes/rotavirus-antigeno-fecal-\(elisa\)-.html](https://www.gastrolabperu.com/examenes/rotavirus-antigeno-fecal-(elisa)-.html)

Labster Theory. (2021). Curva estándar. *Labster.com*. Recuperado de <https://theory.labster.com/standard-curve-qpcr-es/>

López Santiago, Y., López Murrieta, D., Monroy Limas, C., & López Sámano, A. (2021). Programa de Acción Específico para la Prevención y Control de Enfermedades Diarreicas Agudas 2020-2024. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/706928/PAE_EDA_cF.pdf

López, S., & Arias, C. (2001). Los rotavirus. En E. Martínez Romero & J. C. Martínez Romero (Eds.), *Microbiología en línea*. Recuperado de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap17/>

López, S., & Arias, C. F. (2019). Genómica de rotavirus. Impacto en salud pública. *Salud pública de México*, 62(1, ene-feb), 36. <https://doi.org/10.21149/9965>

Luchs, A., & Timenetsky, M. do C. S. T. (2016). Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (Sao Paulo, Brasil)*, 14(2), 278–287. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082016rb3582>

Meier, J. L. (2021). Viral acute gastroenteritis in special populations. *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(2), 305–322. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2021.02.003>

Meridian Bioscience. (2008). EIA for the detection of Rotavirus Antigen in Human Fecal Samples. Meridianbioscience.com. Recuperado de https://www.meridianbioscience.com/uploads/696004_pi.pdf

Mora, M., Ascón, D., & Hung, A. (2016). Evaluación y validación de la prueba de qPCR para el control y monitoreo de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* en las bahías de Guaynuna y Salinas. *Salud y tecnología veterinaria*, 3(1), 13. <https://doi.org/10.20453/stv.v3i1.2760>

Mousavi-Nasab, S. D., Sabahi, F., Kaghazian, H., Paryan, M., Mirab Samiee, S., Ghaderi, M., Zali, F., & Makvandi, M. (2020). A real-time RT-PCR assay for genotyping of Rotavirus. *Iranian Biomedical Journal*, 24(6), 399–404. <https://doi.org/10.29252/ibj.24.6.394>

Nates, S. (2015). Virus productores de diarrea. En G. Carballal & J. R. Oubiña (Eds.), *Virología médica* (pp. 347–356). Corpus Libros Médicos y Científicos.

Organización Mundial de la Salud. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods. World Health Organization. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70122>

Ortega García, M. ^aV, Jiménez Mateo, O., Sellek Cano, R., Bassy Álvarez, O., Granja Albarellós, C., & Cabria Ramos, J. C. (2017). PCR cuantitativa en tiempo real para la amplificación de ADN de *Burkholderia mallei*: comparación con el método molecular recomendado por la OIE. *Sanidad militar*, 73(2), 85–90. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712017000200002>

Posada Hernández, J. G. (2016). Elementos básicos de estadística descriptiva para el análisis de datos.

Fundación

Universitaria

Luis

Amigó.

https://www.funlam.edu.co/uploads/fondoeditorial/120_Ebook-elementos_basicos.pdf

Ramírez-Pacheco, A., Moreno-Guerrero, S. S., & Medina-Sanson, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta mexicana de oncología*, 12(3), 162–173.

<https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-herramientas-moleculares-su-utilidad-el-X1665920113270127>

Revilla, F. (2009). OPS/OMS. Pan American Health Organization / World Health Organization. Recuperado de https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1861:2009-about-rotavirus&Itemid=1621&lang=es

Reyes-Gómez, U., Reyes-Hernández, K. L., Luis, A., Luévanos-Velázquez, A., Guerrero-Becerra, M., Antonio Martínez-Arce, P., De-Lara-Huerta, J., Santamaría-Arza, C., Quero-Hernández, A., López-Cruz, G., & Reyes, U. (2018). Enfermedad diarreica aguda en niños. *Salud Quintana Roo*, 34–41.

Rodríguez, E., Betancourt, A., Acevedo, A. M., Relova, D., Ayala, J., & Barrera, M. (2008). Aislamiento del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo en cultivos celulares. *Revista de salud animal*, 30(2), 93–97. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2008000200004

Romero Saldaña, M. (2013). Comparación de medias en grupos apareados o dependientes. *Enfermería del trabajo*, 118–123. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4421495>

Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K. C., Naseem, S., & Sattar, S. (2018). Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in Medical Virology*, 28(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>

Sandoval Rodríguez, A. S., Mena Enríquez, M., & Márquez Aguirre, A. L. (2013). Capítulo 14: Vectores de clonación y expresión. En A. M. Salazar Montes, A. S. Sandoval Rodríguez, & J. S. Armendáriz Borunda (Eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.

Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria, Inocuidad y Calidad. (2022). Criterios para el funcionamiento, aplicación e interpretación de métodos analíticos. [gob.mx](https://www.gob.mx/senasica/documentos/criterios-para-el-funcionamiento-aplicacion-e-interpretacion-de-metodos-analiticos?state=published). Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/criterios-para-el-funcionamiento-aplicacion-e-interpretacion-de-metodos-analiticos?state=published>

Sociedad Española de Epidemiología. (2007). Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas. EMISA. Recuperado de https://www.seepidemiologia.es/documents/dummy/265-gastroenteritis_agudas_viricas.pdf

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2, 70–78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Tamayo Meneses, L., & Moreno Lagos, B. O. (2007). Rotavirus. *Cuadernos Hospital de Clínicas*, 52(1), 97–106. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1652-67762007000100017&lng=es&tlng=es.

Tapia, L. I. (2015). Laboratorio de Virología en la Práctica Clínica. *Revista médica Clínica Las Condes*, 26(6), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.003>

Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—
Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), S1–S5.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>

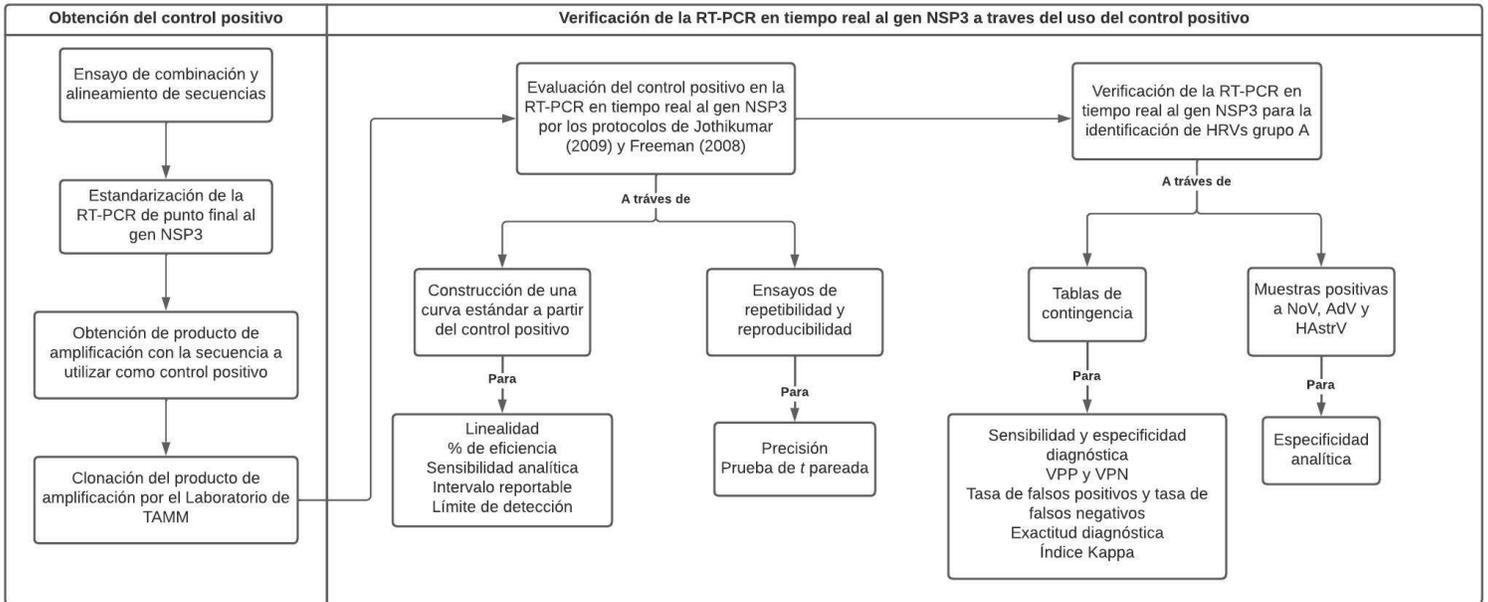
Thermo Fisher Scientific. (s/f). Real-Time PCR: Understanding ct. Thermo Fischer. Recuperado de
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>

Vircell. (s/f). Amplirun Rotavirus RNA Control. Vircell.com. Recuperado de
<https://www.vircell.com/producto/amplirun-rotavirus-rna-control/>

Vizcaíno Salazar, G. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y Laboratorio*, 365–386

ANEXOS

1. DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA

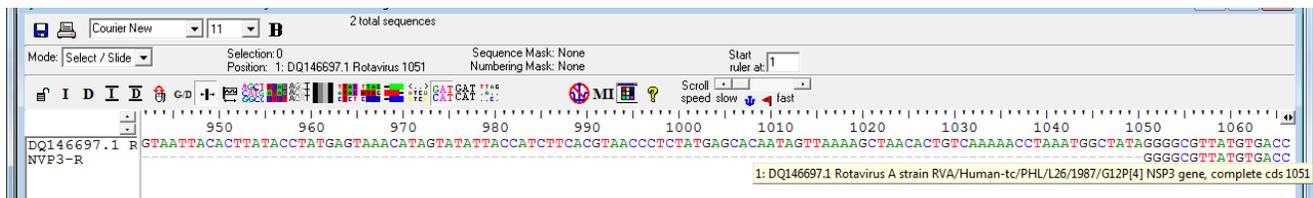


2. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

2.1 Alineamiento de los iniciadores JVKF del protocolo de Jothikumar (2009) y NVP3-R1 del protocolo de Freeman (2008)

JVKF: 17 – 39 pb

NVP3-R1: 1051 – 1066 pb



JVKF

```

GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGGTTGATGCTCAAGATGGAGTCTACTCAACAGATGGCATCTTCTATTATTAACCTCTCTTTTGAAGCTGCAGTTGTCGCTGCAACTTCTACATTAGAATTAATGGGTAATCAATATGATTATAATGAAGTATACACT
CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA
AGAGTTAAAAGTAAGTTTGATTTGTAATGGATGATCTGGTGTAAAAAATAATTAATGGGTAAGAGCTACAATTGATCAGGCTTTGAAATGGTAAGTTGATGTTCACTATTAGAAAATAGAAATGGATGACTGATTCAAAAACGTAGCGAGAT
TGGATGAAGATGTGAATAAAC TTAGATTATTTATTCATCAGAAAGAAATTTGATCAAAAAATGAGAGTTC TTAATGC GTGTTTAAATGTTAAGAGAGTGCC TGGAAAATCATCATCTGCTCATTAATGTACTAGGTTAATGAAAGATAAAATAGAACC
TGGAGAAGTGAAGTGGATGATACATTC GTTGAGGAAAGAAATGGAATTTGACACCAATAGATTTGAAATCCAGATATGACCAACTTGAAGAGCATTGAGTCTTAAAACAGCGAGTTAATGAAAATACAATAATTTGGGTTATTAAGGCAAGGAAA
GTAATGAAAACATGAACCTCTCTCAAAATGTTATTTCAACAGCAAGCTCATATCAATGAATACAAATATATAATAAATAGAGCTGATTTACAATCAAAAAATAGGATCAGTTATTTCACTCATTGAATGGTACTTGGGCTCATGGAGC
GTCCAGATGACATTAATCAGATATTTGAACAAACACTCAATTC AATAGATCATATTAATCCAGTTAATGCTTTCGATGATTTTGAGTCAATTCCTTGTAATTTAATATCTGATTATAGATAGAATTTTTATTATGTTTAAAGGATTGTTGACGCAAAAG
TAATTACACTTATACCTATGAGTAACATAGTATATTACCATCTTACGTAACCCCTATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGCGTTATGTGACC
GGGGCGTTATGTGACC
  
```

NVP3-R1

CAGTTGAGTGGTATTTAAGATCTATGGAATTACCAGATGATGTAAAGAATGATATTGAAC
 AGCAGTTAAATTC AATTGATTTAATTAATCCCATTAATGCTATAGATGATATCGAATCAT
 TGGTTAGAAATTTAGTTCAGGATTATGATAGAACATTTTTAATGTTAAAGGGACTGTTGA
 AGCAATGCAACTATGAATATGTATATGAATAGTCACATAATTAATAATCATTAAACCATCTA
 CACATGACCCTCTATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGCGTTATGTG

3.1. Búsqueda de la secuencia con BLAST

[← Edit Search](#) Save Search Search Summary ▾ [?](#)

Job Title **ROTAVIRUS-3 Human rotavirus A 1036PB ...**

RID [BJJZ9DBD016](#) Search expires on 07-21 22:59 pm [Download All](#) ▾

Program BLASTN [?](#) [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID |c|Query_28475

Description ROTAVIRUS-3 Human rotavirus A 1036PB 100/100

Molecule type dna

Query Length 1032

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

[Descriptions](#) [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show [?](#)

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein complete cds segment 7 strain RVA/Human/JPN/YM051/20...	Human rotavirus A	1906	1906	100%	0.0	100.00%	1071	LC173940.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein complete cds segment 7 strain RVA/Human/JPN/YM038/20...	Human rotavirus A	1906	1906	100%	0.0	100.00%	1074	LC173936.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Vector pTAMM-52 partial sequence	Vector pTAMM-52	1906	1906	100%	0.0	100.00%	1275	OQ238709.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein complete cds segment 7 strain RVA/Human/JPN/YM017/20...	Human rotavirus A	1906	1906	100%	0.0	100.00%	1074	LC173926.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A isolate LL09131481 nonstructural protein 3 gene complete cds	Human rotavirus A	1906	1906	100%	0.0	100.00%	1070	KJ094902.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A RVA/Human-wt/VNM/RVN16.1467/2016/G9P[8] NSP3 gene for NSP3 protein complete cds	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1073	LC491503.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A RVA/Human-wt/VNM/RVN16.0876/2016/G9P[8] NSP3 gene for NSP3 protein complete cds	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1060	LC491481.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A Human-wt/JPN/Tokyo18-49/2018/G9P[8]-E1 NSP3 gene for NSP3 protein complete cds	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1071	LC477618.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A Human-wt/JPN/Tokyo18-43/2018/G9P[8]-E2 NSP3 gene for NSP3 protein complete cds	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1052	LC477617.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A Human-wt/JPN/Tokyo18-37/2018/G9P[8]-E1 NSP3 gene for NSP3 protein complete cds	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1061	LC477611.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein complete cds segment 7 strain RVA/Human/JPN/YM022/20...	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1074	LC173928.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein complete cds segment 7 strain RVA/Human/JPN/SP024/201...	Human rotavirus A	1901	1901	99%	0.0	100.00%	1064	LC173912.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein complete cds segment 7 strain RVA/Human/JPN/SP010/201...	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1073	LC173900.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Human rotavirus A isolate RVA/Human-wt/CHN/Fuzhou20-045/2020/G9P[8] NSP3 gene complete cds	Human rotavirus A	1901	1901	100%	0.0	99.90%	1074	MZ407440.1

4. NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO EN LA BASE DE DATOS GenBank

GenBank ▾

Vector pTAMM-52, secuencia parcial

GenBank: OQ238709.1

[Gráficos](#) [rápidos](#)

[Ir a:](#)

LOCUS OQ238709 1275 pb ADN lineal SYN 24-MAY-2023

DEFINICIÓN Vector pTAMM-52, secuencia parcial.

ADHESIÓN OQ238709

VERSIÓN OQ238709.1

PALABRAS CLAVE .

FUENTE Vector pTAMM-52

ORGANISMO [Vector pTAMM-52](#)

otras secuencias; secuencias artificiales; vectores

REFERENCIA 1 (bases 1 a 1275)

AUTORES Fragoso-Fonseca,DE, Centeno-Cayetano,GB, Jiménez-Morales,M.,
Esteban-Valencia,Md.C., Corona-Valdespino,E., Andrade-Montiel,E.,
Escobar-Escamilla,N., Ramirez-Gonzalez,JE and Hernandez-Rivas,L.

TÍTULO Clonación de productos PCR para obtener controles sintéticos para su uso en
procedimientos de diagnóstico molecular

REVISTA Inédito

REFERENCIA 2 (bases 1 a 1275)

AUTORES Landa-Flores,MG, Del Mazo-López,JC, Serrano-Gutiérrez,S.,
Rodríguez-Maldonado,AP y Wong-Arambula,CE

TÍTULO Presentación directa

REVISTA Enviado (11-ENE-2023) Unidad de Desarrollo Tecnológico e
Investigación Molecular, Instituto de Diagnóstico y Referencia
Epidemiológicos (INDRE) 'Dr. Manuel Martínez Báez', Secretaría de
Salud, Francisco de P. Miranda 177 Col. Lomas de Plateros, Álvaro
Obregón, Ciudad de México, CDMX 01480, México

COMENTARIO ##Ensamblaje-Datos-INICIO##

Tecnología de secuenciación :: Secuenciación didesoxi de Sanger

##Datos de ensamblaje-FIN##

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificadores

fuelle 1..1275

/organismo="Vector pTAMM-52"

/mol_type="otro ADN"

/db_xref="taxón: [3048077](#) "

/país="México"

[misc_feature](#)

<1..132

/nota="pDrive vector"

[CDS](#)

<133..>932

/note="Rotavirus humano A"

/codon_start=3

/transl_tabla= [11](#)

/product="proteína NSP3"

/protein_id="OMS55643.1 " _

/translation="ESTQQMVSSIINTSFEEAAVVAATSTLELMGIQYDYNEVFTRVKS
KFDYVMDDSGVKNLLGKAITIDQALNGKFGSAIRNRNIMTDSKTVAKLDEDVNKLRM
TLSSKGIDQKMRVNLNACFSVKRIPGKSSSSIIKCTKLMKDKIERGEVEVDDSYDEKME
IDTIDWKSRYDQLEKRFESLQQRVTEKYNTWVQAKKVNENMYSLQNVISQQQNOIAD
LQQYCNKLETDLQGGFSSLVSSVENYLRSMELPDDVKNDIEQQLNSID"

[misc_feature](#)

1166..>1275

/nota="pDrive vector"

4.1. Secuencia FASTA del control

Vector pTAMM-52, secuencia parcial

GenBank: OQ238709.1

[Gráficos](#) [GenBank](#)

>OQ238709.1 Vector pTAMM-52, secuencia parcial

```
GTAAACGACGGCCAGTGAATTGTGCGGCCATTAGGTGACACTATAGAATACAGCGGCCGCGAGCTCGG
GCCCCACACGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAACCTTGTGACGAATTCAGATTGGAGTCT
ACTCAGCAGATGGTAACTCTATTATTAACACTTCTTTTGAAGCTGCAGTTTGTGCTGCCACTTCAACAT
TAGAATTAATGGGTATTCAATATGATTACAATGAAGATTTACTAGAGTTAAAAGTAAATTTGATTATGT
AATGGATGACTCTGGTGTAAAAATAATCTTTTGGGTAAGCTATAACTATTGACCAGGCGTTAAATGGA
AAGTTTGGCTCAGCTATTAGAAATAGAAATGGATGACTGACTCTAAAACGGTTGCTAAATTGGATGAAG
ACGTGAATAAAGTGAATGACATTGTCTTCTAAAGGAATCGATCAAAGATGAGAGTACTTAATGCTTG
TTTTAGTGTGAAAAGAATACCAGGAAAATCATCATCAATAATTAAGTGCCTAACTTATGAAGGATAAA
ATAGAACGTGGGGAAGTTGAGGTTGATGATTATATATTGATGAGAAAATGGAATTTGATACCATTTGATT
GGAAATCTCGTTATGACCAATTAGAAAAAGATTTGAGTCACTAAAACAAAGAGTTACTGAGAAATACAA
TACTTGGGTACAAAAAGCGAAGAAAGTAAATGAGAATATGACTCTCTCAAAATGTCATTTCAACAACAG
CAAAATCAAATAGCAGATCTTCAACAATATTGTAATAAATTGGAAACTGACTTGCAAGGCAAATTTAGTT
CATTAGTGTATCAGTTGAGTGGTATTTAAGATCTATGGAATACCAGATGATGTAAGAATGATATTGA
ACAGCAGTTAAATCAATGATTTAATTAATCCATTAAAGTCTATAGATGATATCGAATCATTGGTTAGA
AATTTAGTTCAGGATTATGATAGAACATTTTAAATGTTAAGGGACTGTTGAAGCAATGCAACATGAAAT
ATGTATATGAATAGTCACATAATAAAAATCAATACCCTACACATGACCTCTATGAGCACAATAGTT
AAAAGCTAACACTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGCGTTATATCACGAATCTGGATCCGATACGT
AACCGTCTGCAGCATGCGTGGTACCAGCTTTCCCTATAGTGAGTCTGATTAGAGCTTGCGTAATCAT
GGTCATAGCTGTTTC
```

4.2. Búsqueda de la secuencia del control en BLAST

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download | Select columns | Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Vector pTAMM-52, partial sequence	Vector pTAMM-52	2355	2355	100%	0.0	100.00%	1275	OQ238709.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds, segment 7, strain: RVA/Human/JP/YNM038/20...	Human rotavirus A	1912	1912	81%	0.0	100.00%	1074	LC173936.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds, segment 7, strain: RVA/Human/JP/YNM051/20...	Human rotavirus A	1908	1908	81%	0.0	100.00%	1071	LC173940.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds, segment 7, strain: RVA/Human/JP/YNM017/20...	Human rotavirus A	1908	1908	81%	0.0	100.00%	1074	LC173926.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A isolate LL09131481 nonstructural protein 3 gene, complete cds	Human rotavirus A	1908	1908	81%	0.0	100.00%	1070	KJ094902.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A RVA/Human-wt/VNM/RVN16.1467/2016/G9P[8] NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1073	LC491503.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A RVA/Human-wt/VNM/RVN16.0876/2016/G9P[8] NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1060	LC491481.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A Human-wt/JP/Tokyo18-49/2018/G9P[8]-E1 NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1071	LC477618.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A Human-wt/JP/Tokyo18-43/2018/G9P[8]-E2 NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1052	LC477617.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A Human-wt/JP/Tokyo18-37/2018/G9P[8]-E1 NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1061	LC477611.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds, segment 7, strain: RVA/Human/JP/YNM022/20...	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1074	LC173928.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A NSP3 gene for NSP3 protein, complete cds, segment 7, strain: RVA/Human/JP/SP010/201...	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1073	LC173900.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A isolate RVA/Human-wt/CHN/Fuzhou20-045/2020/G9P[8] NSP3 gene, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1074	MZ407440.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human rotavirus A isolate RVA/Human-wt/CHN/Fuzhou20-025/2020/G9P[8] NSP3 gene, complete cds	Human rotavirus A	1903	1903	81%	0.0	99.90%	1074	MZ407385.1

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Reports | Lineage | Organism | Taxonomy

100 sequences selected

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
root			123	
. Vector pTAMM-52	other sequences	2355	1	Vector pTAMM-52 hits
. Human rotavirus A	viruses	1912	116	Human rotavirus A hits
. Rotavirus A	viruses	1903	6	Rotavirus A hits