



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

**Validación de una prueba de Reacción en Cadena de la
Polimerasa Convencional para la detección del Virus
Linfotrópico de Células T Humanas de Tipo 1
(HTLV-1) en células mononucleares de sangre
periférica**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Jorge Luis INOLOPÚ CUCCHE

ASESOR

Ricardo Mafalky RODRÍGUEZ TORRES

Lima, Perú

2017

**Validación de una prueba de Reacción en Cadena de la
Polimerasa Convencional para la detección del Virus
Linfotrópico de Células T Humanas de Tipo 1 (HTLV-1) en
células mononucleares de sangre periférica**

Autor: Bachiller, INOLOPÚ CUCCHE, JORGE LUIS

Asesor: RICARDO MAFALKY RODRÍGUEZ TORRES

Dedicatoria

A mis padres, amigos y maestros que apoyaron mi desarrollo profesional.

Agradecimiento

Al grupo de investigación en HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Este proyecto de investigación se realizó en los laboratorios de Epidemiología Molecular del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Fue financiado por el fondo de cooperación belga: Proyecto VLIRUOS Partner Universidad Católica de Lovaina –Bélgica y aprobado por el comité de ética de la UPCH con código SIDISI 100668 y constancia 256-10-17.

ÍNDICE

CAPITULO I	2
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	2
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.3. OBJETIVOS	5
1.4. BASES TEÓRICAS.....	6
CAPITULO II.....	19
2.1. DISEÑO METODOLOGICO.....	19
2.1.1. Tipo de investigación.....	19
2.1.2. Diseño de la investigación.	19
2.1.3. Población.	19
2.1.4. Muestra y muestreo.....	19
2.1.5. Variables.	20
2.1.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.	22
2.1.7. Procedimientos y análisis de datos.	26
2.1.8. Consideraciones éticas.....	36
CAPITULO III.....	38
3.1. RESULTADOS DE ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN.....	38
3.2. RESULTADOS DE VALIDACIÓN.	47
CAPITULO IV	67
4.1. ENSAYOS DE ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN.	67
4.2. ENSAYOS DE VALIDACIÓN.....	68
4.3. ANÁLISIS DE COSTOS.....	73
4.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	75
CAPITULO IV	78

Lista de tablas

Tabla 1	Registro de resultados de estandarización de la PCR – Ensayo de prueba.	Pág. 39
Tabla 2	Determinación de la temperatura de hibridación.	Pág. 40
Tabla 3	Determinación de la concentración de cloruro de magnesio.	Pág. 42
Tabla 4	Distribución de promedios de los RFU en cada concentración de cloruro de magnesio.	Pág. 42
Tabla 5	Determinación de la concentración de ADN.	Pág. 43
Tabla 6	Distribución de promedios de los RFU con respecto a la cantidad de ADN por reacción de PCR.	Pág. 44
Tabla 7	Determinación de la concentración de Taq. Pol.	Pág. 45
Tabla 8	Distribución de promedios de los RFU con respecto a la cantidad de Taq. Pol por reacción de PCR.	Pág. 46
Tabla 9	Determinación del Límite de detección – Ensayo N°1.	Pág. 48
Tabla 10	Determinación del Límite de detección – Ensayo N°2.	Pág. 49
Tabla 11	Determinación del Límite de detección – Ensayo N°3.	Pág. 50
Tabla 12	Determinación del Límite de detección – Ensayo N°4.	Pág. 51
Tabla 13	Determinación del Límite de detección – Ensayo N°5.	Pág. 52
Tabla 14	Determinación del Límite de detección – Ensayo N°6.	Pág. 54
Tabla 15	Resumen de resultados de validación de la PCR - Determinación del Límite de detección.	Pág. 54
Tabla 16	Determinación de la precisión – Ensayo N°1.	Pág. 56
Tabla 17	Determinación de la precisión – Ensayo N°2.	Pág. 58
Tabla 18	Determinación de la precisión – Ensayo N°3.	Pág. 60
Tabla 19	Resumen de resultados de validación de la PCR - Determinación de la precisión.	Pág. 61
Tabla 20	Determinación de la precisión – Ensayo N°3.	Pág. 63
Tabla 21	Distribución de resultados de veracidad respecto a la prueba de referencia de qPCR-IMTA _v H.	Pág. 65
Tabla 22	Parámetros de veracidad respecto a diferentes pruebas de referencia.	Pág. 65
Tabla 23	Publicaciones de estandarización y validación de pruebas de PCR para la detección del HTLV-1.	Pág. 72

Lista de figuras

Fig. 1	Descripción del virus de HTLV-1 y esquema del genoma proviral del HTLV-1.	Pág. 6
Fig. 2	Mecanismos de transmisión del HTLV-1 por contacto celular.	Pág. 7
Fig. 3	Distribución mundial del HTLV-1.	Pág. 9
Fig. 4	Algoritmo de diagnóstico del HTLV-1.	Pág. 11
Fig. 5	Descripción de la prueba de INNO-LIA.	Pág. 12
Fig. 6	Primer ensayo de PCR convencional.	Pág. 38
Fig. 7	Ensayo de PCR para la determinación de la temperatura de hibridación óptima.	Pág. 39
Fig. 8	Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación a la temperatura de hibridación.	Pág. 40
Fig. 9	Ensayo de PCR para la determinación de la concentración óptima de cloruro de magnesio.	Pág. 41
Fig. 10	Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación al cloruro de magnesio.	Pág. 42
Fig. 11	Ensayo de PCR para la determinación de la concentración óptima de ADN.	Pág. 43
Fig. 12	Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación a la concentración de ADN.	Pág. 44
Fig. 13	Ensayo de PCR para la determinación de la concentración óptima de cloruro de Taq pol.	Pág. 45
Fig. 14	Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación a la concentración de Taq. Pol.	Pág. 46
Fig. 15	Determinación del límite de detección usando 5, 3, 1, 0.5 y 0.25 copias por reacción de PCR.	Pág. 47
Fig. 16	Determinación del límite de detección usando 3 y 2 copias por reacción de PCR.	Pág. 49
Fig. 17	Determinación del límite de detección usando 5 copias por reacción de PCR.	Pág. 51
Fig. 18	Determinación del límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.	Pág. 52
Fig. 19	Determinación del límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.	Pág. 53
Fig. 20	Resultados consolidados de la determinación del límite de detección.	Pág. 55
Fig. 21	Primer ensayo de precisión.	Pág. 56
Fig. 22	Segundo ensayo de precisión.	Pág. 58
Fig. 23	Tercer ensayo de precisión.	Pág. 59
Fig. 24	Resultados consolidados de la precisión.	Pág. 61
Fig. 25	Ensayo de veracidad.	Pág. 62
Fig. 26	Relación de costos y tiempo de procesamiento para las pruebas de tamizaje y confirmatorias para HTLV-1.	Pág. 74
Fig. 27	Formato de procesamiento de una placa de 96 pozos para la determinación de carga proviral.	Pág. 74
Fig. 28	Formato de procesamiento de una placa de 96 pozos para la determinación cualitativa de HTLV-1 por PCR.	Pág. 74

Resumen

Las pruebas serológicas confirmatorias para el HTLV-1 tienen prolongados periodos de procesamiento, no son aplicables a grandes grupos de muestras y pueden generar resultados indeterminados. Además, debido su alto costo, individuos con resultados seropositivos por pruebas de tamizaje y de bajos recursos no acceden a las pruebas confirmatorias. Ante estas limitaciones, las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) o en tiempo real de tipo cuantitativa (qPCR) fueron propuestas debido a su versatilidad a materiales biológicos, alta sensibilidad y especificidad y relativo bajo costo.

La detección del provirus del HTLV-1 por pruebas de PCR convencional tiene bajo costo y es aplicable a diversos formatos como placas de 96 pozos, tiras de 8 pozos y tubos individuales. En contraparte, las pruebas de qPCR generalmente usan master mix universales que limitan las oportunidades de optimización y requiere del uso de una placa de reacción de 96 pozos para el procesamiento de 16 muestras. Por tanto, decidimos desarrollar una prueba de PCR convencional priorizando su utilidad como prueba cualitativa confirmatoria del HTLV-1 de bajo costo y aplicación a diversos formatos de procesamiento.

Los resultados de la validación mostraron un límite de detección de 4.0 copias del gen proviral Tax en 60 ng de ADN por reacción de 15 uL y una precisión con una tasa de detección del 94%, 97% y 100% para 3.2, 4.0 y 4.8 copias por reacción respectivamente. Además, en comparación con una prueba de qPCR considerada prueba de referencia para nuestro estudio, la PCR convencional obtuvo un 97.9% de sensibilidad, 47.6% de especificidad, un valor predictivo positivo y negativo de 80.7 y 83.4 respectivamente y un factor de concordancia kappa de 0.49. La PCR desarrollada permite la detección del HTLV-1 de manera rápida, segura y confiable, siendo aplicable a diversos formatos de procesamiento.

Abstract

Confirmatory serological tests for HTLV-I are time-consuming, not applicable to large population and they could yield imprecise results. Another point to consider is that many seropositive individuals by screening tests can not access to confirmatory tests due to their high cost. Moreover, low tittle-antibodies in immunosupressed subjects or those who are in seroconversion process might generate false negative results. PCR tests were proposed to be an alternative recourse to deal with all these limitatios, due to their versatility, high sensitivity, specificity and relative low cost.

The detection of the HTLV-I provirus through conventional PCR is low cost and applicable to several platforms like 96-well plates, 8-well strips and individual tubes. In contrast, the Quantitative Real Time PCR (qPCR) uses generally a universal master mix which reduces the opportunities for optimization. Furthermore, it requires the use of a single reaction plate to assays 16 samples only (involving high costs). Therefore, given the necessity for a confirmatory test with low cost, high sensitivity and high specificity, the development of a PCR is convenient.

The validation of the PCR followed the CLSI recommendations. The results showed a limit of detection equal to 4.0 copys of the Tax proviral gene in 60ng of DNA per 15uL of reaction and a detection precision of 94%, 97% and 100% for 3.2, 4.0 and 4.8 copys of DNA per reaction, respectively. Additionally, compared to a qPCR, the PCR obtained a kappa concordance factor equal to 0.49, sensitivity of 97.9%, specificity of 47.6% and a Predictive Positive Value (PPV) and Predictive Negative Value (VNP) of 80.7 and 83.4 respectively. In conclusion, our PCR enables to achieve assays quickly, safely, reliably and it is applicable to different processing formats.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.

Las pruebas serológicas basadas en el Western blot son utilizadas para el diagnóstico confirmatorio de la infección por el virus de HTLV-1 y HTLV-2. Sin embargo estas pruebas presentan un alto costo, prolongado periodo de procesamiento, no son aplicables a múltiples muestras y pueden generar resultados indeterminados. Además, al igual que otras pruebas serológicas, bajos títulos de anticuerpos en individuos inmunosuprimidos o en proceso de seroconversión pueden generar resultados falsos negativos (1, 2). Al respecto, estudios muestran que el tiempo promedio de seroconversión del HTLV-1 adquirido por transfusiones con sangre contaminada es 2 de meses (3, 4).

Además, las pruebas serológicas de Western blot no son útiles en el diagnóstico de la transmisión vertical del HTLV-1 en infantes menores de 18 meses dada la posible presencia de anticuerpos maternos específicos al virus (5). Por otro lado, para fines de diagnóstico e investigación, es necesario evaluar la detección del HTLV-1 en muestras no serológicas en las que las pruebas de Western blot no son aplicables. Entre estas muestras se encuentran las células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMCs) (6), leche materna (7), líquido cefalorraquídeo (8) y tejidos embebidos en parafina (9).

Ante estas limitaciones, se propuso el uso de pruebas de PCR para el diagnóstico confirmatorio del HTLV-1 debido a su alta sensibilidad, especificidad y versatilidad a diversos tipos de muestras que contengan linfocitos T CD4+. (10, 11). Esta prueba detecta el provirus de HTLV-1 integrado en el genoma de las células infectadas permitiendo esclarecer resultados serológicos indeterminados. Sin embargo, dado que no existen materiales de referencia ni presentaciones comerciales de la prueba de PCR para el HTLV-

1; de manera independiente se han desarrollado pruebas de PCR (in-house) bajo diversos criterios de validación (12).

Al respecto, se revisaron diez publicaciones de validación de pruebas de PCR in-house para el diagnóstico del HTLV-1, los cuales son analizados en detalle en la sección de discusión y resumidos en el tabla 23 (página 73). En estos estudios, las metodologías de validación no siguen un consenso pues no referencian guías de procedimientos como los planteados por la CLSI. Con respecto al estudio del límite de detección, existen discrepancias respecto al número de copias provirales del HTLV-1 en muestras de líneas celulares y de ADN plasmídico. Así mismo, el estudio de la precisión en las publicaciones revisadas, fueron realizados con materiales de referencia a concentraciones superiores al límite de detección y un mínimo número de réplicas lo cual no garantiza su confiabilidad.

La mayoría de pruebas de PCR in-house para el diagnóstico del HTLV-1 son de tipo qPCR que determinan el número de copias provirales por cada 10,000 PBMCs denominado carga proviral. A diferencia de una PCR convencional, en esta metodología se preparan dos master mix y curvas estándar dispuestas en paralelo en una placa de reacción para el procesamiento de 16 muestras como máximo. Las qPCR generalmente utilizan master mix universales a concentraciones fijas de sus componentes que limitan su optimización. Además, algunas qPCR incluyen cebadores y sondas adicionales para la detección de múltiples agentes infecciosos (HTLV-1, HTLV-2 y HTLV-3) lo cual disminuye su sensibilidad analítica (12).

La determinación de la carga proviral del HTLV-1 por qPCR es un indicador orientado a la investigación de la progresión de enfermedades asociadas, el impacto de nuevos fármacos y estudios epidemiológicos (40). La utilidad clínica de la carga proviral está asociada a la evaluación de tendencias en varias mediciones en casos confirmados, siendo una herramienta especializada con fines de investigación y no esencialmente una prueba diagnóstica confirmatoria. Por ello, el uso de las pruebas de qPCR como prueba confirmatoria representaría una pérdida de recursos.

En relación a la oferta, laboratorios clínicos privados ofrecen pruebas de PCR para la detección del HTLV-1 con un costo que oscila entre 87 y 478 dólares en un tiempo de entrega de resultados de hasta 16 días (sección 4.3, página 73). Por su parte, el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (IMTAvH) desarrolló una prueba de qPCR (qPCR-IMTAvH) para determinar la carga proviral del HTLV-1 con fines de investigación (30). Al igual que otras pruebas de qPCR, la qPCR-IMTAvH procesa 16 muestras por placa de reacción y tiene un costo subvencionado de 75 dólares por ensayo en un tiempo de procesamiento de 05 horas (incluyendo la extracción de PBMCs y ADN).

Por su parte, es conocido que la PCR convencional requiere un mayor tiempo de procesamiento y equipamiento adicional para los procesos de electroforesis de geles de agarosa y revelado de imágenes. No obstante, el IMTAvH dispone de suficientes equipos de PCR convencional y cuenta con ambientes especializados. En contraparte, sólo existe un único equipo de PCR en tiempo real, el cual es utilizado frecuentemente en estudios de investigación. Por tanto, en nuestro contexto, el diagnóstico confirmatorio del HTLV-1 por pruebas de PCR convencional es conveniente, principalmente por su bajo costo y aplicación a diversos formatos de reacción (placas, tiras de 8 pozos y tubos individuales).

Por tanto, el presente estudio establece un protocolo de validación dirigido a la estandarización, optimización y validación de una prueba de PCR convencional para el diagnóstico confirmatorio del HTLV-1 en PBMCs. El desarrollo del estudio permitiría resolver la siguiente pregunta: **¿Es válida la prueba de reacción en cadena de la polimerasa convencional para la detección del HTLV-1 en PBMCs?**

1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

El Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (IMTA_{vH}), es considerado un centro de referencia para el diagnóstico, tratamiento e investigación de diversas enfermedades infecciosas. Esta institución cuenta con un programa para el tamizaje de la infección por HTLV-1 que incluye a familiares del portador (13, 14). Sin embargo, dado que no se disponen de pruebas confirmatorias de Western blot debido a su alto costo, se propuso desarrollar una prueba de PCR para la detección cualitativa del provirus del HTLV-1.

El desarrollo de la PCR convencional siguió las recomendaciones de evaluación del desempeño de pruebas cualitativas propuestas por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, por sus siglas en inglés) (15) y su aplicación a pruebas moleculares según lo descrito por Burd y colaboradores (16). Los parámetros evaluados en la validación para pruebas cualitativas moleculares son: (i) límite de detección, (ii) precisión, (iii) especificidad analítica y (iv) veracidad. El propósito de la PCR a desarrollar es complementar el esquema de diagnóstico confirmatorio para el HTLV-1 en individuos serológicamente reactivos por ELISA y en casos serológicos discordantes.

1.3. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio fue validar una prueba de PCR convencional para la detección del virus del HTLV-1 en células mononucleares de sangre periférica. Los parámetros a estudiar serán los siguientes:

- 1.3.1. Determinar el límite de detección de la PCR.
- 1.3.2. Determinar la precisión de la PCR.
- 1.3.3. Determinar la especificidad analítica de la PCR.
- 1.3.4. Determinar la veracidad de la PCR.

1.4. BASES TEÓRICAS

1.4.1. Base teórica.

a) Características del HTLV-1.

El HTLV-1 es un retrovirus de la subfamilia Oncovirus y familia Retroviridae, descubierto en una línea celular linfocitaria procedente de un individuo con linfoma cutáneo de células T (17). Está provisto de una matriz proteica con envoltura lipídica, conteniendo una nucleocápside icosaédrica que conserva dos hebras idénticas de ARN junto a las enzimas proteasa, transcriptasa reversa, integrasa y RNasa II (18). Como otros retrovirus, el HTLV-1 posee el gen *pol*, codificador la polimerasa viral, así como genes estructurales *env* y *gag*, precursores de glicoproteínas de membrana *gp21* y *gp46*, y subunidades de la matriz y nucleocápside *p19*, *p24* y *p15* (figura 1A). Además, el HTLV-1 presenta genes *tax* y *rex*, responsables de la replicación viral, y genes accesorios *p12/p8*, *p30/p13* y *HBZ*, responsables de la infectividad y persistencia viral (figura 1B) (18, 19).

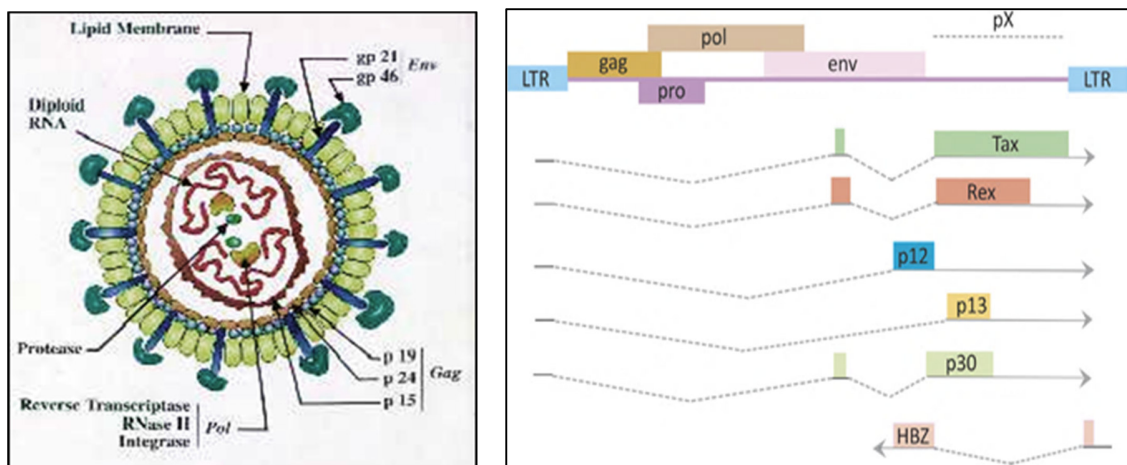


Figura 1A (izquierda). Descripción del virus del HTLV-1. **Figura 1B** (derecha). Esquema del genoma proviral del HTLV-1 (derecha). Imágenes tomadas de Matsuoka and Jeang, 2007 (6).

El HTLV-1 infecta preferentemente linfocitos T CD4+ humanos y en menor frecuencia linfocitos T CD8 +. Las glicoproteínas de membrana viral, *gp21* y *gp46*, forman un complejo con los receptores celulares de proteoglicano de heparán sulfato, neuropilina 1

y el transportador de glucosa (Glut1), permitiendo la fusión de membranas y el ingreso de la nucleocápside (20). En el interior de la célula hospedera, el genoma de ARN viral es liberado y transcrito reversamente a una cadena de doble hebra de ADN de aproximadamente 9100 pares de bases, que se integra aleatoriamente en el genoma celular en forma de provirus. El genoma proviral del HTLV-1 posee secuencias repetitivas en sus extremos (LTR, por sus siglas en inglés) que permiten su transcripción por mecanismos celulares y virales (18, 19).

La liberación de partículas virales del HTLV-1 procedentes de células infectadas es infrecuente. Los mecanismos de transferencia viral que favorecen la infección consisten en la interacción de membranas celulares por cuatro formas conocidas (20). (i) La sinapsis virológica permite la transferencia de partículas virales mediante la movilización de microtúbulos que exponen al virus en el sitio de contacto (figura 2A). (ii) Mediante conductos celulares formados por la extensión de membranas celulares se transfieren las partículas virales del HTLV-1 (figura 2B). (iii) Mediante la formación de fibras proteicas conteniendo partículas virales en la membrana externa a modo de biofilm, existe mayor exposición viral y adhesión entre membranas celulares (figura 2C). (iv) Finalmente, se ha reportado mecanismos de transfección por células dendríticas, quienes capturan células T no infectadas para luego exponer las partículas virales que contienen (figura 2D).

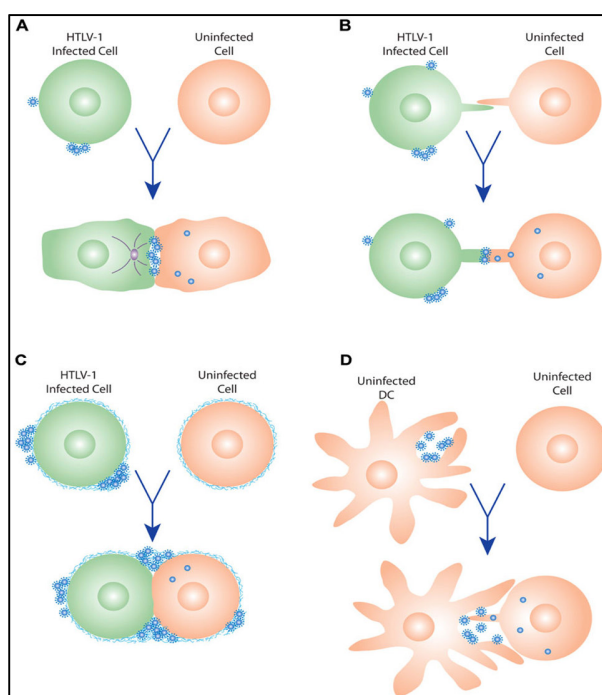


Figura 2. Mecanismos de transmisión del HTLV-1 por contacto celular. Tomado de Claudine Pique y cols. 2012 (4).

Los mecanismos de transmisión viral por contacto celular son importantes en la adquisición del virus del HTLV-1. Sin embargo, el aumento de la carga proviral, se da principalmente por expansión clonal de células infectadas por acción de la proteína viral Tax, que promueve y modula la expresión de genes provirales involucrados en la infectividad y persistencia viral (21). La proteína Tax también actúa sobre el genoma celular, promoviendo la síntesis de interleucina-2 y proteínas celulares involucradas en la progresión del ciclo celular. Asimismo, la proteína Tax activa la vía NF-KB e inhibe los mecanismos de apoptosis y de reparación del ADN, generando inestabilidad genómica y promoviendo la linfoproliferación de células infectadas (22, 23).

La transmisión del HTLV-1 involucra la transferencia de células infectadas mediante leche materna, contacto sexual y transfusiones con sangre (13). (i) La transmisión vertical del HTLV-1 por leche materna contaminada con alta carga proviral tiene una infectividad aproximada del 20% para periodos de lactancia mayores de 6 meses. (ii) El contacto sexual favorece la transmisión de fluidos que contengan células infectadas, lo cual explicaría la mayor incidencia de seropositividad en mujeres respecto a la edad. (iii) La transfusión de sangre o hemoderivados conteniendo células infectadas con HTLV-1 genera un periodo de seroconversión de aproximadamente 2 meses (4), mientras que por otras rutas de transmisión puede ser mayor a 6 meses (3).

b) Epidemiología del HTLV-1.

El HTLV-1 afecta entre 5 a 10 millones de personas en el mundo, siendo las áreas endémicas el sur de Japón, África subsahariana, El Caribe, América latina, Melanesia y Oriente Medio (24, 25) (figura 3). La mayoría de los individuos infectados con el HTLV-1 permanecen como portadores asintomáticos el resto de su vida con capacidad de infectar a otras personas. Sin embargo, entre un 5 – 10 % de ellos, desarrollan las siguientes manifestaciones clínicas: (i) Paraparesia Espástica Tropical, (ii) Leucemia-Linfoma de células T adultas y (iii)

diversas enfermedades inflamatorias tales como uveítis, artritis, polimiositis, alveolitis y dermatitis infecciosa (26).

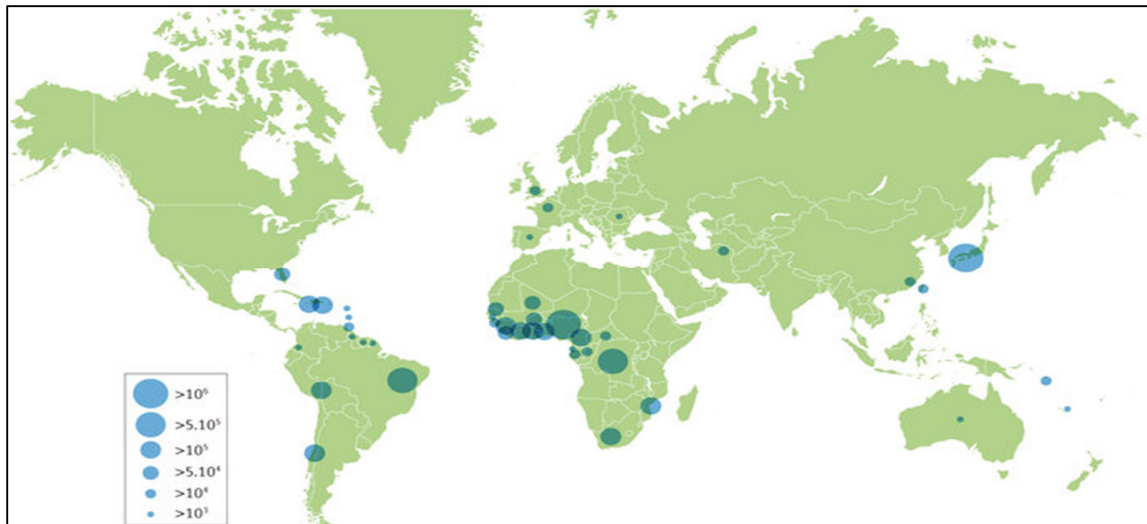


Figura 3. Distribución mundial del virus del HTLV-1. Los círculos en azul muestran la población estimada con HTLV-1 para el año 2015. Tomado de Charles Bangham y cols, (10).

La Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP, por sus siglas en inglés) se caracteriza por una progresiva parálisis de los miembros inferiores, incontinencia urinaria, trastornos intestinales, etc. Su origen está asociado a desmielinización axonal de la médula espinal por un proceso inflamatorio mediado por linfocitos T CD8+ específicos al HTLV-1 (27). La Leucemia-Linfoma de células T adultas (ATL, por sus siglas en inglés), es un conjunto de manifestaciones neoplásicas generado por la expansión clonal de linfocitos infectados con HTLV-1 (28). El ATL está caracterizado por alteraciones morfológicas de los linfocitos infectados, infiltración en diversos órganos, alteraciones bioquímicas y puede presentarse en formas clínicamente definidas como aguda, crónica, linfomatosa y latente.

El desarrollo del HAM/TSP tiende a presentarse entre los 35 y 40 años y está relacionado principalmente al contagio por vía sexual con una prevalencia tres veces mayor en mujeres (25). En contraparte, el desarrollo de ATL está asociado a la transmisión viral por lactancia materna, con un riesgo acumulado de desarrollo en infantes de aproximadamente el 3%. Las madres de individuos con ATL tienen mayor probabilidad de estar infectadas en

comparación con las madres de quienes padecen HAM/TSP y portadores asintomáticos. Debido a la relevancia de la transmisión por vía vertical y por ser un indicador de endemidad en población general, la mayoría de estudios de seroprevalencia del HTLV-1 fueron realizados en mujeres gestantes y en edad fértil (13).

El Perú es un país endémico para el HTLV-1 con una seroprevalencia estimada en población general del 1 al 2% (29). Estudios en gestantes, trabajadoras sexuales, homosexuales varones y varones privados de libertad, muestran una seroprevalencia entre el 1 al 7% (14). En Lima, la seroprevalencia del HTLV-1 en mujeres embarazadas fue del 1.7% (29), mientras que mujeres de comunidades amazónicas shipibo-conibo de 15 a 39 años en la región de Pucallpa tienen una seroprevalencia del 5.9% (30). En Ayacucho, la seroprevalencia en mujeres mayores de 12 años fue del 2% y 10% para ciudades de Vilcashuaman y Parinacochas respectivamente (31). Estos resultados evidencian la alta endemidad del HTLV-1 en nuestro país.

c) Importancia de la detección del HTLV-1.

En el Perú, la detección del HTLV-1 no está incluido en programas de control prenatal ni se cuentan con políticas de salud pública enfocados a la búsqueda activa de portadores, siendo considerada una condición desatendida. La patogénesis de las enfermedades asociadas al HTLV-1 no se conocen por completo, no existe tratamiento eficaz ni vacuna disponible y no es posible predecir su desarrollo. Sin embargo, la detección de portadores de HTLV-1, permite brindarles recomendaciones para evitar la propagación del virus, tratamiento sintomático e incorporarlos dentro de un programa de seguimiento que incluye a familiares cercanos a fin de comprender más sobre el virus.

Desde el año 1997, se realizan el tamizaje serológico de Sífilis, Hepatitis B, Hepatitis C, VIH 1-2, Chagas y HTLV I-II en unidades de hemoterapia y bancos de sangre. Según el Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre del Perú (PRONAHEBAS), durante los años 1997 y 2003 se previnieron entre 1500 y 3000 transfusiones anuales de sangre contaminada a nivel nacional (13). Sin embargo, estos casos no son esclarecidos

por pruebas confirmatorias de Western blot en los centros de salud públicos debido a su alto costo, siendo necesario que los individuos acudan a centros privados.

Las pruebas serológicas para el HTLV-1 buscan anticuerpos específicos a antígenos virales en muestras de suero o plasma. Tradicionalmente, el algoritmo de detección incluye dos inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), seguido de una prueba confirmatoria de Western Blot o inmunoensayo en línea INNO-LIA HTLV I/II, Innogenetics Ghent Belgium (figura 4). También existen pruebas confirmatorias basadas en inmunofluorescencia indirecta no disponibles comercialmente, e inmunoensayos por quimioluminiscencia muy utilizados en el tamizaje del HTLV-1 en bancos de sangre.

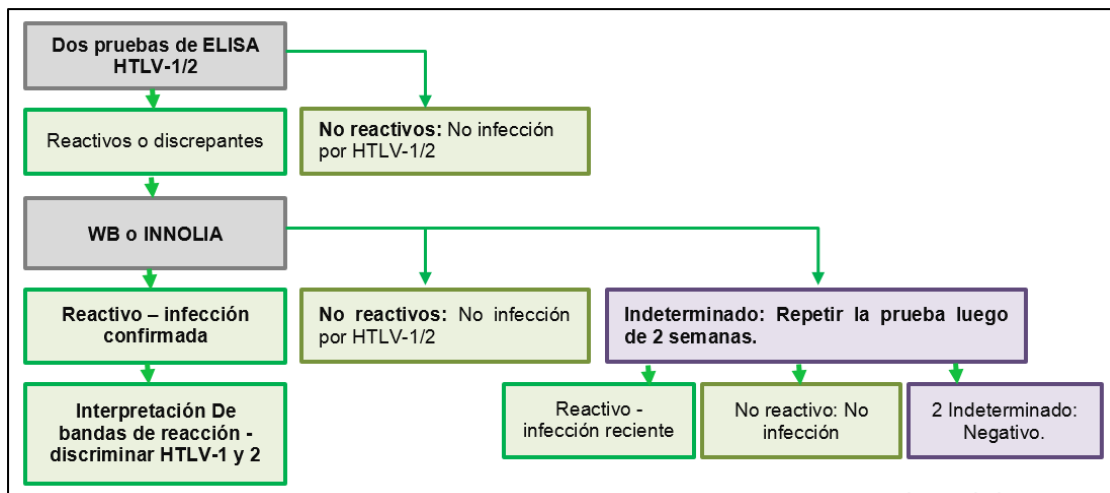


Figura 4. Algoritmo de diagnóstico tradicional para la detección del HTLV-1 mediante pruebas de tamizaje por ELISA y pruebas confirmatorias por Western blot o INNO-LIA.

Las pruebas de ELISA para el HTLV-1/2 detectan anticuerpos IgA, IgG e IgM mediante el uso de proteínas recombinantes gag, env y pol del HTLV-1 y HTLV-2 en un formato de bajo costo, corto procesamiento y que no requiere equipos especializados. Estas pruebas cuentan con una sensibilidad mayor al 98% por lo que son utilizadas como tamizaje. Un resultado de ELISA reactivo indica la presencia de anticuerpos contra el HTLV-1 y/o HTLV-2, siendo necesario su confirmación y tipificación mediante pruebas de Western blot o INNO-LIA. En población con alta endemicidad se recomienda utilizar dos pruebas de ELISA de diferente marca para prevenir resultados falsos negativos (32).

La prueba de Western blot detecta anticuerpos contra el HTLV-1 y/o HTLV-2 mediante la obtención de patrones de reacción con proteínas virales en una tira de nitrocelulosa dispuestas en bandas (33). Según la OMS, un resultado positivo para el HTLV-1 detecta al menos una banda específica de las glicoproteínas env gp46 o gp62/68 y gag p19, p24 o p53, mientras que para la Red Europea de Investigación es necesario la reacción de bandas env p19 y p24, y gag rgp21 y rgp46-I (34). Sin embargo, la presencia de patrones reacción indeterminada ha generado resultados no concluyentes, atribuido a su obtención por cultivo celular, pudiendo alcanzar una frecuencia de hasta un 50% (35, 36).

Ante estas limitaciones, se desarrolló una prueba basada en el Western blot, denominado INNO-LIA que utiliza péptidos sintéticos y recombinantes, e incluye bandas de control. El INNO-LIA detecta anticuerpos contra el HTLV-1 y/o HTLV-2 mediante el uso de glicoproteínas env gp21, env gp46, gag p19 o gag p24 del HTLV-1 y HTLV-2 en un soporte de nitrocelulosa de modo similar al Western blot (33). Un resultado positivo requiere la reacción de al menos una glicoproteína env con una intensidad mínima de 2 cruces (figura 5). Este criterio de interpretación es menos riguroso y permitió reclasificar como negativos hasta un 90% de resultados indeterminados por Western blot (37). Sin embargo, aún se obtienen patrones de reacción indeterminados (13).

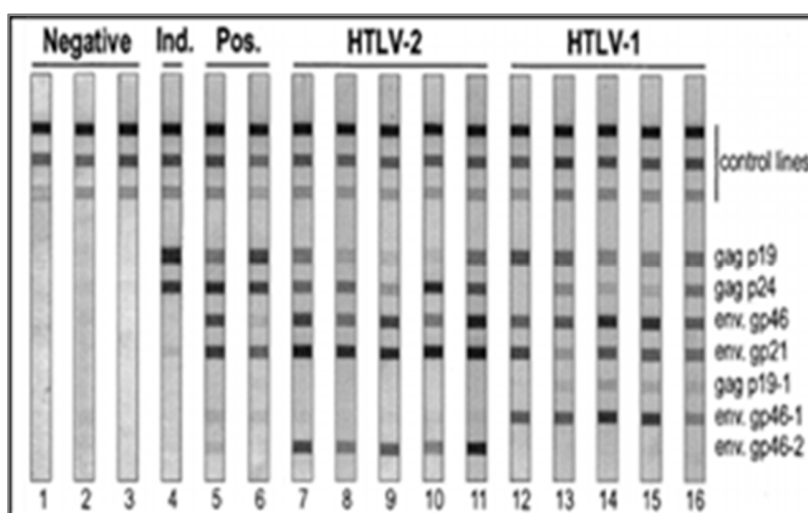


Figura 5. Esquema y patrones de reacción de una prueba de INNO-LIA. Tomado de Zrein y cols. (20).

d) Pruebas de PCR para la detección del HTLV-1.

La PCR es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos que detecta la presencia del provirus de HTLV-1 integrado en el genoma de las células infectadas. La PCR además permite (i) resolver resultados serológicos indeterminados, (ii) discriminar coinfección entre HTLV-1/2, (iii) detección de HTLV-1 en neonatos y (iv) usar diferentes matrices biológicas que contengan linfocitos T CD4+.

El éxito de la prueba de PCR en la detección del provirus del HTLV-1 depende de la recuperación del ADN genómico de PBMCs que incluye a los linfocitos T CD4+ (38). Es por ello recomendable obtener ADN a partir de PBMCs purificados para incrementar la sensibilidad de la prueba. La extracción de ADN a partir de sangre total incluiría ADN genómico de hasta un 50% de leucocitos que no son considerados células hospederas del virus del HTLV-1. Asimismo, es importante el uso de cebadores específicos a regiones altamente conservadas de la secuencia diana.

Al respecto, para la detección del HTLV-1, es recomendable utilizar cebadores dirigidos al gen Tax debido a que es altamente conservado (39). Las secuencias ubicadas en las regiones intermedias del genoma proviral (genes env, pol y gag) pueden estar ausentes en provirus defectivos (40). Ello ha sido demostrado por la ausencia de amplificación de genes pol y env en presencia de amplificación de tax (41). Finalmente, de acuerdo al propósito del diagnóstico confirmatorio, consideramos conveniente optar por una PCR convencional, la cual detecta cualitativamente el provirus del HTLV-1 de acuerdo a lo planteado en la descripción de los antecedentes (ítem 1.1).

e) Validación de una prueba de PCR para la detección del HTLV-1.

El **límite de detección** es una medida de **sensibilidad analítica** definida por la menor concentración del analito que puede ser detectado o medido. Para una prueba de PCR, el Límite de detección se define como la mínima cantidad de copias de la secuencia diana que es amplificado con una **tasa de detección** igual o mayor al 95% y es expresado como el número de copias por unidad de volumen o cantidad de ADN en una reacción (copias/uL

o copias/ng por PCR) (42). Debido a que el HTLV-1 se encuentra en el ADN genómico de los linfocitos T CD4+, se recomienda que las diluciones seriadas del material de referencia se realice sobre ADN genómico de PBMCs no infectados con HTLV-1 (ADN foráneo) a una concentración estándar para mantener el efecto de la matriz.

El efecto de la matriz es una condición que garantiza que la influencia de las condiciones fisicoquímicas que ejerce la matriz biológica de ADN sobre el rendimiento de los cebadores y la Taq polimerasa sea equivalente al experimentado en cada ensayo rutinario de PCR incluido por los materiales de referencia (15). Generalmente, los estudios, las diluciones en serie del material de referencia no toman en cuenta el efecto de la matriz ni consideran necesario obtener una tasa de detección no menor del 95% para establecer el Límite de detección (2, 5, 43, 44). El considerar añadir ADN foráneo libre de provirus de HTLV-1 pretende evitar la subestimación del Límite de detección.

La **precisión** es una medida del error aleatorio analítico de una prueba, generalmente atribuida a partes no automatizadas del proceso, siendo definida como el grado de concordancia entre los mesurandos obtenidos de un analito en ensayos independientes. La precisión puede ser expresada como aceptable o no en base al grado de imprecisión, la cual representa la variabilidad de las mediciones. La imprecisión es atribuida a partes del proceso normal de una prueba, siendo la repetibilidad y reproducibilidad medidas mínimas y máximas. Para pruebas cualitativas como la PCR, la imprecisión es representada como la tasa de detección intraensayo (repetibilidad) o interensayo (reproducibilidad) con respecto a variante como analista, reactivos, equipos, tiempo, etc.

La CLSI indica que los estudios de precisión deben ser realizados con un material de referencia con valor cercano al límite de detección de la prueba a evaluar. Los ensayos de precisión para una PCR son obtenidos mediante mediciones de al menos 40 réplicas del analito empleando materiales de referencia o estándares con un número de copias por reacción igual al límite de detección, 20% mayor y 20% menor a este (+/- 20% del límite de detección) (16). Para ello, de modo similar al límite de detección, se realizan diluciones

seriadas de un material de referencia para el cual también se considera añadir ADN foráneo libre de provirus de HTLV-1 para asegurar que el efecto matriz.

La **especificidad analítica** evalúa la capacidad de una prueba en detectar y/o cuantificar únicamente el analito de interés, en ausencia de reacciones cruzadas por interferentes que generan resultados falsos positivos. Este parámetro debe ser diferenciado de la sensibilidad diagnóstica, dado que esta última representa el porcentaje de individuos reportados como negativos por una prueba diagnóstica y que no presentan una condición clínica. La especificidad analítica de una prueba de PCR evalúa la reactividad cruzada, determinando la tasa de detección en muestras de ADN conteniendo agentes con similitudes genéticas. La PCR para HTLV-1 puede incluir a los retrovirus HTLV-2 y VIH o muestras de ADN de individuos con manifestaciones clínicas similares a las causadas por el HAM/TSP. (16)

La **veracidad** mide el grado de error de una o más mediciones obtenidas por la prueba a ser validada con respecto a las mediciones dadas por una prueba de referencia. El término exactitud se refiere a error absoluto o relativo entre una medición y otra verdadera, mientras que la veracidad es el error absoluto o relativo entre el promedio de las mediciones y un valor verdadero. Los estudios de veracidad están diseñados de acuerdo al propósito esperado de una prueba dentro de un algoritmo diagnóstico. Los ensayos de veracidad para una prueba de PCR dirigido a la detección del HTLV-1 tiene el propósito de confirmar la infección por HTLV-1 en muestras con resultados serológicos HTLV-1/2 reactivos por ELISA. El ensayo de veracidad propuesto para la PCR consiste en evaluar la concordancia existente con la qPCR.

1.4.2. Definición de términos.

a) PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Es un método de biología molecular que consiste en la amplificación de segmentos de ácidos nucleicos de un genoma. En ello participa la acción de la enzima Taq. Polimerasa que extiende los cebadores que delimitan los extremos de una secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa de tipo convencional es el procedimiento de PCR que utiliza un sistema de electroforesis y fluoróforos con afinidad al ADN para la identificación de los productos de PCR.

b) qPCR.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de tipo cuantitativa. Es un método de PCR que utiliza un sistema de detección del producto de PCR mediante el uso de SYBR Green o sondas fluorescentes.

c) PBMCs.

Células mononucleares de sangre periférica. Conjunto de células sanguíneas, mayormente linfocitos y monocitos que son obtenidos a partir de la sangre periférica por centrifugación en gradiente. Estas células participan en la respuesta inmune y son usualmente infectadas por virus linfotrópicos tales como el VIH, citomegalovirus y el HTLV-1.

d) Western Blot para HTLV-1.

Es un inmunoensayo que consiste en la generación de patrones de reacción antígeno anticuerpo sobre tiras de nitrocelulosa que contienen a antígenos de proteínas virales gag y env del HLV-1. Estos antígenos están distribuidos en bandas frente al contacto con anticuerpos de muestras de plasma o suero. Los patrones de reacción antígeno-anticuerpo permitirán determinar el agente infeccioso.

e) ELISA para HTLV-1.

Es un inmunoensayo ligado a enzimas que permite determinar la presencia de anticuerpos para los virus como el del HTLV-1/2 mediante el uso de antígenos virales Gag y Env. La

interacción antígeno anticuerpo es determinado por la introducción de un anticuerpo unido a una enzima que genera un producto en presencia de sustrato detectable por espectrofotometría.

f) Región pX del HTLV-1.

Región del genoma del HTLV-1 comprendido entre el extremo 5-terminal y el gen Env del genoma proviral del HTLV-1. Codifica las proteínas nucleares Tax, HBZ y Rex, involucradas en la modulación de los procesos que alteran el ciclo celular y la persistencia viral.

g) Gen Tax del HTLV-1.

El gen Tax codifica la proteína del mismo nombre, la cual actúa sobre mecanismos involucrados en la síntesis de interleuquina-2 y la progresión del ciclo celular. Además, inhibe los mecanismos de apoptosis y de reparación del ADN generando inestabilidad genómica.

h) TART-2.

Línea celular de origen linfocítico perteneciente a rata que tiene un provirus de HTLV-1 por genoma.

1.4.3. Formulación de la hipótesis.

La PCR tiene un límite de detección menor de 5 copias por reacción, una especificidad del 100%, una sensibilidad del 95% y un valor predictivo positivo y negativo del 80% y 90% respectivamente.

CAPITULO II

MÉTODOS

2.1. DISEÑO METODOLOGICO.

2.1.1. Tipo de investigación.

Estudio experimental.

2.1.2. Diseño de la investigación.

Estudio de validación de una prueba de laboratorio.

2.1.3. Población.

No existe población de estudio definida dado que el estudio está enfocado en estandarizar, optimizar y validar una prueba de laboratorio. Por ello se utilizarán principalmente materiales de referencia consistentes en ADN plasmídico o de líneas celulares no pertenecientes a individuos. Sin embargo, para la determinación de la veracidad, se seleccionaron muestras de ADN almacenadas pertenecientes a individuos de la cohorte de Investigación del “Grupo de Investigación de HTLV-1” del IMTA_vH.

2.1.4. Muestra y muestreo.

Se seleccionó por conveniencia 69 muestras de ADN pertenecientes a individuos de la cohorte de Investigación del “Grupo de Investigación de HTLV-1” del IMTA_vH.

2.1.4.1. Criterios de inclusión.

- a) Muestras de ADN de individuos pertenecientes a la cohorte de HTLV-1 y que hayan firmado el consentimiento informado para el uso de sus muestras en estudios posteriores.

- b) Muestras con dos resultados de ELISA reactivo.
- c) Individuos con resultado conocido de carga proviral.

2.1.4.2. Criterios de exclusión.

- a) Muestras de ADN proveniente de individuos con diagnóstico serológico indeterminado.
- b) Muestras sin resultado de ELISA ni de carga proviral.

2.1.5. Variables.

2.1.5.1. Límite de detección.

- a) Definición conceptual: Es la menor concentración del analito que una prueba puede detectar con una precisión mayor o igual a un 95%.
- b) Dimensiones: Es una variable cuantitativa de tipo continua, cuya escala de medición es de intervalo y representa al número de copias del gen Tax por nanogramo de ADN incorporado en una reacción de PCR.
- c) Definición operacional: Es el menor número de copias del plásmido p4.39 por nanogramo de ADN incorporado en una reacción de PCR que permita la detección del gen Tax del HTLV-1 identificado como una banda de amplificación de 80 pares de bases (pb) en una electroforesis en gel de agarosa con al menos un 95% de repetibilidad.

2.1.5.2. Precisión.

- a) Definición conceptual.- Es la capacidad de la prueba en brindar mediciones repetibles y reproducibles de un analito evaluado mediante la dispersión o la tasa de detección en métodos cuantitativos y cualitativos respectivamente.
- b) Dimensiones.- Es una variable cuantitativa de tipo continua, cuya escala de medición es de intervalo y representa la tasa de detección del gen Tax en réplicas con diferente concentración del analito.

- c) Definición operacional.- Es la tasa de detección del producto de amplificación de 80 pb en un gel de agarosa correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en 30 réplicas de 3 pools de muestras de ADN con número de copias en el límite de detección, 20% mayor y 20% menor y procesados durante 3 días.

2.1.5.3. Especificidad analítica.

- a) Definición conceptual.- Es la capacidad de una prueba de detectar sólo el analito de interés y no ser afectado por reacciones cruzadas generadas por agentes con características similares.
- b) Dimensiones.- Es una variable cuantitativa de tipo continua y representa la tasa de detección del gen Tax.
- c) Definición operacional.- Es la tasa de presencia o ausencia del producto de amplificación de 80 pb en un gel de agarosa correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en muestras conteniendo ADN de los virus HTLV-2 y VIH en presencia o ausencia del ADN del HTLV-1

2.1.5.4. Veracidad.

- a) Definición conceptual.- Es la capacidad de una prueba en brindar resultados concordantes con una prueba de referencia o gold standard.
- b) Dimensiones.- Es una variable cuantitativa de tipo continua y representa la tasa de detección del gen Tax en muestras con resultado serológico de ELISA y carga proviral conocida.
- c) Definición operacional.- Tasa de verdaderos positivos y verdaderos negativos asociado a la presencia o ausencia de amplificación de un producto de 80 pb en un gel de agarosa correspondiente del gen Tax del HTLV-1 por PCR y el resultado serológico por una prueba de ELISA para HTLV-1/2 junto con el resultado de carga proviral como prueba de referencia.

2.1.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

2.1.6.1. Material biológico.

a) Control negativo de HTLV-1.

Se preparó un pool con 4 muestras aleatorias de ADN pertenecientes a individuos con resultado serológico por ELISA no reactivo al HTLV-1 y HTLV-2. La concentración de ADN fue cuantificada por fluorimetría mediante el Qubit dsDNA HS Assay Kit - Invitrogen, diluida a una concentración de 8 ng/uL con agua de PCR Nuclease-Free Water – Qiagen y almacenada a -20°C hasta su uso.

b) Control positivo de HTLV-1.

Se preparó un pool con 4 muestras de ADN pertenecientes a individuos con resultado serológico por ELISA reactivo y carga proviral detectable de HTLV-1. La concentración de ADN fue cuantificada por fluorimetría mediante el Qubit dsDNA HS Assay Kit - Invitrogen, diluida a una concentración de 8 ng/uL con agua de PCR Nuclease-Free Water - Qiagen, y almacenada a -20°C hasta su uso.

c) Control blanco de reacción.

El control blanco de reacción es el agua de PCR Nuclease-Free Water – Qiagen libre de ADN utilizado en las diluciones de las muestras de ADN que es incorporado en la reacción para evaluar la contaminación que pudieran explicar la presencia de amplificaciones falsas positivas.

d) Material de referencia interno 1 (MRi-1).

El MRi-1 es una muestra de ADN plasmídico p4.39 a una concentración de 200 copias por microlitro, una longitud de 18,773 pares de bases y una masa de 2.06E-05 picogramos. Cada plásmido contiene una copia de 80 pares de bases del gen Tax del HTLV-1 como secuencia diana de la PCR y fue exclusivamente utilizado en los ensayos de determinación

el límite de detección de la PCR. El MRi-1 es utilizado en la prueba de carga proviral por qPCR (cedido por Thérèse Astier-Gin, Université Victor Ségalen, Bordeaux 2 de Francia).

A partir del MRi-1, se preparó materiales de referencia de 2.0, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 copias/uL para ser utilizado en los ensayos del límite de detección de la PCR. Por tanto, dado que el volumen de ADN incorporado a una reacción de PCR es 5 microlitros, la cantidad equivalente de copias del gen Tax agregados por reacción fue de 10, 5.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 y 0.15 copias respectivamente (ensayo N°4 al 7 del anexo a). Las diluciones seriadas se realizaron en Nuclease-Free Water - Qiagen y ADN genómico de libre de HTLV-1 (ADN foráneo) a una concentración final de 40 ng por reacción de PCR para conservar el efecto de la matriz (ensayo N° 1 al 3 del anexo a).

e) Material de referencia interno 2 (MRi-2)

El MRi-2 es una muestra de ADN genómico de la línea celular TARL-2 (45), a una concentración de 8580 copias del provirus de HTLV-1 por uL, 52 ng/uL y un número de 1.105 copias por genoma. El MRi-2 fue provisto por el Grupo de Investigación en HTLV-1 del IMTAvH para ser utilizado en los ensayos de estandarización y precisión. A partir del MRi-2 (8580 copias/uL del gen tax), se realizaron diluciones seriadas hasta obtener concentraciones de 0.76, 0.80 y 0.84 copias del gen Tax por uL. Por tanto, al incorporar 5 microlitros de cada una de las diluciones a una reacción de PCR la cantidad de copias del gen Tax por reacción fue de 3.2, 4.0 y 4.8 respectivamente.

Las diluciones seriadas se hicieron en Nuclease-Free Water - Qiagen que contuvo cantidad de ADN genómico de libre de HTLV-1 (ADN foráneo) para que exista una concentración final de 40 ng por reacción para conservar el efecto de la matriz. Se prepararon suficientes alícuotas del MRi-2 para ser almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso. Los tablas del 1 al 4 muestran cuatro procesos de dilución del MRi-1 para su uso en seis ensayos de límite de detección.

f) Selección de muestras de ADN.

Se seleccionaron por conveniencia 69 muestras de ADN provenientes de individuos enrolados en la cohorte de investigación con resultado serológico reactivo por ELISA al HTLV-1/2 y en su mayoría con resultado conocido de carga proviral. Las muestras fueron obtenidas del criobanco del Grupo de Investigación de HTLV-1 del IMTA_vH de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y fueron clasificadas en tres grupos:

- 21 muestras con carga proviral no detectable del gen Tax por cada 10,000 PBMCs.
- 39 muestras con carga proviral menor o igual a 10 copias del gen Tax por 10,000 PBMCs.
- 9 muestras con carga proviral mayor de 10 copias del gen Tax por cada 10,000 PBMCs.

2.1.6.2. Técnicas.

a) Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADN con el QIAmp DNA Blood Mini kit – Qiagen a partir de $3.00E+06$ PBMCs de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los PBMCs fueron obtenidos mediante centrifugación en gradiente a partir de sangre periférica colectada mediante sistema de extracción al vacío con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La concentración de ADN fue determinada por fluorometría mediante el Qubit dsDNA HS Assay Kit – Invitrogen, diluida en Nuclease-Free Water - Qiagen y almacenada a -20°C hasta su uso.

b) Prueba de ELISA para HTLV-1/2.

Se utilizó el ELISA HTLV-I/II – BIOKIT, el cual detecta anticuerpos séricos específicos del HTLV-1 y HTLV-2 mediante su interacción con antígenos virales Gag y Env, y anticuerpos secundarios ligados a enzimas absorbidos a una placa de polietileno. La prueba indica tener un 100% de sensibilidad y un 99,82% de especificidad para los virus del HTLV-1 y HTLV-2. Un resultado reactivo indica la presencia de anticuerpos contra

el HTLV-1, HTLV-2 o ambos, mientras que el resultado no reactivo indica la ausencia de anticuerpos a estos virus.

c) Prueba de qPCR para la cuantificación de la carga proviral del HTLV-1.

La prueba de qPCR para la cuantificación de la carga proviral del HTLV-1 implementado por Aduai y colaboradores (qPCR-IMTA_vH) fue utilizada como referencia (46) . La qPCR-IMTA_vH determina el número de copias de provirus de HTLV-1 por cada 10 000 PBMCs mediante cuantificación absoluta del gen Tax del HTLV-1 y del gen del retrovirus endógeno humano tipo 3 (ERV-3). La estimación del número de copias del gen Tax se realizó mediante la curva estándar del MRi-1 a concentraciones de 1.00E+06, 1.00E+05, 1.00E+04, 1.00E+03, 1.00E+02 y 1.00E+01 copias por reacción de qPCR, mientras que la estimación del número de PBMCs utilizó la curva estándar del gen ERV-3 tuvieron concentraciones de 3.00E+04, 2.00E+04, 6.00E+03, 1.20E+03 y 2.40E+02 copias por reacción.

Los cebadores para el gen Tax del HTLV-1 fueron diseñados por Nagai y colaboradores (47) y son: PX3-F (5'-ACAAAGTTAACCATGCTTATTATCAGC-3') y PX4-R (5'-ACACGTAGACTGGGTATCCGAA-3'). Los cebadores del gen ERV-3 fueron diseñados por Yuan y colaboradores (48) y son: PHP10-f (5'-CATGGGAAGCAAGGGAACTAATG-3') y PHP10-r (5'-CCCAGCGAGCAATACAGAATTT-3'). El ensayo de qPCR utilizó el iQ SYBR Green Supermix 1X - Bio-Rad, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM de cada dNTP, iTaq ADN polimerasa 0.3 U/reacción, 3mM Mg₂Cl₂, SYBR Green I, 10 nM fluoresceína y estabilizadores. La qPCR fue realizada en el termociclador LightCycler® 480, Roche e incorporó muestras de ADN a una concentración de 40 ng/uL en volumen de 5 uL. La reacción tuvo una temperatura de desnaturalización, hibridación y elongación de 95°C, 60°C y 72°C respectivamente, y los productos fueron identificados mediante el análisis de las curvas melting.

2.1.7. Procedimientos y análisis de datos.

El estudio se realizó en tres procesos: (i) estandarización, (ii) optimización y (iii) validación. La estandarización establece especificaciones para la obtención del material biológico, aislamiento del ADN, concentraciones de los componentes del master mix, selección de la metodología de PCR (49). La optimización es un estudio exploratoria de las variantes de la PCR con el fin de incrementar la eficiencia de reacción lo cual incrementa la sensibilidad analítica de la prueba. Por su parte, el rendimiento de la prueba y su ajuste al propósito deseado son evaluados mediante ensayos de validación, a fin de confirmar el grado de exactitud y consistencia de los resultados mediante experimentos (50). Los ensayos de PCR serán realizados con materiales de referencia internos.

2.1.7.1. Procedimientos de estandarización de la PCR.

La estandarización de la prueba de PCR utilizó agua de PCR Nuclease-Free Water - Qiagen, cloruro de magnesio (MgCl₂) - Qiagen, buffer de reacción de PCR CoralLoad PCR Buffer - Qiagen, dNTP Mix (Qiagen) y la enzima Hot Start Plus®Taq DNA Polymerase - Qiagen (Taq polimerasa). En la electroforesis se utilizó gel de agarosa al 2% LE, Analytical Grade- Promega y marcador de peso molecular de 50 y 100 pares de bases - Life Technologies. Las condiciones térmicas de la PCR fueron dadas por el termociclador Veriti™ Thermal Cycler - Applied Biosystems. Se utilizaron cebadores PX3-F (5'-ACAAAGTTAACCATGCTTATTATCAGC-3') y PX4-R (5'-ACACGTAGACTGGGTATCCGAA-3'), ambos dirigidos al gen Tax del HTLV-1 como secuencia diana, los cuales generan un producto de 80 pares de bases. Los cebadores para el gen tax son los mismos utilizados en la qPCR-IMTA_vH.

El volumen de reacción fue de 15 uL y fue totalmente colectado y distribuido directamente en los geles de agarosa gracias uso del buffer CoralLoad PCR Buffer - Qiagen en el master mix del PCR y fueron detectados mediante electroforesis con la fuente de poder PowerPac Basic Power Supply (Bio-rad) y teñidos con Bromuro de Etidio (Bio-rad). Las bandas de 80 pares de bases del gen Tax fueron visualizadas con el fotodocumentador Gel Doc XR™

(Bio-rad) y cuantificados con el Image Lab™ Software (Bio-rad). Las condiciones de la prueba (concentración de componentes del master mix y temperaturas de amplificación) a partir de la cual se desarrolló la PCR, fueron las mismas que la qPCR-IMTA_vH disponible para la determinación de carga proviral en el IMTA_vH.

Ensayo N°1.

- i. Material biológico:
 - Muestra a evaluar: MRi-2.
 - Concentración del MRi-2: 8.0 ng/uL.
 - Volumen del MRi-2 agregado a la reacción de PCR: 5 uL.
 - Cantidad de MRi-2 incorporado a una reacción de PCR: 40 ng.
 - Número de réplicas del MRi-2: 5 réplicas.

- ii. Condiciones térmicas de ciclado:
 - Temperatura de desnaturalización: 95°C.
 - Temperatura de hibridación: 60°C.
 - Temperatura de elongación: 72°C.
 - N° ciclos de amplificación: 42.

- iii. Componentes del master mix:
 - Concentración de MgCl₂: 2.0 mM.
 - Concentración de Taq polimerasa: 0.5 U/uL.
 - Concentración de cebadores: 0.2 uM.
 - Concentración de dNTPs: 200 uM.

2.1.7.2. Procedimientos de optimización de la PCR.

Se realizó cinco ensayos de optimización de PCR con el objetivo de obtener las condiciones óptimas de reacción en los parámetros de temperatura de hibridación, concentración de cloruro de magnesio, cantidad de ADN incorporado por reacción de PCR

y concentración de Taq polimerasa. Para ello se evaluó la tasa de detección y la intensidad de las banda de 80 pares en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio correspondiente al gen Tax del HTLV-1 expresado en unidades de intensidad relativa (RFU) obtenidas por el fotodocumentador de imágenes.

Se utilizó el MRi-2 a una cantidad inicial de 40 ng por reacción de PCR y en principio utilizó las mismas concentraciones de componentes del master mix y condiciones térmicas de la prueba de qPCR para la carga proviral. Los ensayos se realizaron en secuencia de modo que los valores óptimos de cada parámetro de reacción se incluyeran en el ensayo consecutivo. Se realizó un ensayo de prueba para evaluar la calidad del producto de amplificación de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 así como la presencia de productos inespecíficos.

Para ello se realizó un ensayo de PCR que incluyó cinco réplicas del MRi-2 a 40 ng de ADN por reacción. Se realizaron cinco ensayos de PCR para determinar los parámetros de amplificación óptima para la temperatura de hibridación, concentración de cloruro de magnesio, concentración de ADN y concentración de Taq polimerasa respectivamente. Las condiciones iniciales de reacción fueron tomadas del esquema de qPCR para carga proviral.

a) Determinación de la temperatura de hibridación.

Se determinó la tasa de detección y la intensidad del producto de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en dos ensayos de PCR con temperaturas de hibridación de 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 y 66 °C. Se incluyó dos réplicas por cada una de las doce variantes de temperatura de hibridación y en cada una se incorporó 40 ng de ADN del MRi-2.

Ensayo N°1.

- i. Material biológico:
 - Muestra a evaluar: MRi-2.

- Concentración de ADN por reacción: 40 ng/uL.
 - Volumen de ADN agregado a la reacción de PCR: 5 uL
 - Cantidad de ADN incorporado a una reacción de PCR: 80 ng.
 - Número de réplicas del MRi-2: 12 réplicas.
- ii. Condiciones térmicas de ciclado:
- Temperatura de desnaturalización: 95°C.
 - Temperatura de hibridación: 44, 46, 48, 50, 52 y 54 °C.
 - Temperatura de elongación: 72°C.
 - N° ciclos de amplificación: 42.
- iii. Componentes del master mix:
- Concentración de MgCl₂: 2mM.
 - Concentración de Taq polimerasa: 0.5 U/uL.
 - Concentración de cebadores: 0.2 uM.
 - Concentración de dNTPs: 200 uM.

Ensayo N°2.

- i. Material biológico:
- Muestra a evaluar: MRi-2.
 - Concentración de ADN por reacción: 40 ng/uL.
 - Volumen de ADN agregado a la reacción de PCR: 5 uL
 - Cantidad de ADN incorporado a una reacción de PCR: 80 ng.
 - Número de réplicas del MRi-2: 12 réplicas.
- ii. Condiciones térmicas de ciclado:
- Temperatura de desnaturalización: 95°C.
 - Temperatura de hibridación: 56, 58, 60, 62 y 64 °C.
 - Temperatura de elongación: 72°C.
 - N° ciclos de amplificación: 42.

- iii. Componentes del master mix:
 - Concentración de MgCl₂: 2mM.
 - Concentración de Taq polimerasa: 0.5 U/uL.
 - Concentración de cebadores: 0.2 uM.
 - Concentración de dNTPs: 200 uM.

- b) Determinación de la concentración de Cloruro de magnesio.

Se determinó la tasa de detección y la intensidad de producto de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en un ensayo de PCR con concentraciones incorporadas de cloruro de magnesio de 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mM. Se procesaron tres réplicas por cada variante y se incorporó 40 ng de ADN del MRi-2 por cada reacción de PCR. Además se utilizó una temperatura de hibridación de 58°C acorde al ensayo de estandarización previo.

Ensayo N°1.

- i. Material biológico:
 - Muestra a evaluar: MRi-2.
 - Concentración de ADN por reacción: 40 ng/uL.
 - Volumen de ADN agregado a la reacción de PCR: 5 uL
 - Cantidad de ADN incorporado a una reacción de PCR: 80 ng.
 - Número de réplicas: 12 réplicas.

- ii. Condiciones térmicas de ciclado:
 - Temperatura de desnaturalización: 95°C.
 - Temperatura de hibridación: 58°C.
 - Temperatura de elongación: 72°C.
 - N° ciclos de amplificación: 42.

- iii. Componentes del master mix:
 - Concentración de MgCl₂: 2, 3, 4 y 5 mM.
 - Concentración de Taq polimerasa: 0.5 U/uL.
 - Concentración de cebadores: 0.2 uM.
 - Concentración de dNTPs: 200 uM.

- c) Determinación de la concentración de ADN.

Se determinó tasa de detección y la intensidad del producto de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en un ensayo de PCR con cantidades incorporadas de 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ng de ADN del MRi-2. Para ello, se incluyó dos réplicas por cada una de las seis variantes de concentración de ADN. Se utilizó una temperatura de hibridación de 58°C, una concentración de cloruro de magnesio de 4 mM acorde al ensayo de estandarización previo.

Ensayo N°1.

- i. Material biológico:
 - Muestra a evaluar: MRi-2.
 - Volumen de ADN agregado a la reacción de PCR: 5 uL
 - Cantidad de ADN incorporado a una reacción de PCR: 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ng.
 - Número de réplicas: 12 réplicas.

- ii. Condiciones térmicas de ciclado:
 - Temperatura de desnaturalización: 95°C.
 - Temperatura de hibridación: 58°C.
 - Temperatura de elongación: 72°C.
 - N° ciclos de amplificación: 42.

- iii. Componentes del master mix:
 - Concentración de MgCl₂: 4mM.
 - Concentración de Taq polimerasa: 0.5 U/uL.

- Concentración de cebadores: 0.2 uM.
- Concentración de dNTPs: 200 uM.

d) Determinación de la concentración de Taq polimerasa.

Se determinó tasa de detección y la intensidad del producto de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en un ensayo de PCR a concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 U/uL de Taq polimerasa. Para ello se realizaron seis réplicas del MRi-2 utilizando concentraciones de Taq polimerasa de por duplicado y dos réplicas correspondientes al control negativo y blanco.

Ensayo N°1.

- i. Material biológico:
 - Muestra a evaluar: MRi-2.
 - Volumen de ADN agregado a la reacción de PCR: 5 uL
 - Cantidad de ADN incorporado a una reacción de PCR: 60 ng.
 - Número de réplicas: 6 réplicas.
- ii. Condiciones térmicas de ciclado:
 - Temperatura de desnaturalización: 95°C.
 - Temperatura de hibridación: 58°C.
 - Temperatura de elongación: 72°C.
 - N° ciclos de amplificación: 42.
- iii. Componentes del master mix:
 - Concentración de MgCl₂: 4.0 mM.
 - Concentración de Taq. Polimerasa por reacción de PCR: 0.5, 1.0 y 1.5 U/uL.
 - Concentración de cebadores: 0.2 uM.
 - Concentración de dNTPs: 200 uM.

2.1.7.3. Procedimientos de validación de la PCR.

Se realizaron diez ensayos de PCR para determinar el límite de detección, precisión y veracidad usando el MRi-1. Las condiciones de reacción fueron obtenidas durante la estandarización:

- Temperatura de desnaturalización: 95°C.
- Temperatura de hibridación: 58°C.
- Temperatura de elongación: 72°C.
- N° ciclos de amplificación: 42.
- Concentración de MgCl₂: 4.0 mM.
- Concentración de Taq polimerasa por reacción de PCR: 0.5 U/uL.
- Concentración de cebadores: 0.2 uM.
- Concentración de dNTPs: 200 uM.

a) Límite de detección.

Se realizó 71 réplicas de PCR del MRi-1 a cantidades de 10, 5.0, 4.0, 3.0, 1.0, 0.5 y 0.25 copias por reacción incluidos en seis ensayos y durante cinco días diferentes.

Ensayo N°1 - Determinación del Límite de detección usando 5.0, 3.0, 1.0, 0.5 y 0.25 copias por reacción de PCR.

- Muestra a evaluar: MRi-1.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 10.0, 5.00, 3.00, 1.00, 0.50 y 0.25.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 04.
- Número de total de réplicas: 24.

Ensayo N° 2 - Determinación del Límite de detección usando 3 copias por reacción de PCR.

- Muestra a evaluar: MRi-1.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 3.00.

- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 13.
- Número de total de réplicas: 13 réplicas.

Ensayo N° 3 - Determinación del Límite de detección usando 2 copias por reacción de PCR.

- Muestra a evaluar: MRi-1.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 2.00.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 13.
- Número de total de réplicas: 13.

Ensayo N°4 - Determinación del Límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.

- Muestra a evaluar: MRi-1.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 4.00.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 13.
- Número de total de réplicas: 13.

Ensayo N°5 - Determinación del Límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.

- Muestra a evaluar: MRi-1.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 4.00.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 12.
- Número de total de réplicas: 12.

b) Precisión.

Se determinó la tasa de detección y la intensidad de producto de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en tres ensayos de PCR con MRi-2 a concentraciones de 3.2, 4.0 y 4.8 copias por reacción. Para ello se procesaron 10 réplicas

del MRi-2 con las condiciones estandarizadas de PCR para cada una de las tres variantes por tres días diferentes haciendo un total de noventa réplicas.

Ensayo N°1.

- Muestra a evaluar: MRi-2.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 4.8, 4.0 y 3.2 copias.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 10 réplicas.
- Número de total de réplicas: 30 réplicas.

Ensayo N°2.

- Muestra a evaluar: MRi-2.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 4.0, 4.8 y 3.2 copias.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 10 réplicas.
- Número de total de réplicas: 30 réplicas.

Ensayo N°3.

- Muestra a evaluar: MRi-2.
- Número de copias de Tax por reacción de PCR: 4.0, 4.8 y 3.2 copias.
- Número de réplicas por copia de reacción de PCR: 10 réplicas.
- Número de total de réplicas: 30 réplicas.

c) Veracidad.

Se determinó la tasa de detección verdadera positiva y negativa del producto de 80 pares de bases correspondiente al gen Tax del HTLV-1 en un ensayo de PCR con 21 muestras con carga proviral no detectable (grupo A), 39 con carga proviral menor o igual a 10 (grupo B) y 9 con carga proviral mayor de 10 (grupo C). Posteriormente, mediante una tabla de contingencia se determinó la proporción de verdaderos positivos (sensibilidad diagnóstica), verdaderos negativos (especificidad diagnóstica) y el índice de concordancia kappa.

Ensayo N°1.

Material biológico:

- Muestra a evaluar: muestras de ADN pertenecientes con resultado de carga proviral.
- Número de grupos: 1°. 21 muestras con carga proviral no detectable, 39 muestras con carga proviral menor o igual que 10 y 09 muestras con carga proviral mayor de 10.
- Número de réplicas por grupo de reacción: 01 réplicas.

2.1.7.4. Análisis de los datos.

Los datos que se obtengan del estudio fueron almacenados en formato Excel y analizados mediante el software STATA versión 12. La determinación del límite de detección se realizó mediante el análisis de regresión lineal simple y para la veracidad del ensayo se determinó el índice de concordancia kappa.

2.1.8. Consideraciones éticas.

Se utilizaron muestras almacenadas de ADN, procedentes de participantes incluidos en la cohorte del Grupo de HTLV-1 del IMTAvH de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, las cuales fueron obtenidas con fines de investigación. Además, no se tuvo acceso a información personal ni clínica de los individuos de estudio. Por tanto, según las consideraciones del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el estudio está exento de consentimiento informado. El protocolo fue registrado con código SIDISI 100668 y constancia 256-10-17 (Anexo b).

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1. RESULTADOS DE ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN.

3.1.1. Ensayo 1. Ensayo de prueba.

La figura 6 muestra el gel de electroforesis del ensayo de prueba de PCR. En la columna 2 se encuentra el marcador de peso molecular de 50 pares de bases seguido de 05 réplicas del MRi-2 a 40 ng de ADN por reacción de PCR, un control negativo, positivo y blanco. Se observan productos de amplificación del gen Tax de 80 pares aproximadamente en las cinco réplicas correspondientes MRi-2 y en el control positivo de amplificación. El ensayo no muestra amplificación de productos inespecíficos. La tasa de detección del MRi-2 en las 5 réplicas fue del 100% y la intensidad relativa de fluorescencia tuvo una media, desviación estándar y coeficiente de variación de 4661.07, 279.32 y 16.69 respectivamente.

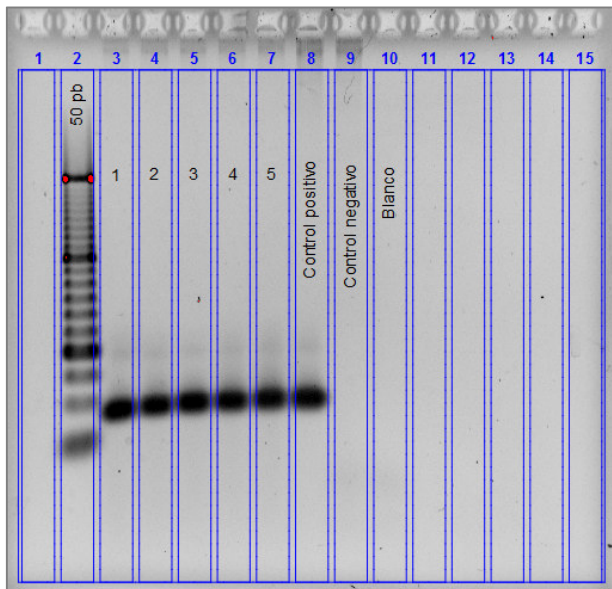


Figura 6. Gel de electroforesis de ensayo de prueba de PCR convencional. Se muestran 05 repeticiones del MRi-2, un control positivo, negativo y blanco.

Tabla 1. Registro de resultados de estandarización de la PCR.

n	Material Biológico	Variante	Temp. (°C)	MgCl2 (mM)	ADN (ng/rxn)	Taq_pol (U/uL)	Intensidad de fluorescencia	Interpretación
1	MRi-2	Ninguna	60°C	2	40	0.5	4,750.68	Positivo
2	MRi-2	Ninguna	60°C	2	40	0.5	4,328.06	Positivo
3	MRi-2	Ninguna	60°C	2	40	0.5	4,651.74	Positivo
4	MRi-2	Ninguna	60°C	2	40	0.5	4,910.90	Positivo
5	MRi-2	Ninguna	60°C	2	40	0.5	4,985.53	Positivo

3.1.2. Ensayo 2 y 3. Determinación de la temperatura de hibridación.

La figura 7 muestra los geles de electroforesis de dos ensayos de PCR a temperaturas de hibridación de 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 62 64 y 66 °C, por duplicado. Para ambos geles, la primera columna corresponde al marcador de peso molecular de 50 pares de bases, seguido de 12 réplicas del MRi-2 a 40 ng/reacción, un control negativo y un control blanco. El ensayo no muestra amplificación de productos inespecíficos. La tasa de detección del MRi-2 en las diferentes temperaturas de hibridación fue del 100% y tuvo un valor de intensidad de fluorescencia máximo de 5776.54 a la temperatura de 58°C, seguido del valor de 5741.36 a la temperatura de 56°C y un mínimo de 4538.84 a 44°C (tabla 2; figura 8). La temperatura de hibridación seleccionada fue de 58°C.

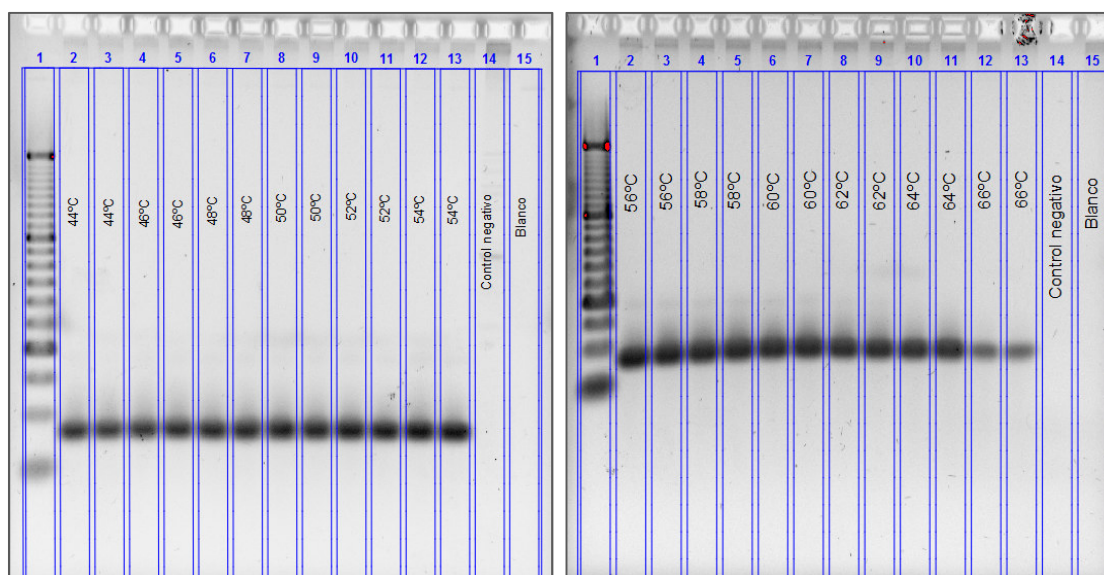


Figura 7. Ensayo de PCR para la determinación de la temperatura de hibridación óptima.

Tabla 2. Registro de resultados de estandarización de la temperatura de hibridación.

n	Material Biológico	Variante	Temp. (°C)	MgCl2 (mM)	ADN (ng/rxn)	Taq_pol (U/uL)	Intensidad de fluorescencia	Interpretación
1	MRi-2	T° hibridac.	44°C	2	40	0.5	4,563	positivo
2	MRi-2	T° hibridac.	44°C	2	40	0.5	4,515	positivo
3	MRi-2	T° hibridac.	46°C	2	40	0.5	4,561	positivo
4	MRi-2	T° hibridac.	46°C	2	40	0.5	4,859	positivo
5	MRi-2	T° hibridac.	48°C	2	40	0.5	5,036	positivo
6	MRi-2	T° hibridac.	48°C	2	40	0.5	5,275	positivo
7	MRi-2	T° hibridac.	50°C	2	40	0.5	5,436	positivo
8	MRi-2	T° hibridac.	50°C	2	40	0.5	5,403	positivo
9	MRi-2	T° hibridac.	52°C	2	40	0.5	5,663	positivo
10	MRi-2	T° hibridac.	52°C	2	40	0.5	5,585	positivo
11	MRi-2	T° hibridac.	54°C	2	40	0.5	5,476	positivo
12	MRi-2	T° hibridac.	54°C	2	40	0.5	5,711	positivo
13	MRi-2	T° hibridac.	56°C	2	40	0.5	5,535	positivo
14	MRi-2	T° hibridac.	56°C	2	40	0.5	5,948	positivo
15	MRi-2	T° hibridac.	58°C	2	40	0.5	5,717	positivo
16	MRi-2	T° hibridac.	58°C	2	40	0.5	5,836	positivo
17	MRi-2	T° hibridac.	60°C	2	40	0.5	5,520	positivo
18	MRi-2	T° hibridac.	60°C	2	40	0.5	5,906	positivo
19	MRi-2	T° hibridac.	62°C	2	40	0.5	5,062	positivo
20	MRi-2	T° hibridac.	62°C	2	40	0.5	4,751	positivo
21	MRi-2	T° hibridac.	64°C	2	40	0.5	4,559	positivo
22	MRi-2	T° hibridac.	64°C	2	40	0.5	4,867	positivo
23	control negativo	T° hibridac.	60°C	2	40	0.5	ND	negativo

ND: no disponible.

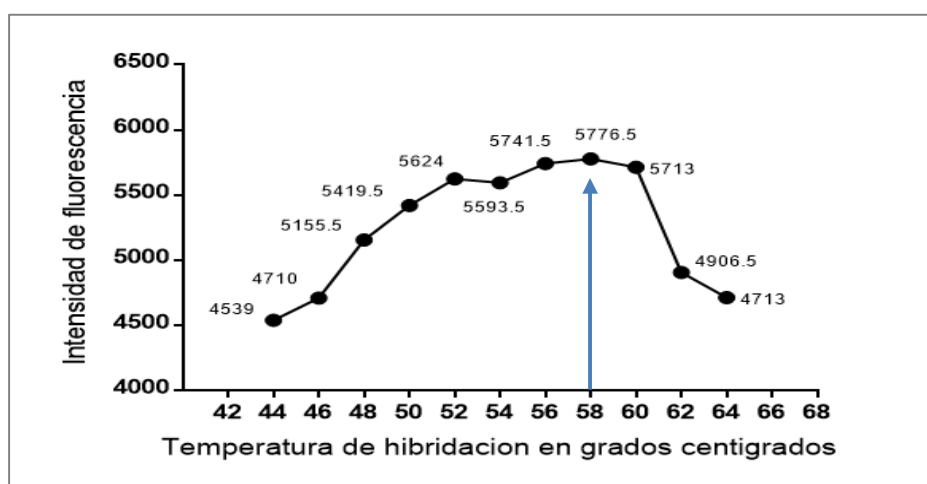


Figura 8. Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en la temperatura de hibridación que muestra una intensidad máxima a 58 °C.

3.1.3. Ensayo 4. Determinación de la concentración de cloruro de magnesio.

La Figura 9 muestra el gel de electroforesis de un ensayo de PCR a concentraciones de cloruro de magnesio de 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mM cada uno por triplicado. En la primera columna está el marcador de peso molecular de 50 pares de bases seguido de 12 réplicas del MRi-2 a diferentes concentraciones de cloruro de magnesio y en la última columna el control blanco de reacción. Se observa la presencia de amplificación del gen tax de 80 pares en las 12 réplicas del MRi-2 y ausencia de productos inespecíficos. La tasa de detección del MRi-2 en las diferentes concentraciones de cloruro de magnesio fue del 100% y tuvo un valor máximo de RFU de 3,106.39 a 4mM (tabla 3 y 4; figura 10). La concentración de cloruro de magnesio seleccionada fue 4 mM.

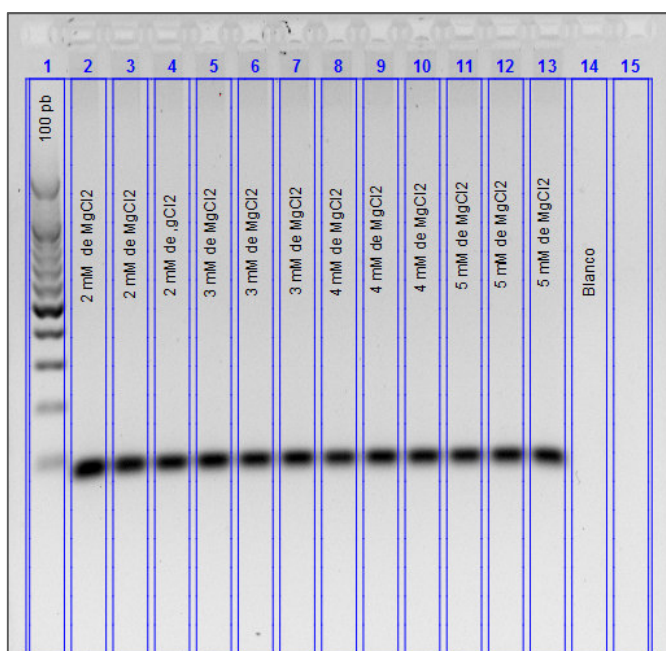


Figura 9. Ensayo de PCR para la determinación de la concentración óptima de cloruro de magnesio.

Tabla 3. Registro de resultados de estandarización de la PCR– Determinación de la concentración de cloruro de magnesio.

n	Material Biológico	Variante	Temp. (°C)	MgCl2 (mM)	ADN (ng/rxn)	Taq_pol (U/uL)	Intensidad de fluorescencia	Interpretación
1	MRi-2	MgCl2	58°C	2	40	0.5	3,223.	positivo
2	MRi-2	MgCl2	58°C	2	40	0.5	2,863	positivo
3	MRi-2	MgCl2	58°C	2	40	0.5	2,877	positivo
4	MRi-2	MgCl2	58°C	3	40	0.5	3,160	positivo
5	MRi-2	MgCl2	58°C	3	40	0.5	2,964	positivo
6	MRi-2	MgCl2	58°C	3	40	0.5	2,981	positivo
7	MRi-2	MgCl2	58°C	4	40	0.5	3,159	positivo
8	MRi-2	MgCl2	58°C	4	40	0.5	3,080	positivo
9	MRi-2	MgCl2	58°C	4	40	0.5	3,079	positivo
10	MRi-2	MgCl2	58°C	5	40	0.5	3,015	positivo
11	MRi-2	MgCl2	58°C	5	40	0.5	2,839	positivo
12	MRi-2	MgCl2	58°C	5	40	0.5	2,720	positivo

Tabla 4. Distribución de promedios de intensidades de fluorescencia en cada concentración de cloruro de magnesio.

n	Parámetros	2mM	3mM	4mM	5mM
1	Promedio de la intensidad de fluorescencia.	2 988	3 035	3 106	2 858
2	Desviación estándar.	204	108	45	148
3	Coefficiente de variación.	6.83	3.56	1.45	5.2

ND: no disponible.

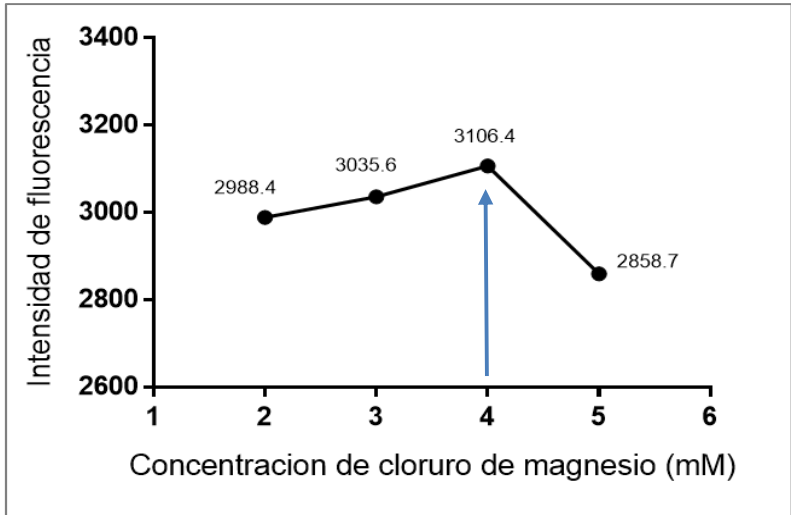


Figura 10. Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación la concentración de cloruro de magnesio.

3.1.4. Ensayo 5. Determinación de la concentración de ADN.

La figura 11 muestra el gel de electroforesis de un ensayo de PCR a concentraciones de ADN de 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ng por reacción de PCR, cada uno por duplicado. En la primera columna se encuentra el marcador de peso molecular de 50 pares de bases, seguido de 12 réplicas del MRi-2 en relación a las variantes de ADN, un control negativo y un control blanco de reacción. La tasa de detección del MRi-2 en todas las variantes de ADN fue del 100% y tuvo un valor máximo de RFU de 5,184.95 a 60 ng/reacción (tabla 5 y 6; figura 12). La concentración de ADN por reacción de PCR seleccionada fue 60 ng/reacción.

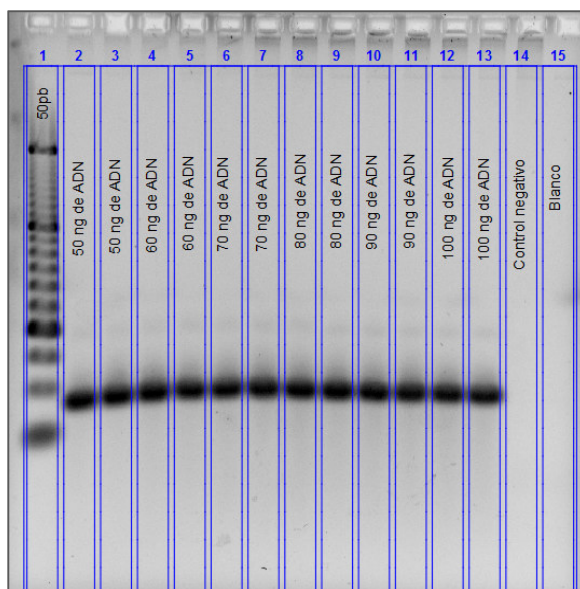


Figura 11. Ensayo de PCR para la determinación de la concentración óptima de ADN.

Tabla 5. Registro de resultados de estandarización de la PCR. Determinación de la concentración de ADN.

n	Material Biológico	Variante	Temp. (°C)	MgCl2 (mM)	ADN (ng/rxn)	Taq_pol (U/uL)	Intensidad de fluorescencia	Interpretación
1	MRi-2	ADN	58°C	4	50	0.5	4,752	positivo
2	MRi-2	ADN	58°C	4	50	0.5	5,484	positivo
3	MRi-2	ADN	58°C	4	60	0.5	5,572	positivo
4	MRi-2	ADN	58°C	4	60	0.5	4,797	positivo
5	MRi-2	ADN	58°C	4	70	0.5	4,782	positivo
6	MRi-2	ADN	58°C	4	70	0.5	4,872	positivo
7	MRi-2	ADN	58°C	4	80	0.5	4,915	positivo

8	MRi-2	ADN	58°C	4	80	0.5	5,261	positivo
9	MRi-2	ADN	58°C	4	90	0.5	4,756	positivo
10	MRi-2	ADN	58°C	4	90	0.5	5,019	positivo
11	MRi-2	ADN	58°C	4	100	0.5	4,733	positivo
12	MRi-2	ADN	58°C	4	100	0.5	4,769	positivo
13	control negativo	ADN	58°C	4	50	0.5	ND	negativo
14	blanco	ADN	58°C	4	50	0.5	ND	negativo

ND: no disponible.

Tabla 6. Distribución de promedios de los RFU con respecto a la cantidad de ADN incorporado por reacción de PCR.

n	Parámetros	50 ng	60 ng	70 ng	80 ng	90 ng	100 ng
1	Promedio	5118	5184	4827	5088	4887	4751
2	Desviación estándar.	517.6	548.0	63.6	244.7	186.0	25.5
3	Coefficiente de variación.	10.1	10.6	1.3	4.8	3.8	0.5

ND: no disponible.

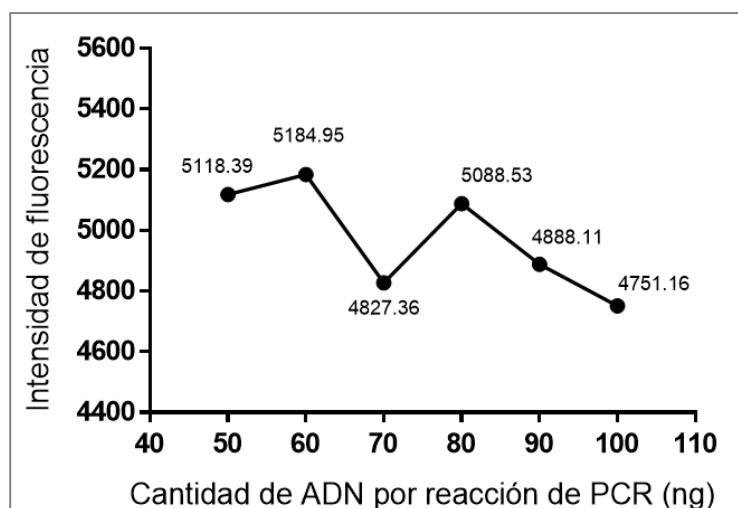


Figura 12. Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación a la concentración de ADN.

3.1.5. Ensayo 6. Determinación de la concentración de Taq polimerasa.

La figura 13 muestra el gel de electroforesis resultado de un ensayo de PCR a concentraciones de Taq. Pol de 0.5, 1.0 y 1.5 U por reacción, cada uno por duplicado. En la primera columna se encuentra el marcador de peso molecular de 50 pares de bases, seguido de seis réplicas del MRi-2 en relación a las variantes de Taq. Pol, un control

negativo y un control blanco. Se observa presencia de productos de amplificación del gen Tax de 80 pares aproximadamente en las seis réplicas del MRi-2 y ausencia de productos inespecíficos. La tasa de detección del MRi-2 fue del 100% y el valor máximo de RFU fue 1.808.38 correspondiente a 1.0 unidades de Taq. Pol por reacción de PCR (tabla 7 y 8; figura 14). No obstante, dado el alto costo de La Taq. Polimerasa, se propuso mantener la concentración de 0.5 U por reacción. Por tanto, dado que la presentación comercial de la Taq polimerasa tiene una concentración de 5 U/uL, para un volumen final de reacción de PCR de 15 uL se agregará 0.1 uL.

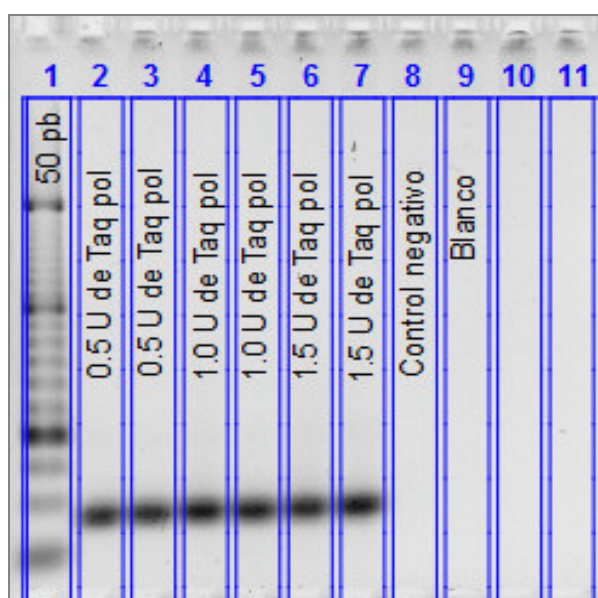


Figura 13. Ensayo de PCR para la determinación óptima de cloruro de Taq polimerasa.

Tabla 7. Registro de resultados de estandarización de la PCR estandarización – Determinación de la concentración de Taq. Pol.

n	Material Biológico	Variante	Temp. (°C)	MgCl ₂ (mM)	ADN (ng/rxn)	Taq_pol (U/uL)	Intensidad de fluorescencia	Interpretación
1	MRi-2	Taq_pol	58°C	4	60	0.5	1,811	positivo
2	MRi-2	Taq_pol	58°C	4	60	0.5	1,805	positivo
3	MRi-2	Taq_pol	58°C	4	60	1.0	2,005	positivo
4	MRi-2	Taq_pol	58°C	4	60	1.0	1,956	positivo
5	MRi-2	Taq_pol	58°C	4	60	1.5	1,962	positivo
6	MRi-2	Taq_pol	58°C	4	60	1.5	1,987	positivo

ND: no disponible.

Tabla 8. Distribución de promedios de los RFU con respecto a la cantidad de Taq. Pol incorporado por reacción de PCR.

n	Parámetros	0.5 U/reacción	1.0 U/reacción	1.5 U/reacción
1	Promedio	1808	1981	1975
2	Desviación estándar.	4.2	34.6	17.7
3	Coefficiente de variación.	0.23	1.75	0.90

ND: no disponible.

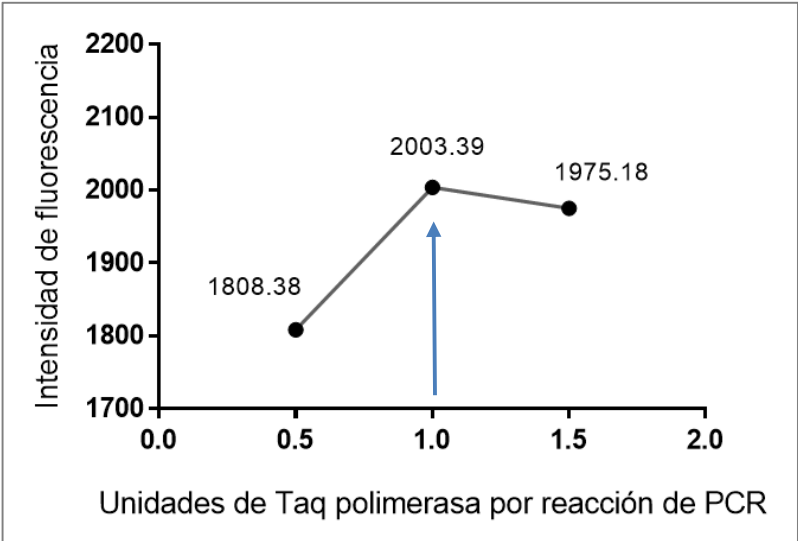


Figura 14. Distribución de las intensidades relativas de fluorescencia en relación a la concentración de Taq. Polimerasa. Se observa una máxima intensidad de fluorescencia a 1.0 unidad de Taq. Polimerasa por reacción de PCR

3.2. RESULTADOS DE VALIDACIÓN.

3.2.1. Determinación del límite de detección.

3.2.1.1. Ensayo N°1. Determinación del límite de detección usando 5, 3, 1, 0.5 y 0.25 copias por reacción de PCR.

La figura 15 muestra un gel de dos niveles del ensayo de determinación del límite de detección a 5.0, 3.0, 1.0, 0.5 y 0.25 copias por reacción de PCR (columnas 2 al 6 y 8 al 12). En la primera columna se muestra al marcador de peso molecular de 100 pares de bases, en la columna 14 está el blanco, mientras que las columnas 7, 13 y 15 no fueron utilizadas. La tasa de detección del MRi-1 para 5.0, 3.0, 1.0 y 0.5 copias por reacción de PCR en 4 réplicas independientes fue 100, 100, 50, 25% respectivamente (tabla 9), sugiriendo que el límite de detección está entre 3 y 5 copias por reacción de PCR.

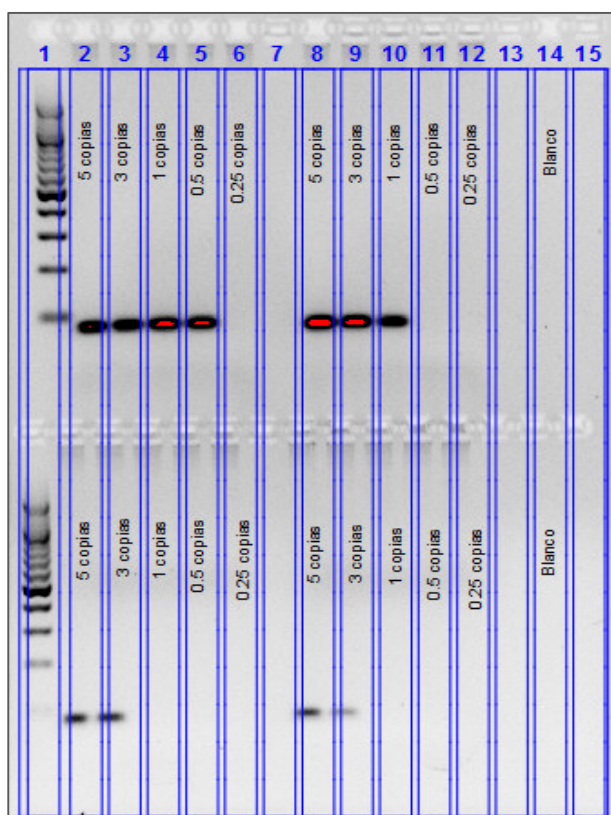


Figura 15. Determinación del límite de detección usando 04 repeticiones de 5, 3, 1, 0.5 y 0.25 copias por reacción de PCR.

Tabla 9. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación del límite de detección – Ensayo 1.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-1	5.0	LoD	cuantitativo	positivo
2	MRi-1	5.0	LoD	cuantitativo	positivo
3	MRi-1	5.0	LoD	cuantitativo	positivo
4	MRi-1	5.0	LoD	cuantitativo	positivo
5	MRi-1	3.0	LoD	cuantitativo	positivo
6	MRi-1	3.0	LoD	cuantitativo	positivo
7	MRi-1	3.0	LoD	cuantitativo	positivo
8	MRi-1	3.0	LoD	cuantitativo	positivo
9	MRi-1	1.0	LoD	cuantitativo	positivo
10	MRi-1	1.0	LoD	cuantitativo	positivo
11	MRi-1	1.0	LoD	cuantitativo	negativo
12	MRi-1	1.0	LoD	cuantitativo	negativo
13	MRi-1	0.5	LoD	cuantitativo	positivo
14	MRi-1	0.5	LoD	cuantitativo	negativo
15	MRi-1	0.5	LoD	cuantitativo	negativo
16	MRi-1	0.5	LoD	cuantitativo	negativo
17	MRi-1	0.25	LoD	cuantitativo	negativo
18	MRi-1	0.25	LoD	cuantitativo	negativo
19	MRi-1	0.25	LoD	cuantitativo	negativo
20	MRi-1	0.25	LoD	cuantitativo	negativo
LoD: Límite de detección.					

3.2.1.2. Ensayo 2 y 3. Determinación del límite de detección usando 3 y 2 copias por reacción de PCR.

En la figura 16 se muestra un gel de electroforesis de dos ensayos de límite de detección independientes. En la primera columna de la parte superior se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, seguido de 13 réplicas (columnas 2 al 14) del MRi-1 a 3 copias por reacción de PCR, mientras que en la parte inferior se muestran 13 réplicas del MRi-1 a 2 copias por reacción de PCR. La tasa de detección del MRi-1 para 3.0 y 2.0 copias por reacción de PCR fue del 61.5 y 70% respectivamente (tabla 10 y 11). Ello sugiere que el Límite de detección de la PCR es mayor de 3 copias por reacción de PCR. Por tanto, el siguiente ensayo evaluó si el límite de detección se encuentra en 5 copias por reacción de PCR dado que en el primer ensayo tuvo una tasa de detección del 100 %.

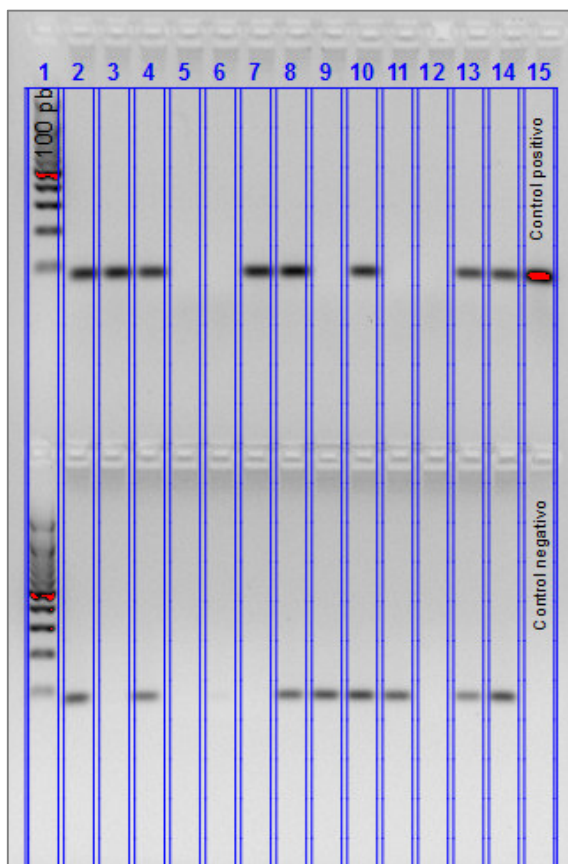


Figura 16. Determinación del límite de detección usando 13 repeticiones de 3 copias por reacción de PCR (imagen superior) y 2 copias por reacción de PCR (imagen inferior).

Tabla 10. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación del límite de detección – Ensayo 2.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
2	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
3	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
4	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	negativo
5	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	negativo
6	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
7	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
8	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	negativo
9	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
10	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	negativo
11	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	negativo
12	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
13	MRi-1	3	LoD	cuantitativo	positivo
LoD: Límite de detección.					

Tabla 11. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación del límite de detección – Ensayo 3.					
n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
2	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	negativo
3	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
4	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	negativo
5	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
6	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	negativo
7	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
8	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
9	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
10	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
11	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	negativo
12	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
13	MRi-1	2	LoD	cuantitativo	positivo
LoD: Límite de detección.					

3.2.1.3. Ensayo 4. Determinación del límite de detección usando 5 copias por reacción de PCR.

En la figura 17 se muestra un gel de electroforesis de un ensayo de PCR. En la primera columna se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, seguido de 13 réplicas (columnas 2 al 14) del MRi-1 a 5.0 copias/reacción de PCR. Adicionalmente en la columna 15 el control blanco. La tasa de detección del MRi-1 para 5.0 copias por reacción de PCR en 13 réplicas fue del 100 % (tabla 12), por lo que el Límite de detección puede ser 5 ó 4 copias por reacción de PCR. Por tanto, se realizó un ensayo de PCR para evaluar la tasa de detección de la PCR con 4 copias/reacción.

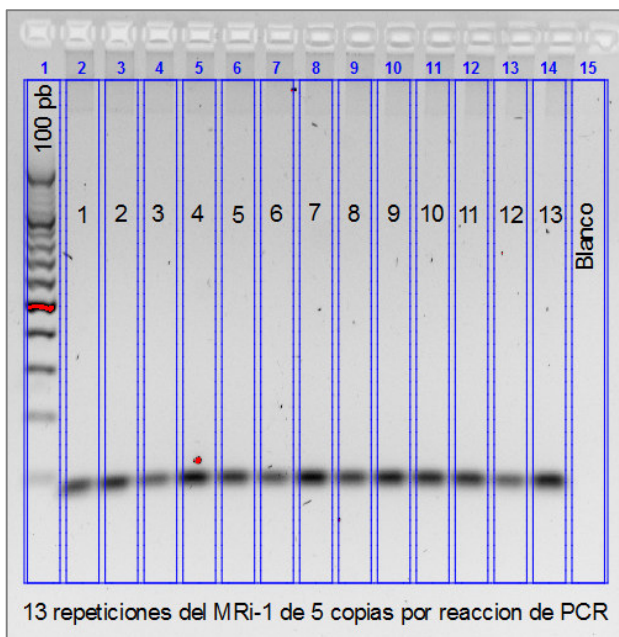


Figura 17. Determinación del Límite de detección en 13 repeticiones de 5 copias por reacción de PCR.

Tabla 12. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación del Límite de detección – Ensayo 4.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
2	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
3	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
4	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
5	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
6	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
7	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
8	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
9	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
10	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
11	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
12	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
13	MRi-1	5	LoD	cuantitativo	positivo
LoD: Límite de detección.					

3.2.1.4. Ensayo 5. Determinación del límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.

En la figura 18 se muestra el gel de electroforesis de un ensayo de PCR realizado en 13 réplicas del MRi-1 a 4.0 copias/reacción. En la primera columna se muestra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, en las columnas 2 al 14 las réplicas del MRi-1 y en la columna 15 el control blanco. La tasa de detección del MRi-1 para 4.0 copias/reacción de PCR fue del 100 %, lo cual sugiere fuertemente que el límite de detección de la PCR pudiera ser 4.0 copias del gen Tax (Tabla 13).

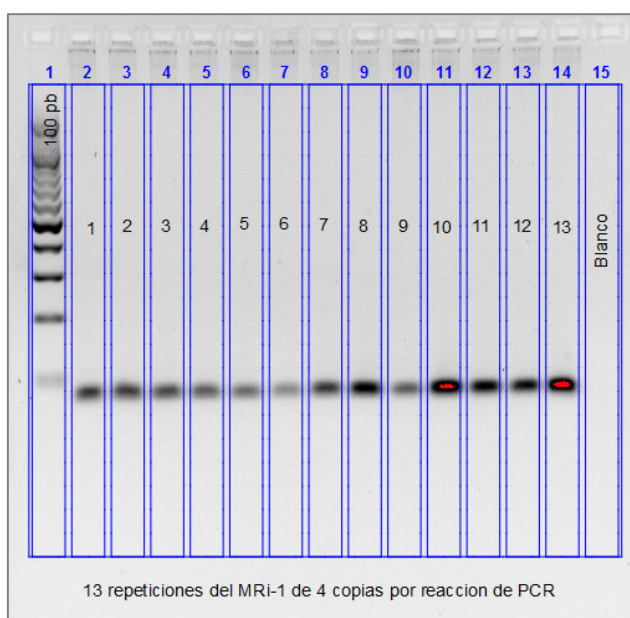


Figura 18. Determinación del Límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.

Tabla 13. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación del límite de detección – Ensayo 5.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo
2	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo
3	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo
4	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo
5	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo
6	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo
7	MRi-1	4	LoD	cuantitativo	positivo

8	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
9	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
10	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
11	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
12	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
13	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
LoD: Límite de detección.					

3.2.1.5. Ensayo N°6 - Determinación del límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.

En la figura 19 se muestra un gel de electroforesis de un ensayo de PCR realizado sobre 12 réplicas del MRi-1 a 4.0 copias/reacción de PCR. En la primera columna se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, en las columnas 2 al 13 las réplicas del MRi-1 de 4 copias del gen tax y en la columna 14 y 15 el control negativo y blanco. Al igual que el ensayo anterior, la tasa de detección del MRi-1 para 4.0 copias por reacción de PCR en 12 réplicas fue del 100 % (tabla 14), confirmando que el Límite de detección es de 4 copias del gen Tax por reacción de PCR.

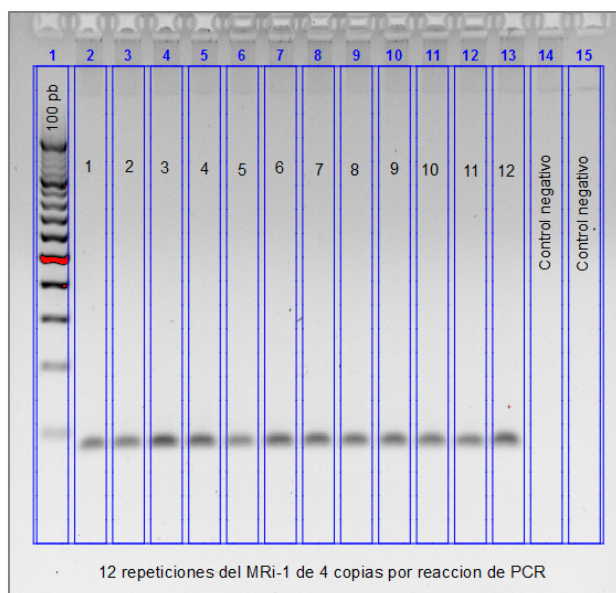


Figura 19. Determinación del Límite de detección usando 4 copias por reacción de PCR.

Tabla 14. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación del límite de detección – Ensayo 6.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
2	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
3	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
4	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
5	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
6	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
7	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
8	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
9	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
10	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
11	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
12	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
13	MRi-1	4	LoD	cualitativo	positivo
LoD: Límite de detección.					

3.2.1.6. Resumen de resultados del límite de detección.

El tabla 15 y la figura 20 muestran el consolidado de 04 ensayos de límite de detección con 72 réplicas del material de referencia durante 05 días. El límite de detección fue de 4 copias por reacción de PCR a un 95% de tasa de detección, siendo posteriormente estimado en 4.34 copias por reacción para un 100% de tasa de detección. La relación lineal entre tasa de detección y número de copias evaluadas mostró un coeficiente de determinación de 0.91 y un intercepto de 0.205. Cada una de las variantes se incluyó ADN foráneo para mantener el efecto de la matriz.

Tabla 15. Resumen de resultados de validación de la PCR - Determinación del límite de detección.

n	Copias/rxn	Copias / ng	Verdaderos positivos	Falsos negativos	Total de réplicas	Tasa de detección
1	5.00	0.083	4	0	4	100.0 %
2	4.00	0.067	23	0	23	100.0 %
3	3.00	0.050	12	5	17	70.6 %
4	2.00	0.033	9	4	13	69.2 %
5	1.00	0.017	2	4	6	33.3 %
6	0.50	0.008	1	4	5	20.0 %
7	0.25	0.004	0	4	4	0.0 %

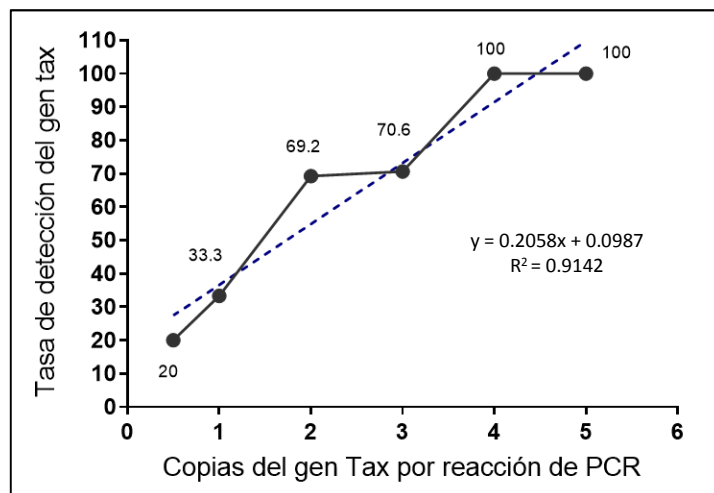


Figura 20. Resultados consolidados de la determinación del límite de detección.

3.2.2. Determinación de la precisión.

3.2.2.1. Primer ensayo de precisión: Determinación de la tasa de detección de 4.8, 4.0 y 3.2 copias por reacción de PCR.

La figura 21 se muestra un gel de electroforesis de un ensayo de PCR realizado sobre 10 réplicas del MRi-2 a 4.8, 4.0 y 3.2 copias por reacción de PCR cada una (tabla 16). En la tercera columna se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases y en las columnas 5 a 14, 16 a 25 y 27 a 36, las réplicas del MRi-2 a 4.8, 4.0 y 3.2 copias por reacción de PCR respectivamente. Las columnas 4, 15 y 26 contienen a los blancos de reacción para cada una de las variantes. La tasa de detección del MRi-2 para 4.8, 4.0 y 3.2 copias/reacción fue del 100, 100 y 80% respectivamente.

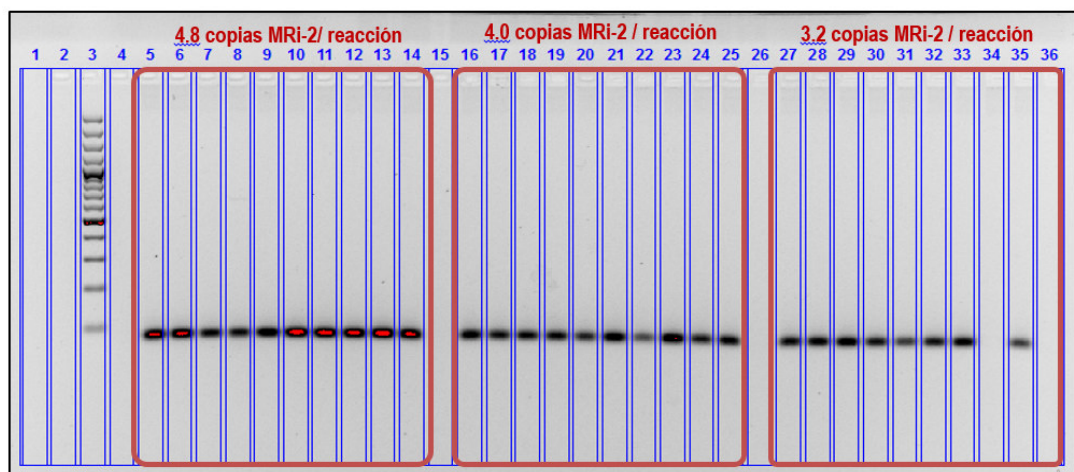


Figura 21. Primer ensayo de precisión. Determinación de la tasa de detección a 4.8, 4.0 y 3.2 copias provirales por reacción de PCR usando el MRi-2 (TARL-2).

Tabla 16. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación de la precisión – Ensayo N°1.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
2	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
3	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
4	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
5	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo

6	MRi-2	4.8	precisión	cualitativo	positivo
7	MRi-2	4.8	precisión	cualitativo	positivo
8	MRi-2	4.8	precisión	cualitativo	positivo
9	MRi-2	4.8	precisión	cualitativo	positivo
10	MRi-2	4.8	precisión	cualitativo	positivo
11	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
12	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
13	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
14	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
15	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
16	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
17	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
18	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
19	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
20	MRi-2	4.0	precisión	cualitativo	positivo
21	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
22	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
23	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
24	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
25	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
26	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
27	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
28	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
29	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	negativo
30	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo

3.2.2.2. Segundo ensayo de precisión: Determinación de la tasa de detección de 4.8, 4.0 y 3.2 copias por reacción de PCR.

En la figura 22 se muestra un gel de electroforesis de un ensayo de PCR realizado sobre 10 réplicas del MRi-2 a 4.8, 4.0 y 3.2 copias cada una, por reacción de PCR. En la segunda columna está el marcador de peso molecular de 100 pares de bases y en las columnas 4 a 13, 15 a 24 y 26 a 35 están las réplicas del MRi-2 a 4.8, 4.0 y 3.2 copias del gen Tax por reacción de PCR respectivamente. Las columnas 3, 14 y 25 contienen a los blancos de reacción para cada una de las variantes y en la columna 36 el control negativo. La tasa de detección del MRi-2 para 4.8, 4.0 y 3.2 copias/reacción fue del 100, 90 y 100% respectivamente (tabla 17).

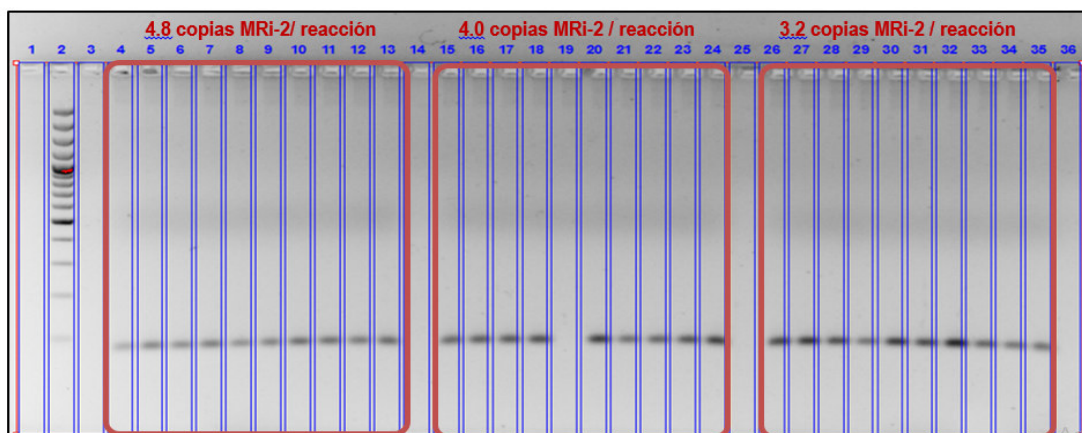


Figura 22. Segundo ensayo de precisión. Determinación de la tasa de detección a 4.8, 4.0 y 3.2 copias provirales por reacción de PCR usando el MRi-2 (TARL-2).

Tabla 17. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación de la precisión – Ensayo N°2.

n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
2	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
3	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
4	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
5	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
6	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
7	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
8	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
9	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
10	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
11	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
12	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
13	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
14	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
15	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	negativo
16	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
17	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
18	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
19	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
20	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
21	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
22	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
23	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo

24	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
25	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
26	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
27	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
28	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
29	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo
30	MRi-2	3.2	precisión	cualitativo	positivo

3.2.2.3. Tercer ensayo de precisión: Determinación de la tasa de detección de 4.8, 4.0 y 3.2 copias por reacción de PCR.

En la figura 23 se muestra un gel de electroforesis de un ensayo de PCR realizado con 30 réplicas del MRi-2 a 4.8, 4.0 y 3.2 copias/reacción de PCR. En la segunda columna se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases y en las columnas 4 a 13, 15 a 24 y 25 a 34 se encuentran las réplicas del MRi-2 a 4.8, 4.0 y 3.2 copias por reacción de PCR respectivamente. Las columnas 3, 14 y 35 contienen a los blancos de reacción para cada una de las variantes y en la columna 36 el control negativo. La tasa de detección del MRi-2 para todas las réplicas fue del 100 % (tabla 18).

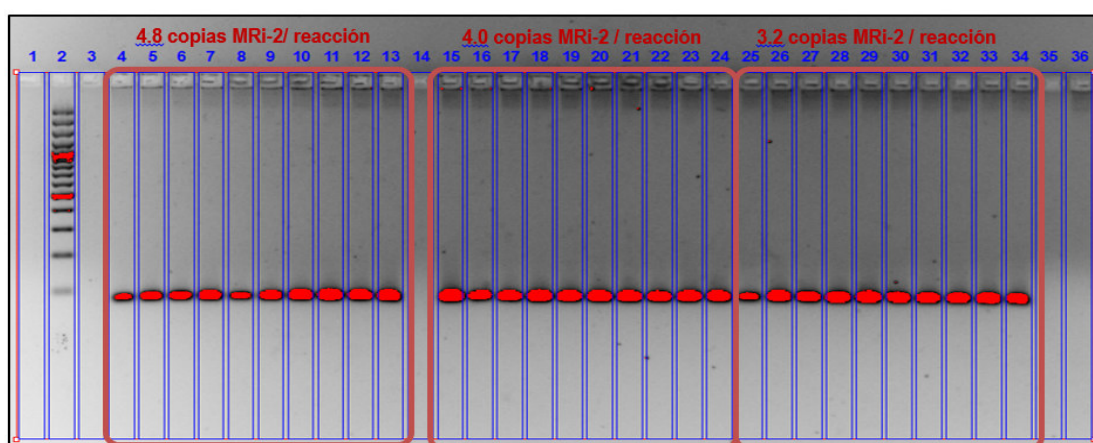


Figura 23. Tercer ensayo de precisión. Determinación de la tasa de detección a 4.8, 4.0 y 3.2 copias provirales por reacción de PCR usando el MRi-2 (TARL-2).

Tabla 18. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación de la precisión – Ensayo 3					
n	Material Biológico	Copias / reacción	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
2	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
3	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
4	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
5	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
6	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
7	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
8	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
9	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
10	MRi-2	4.8	precisión	cuantitativo	positivo
11	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
12	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
13	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
14	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
15	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
16	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
17	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
18	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
19	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
20	MRi-2	4.0	precisión	cuantitativo	positivo
21	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
22	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
23	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
24	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
25	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
26	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
27	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
28	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
29	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo
30	MRi-2	3.2	precisión	cuantitativo	positivo

3.2.2.4. Resumen de resultados de precisión.

Los ensayos de precisión usaron el MRi-2 consistente en una línea celular de TARI-2 que contiene un aproximado de 01 copia del provirus del HTLV-1 por genoma y fueron realizados durante tres días. Dado que el límite de detección de la PCR fue 04 copias por

reacción, las concentraciones utilizadas fueron 3.2, 4.0 y 4.8 copias por reacción. El tabla 20 y figura 24 muestran que la PCR obtuvo una precisión intraensayo del 80 a 100% de detección y una precisión interensayo con un 94%, 97% y 100% de detección para 3.2, 4.0 y 4.8 copias por reacción de PCR respectivamente (tabla 19).

Tabla 19. Resumen de resultados de validación de la PCR - Determinación de la precisión.						
n	Copias/rxn	Número de repeticiones	Repetibilidad			Reproducibilidad
			Día 1	Día 2	Día 3	
1	3.2	30	10 (100%)	10 (100%)	8 (80%)	28 (94%)
2	4.0	30	10 (100%)	9 (90%)	10 (100%)	29 (97%)
3	4.8	30	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	30 (100%)

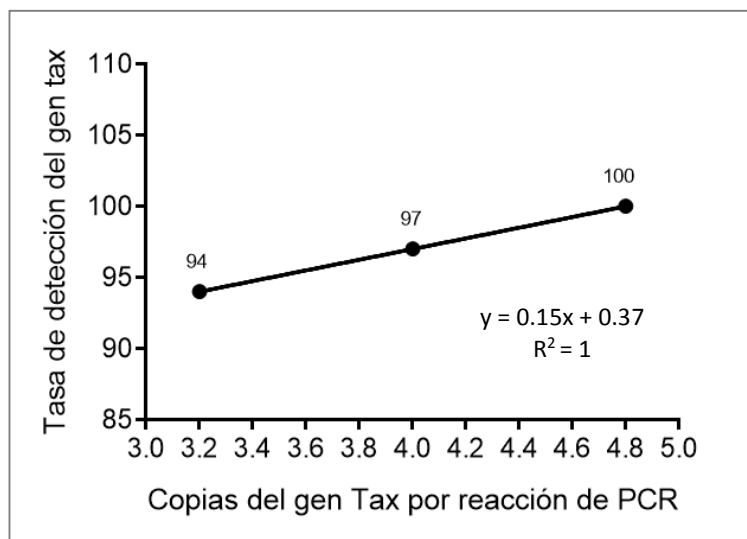


Figura 24. Resultados consolidados de la precisión.

3.2.3. Determinación de la veracidad.

En la figura 25 se muestra un gel de electroforesis de dos niveles, resultado de un ensayo de PCR realizado sobre 21 muestras con carga proviral no detectable (columnas 4 al 24), 39 muestras con carga proviral menos o igual a 10 (columnas 26 al 51 del nivel superior y columnas 4 al 16 del nivel inferior) y 09 muestras con carga proviral mayor de 10 (columnas 18 a 26). La segunda columna de ambos niveles encuentra el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (tabla 20).

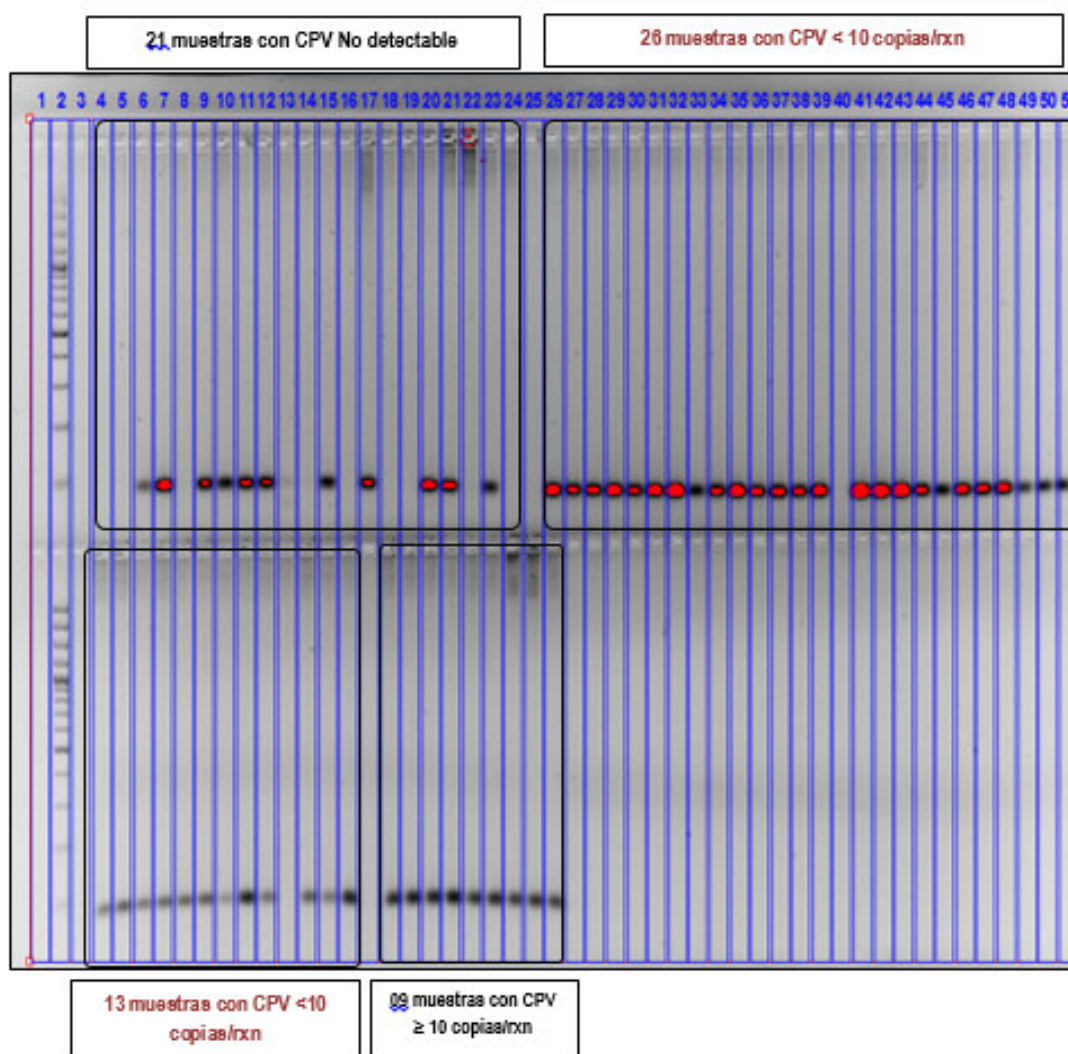


Figura 25. Ensayo de veracidad. Determinación de la tasa de detección en 21 muestras con carga proviral no detectable, 39 muestras con carga proviral menos o igual a 10 y 09 muestras con carga proviral mayor de 10.

Tabla 20. Registro de resultados de validación de la PCR - Determinación de la precisión – Ensayo 3.

n	Carga proviral	Parámetro	Resultado	Interpretación
1	ND	veracidad	cualitativo	negativo
2	ND	veracidad	cualitativo	negativo
3	ND	veracidad	cualitativo	positivo
4	ND	veracidad	cualitativo	positivo
5	ND	veracidad	cualitativo	negativo
6	ND	veracidad	cualitativo	positivo
7	ND	veracidad	cualitativo	positivo
8	ND	veracidad	cualitativo	positivo
9	ND	veracidad	cualitativo	positivo
10	ND	veracidad	cualitativo	negativo
11	ND	veracidad	cualitativo	negativo
12	ND	veracidad	cualitativo	positivo
13	ND	veracidad	cualitativo	negativo
14	ND	veracidad	cualitativo	positivo
15	ND	veracidad	cualitativo	negativo
16	ND	veracidad	cualitativo	negativo
17	ND	veracidad	cualitativo	positivo
18	ND	veracidad	cualitativo	positivo
19	ND	veracidad	cualitativo	negativo
20	ND	veracidad	cualitativo	positivo
21	ND	veracidad	cualitativo	negativo
22	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
23	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
24	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
25	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
26	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
27	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
28	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
29	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
30	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
31	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
32	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
33	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
34	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
35	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
36	< 10	veracidad	cualitativo	negativo
37	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
38	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
39	< 10	veracidad	cualitativo	positivo

40	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
41	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
42	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
43	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
44	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
45	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
46	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
47	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
48	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
49	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
50	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
51	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
52	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
53	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
54	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
55	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
56	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
57	< 10	veracidad	cualitativo	negativo
58	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
59	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
60	< 10	veracidad	cualitativo	positivo
61	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
62	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
63	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
64	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
65	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
66	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
67	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
68	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo
69	≥ 10	veracidad	cualitativo	positivo

Se tomó como prueba de referencia la prueba de qPCR-IMTA_vH debido a que, al igual que la PCR está basada en la amplificación de ácidos nucleicos y utiliza la misma secuencia diana. Los ensayos incluyeron 69 muestras de individuos pertenecientes a la cohorte de HTLV-1 con resultado de carga proviral por qPCR-IMTA_vH definido como no detectable, menor igual que 10 y mayor de 10. Estas muestras fueron sometidas a PCR (tabla 21).

Considerando los resultados con qPCR mayor o igual a 10 como resultados positivos, la sensibilidad y especificidad de la PCR fue del 97.9% y 47.6% con un valor predictivo positivo y negativo de 80.7 y 83.4 % respectivamente, y un coeficiente de concordancia kappa de 0.49 (tabla 22). Sin embargo, suponiendo que la PCR tuviera mayor sensibilidad analítica de la prueba de qPCR-IMTA_vH y por tanto fuera considerada como referencia, la sensibilidad y especificidad de la qPCR-IMTA_vH sería de 80.7% y 83.4% con un valor predictivo positivo y negativo de 95.8 y 90.9 % respectivamente (tabla 22).

Tabla 21. Distribución de resultados de veracidad respecto a la prueba de referencia de qPCR-IMTA_vH.

n	Resultado de la PCR	Número de repeticiones	Resultado de la qPCR-IMTA _v H		
			CPV ND	CPV ≤ 10	CPV > 10
1	Positivo	57	11	37	09
2	Negativo	12	10	02	0
3	Total	69	21	39	09

qPCR-IMTA_vH: Prueba de qPCR realizada en el IMTA_vH.
CPV: Carga proviral.

Tabla 22. Parámetros de veracidad respecto a diferentes pruebas de referencia.

Prueba de referencia	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP	VPN	Coef. Kappa
qPCR-IMTA _v H	97.9	47.6	80.7	83.4	0.49
PCR	80.7	83.3	95.8	90.9	

VPP: Valor predictivo positivo.
VPN: Valor predictivo negativo.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS DE ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN.

A diferencia de otros estudios, el desarrollo de nuestra PCR siguió las recomendaciones de la CLSI referente a la validación de pruebas moleculares para agentes infecciosos. Además, con fines comparativos, se realizó una búsqueda bibliográfica en Medline sobre estandarización o validación de pruebas de PCR para HTLV-1 (tabla 23). Se obtuvo 10 estudios, de los cuales 09 son de tipo qPCR (1, 2, 5, 10, 12, 43, 44, 46, 51) y 01 de PCR (52)

Los ensayos de optimización recomendaron usar las concentraciones de 4 mM de $MgCl_2$, 60 ng de ADN por reacción, 58°C de temperatura de hibridación y 0.5 U/uL de concentración Taq polimerasa. Estas condiciones se seleccionaron en base a la mayor intensidad de fluorescencia del producto de PCR en cada variante de optimización. No obstante, se sabe que la cantidad de producto de PCR generado, no está necesariamente relacionado con la eficiencia de reacción o la cantidad de ADN inicial. Además, debido al insuficiente número de réplicas, el estudio no incluyó intervalos de confianza útiles por variante. Sin embargo, los resultados de optimización pueden ser importantes desde la perspectiva de que no se hallaron amplificaciones falsas negativas, positivas ni productos inespecíficos.

El aumento de concentración de ADN de 40 a 60 ng por reacción de PCR incrementa las posibilidades de detección del provirus del HTLV-1 en muestras con baja carga proviral. Sin embargo, su exceso impide que los cebadores identifiquen la secuencia diana y la extensión de la cadena por la Taq polimerasa, afectando la eficiencia de reacción y generando productos inespecíficos. La PCR optimizada incorporó 60 ng de ADN en un volumen de reacción de 15 uL, no siendo observados productos inespecíficos. Por otro lado, según los ensayos de optimización, la adición de 1.5 unidades de Taq polimerasa por

reacción incrementa del producto de PCR. Sin embargo, se decidió mantener la concentración de 0.5 unidades por reacción a fin de tener una prueba a bajo costo.

De las diez publicaciones revisadas, siete muestran una concentración de 3.0 a 5.0 mM de MgCl₂, cinco usan entre 0.3 a 1.5 U/rxn de Taq polimerasa y tres agregan hasta 100 ng de ADN por reacción de PCR, siendo las concentraciones utilizadas por nuestra PCR intermedias. No obstante, existen cinco publicaciones de tipo qPCR que no mencionan la cantidad de Taq polimerasa ni MgCl₂ (29, 36, 37, 40, 47), debido a que los master mix universales que usan mantienen en reserva estas especificaciones. Aunque los master mix universales brindan practicidad, hacer modificaciones en sus componentes y eventuales cambios de master mix universal son tediosas y exigen nuevas evaluaciones.

En concordancia con nuestra estandarización, seis utilizan como secuencia diana el gen Tax, ocho publicaciones utilizan ADN aislado de PBMCs y en dos utilizan ADN de sangre total con fines de practicidad y economía (tabla). Al respecto, el aislamiento de PBMCs puede ser realizado en microtubos que requieren menos de 500 uL de Ficoll o Percoll (micrométodos). Ello no eleva significativamente el tiempo ni el costo, pero favorece la capacidad de detección de la prueba. Por otro lado, siete publicaciones sólo reportan el volumen de ADN incorporado en cada reacción de PCR pero no su concentración, a pesar de ser un parámetro complementario para el Límite de detección de la prueba.

4.2. ENSAYOS DE VALIDACIÓN.

El valor del límite de detección es expresado haciendo mención del volumen o cantidad de ADN utilizado en la reacción de PCR (copias/uL o copias/ng de reacción de PCR). La PCR validada tiene un límite de detección de 4.0 copias del gen Tax en 60 ng de ADN por reacción de 15 uL, siendo posteriormente estimado en 4.34 copias por reacción para un 100% de tasa de detección. Consideramos agregar “ADN foráneo” no infectado con HTLV-1, equivalente a 60 ng en cada una de las diluciones del material de referencia para asegurar el efecto matriz. De las diez publicaciones revisadas, sólo tres agregan ADN

foráneo para mantener el efecto matriz en los ensayos de límite de detección (40, 50, 54) pero brindan información insuficiente o limitada.

Asimismo, de diez publicaciones, cuatro ofrecen valores no plausibles de límite de detección entre 01 y 2.97 copias por reacción dado que no consideran el efecto matriz ni realizan el número suficiente de réplicas para evaluar la reproducibilidad (29, 36, 47, 53). Tres publicaciones ofrecen un valor ≤ 10 copias por reacción debido a que no se exploraron concentraciones menores de la curva estándar para carga proviral (37, 40, 50). Mientras que tres publicaciones expresan términos no convencionales de límite de detección, como por ejemplo 400 copias por $1.00E+06$ PBMCs (48), ≥ 8 copias por $1.00E+06$ PBMCs (54) o 1 – 10 copias por uL (30).

Asimismo, existe divergencia en el número de copias de las líneas celulares usadas como material de referencia. Al respecto, cuatro estudios que utilizan la línea celular MT-2 con un número de copias establecido de 2.0, 2.1 y 8.0 copias provirales por genoma, mientras que dos estudios difieren en la línea celular MT-4 con 1.4 y 7.0 copias por genoma (40, 47). Al respecto, igual que Rosadas y cols. (36), la PCR validada utilizó la línea celular TARL-2 para el estudio de la precisión, obteniéndose una concentración de 165 copias por ng. Considerando un peso de 6.7 pg por genoma diploide, nuestra línea celular TARL-2 cuenta con 1.105 copias por genoma, cercano a 1.0 copia por genoma.

Con respecto a la precisión, ésta es evaluada usando un material de referencia a concentraciones 20% alrededor del límite de detección por su significancia diagnóstica. La PCR validada obtuvo una precisión intraensayo del 80 a 100% de detección y una precisión interensayo con un 94%, 97% y 100% de detección para 3.2, 4.0 y 4.8 copias por reacción de PCR respectivamente. Es decir, se obtuvo un porcentaje mayor al 95% en el límite de detección de 4 copias por reacción de PCR, usando como material de referencia la línea celular TARL-2, con resultados similares a los obtenidos en el límite de detección usando el plásmido p4.39. Nosotros incluimos como variante interensayo, los días de procesamiento, siendo el analista, reactivos, equipo e incluso el material de referencia los mismos.

De las nueve publicaciones de qPCR seleccionadas, seis tienen como precisión intra e interensayo, un coeficiente de variación menor al 5% del nivel umbral (cycle threshold), siendo considerados aceptables valores menores al 10% para la reproducibilidad intraensayo y menor del 3 % para la reproducibilidad interensayo (40). Sin embargo, estos estudios fueron realizados con materiales de referencia a concentraciones típicas de la curva estándar para carga proviral. Es decir, los ensayos de precisión no fueron realizados a concentraciones cercanas al límite de detección y por tanto no son significativos. Ello, sumado a los pocos estudios que realizan ensayos de límite de detección, sugiere que pruebas de qPCR para carga proviral no tienen como finalidad la detección.

Por otro lado, el propósito de nuestra prueba de PCR es ser confirmatoria para muestras con resultado reactivos por ELISA. Sin embargo, debido a la no disponibilidad del INNO-LIA, la qPCR-IMTA_vH utilizada en el IMTA_vH y desarrollada por Adauí y colaboradores (50) fue utilizada con fines comparativos en el estudio de veracidad. Los ensayos utilizaron 48 muestras de ADN almacenados que mostraron amplificación del gen tax (positivas) y 21 que no mostraron amplificación para el gen tax (negativas) por qPCR-IMTA_vH. La PCR pudo detectar 11 casos (52.4%) de HTLV-1 de 21 muestras con carga proviral no detectable (qPCR-IMTA_vH negativas), obteniéndose un aceptable factor de concordancia kappa del 0.49 (45).

La amplificación de las 11 muestras por PCR probablemente se deba a su mayor sensibilidad analítica o producto de la contaminación cruzada. No obstante, ningún ensayo de optimización mostró contaminación de los controles negativos, por lo que resulta poco probable su contaminación en el ensayo de veracidad. Al respecto, se cree que la mayor intensidad de fluorescencia del SYBR Green le confiere mayor sensibilidad a la qPCR con respecto al uso de bromuro de etidio para una PCR. Para Bastien y colaboradores (53), existen pruebas de PCR que tienen mayor sensibilidad analítica (menor Límite de detección) que pruebas de qPCR.

El sustento se basa en que la sensibilidad analítica de una prueba de PCR depende de una óptima condición fisicoquímica de reacción, eficiencia de los cebadores y calidad del

ADN; independientemente de ser de tipo qPCR o PCR. En nuestro estudio, la incorporación de 60 ng de ADN en 15 uL de reacción de PCR en comparación con los 40 ng de ADN y 20 uL de reacción de qPCR-IMTAvH podría incrementar significativamente las condiciones de la PCR en las muestras con carga proviral menor de 10 copias por 10E+06 PBMCs. Creemos que la mayoría de las qPCR se han enfocado en asegurar una menor variabilidad entre las mediciones del nivel umbral de las diluciones de la curva estándar en lugar de obtener un adecuado límite de detección.

Considerando la qPCR-IMTAvH como prueba de referencia, la PCR tiene una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 97.9 y 47.6 % respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95.8 % y un valor predictivo negativo de 90.9 % respectivamente. No obstante, si asumiéramos la prueba de PCR tiene mayor sensibilidad analítica y fuera tomada como prueba de referencia, entonces la qPCR-IMTAvH tendría una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 80.7 y 83.3 % respectivamente. Además la qPCR tendría un valor predictivo positivo y negativo de 95.8 y 90.9 % respectivamente, siendo estos resultados más acordes a la naturaleza de una prueba molecular y a las publicaciones revisadas.

Por otro lado, los resultados muestran que la PCR no detectó 02 casos de 48 muestras positivas por qPCR, las cuales tenían una carga proviral menor o igual que 10. Lamentablemente, no fue posible realizar un duplicado porque no se contaba con suficiente ADN y no estuvo programado. Sin embargo, es posible que debido al mayor tiempo de almacenamiento, sumado a la baja carga proviral, el ADN no haya sido de buena calidad. Al respecto, no conocemos la fecha de colecta de estas muestras, sin embargo, se empezaron a coleccionar muestras desde el inicio de la cohorte de estudio en el año 2008.

Tabla 23. Publicaciones de estandarización y validación de pruebas de PCR para la detección del HTLV-1.																	
Referencia	PCR	Objetivo	ADN	Targ et	Master mix	Volumen de reacción	ADN incorp orado	Efecto matrix	Temp de hibrid.	Taq. Pol.	MgCl2	Material de referencia	Límite de detección	Límite de cuantificación	Especificidad analítica	Precisión (inter e intraensayo)	Veracidad
1	Gallego y cols. (64)	Cualitativo - detección	PBMC	pX	No universal	45 ul 49 ul	5 ul 1 ul	Sí	60 ciclos x 55°C	1.0 U/rxn	1.5 mM	MT-2 (mayor igual a 8 copias por rxn)	≥ 8 copias /10E+06 PBMCs	NA	In silico	NR	Pruebas serológicas
2	Lee y cols. (53)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	Tax	No universal	75 ul	25 ul	No	45 ciclos x 56°C	1.5 U/rxn	5.0 mM	MT-2 (2.1 copias por genoma)	1 copiar/rxn	10 copias/rxn	In silico	NR	Pruebas serológicas
3	Castro y cols. (23)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	Tax	Quantitect SYBR Green PCR Master Mix	25 ul	5 ul	No	45 ciclos x 60°C	NR	2.5 mM	MT-2 (2.1 copias por genoma)	2.97 copias/rxn	10 copias/rxn	HIV, HCV, HTLV-2	CV<2.0%	Pruebas serológicas y condición clínica (HAM/TSP, AC)
4	Altamirano y cols. (48)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	Pol	iQ SYBR Green Supermix	25 ul	5 ul	No	45 ciclos x 55°C	0.3 U/rxn	3.0 mM	MT-2 (2.0 copias por genoma)	400 copias/10E+06 PBMCs	10 copias/rxn	HTLV-2, VIH	CV<2.4 %	NR
5	Adau y cols. (50)*	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	pX	iQ SYBR Green Supermix	25 ul	5 ul de 20 ng/ul	Sí	45 ciclos x 60°C	0.3 U/rxn	3.0 mM	Plasmido p4.39 (1 copia proviral)	< 10 copias/rxn.	10 copias/rxn	In silico	CV<2.0%	Condición clínica (HAM/TSP, AC)
6	Moens y cols. (40)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	Tax	TaqMan universal PCR master mix	25 ul	5 ul de 20 ng/ul	Sí	45 ciclos x 60°C	NR	NR	MT-4 (1.4 copias por genoma) y ADN plasmídico (1 copia proviral)	< 10 copias/rxn	4.6 copias/rxn	In silico	CV<5.0%	Condición clínica (HAM/TSP, AC) y MR
7	Naderi y cols. (37)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	Tax	Quantifas 1 probe PCR kit	20 ul	5 ul	No	45 ciclos x 60°C	NR	NR	ADN plasmídico (1 copia proviral)	< 10 copias/rxn.	10 copias/rxn	In silico	CV<4.8%	Condición clínica (HAM/TSP, AC) y MR
8	Rosadas y cols. (36)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC	pX	Taq-Man Universal PCR Master Mix	25 ul	10 ul de 10 ng/ul	No	45 ciclos x 60°C	NR	NR	TARL (1.0 copias por genoma)	1 copiar/rxn	5 copias/rxn	In silico	CV<2.4%	Pruebas serológicas
9	Besson y cols. (47)	Cuantitativo - carga proviral	PBMC y sangre total	Tax	Quantitect multiplex NoROX kit	25 ul	5 ul	No	50 ciclos x 55°C	NR	2.5 mM	MT-4 (7.0 copias por genoma)	1 copiar/rxn	10 copias/rxn	In silico	NR	Pruebas serológicas
10	Waters y cols. (30)	Cuantitativo - carga proviral	Sangre total	Pol	Quantitect Multiplex PCR kit	25 ul	5 ul	No	36 ciclos x 60°C	1.0 U/rxn	1.5 mM	ADN plasmídico (1 copia proviral)	1 -10 copias/ul.	10 copias/rxn	VIH y genotipos de HTLV-1	CV<5.0%	Pruebas serológicas y condición clínica (HAM/TSP, AC)

* Prueba de referencia qPCR-IMTAVH.

NR: No reportado.

NA: No aplica.

4.3. ANÁLISIS DE COSTOS.

En el ámbito de laboratorios clínicos privados, la prueba de ELISA tiene un costo promedio de 25.5 dólares por ensayo, mientras que la prueba de Western Blot tiene un costo promedio de 63 dólares^(1,2). De acuerdo ello, el descarte de un caso negativo según el esquema de diagnóstico clásico requiere dos pruebas de ELISA no reactivo con un costo total de 51 dólares, mientras que un caso positivo incluye además una prueba de INNO-LIA o Western blot positiva con un costo total de 114 dólares. Estos costos son inaccesibles para gran parte de la población que padece infección por HTLV-1, dado que mayormente pertenecen a sectores social y económicamente desfavorecidos.

Por su parte, la PCR validada exige adicionales procedimientos (preparación de geles, electroforesis y revelado) y equipamiento (fuentes de poder, cámaras de electroforesis, fotodocumentador de imágenes). No obstante, la interpretación de resultados es sencilla, cuenta con mayor oportunidad de optimización y puede ser realizada en diversos formatos de procesamiento. En el IMTAvH, el costo subvencionado de la PCR validada es de 16 dólares por muestra, lo cual representa el 21% del costo del qPCR-IMTAvH (70 dólares) y el 14% de las pruebas de Western blot ofrecidas por laboratorios privados (63 dólares). Asimismo, la prueba de PCR validada representa hasta un 18% del costo de la prueba de PCR diagnóstica ofrecida por laboratorios privados (87 dólares) (figura 26).

La PCR validada tiene un tiempo de procesamiento de aproximadamente 6 horas por ensayo (considerando el aislamiento de PBMCs y ADN) mientras que la qPCR-IMTAvH toma 5 horas. Asimismo, la PCR validada incluye hasta 44 muestras por duplicado (figura 27) en comparación las 16 muestras de la qPCR-IMTAvH por placa de reacción (figura 28). El IMTAvH cuenta con ambientes especializados y disponibilidad de equipos de PCR convencional pero sólo un único equipo de PCR en tiempo real. Por ello, el uso rutinario de una PCR es factible y se ajusta al propósito de confirmar casos reactivos por ELISA dada la ausencia de las pruebas serológicas confirmatorias, siendo la prueba de qPCR-IMTAvH exclusivos para casos especiales.

¹ Laboratorio de análisis clínico Multilab. Relación de exámenes de laboratorio 2017. [Internet]. Disponible en: <http://www.multilab.com.pe/examenes>.

² Laboratorio de análisis clínico ROE. Listado maestro de análisis 2017. [Internet]. Disponible en: https://www.labroe.com/roe/roe_analisis_home.aspx.

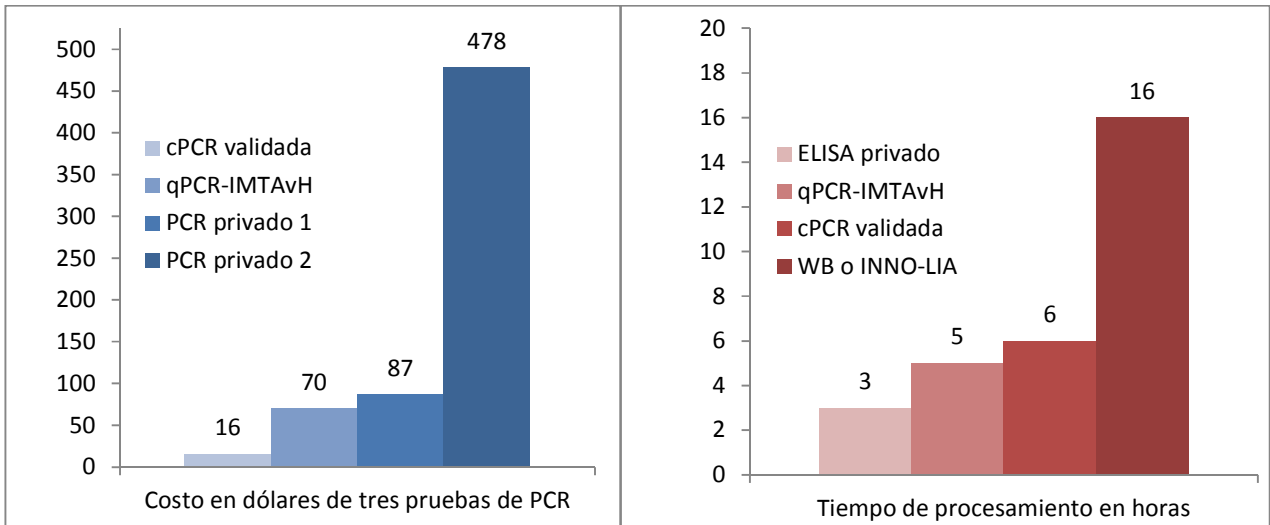


Figura 26. Relación de costos y tiempo de procesamiento para las pruebas de tamizaje y confirmatorias para HTLV-1. PCR privado: Prueba ofrecida por laboratorios clínicos privados, qPCR-IMTA vH: qPCR para carga proviral desarrollado en el IMTA vH, PCR validada: PCR convencional validada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	Mt05	Mt05	Mt13	Mt13	Mt21	Mt21	Mt29	Mt29	Mt37	Mt37
B	CP	CP	Mt06	Mt06	Mt14	Mt14	Mt22	Mt22	Mt30	Mt30	Mt38	Mt38
C	CN	CN	Mt07	Mt07	Mt15	Mt15	Mt23	Mt23	Mt31	Mt31	Mt39	Mt39
D	CR	CR	Mt08	Mt08	Mt16	Mt16	Mt24	Mt24	Mt32	Mt32	Mt40	Mt40
E	Mt01	Mt01	Mt09	Mt09	Mt17	Mt17	Mt25	Mt25	Mt33	Mt33	Mt41	Mt41
F	Mt02	Mt02	Mt10	Mt10	Mt18	Mt18	Mt26	Mt26	Mt34	Mt34	Mt42	Mt42
G	Mt03	Mt03	Mt11	Mt11	Mt19	Mt19	Mt27	Mt27	Mt35	Mt35	Mt43	Mt43
H	Mt04	Mt04	Mt12	Mt12	Mt20	Mt20	Mt28	Mt28	Mt36	Mt36	Mt44	Mt44

Figura 27. Formato de procesamiento de una placa de 96 pozos para la determinación cualitativa de HTLV-1 por la prueba de PCR. CP: Control positivo, CN: Control negativo, CR: Control endógeno de reacción, Mt: Muestra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St Tax 1	St Tax 1	Mt01	Mt01	Mt09	Mt09	St Erv 1	St Erv 1	Mt01	Mt01	Mt09	Mt09
B	St Tax 2	St Tax 2	Mt02	Mt02	Mt10	Mt10	St Erv 2	St Erv 2	Mt02	Mt02	Mt10	Mt10
C	St Tax 3	St Tax 3	Mt03	Mt03	Mt11	Mt11	St Erv 3	St Erv 3	Mt03	Mt03	Mt11	Mt11
D	St Tax 4	St Tax 4	Mt04	Mt04	Mt12	Mt12	St Erv 4	St Erv 4	Mt04	Mt04	Mt12	Mt12
E	St Tax 5	St Tax 5	Mt05	Mt05	Mt13	Mt13	St Erv 5	St Erv 5	Mt05	Mt05	Mt13	Mt13
F	Blanco	Blanco	Mt06	Mt06	Mt14	Mt14	Blanco	Blanco	Mt06	Mt06	Mt14	Mt14
G	CP	CP	Mt07	Mt07	Mt15	Mt15	CP	CP	Mt07	Mt07	Mt15	Mt15
H	CN	CN	Mt08	Mt08	Mt16	Mt16	Mt08	Mt08	Mt16	Mt16

Figura 28. Formato de procesamiento de una placa de 96 pozos para la determinación de carga proviral en el equipo Light Cycler 450, Roche, por la prueba de qPCR-IMTA vH. St: Estándar, CP: Control positivo, CN: Control negativo, Mt: Muestra.

A pesar de sus ventajas, la revisión de publicaciones no mostró pruebas de PCR en tiempo real de tipo cualitativas. Por el contrario, existe la tendencia de desarrollar qPCR para carga proviral de múltiples agentes como HTLV-1, HTLV-2 y HTLV-3, mediante la adición desmedida de cebadores y sondas tipo Taqman o Beacon. Sin embargo, ello incrementa aún más el costo y afecta significativamente la eficiencia de la prueba, siendo evidenciado en los ensayos de límite de detección y precisión (30, 40, 47).

Algunas publicaciones sugieren reemplazar las pruebas confirmatorias de Western blot e INNO-LIA por pruebas de PCR (31), mientras que otros sugieren utilizar las pruebas de PCR únicamente para casos con resultado indeterminado o no tipificarle por estas por las pruebas confirmatorias serológicas (30). No obstante, ello debe ser confirmado mediante estudios de costo efectividad. En nuestro caso, la PCR está únicamente dirigida a detectar el provirus de HTLV-1, por lo que su uso en reemplazo las pruebas serológicas confirmatorias no permitiría detectar al HTLV-2, quedando el esquema de diagnóstico incompleto.

4.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las principales limitaciones del estudio recaen en el proceso de optimización de la prueba. Estos ensayos fueron realizados con ADN de la línea celular MT-2 (2.0 copias por genoma) la cual fue utilizada en una cantidad de 40 ng y 60 ng por reacción. Considerando un peso de 6.7 pg por genoma diploide del MT-2, el número de copias adicionado por reacción de PCR fue de aproximadamente 11 940 copias. Ello resulta excesivo para un ensayo de optimización basado en seleccionar la variante con mayor intensidad de fluorescencia del producto final de PCR.

Por otro lado, la PCR utilizó controles positivos, negativos y eventualmente bancos de reacción conteniendo agua de PCR. Sin embargo, algunas imágenes de geles de agarosa no muestran estos elementos. Ello generalmente se debe a que la imagen corresponde a una parte del gel, estando compartido con otras reacciones en las cuales se adjuntaron estos controles. Tampoco se utilizó un control endógeno de reacción debido a que no fue

programado, así como el procesamiento por duplicado de las muestras biológicas procesadas en el ensayo de veracidad.

Nuestro estudio utilizó como prueba de referencia la qPCR-IMTA_vH debido a su disponibilidad y similitud metodológica con la PCR. No obstante, dado que el propósito de la prueba de PCR es ser confirmatoria, se deben hacer estudios de veracidad con las pruebas serológicas confirmatorias de referencia como Western blot o INNO-LIA. Además se debe incluir muestras provenientes de individuos con manifestaciones clínicas del HTLV-1 en todas sus formas. Para ello, dado que la prueba de PCR detecta únicamente al HTLV-1, es necesario su adaptación o implementación de una nueva para complementar el esquema de diagnóstico para HTLV-2.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Desarrollamos un ensayo de estandarización y validación de una PCR para la detección del provirus de HTLV-1 en muestras de ADN de PBMCs, con un límite de detección de 4 copias por reacción y una precisión aceptable. A diferencia de otros estudios, esta prueba fue realizada siguiendo recomendaciones de validación de la CLSI, y tiene el propósito de complementar el esquema de diagnóstico confirmatorio del HTLV-1. Gracias a nuestra capacidad instalada, la prueba de PCR es realizada de manera rápida, segura, confiable y es aplicable a diversos formatos de procesamiento como placas, tiras de ocho pozos o tubos individuales de reacción.

Sin embargo, dado que nuestra PCR no detecta el HTLV-2, recomendamos implementar una nueva prueba de PCR exclusiva para HTLV-2 o modificar la nuestra para hacerla de tipo dúplex para HTLV-1 y HTLV-2. Esto último implicaría reevaluar los parámetros de validación obtenidos, especialmente el límite de detección, ya que la incorporación de cebadores pudiera afectar significativamente la eficiencia de la prueba (40). Para ambos casos, se debería evaluar si la prueba puede ser estandarizada en un formato de PCR en tiempo real cualitativo, con capacidad de formatos de al menos 8 pozos, uso de master mix no comercial e incorporar controles a diversos niveles de positividad.

Adicionalmente, se recomienda que los ensayos de optimización para esta nueva prueba, utilicen materiales de referencia a concentraciones cercanas al límite de detección (4 copias por reacción) frente a variantes de temperatura, concentración de MgCl₂, Taq polimerasa y ADN foráneo. Creemos conveniente que su proceso de implementación siga las siguientes fases: (i) estandarizar, (ii) validar, (iii) optimizar y (iv) revalidar y no (i) estandarizar, (ii) optimizar y (iii) validar como fue presentado aquí. Este proceso de cuatro fases, brinda un esquema de trabajo coherente a fin de para aumentar el desempeño de la prueba como por ejemplo disminuir el límite de detección, incrementar la precisión, evaluar el efecto matriz, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rosadas C, Cabral-Castro MJ, Vicente AC, Peralta JM, Puccioni-Sohler M. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of virological methods*. 2013;193(2):536-41.
2. Naderi M, Paryan M, Azadmanesh K, Rafatpanah H, Rezvan H, Mirab Samiee S. Design and development of a quantitative real time PCR assay for monitoring of HTLV-1 provirus in whole blood. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;53(4):302-7.
3. Martins ML, Andrade RG, Nédír BH, Barbosa-Stancioli EF. Human T-Lymphotropic Viruses (HTLV), *Blood Transfusion in Clinical Practice*. 2012.
4. Murphy EL. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2016;23(1):13-9.
5. Castro GM, Balangero MC, Maturano E, Mangeaud A, Gallego SV. Development and validation of a real-time PCR assay for a novel HTLV-1 tax sequence detection and proviral load quantitation. *Journal of virological methods*. 2013;189(2):383-7.
6. Brasil. MdSd. Guía de manejo clínico del HTLV. . Brasilia: Secretaría de Vigilancia de Salud de Brasil. Programa Nacional de ITS y Sida. , 2003.
7. Li HC, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B, et al. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(7):1275-8.
8. Lezin A, Olindo S, Oliere S, Varrin-Doyer M, Marlin R, Cabre P, et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: a new criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(11):1830-4.
9. Pancake BA, Zucker-Franklin D, Coutavas EE. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(2):547-54.
10. Waters A, Oliveira AL, Coughlan S, de Venecia C, Schor D, Leite AC, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;52(1):38-44.
11. Ishihara K, Inokuchi N, Tsushima Y, Tsuruda K, Morinaga Y, Hasegawa H, et al. Relevance of molecular tests for HTLV-1 infection as confirmatory tests after the first sero-screening. *Journal of immunoassay & immunochemistry*. 2014;35(1):74-82.
12. Moens B, Lopez G, Adai V, Gonzalez E, Kerremans L, Clark D, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(11):3682-91.
13. Gotuzzo Herencia E, González Lagos E, Verdonck Bosteels K, Mayer Arispe E, Ita Nagy F, Clark Leza D. Veinte años de investigación sobre HTLV-1 y sus

- complicaciones médicas en el Perú: Perspectivas generales. *Acta Médica Peruana*. 2010;27:196-203.
14. Villaverde JA, Romani FR, Torres SM, Zunt JR. TRANSMISIÓN VERTICAL DE HTLV-1 EN EL PERÚ. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. 2011;28(1):101-8.
 15. Clark LW. EP12-A. User protocol for evaluation of qualitative test performance. Approved guideline. Second Edition ed: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 16. Burd EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(3):550-76.
 17. Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*. 2005;24(39):5926-30.
 18. Kannian P, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses*. 2010;2(9):2037-77.
 19. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(4):270-80.
 20. Pique C, Jones K. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3(378).
 21. Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogawa T, Matsuoka M, Matsumoto T, et al. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 8):1806-11.
 22. Marriott SJ, Lemoine FJ, Jeang KT. Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells. *Journal of biomedical science*. 2002;9(4):292-8.
 23. Azran I, Jeang KT, Aboud M. High levels of cytoplasmic HTLV-1 Tax mutant proteins retain a Tax-NF-kappaB-CBP ternary complex in the cytoplasm. *Oncogene*. 2005;24(28):4521-30.
 24. Bangham CRM, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15023.
 25. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388.
 26. Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet Infectious diseases*. 2007;7(4):266-81.
 27. Yamano Y, Sato T. Clinical Pathophysiology of Human T-Lymphotropic Virus-Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:389.
 28. Yasunaga J, Matsuoka M. [HTLV-I and leukemogenesis]. *Uirusu*. 2006;56(2):241-9.
 29. Alarcón JO, Friedman HB, Montano SM, Zunt JR, Holmes KK, Quinnan GV. High Endemicity of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 Among Pregnant Women in Peru. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2006;42(5):604-9.
 30. Blas MM, Alva IE, Garcia PJ, Carcamo C, Montano SM, Munante R, et al. Association between human papillomavirus and human T-lymphotropic virus in indigenous women from the Peruvian Amazon. *PloS one*. 2012;7(8):e44240.

31. Ita F, Mayer EF, Verdonck K, Gonzalez E, Clark D, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus type 1 infection is frequent in rural communities of the southern Andes of Peru. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;19:46-52.
32. Verdonck K, Gonzalez E, Maldonado F, Agapito D, Van Dooren S, Vandamme AM, et al. Comparison of three ELISAs for the routine diagnosis of human T-lymphotropic virus infection in a high-prevalence setting in Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(4):420-2.
33. Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G, Bosman F, et al. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998;5(1):45-9.
34. Moreno C, Balangero M, Barbas MG, Cudola A, Gallego S. [Serological diagnosis of HTLV-1/2: combination of screening assays to define the serological status in blood donors]. *Revista Argentina de microbiologia*. 2013;45(3):165-8.
35. Thorstensson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusion*. 2002;42(6):780-91.
36. Yao K, Hisada M, Maloney E, Yamano Y, Hanchard B, Wilks R, et al. Human T lymphotropic virus types I and II western blot seroindeterminate status and its association with exposure to prototype HTLV-I. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(3):427-37.
37. Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Saez-Alquezar A. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(5):1324-8.
38. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2000;95(4):1386-92.
39. Ohshima K, Kikuchi M, Masuda Y, Kobari S, Sumiyoshi Y, Eguchi F, et al. Defective provirus form of human T-cell leukemia virus type I in adult T-cell leukemia/lymphoma: clinicopathological features. *Cancer research*. 1991;51(17):4639-42.
40. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood*. 1996;88(8):3065-73.
41. Manca N, Perandin F, De Simone N, Giannini F, Bonifati D, Angelini C. Detection of HTLV-I tax-rex and pol gene sequences of thymus gland in a large group of patients with myasthenia gravis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;29(3):300-6.
42. Tholen DW. EP17-A. Protocols for determination for limits of detection and limits of quantitation. Approved guideline. First edition ed: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.
43. Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation, and quantification of human T-cell leukemia virus types 1, 2, and 3. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(4):1129-35.
44. Altamirano NA, Rocco C, Aulicino P, Sen L, Mangano A. Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. *Journal of virological methods*. 2010;170(1-2):160-4.

45. Tateno M, Kondo N, Itoh T, Chubachi T, Togashi T, Yoshiki T. Rat lymphoid cell lines with human T cell leukemia virus production. I. Biological and serological characterization. *The Journal of experimental medicine*. 1984;159(4):1105-16.
46. Adai V, Verdonck K, Best I, Gonzalez E, Tipismana M, Arevalo J, et al. SYBR Green-based quantitation of human T-lymphotropic virus type 1 proviral load in Peruvian patients with neurological disease and asymptomatic carriers: influence of clinical status, sex, and familial relatedness. *Journal of neurovirology*. 2006;12(6):456-65.
47. Nagai M, Brennan MB, Sakai JA, Mora CA, Jacobson S. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood*. 2001;98(6):1858-61.
48. Yuan CC, Miley W, Waters D. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. *Journal of virological methods*. 2001;91(2):109-17.
49. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(12):1276-88.
50. OIE. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. OIE Terrestrial Manual. Six Edition ed. Paris, France 2008. p. 46 - 55.
51. Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2004;31(4):275-82.
52. Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sen L, Medeot S. Usefulness of a Nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(4):377-80.
53. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(6):1897-900.

ANEXOS

a) Instrumentos.

Ensayo N°1. Cálculo del material de referencia interno N°1 (MRi -1).						
N° de copias de Tax por reacción de PCR requerido		copias de Tax en 15 uL de master mix	Volumen agregado de ADN al tubo de PCR	Volumen de master mix	Stock del plásmido a preparar	
Item	Copias / reacción	Conc. final de reacción (copias/uL)	vol. Inicial (uL)	vol. Final (uL)	Conc. Inicial (copias/uL)	MRi
1	10.0	0.667	5	15	2.00	MRi 2.0
2	5.00	0.333	5	15	1.00	MRi 1.0
3	3.00	0.200	5	15	0.60	MRi 0.6
4	1.00	0.067	5	15	0.20	MRi 0.2
5	0.50	0.033	5	15	0.10	MRi 0.1
6	0.25	0.017	5	15	0.05	MRi 0.05

Ensayo N°2. Preparación del material de referencia interno N°1 (MRi-1) de 2, 1, 0.6, 0.1 y 0.05 copias/uL a partir del STOCK de 200 copias/uL								
MRi	Copias / reacción	copias/ uL	Factor de dilución de las diluciones adyacentes	Volumen final a preparar (uL)	Volumen inicial de plásmido (uL)	H2O de PCR (uL)	Volumen restante (uL)	N° de réplicas a utilizar
MRi 200	1000.0	200.0						
MRi 2.0	10.0	2.00	100	450	4.5	445.5	250.00	90
MRi 1.0	5.0	1.00	2.00	400	200.0	200.0	220.00	80
MRi 0.6	3.0	0.60	1.67	300	180.0	120.0	200.00	60
MRi 0.2	1.0	0.20	3.00	300	100.0	200.0	200.00	60
MRi 0.1	0.5	0.10	2.00	200	100.0	100.0	100.00	40
MRi 0.05	0.3	0.05	2.00	200	100.0	100.0	200.00	40
Total:						1165.5	1170.00	-

Ensayo N°3. Límite de detección. Cálculo de la cantidad de ADN foráneo	
C.I. muestra negativa (ng/uL)	165
C.F. por reacción de PCR (ng/uL)	12
Volumen final (uL)	1165.5
Volumen inicial (uL)	84.8
Volumen de H2O de PCR (uL)	1080.7

Ensayo N°4. Preparación del MRi-1 de 2.0, 1.0, 0.6, 0.2 y 0.1 copias/uL.						
MRi-1 (copias/uL)	copias/reacción	Factor de dilución	Volumen final (uL)	Volumen inicial (uL)	H2O de PCR* (uL)	Volumen restante (uL)
200.0	1000.0					
2.00	10.0	100	450	4.5	445.5	250

1.00	5.0	2.00	400	200.0	200.0	220
0.60	3.0	1.67	300	180.0	120.0	200
0.20	1.0	3.00	300	100.0	200.0	200
0.10	0.5	2.00	200	100.0	100.0	100
0.05	0.3	2.00	200	100.0	100.0	200

* Conteniendo ADN foráneo.

Ensayo N°5. Preparación del MRi-1 de 0.6 y 0.4 copias/uL.						
MRi-1 (copias/uL)	copias/reacción	Factor de dilución	Volumen final (uL)	Volumen inicial (uL)	H2O de PCR* (uL)	Volumen restante (uL)
200.0	1000.0					
2.00	10.0	100	450	4.5	445.5	250.00
1.00	5.0	2.00	400	200.0	200.0	220.00
0.60	3.0	1.67	300	180.0	120.0	233.33
0.40	2.0	1.50	100	66.7	33.3	100.00

* Conteniendo ADN foráneo.

Ensayo N°6. Preparación del MRi-1 de 0.8 d copias/uL.						
MRi-1 (copias/uL)	copias/reacción	Factor de dilución	Volumen final (uL)	Volumen inicial (uL)	H2O de PCR* (uL)	Volumen restante (uL)
200.0	1000.0					
2.00	10.0	100	450	4.5	445.5	350.00
1.00	5.0	2.00	200	100.0	100.0	144.00
0.80	4.0	1.25	70	56.0	14.0	70.00

* Conteniendo ADN foráneo.

Ensayo N°7. Preparación del MRi-1 de 0.8 copias/uL.						
MRi-1 (copias/uL)	copias/reacción	Factor de dilución	Volumen final (uL)	Volumen inicial (uL)	H2O de PCR* (uL)	Volumen restante (uL)
200.0	1000.0					
2.00	10.0	100	450	4.5	445.5	380.00
1.00	5.0	2.00	140	70.0	70.0	76.00
0.80	4.0	1.25	80	64.0	16.0	80.00

* Conteniendo ADN foráneo.

b) Aprobación del comité de ética.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología (DUICT)

CONSTANCIA 256 - 10- 17

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Validación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa convencional para la detección del virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 (HTLV-1) en células mononucleares de sangre periférica".

Código de inscripción : 100668

Investigador principal : Inolopú Cucche, Jorge Luis

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 26 de abril del 2017.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador esta exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **26 de abril del 2022**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, **27 de abril del 2017**.


Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación



/gso

Av. Honorio Delgado 430
Lima 31
P.O. Box 4314 Lima 100

T. (51 1) 319-0000 A. 2271 / 2542
E. duict@oficinas-upch.pe

www.upch.edu.pe/vrinve/duict