



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA



**AMPLIFICACION DE UNA REGION DEL GEN NS5 DEL VIRUS
FIEBRE AMARILLA MEDIANTE LA TECNICA DE TRANSCRIPCION
INVERSA ACOPLADA LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA.**

Autora: Ruiz Perez Ysmar B.

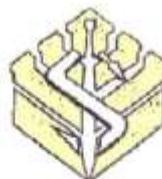
Tutora Científica: Dra. Flor Herrera

Tutora Metodológica: Milena Mazzarii

Maracay, octubre de 2009



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Trabajo de Investigación titulado: **“Amplificación de una región del gen NS5 del virus de fiebre amarilla mediante RT-PCR”** presentado por la bachiller Ruiz Ismar, con el fin de aprobar la Asignatura Trabajo de Investigación; después de la exposición y discusión pública del citado trabajo, consideramos que las misma reúne los requisitos para **APROBARLO** como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta, el día treinta del mes de Octubre del año dos mil nueve, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como coordinador (a) del jurado, la Tutora Metodológica Prof. (a) Milena Mazzarri.

Prof. Flor Herrera
C.I.: 632 632
Tutora Científica

Prof. Elizabeth Ferrer
C.I.: 7/01850
Jurado Evaluador

Prof. Milena Mazzarri
C.I.: 3845302
Coordinador del Jurado





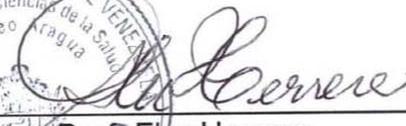
**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CUENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



Maracay, Octubre de 2009.

APROBACION DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor Científico de trabajo titulado: Amplificación de una región del gen NS5 del Virus Fiebre Amarilla mediante la técnica de Transcripción Inversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa el cual es presentado por la bachiller: Ruiz Ysmar C.I.: 18.490.544 para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado designado.


Prof. Flor Herrera
C.I.: 632632
Tutora Científica

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
Facultad de Ciencias de la Salud
Núcleo Aragua
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Escuela de Bioanálisis

DEDICATORIA:

A mi sobrino Jeremy Johan,

quien es la luz de mis ojos,

la ilusión pura, mi alegría

y mi felicidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, el poder haber culminado este trabajo de Investigación a muchas personas quienes siempre estuvieron a mi lado ayudándome y apoyándome con sus consejos y compañía.

En primer lugar, a Dios por darme la oportunidad de estar en el sitio correcto y en el momento indicado y por nunca abandonarme

A mi madre quien con sus consejos me supo guiar, por el camino del bien y de quien siempre estaré orgullosa como mi mejor ejemplo de dedicación y perseverancia en la vida, a mis hermanos por ser los pilares en donde siempre encontré sostén.

A mis amigos y amigas de diferentes partes y diferentes ambientes, gracias por preguntar, por ayudar, y por comprender mi falta de tiempo para compartir.

A mi tutora la Dra. Flor Herrera por brindarme sus consejos y conocimientos en la realización de este trabajo, por ayudarme incondicionalmente y estar pendiente de todo.

A todos los que de una manera u otra estuvieron en mi vida, y ya no lo están, pero de seguro estarán felices de ver que este sueño es ya una realidad.

A todos, muchas gracias

Ysmar Ruiz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología (FONACIT) Proyecto de Grupo G-20000041-4, además del otorgamiento de una beca estudio por esta misma institución.

Así mismo consto con diversas instalaciones para la realización de los experimentos, en primer lugar, el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (Sede Aragua) Biomed – UC, Laboratorio de Biología Molecular bajo la dirección de la Dra. Flor Herrera, la Lic. Johanny Ruiz y el Técnico de laboratorio José Rivero.

El Centro de Microbiología y Biología de Virus y el Insectario “Octavio Suarez”, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), con el apoyo del Dr. Ferdinando Liprandi, la Dra. Zoraida Fernández, Lic. Lourdes Acuña y demás miembros del laboratorio.

El Centro de Investigaciones de la Universidad de los Andes, Núcleo Trujillo, bajo la dirección de la Dra. Elma Rojas.

INDICE

| | |
|--------------------------------------|------|
| Contenido | Pg |
| Veredicto..... | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Agradecimientos..... | iv |
| Agradecimientos Institucionales..... | v |
| Índice General..... | vi |
| Resumen..... | viii |
| Abstract..... | ix |
| 1.-Introduccion..... | 1 |
| 1.1.- Objetivos..... | 10 |
| 2.- Materiales y Métodos..... | 11 |
| 3.- Resultados..... | 17 |
| 4.- Discusión..... | 23 |
| 5.- Conclusiones..... | 26 |
| 6.- Recomendaciones..... | 27 |
| 7.- Referencias Bibliográficas..... | 28 |



UNIVERSIDAD DE CARABOBO



ESCUELA DE BIOANÁLISIS

SEDE ARAGUA

AMPLIFICACION DE UNA REGION DEL GEN NS5 DEL VIRUS FIEBRE AMARILLA MEDIANTE LA TECNICA DE TRANSCRIPCION INVERSA ACOPLADA LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Autora: Ruiz Ysmar.

Tutora Científica: Dra. Flor Herrera

Tutora Metodológica: Milena Mazzarii

Maracay, octubre de 2009

RESÚMEN

La fiebre amarilla es una enfermedad viral aguda infecciosa perteneciente al grupo de las fiebres hemorrágicas, causada por un *flavivirus* de la familia Flaviviridae y se ha mantenido como un problema importante de salud pública en las áreas selváticas donde se trasmite entre los monos a través de la picadura de mosquitos del género *Haemagogus* y *Aedes africanus* y también en las áreas urbanas por *Aedes aegypti*. En este trabajo se planteó el diseño y estandarización de la RT-PCR para la amplificación de una región del gen NS5 del virus fiebre amarilla, en virtud de aportar una técnica molecular rápida y sencilla que permita la detección temprana del virus y como diagnóstico alternativo de la infección por fiebre amarilla. Para establecer las condiciones necesarias, se extrajo el ARN viral de cultivos celulares de células Vero que fue sometido a reacción de RT y posteriormente PCR, para lo cual se diseñó un par de cebadores NS5FV 8658(+) y NS5FV 9160(-); lográndose optimizar el ensayo con las siguientes condiciones: 0,8 mM MgSO₄, 0,06 pmol de cebadores, 12 ng/μl de ARN y temperatura de hibridación de 61°C. En geles de agarosa se observaron bandas únicas de amplificación del tamaño esperado (503 pb). Este método molecular demostró sensibilidad y especificidad para la detección del virus de la fiebre amarilla, esto lo convierte en un complemento esencial para una vigilancia epidemiológica y entomológica.

Palabras clave: RT-PCR, Gen NS5, Virus Fiebre Amarilla



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA



**AMPLIFICATION OF A REGION OF THE YELLOW FEVER VIRUS NS5
GENE THROUGH THE REVERSE TRANSCRIPTION TECHNIQUE
COUPLED THE POLYMERASE CHAIN REACTION.**

Autora: Ruiz Ysmar.

Tutora Científica: Dra. Flor Herrera

Tutora Metodológica: Milena Mazzarii

October 2009

ABSTRACT

Yellow fever is an acute infectious viral disease belonging to the group of hemorrhagic fevers, caused by a *flavivirus* of the Flaviviridae family and has remained an important public health problem in jungle areas where it is transmitted among monkeys through the mosquito bites of the genus *Haemagogus* and *Aedes africanus* and also in urban areas by *Aedes aegypti*. In this work, the design and standardization of RT-PCR for the amplification of a region of the NS5 gene of the yellow fever virus was proposed, by virtue of providing a fast and simple molecular technique that allows the early detection of the virus and as an alternative diagnosis of yellow fever infection. To establish the necessary conditions, the viral RNA was extracted from Vero cell cultures, which was subjected to a RT reaction and subsequently PCR, for which a pair of primers NS5FV 8658 (+) and NS5FV 9160 (-) was designed; achieving optimization of the assay with the following conditions: 0.8 mM MgSO₄, 0.06 pmol of primers, 12 ng / μl of RNA and hybridization temperature of 610C. Single amplification bands of the expected size (503 bp) were observed on agarose gels. This molecular method demonstrated sensitivity and specificity for the detection of the yellow fever virus, this makes it an essential complement for epidemiological and entomological surveillance.

Keywords: RT-PCR, Gen NS5, Yellow Fever Virus.

INTRODUCCION

La fiebre amarilla es una enfermedad viral aguda infecciosa perteneciente al grupo de las fiebres hemorrágicas, caracterizada por presentar cuadros de gravedad variable, desde infección asintomática, sepsis de viremia, fiebre, postración, daño hepático, renal y miocárdico, hemorragia, ictericia y hasta la muerte (Carrera y cols., 2003; OPS, 2004). Las razones por las cuales hay variación en las manifestaciones clínicas podrían depender de la constitución genética del paciente u otros factores como la edad, el estado nutricional, el sexo, el genotipo, entre otros (Diamond, 2003). En cuanto a su patogenia los cambios patológicos son más pronunciados en el hígado y en los pulmones, donde el daño hepatocelular se caracteriza por una distribución central en parches, con escasas células alrededor de la vena portal y de la triada portal, las células necróticas sufren coagulación con la formación de los característicos cuerpos de Coicilman, eosinófilos que pueden corresponder a las células apoptóticas (Prada y Castellanos, 2006).

La infección de la Fiebre Amarilla es mantenida en dos ciclos de transmisión, un ciclo selvático que tiene como huésped del virus a primates y la presencia de un insecto vector para la transmisión, el hombre infectado aparece de forma accidental cuando este invade áreas de riesgo selvático sin la debida protección. En el ciclo urbano, el virus es transmitido desde un humano infectado a uno susceptible a través de la picadura de especies domésticas de mosquitos, considerándose esta, como una enfermedad metaxénica antropofílica y zoofílica (Figura1). Ambos ciclos tienen en común la etiología, fisiopatología, inmunología y manifestación clínica, diferenciándose sólo en la localización geográfica de aparición, especie vectorial y tipo de hospedador (Muñoz y cols., 2004). Según Salvatela (1996), *Aedes*

aegypti es una especie que está ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, considerándose uno de los vectores domésticos más importantes en la transmisión urbana del virus de la fiebre amarilla, el mosquito es infectante durante toda su vida y el virus se transmite transováricamente a su descendencia. Los transmisores selváticos como los vectores del género *Haemagogus spp* principalmente, *Africanus jantinomys*, *Sabethes*, entre otros, también transmiten el virus transováricamente, viven en las copas de los árboles, en donde perpetúan el ciclo selvático entre los primates que tienen este hábitat (Salvatella, 1996; Méndez, 2007). Es importante mencionar que el Virus de la Fiebre Amarilla es altamente transmisible donde coexisten numerosas personas susceptibles y abundan los mosquitos vectores y este no se transmite por contacto directo, ni a través de objetos contaminados (Philip, 1992; Salvatella, 1996; Mendel, 2002; Heyman, 2005).



Figura 1. Ciclo de transmisión de la Fiebre Amarilla. Fuente: Méndez Nava. 2007

En la actualidad, las infecciones transmitidas por *flavivirus* son enfermedades transmisibles con una gran incidencia en el mundo, causando gran morbilidad y mortalidad. Particularmente, se reportan anualmente más de 5000 casos de fiebre amarilla en países tropicales del África (principalmente Nigeria, Camerún, Liberia, Gabón, Senegal, y Kenia) y más de 300 en países subtropicales de Suramérica (Brasil, Bolivia, Perú y Venezuela). Sin embargo, se estima que la verdadera incidencia es de 10 – 50 veces mayor que la registrada en los reportes oficiales (Prada y Castellanos, 2006). La mayoría de los brotes en Sudamérica ocurren entre personas que trabajan en las selvas tropicales lluviosas, los trabajos de talador, colono, aserrador, minero, explorador agrícola y de petróleo, constituyen factores de riesgo para adquirir la enfermedad. Como estas actividades las realizan primordialmente los hombres, la fiebre amarilla selvática predomina en ellos entre los 15-45 años de edad y se considera en América una enfermedad ocupacional. Otras personas en riesgo son los cultivadores de coca, los grupos alzados en armas, los soldados que penetran a zonas selváticas, los desplazados o las que migran a zonas selváticas (MSDS, 2003; Navarro y cols., 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 1987- 1991 hubo un registro anual de 200.000 casos con una letalidad global de 24%, siendo la gran mayoría proveniente de África. En Suramérica, entre 1985-1994 se confirmaron en promedio 150 enfermos anuales. Para el año de 1995 se reportaron 10 casos en soldados ecuatorianos y cerca de 500 casos en campesinos peruanos, con una letalidad del 38%. Entre 1998 y 2000 se confirmaron 192 casos de fiebre amarilla selvática en Brasil, de los cuales se obtuvo 46% de letalidad.

En Venezuela, existen tres focos naturales de la enfermedad, los cuales son: el foco de la Selva de San Camilo en el Edo. Apure, aparentemente, sin actividad desde 1973, no obstante, en diciembre de 1995, el sistema de vigilancia epidemiológica notificó la muerte de un paciente procedente de Saravena, Colombia. El foco de Guayana que tras un periodo silente desde 1980, presentó un brote en la región de Parima del Edo. Amazonas en 1998 y un caso en la región de Canaima en el Edo. Bolívar en 1999 (MSDS, 2003). El foco del Sur del Lago de Maracaibo, que se mantenía sin actividad desde 1980, sin embargo, en el año 2002, en la población de Casigua el Cubo, municipio Jesús Maria Semprúm del Edo. Zulia, se presentó una epizootia en monos araguatos con elevada mortalidad. Para enero de este año se reportaron epizootias, donde localizaron monos araguatos muertos en el estado Guárico, en los municipios Roscio Ortiz, Monagas, Guaribe y Chaguaramos; cuya región colindo con Piritu en el estado Aragua encontrándose 6 monos muertos (MPPS,2009)

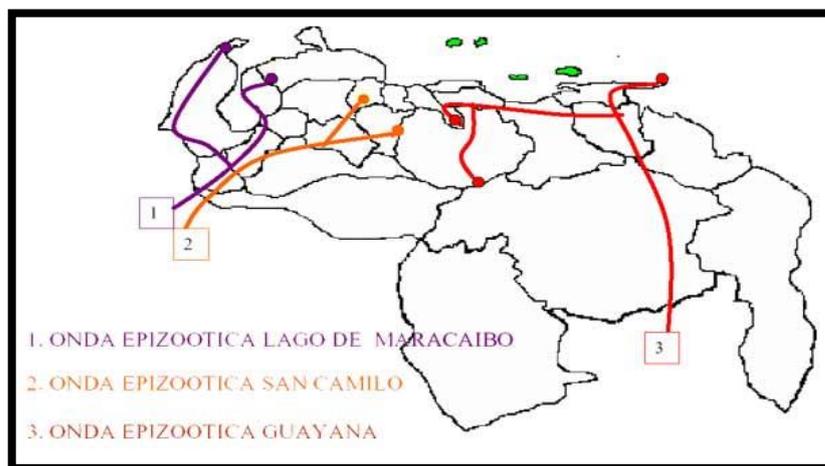


Figura 2. Focos Epizoóticos de la Fiebre Amarilla. Fuente: MSDS, 2004

Según informes de la OPS (2004), fueron reportados 226 casos de fiebre amarilla selvática (FAS), con 99 muertes en la región Andina. Dos brotes importantes uno en Brasil y uno en la frontera colombo-venezolana. En Brasil apareció en Minas Gerais (58 casos), Mato Grosso (4 casos) y Gurupá, Pará (1 caso) teniendo una mortalidad total de 36%. En la zona frontera colombo-venezolana, específicamente al Norte de Santander (Colombia) se reportaron un total de 101 de casos (44% de mortalidad) y para nuestro país 39 casos (41% de mortalidad) proveniente de los estados Zulia, Táchira y Portuguesa.

Para el año 2004 cifras manejadas por el Ministerio de Salud reportaron 10 casos de fiebre amarilla en todo el país, de los cuales, cinco provenían de Portuguesa, tres de Mérida (hacia la región andina) uno en Bolívar y uno en Apure (MSDS, 2004). Los últimos casos de Fiebre Amarilla selvática que se presentaron en Venezuela ocurrieron en 2005, 57 personas fueron víctima de la enfermedad en los estados Mérida, Apure, Portuguesa y Bolívar cuya tasa de incidencia fue 2,14 por 100.000 habitantes (MPPS,2009)

La vigilancia epidemiológica de la fiebre amarilla tiene por objeto la detección precoz de la circulación del virus para la adopción oportuna de medidas adecuadas de control orientadas a prevenir nuevos casos, impedir la progresión de brotes y no permitir la reurbanización de la enfermedad (OPS, 2005). La vigilancia epidemiológica de la circulación viral de la fiebre amarilla debe intensificarse tanto en las áreas enzoóticas como en las no enzoóticas. Los principales mecanismos empleados en la vigilancia de la fiebre amarilla son:

- Vigilancia de los casos clínicos compatibles con la forma clásica de la enfermedad, según las definiciones de casos de la OMS.

- Puesta en práctica de la vigilancia de los síndromes febriles ictericos.
- Vigilancia de epizootias (aparición de la enfermedad y muerte de monos en áreas selváticas).
- Alta cobertura de inmunización (vacunación masiva), como medida de prevención a la aparición de nuevos casos.
- Monitoreo y control de la densidad y distribución del vector en zonas urbanas.

El virus de la Fiebre Amarilla pertenece a la familia *flaviviridae*, que es una gran familia de patógenos virales compuesta de tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* (Mukhopadhyay y cols., 2005). Dentro del género *Flavivirus* (del lat. *flavus*: «amarillo») se encuentran los virus responsables de enfermedades febriles como es el caso del dengue, encefalitis japonesa, encefalitis por virus oeste del nilo (West Nile), encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla, entre otras (Burke y Monath, 2001).

El virus de la fiebre amarilla posee un serotipo único del cual se han distinguido cinco genotipos (tres en el África y dos en Suramérica); pertenece al género *Flavivirus*, su genoma está constituido por una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y de polaridad positiva de aproximadamente 11 Kilo-bases (Kb), que codifica diez proteínas, de las cuales, tres cumplen funciones estructurales como son la proteína de la nucleocapside (C), la proteína asociada a la membrana (prM) donde la formación de M (proteína de la membrana) a partir de prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la

estructura de la superficie viral y la proteína de la envoltura (E) que junto a la proteína prM en forma de prM-E constituye un complejo que contiene los determinantes antigénicos responsables de la neutralización del virus, está también involucrado en la unión de los viriones a los receptores celulares y, probablemente, juega un papel importante en la fusión intraendosomal. Por otro lado, presenta siete proteínas no estructurales (NS), conocidas como: NS1, NS2A, NS2B, cuyas funciones no están definidas, NS3 que se caracteriza por ser trifuncional ya que es una proteína que presenta actividad de nucleotidasa, helicasa y serina proteasa. Estas características enzimáticas permiten sugerir que NS3 es un componente importante durante los eventos de síntesis en la replicación del ARN viral, NS4A, NS4B, cuyas funciones no están aclaradas y NS5 la cual tiene una secuencia altamente conservada entre los *flavivirus* presentando actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (Acosta y Gómez, 2005).

En la actualidad, la serología es el procedimiento más utilizado en el diagnóstico de laboratorio de la fiebre amarilla. La detección de IgM por el método ELISA es actualmente la técnica más utilizada y difundida, por presentar alta sensibilidad, especificidad, y simplicidad. Además, con una sola muestra obtenida después del séptimo día de la enfermedad es posible establecer el diagnóstico. Se utilizan también otras técnicas serológicas, tales como la inhibición de la hemaglutinación y las pruebas de neutralización. Estas pruebas se basan en la conversión serológica, por lo tanto, se necesitan dos muestras de suero, de fase aguda y de convalecencia, para la conclusión del diagnóstico. Otras técnicas como la inmunohistoquímica consisten en la demostración del antígeno vírico en tejido principalmente hepático, el aislamiento del microorganismo y la detección de ARN vírico en la sangre, es posible cuando la muestra se obtiene en la fase aguda, durante el período de viremia, es decir, entre el

primero y el quinto día después del inicio de los síntomas. El aislamiento se realiza por la inoculación intracerebral en ratones lactantes, en cultivos de células o por la inoculación intratorácica en mosquitos. (Acosta y Gómez, 2005; Muñoz y cols., 2004).

El desarrollo de las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es claramente uno de los principales avances técnicos en el diagnóstico de las enfermedades virales. La técnica **PCR** consiste en efectuar una replicación repetitiva *in vitro* de una secuencia específica de ADN. Al amplificar o copiar varias veces una misma secuencia específica de ADN, aumenta proporcionalmente la sensibilidad de la misma, a tal nivel que, si el producto amplificado se analiza en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio, la secuencia amplificada o producto de PCR se detecta visualmente al iluminar el gel con luz ultravioleta. (Panduro, 2000; Mathew, 1999; Monod y François 1996). Mediante esta técnica el ARN viral de la Fiebre Amarilla es detectado en casi un 90%, es una técnica de diagnóstico muy útil debido a su sensibilidad, especificidad y rápida detección requiriendo cantidades mínimas de material genético. Con esta técnica se evidencia una infección, aunque el individuo se encuentre en ventana inmunológica, lo que permite disminuir la transmisión de la enfermedad (Acosta y Gómez, 2005).

La Transcripción Reversa y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), se muestra como un método molecular de gran especificidad y sensibilidad para la detección rápida de regiones del genoma viral. Razón por la cual, en el presente trabajo se plantea diseñar esta herramienta molecular para amplificar una región del gen NS5 del virus de la Fiebre Amarilla. De tal manera que pueda ser utilizada para reforzar el sistema de vigilancia entomológico y

epidemiológico de esta enfermedad, aplicando la misma en el monitoreo de epizootias y detección rápida de la circulación viral.

En este sentido Figueiredo y cols, (1998) mediante un estudio realizado en Brasil, orientado hacia la identificación de *flavivirus* brasileños por el método RT-PCR (Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa) emplearon cebadores basados en la secuencia del virus de la fiebre amarilla localizado en la región de la proteína no estructural NS5 altamente conservada, con la posterior aplicación de RT-PCR. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que los cebadores universales pueden ser usados para una exacta identificación de los *flavivirus* de la región y la secuencia de los cebadores de la región NS5 es útil para la identificación específica del virus fiebre amarilla.

Desde este punto de vista, Méndez y cols. (2007), se plantearon detectar el virus de la fiebre amarilla en muestras de tejido hepático de primates no humanos, mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con cebadores específicos, para ello se procesaron muestras de tejido hepático de cinco monos del género *Alouatta spp.* Los cuales fueron encontrados muertos en territorio selvático. Las muestras fueron tratadas con una solución de lisis para aislar el ARN viral que, posteriormente, fue utilizado en una RT-PCR, lo cual arrojó como resultado productos de amplificación del tamaño esperado, (424 pb) en cuatro de las muestras analizadas; estas muestras presentaron, además, una reacción inmunohistoquímica positiva, lo que confirma la presencia del virus.

1. Objetivos de la Investigación

1.1 Objetivo General

Diseñar una técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para la amplificación de una región del gen NS5 del virus de la Fiebre Amarilla en cultivos celulares de células Vero.

1.2 Objetivos Específicos

- Diseñar el cebador específico para amplificar un producto de 500 pb, correspondiente a una región del gen NS5 del virus Fiebre Amarilla, siguiendo, inicialmente, un programa de amplificación para regiones génicas de otros *flavivirus*.
- Determinar las concentraciones de algunos de los componentes de RT-PCR: Magnesio, Cebadores y ARN; para la amplificación de un producto de 500 pb, correspondiente a una región del gen NS5 del virus Fiebre Amarilla.
- Determinar la especificidad de la técnica de RT-PCR frente a otros *flavivirus* como el virus dengue y virus de la Fiebre del Oeste del Nilo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, equipos y reactivos.

- Muestra de sobrenadante de cultivo celular de virus Fiebre Amarilla en células vero, donado por el Instituto Nacional de Higiene en Caracas (INH)
- Kit de extracción de ARN desarrollado y estandarizado por el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC).
- Kit Access RT-PCR Systems de los laboratorios Promega.
- ARNsin 5U/ul.
- Marcador de Peso Molecular (PM) 1000 pB de los laboratorios Promega.
- Cebadores oligonucleótidos:
- Agua calidad PCR alta pureza libre de nucleasas (nano pure) de laboratorio Promega.
- Buffer TBE 1 X de corrida (Tris, Borato, EDTA 0.5 x pH 8.2)
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Buffer TAE (Tris ácido acético EDTA p H 8.5) (Sigma)
- Buffer loading o de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) (Sigma).
- Agarosa LE (Promega)
- Tubos eppendorf libre de nucleasas y estériles de 1.5 ml, 0.5 ml y 0.2 ml.
- Pipetas automáticas graduables de 1000 ul, 200ul, 20ul, 10ul y 2.5ul.
- Puntas desechables libre de nucleasas con y sin filtro antiaerosol estériles.
- Gradillas para tubos eppendorf.
- Bandeja con hielo

- Papel parafilm.
- Guantes desechables.
- Metanol
- Termociclador modelo PT- 100 MJ Research, Inc.
- Equipo Speed Vac DNA.
- Microcentrifuga refrigerada.
- Refrigerador de -20C y -80C.
- Cámara de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Equipo transluminador de luz ultravioleta y de registro fotográfico Gel Doc 2000 BIORAD.
- Cámara de flujo laminar.

2.2 METODOS

2.2.1 Obtención del sobrenadante del cultivo celular del Virus Fiebre Amarilla en células Vero.

De acuerdo a la información suministrada por el Instituto Nacional de Higiene, se tomaron como positivas aquellas diluciones donde la intensidad de la fluorescencia, fue intensa y se presentó alrededor del todo el campo visual de la monocapa de células una distribución uniforme del color verde brillante. Una vez realizada las lecturas por triplicado, y en conversión de unidades se obtuvo un título viral del sobrenadante del cultivo de Virus Fiebre Amarilla 1×10^8 PUF/ml.

2.2.2 Extracción del ARN total

Para los experimentos de extracción del ARN viral, se utilizó el método de extracción con Tiocianato de guanidina, fenol cloroformo y precipitación con etanol (Sambrook y cols., 1989), con algunas modificaciones (Urdaneta y cols., 2005).

Procedimiento:

En un tubo eppendorf de 1.5ml previamente rotulado, se colocó 300 ul de solución desnaturante (citrate de sodio 26 Mm, p H: 4.0, N-lauryl sarcosina al 0.5%, B- mercapto etanol 0.125 Mm, tiocinato de guanidina 4M) y 200 ul de sobrenadante de cultivo de virus Fiebre Amarilla; se mezcló por inversión y luego mediante vortex por 10-20 seg. (mantenido en bandeja con hielo), posteriormente se añadieron 30 ul de acetato de sodio 2M, (p H: 4,0) mezclando nuevamente, luego se agregó 300 ul de fenol cloroformo alcohol isoamilico (125:24:1 p H: 4.7), mezclando nuevamente por inversión y después mediante vortex 10-20 seg y fue colocado en el congelador a -20C durante 15 minutos. Al finalizar este tiempo se centrifugo la muestra a 14.000 rpm en centrifuga refrigerada a -4 C durante 20 min. Seguidamente se extrajo la fase acuosa (aproximadamente 400 ul) y se trasvaso a otro tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía 400 ul de isopropanol. Fue agitado suavemente por inversión y se colocó a -20 C durante toda la noche para la precipitación del ARN total. Después fue centrifugado a 14000 rpm, a -4 C durante 20 min. nuevamente, para sedimentar el ARN. Una vez obtenido, se lavó el sedimento con etanol al 75% (500 ul) centrifugando durante 10 min. a 14000 rpm y el pellet de ARN, fue secado al vacío durante 10 min.

Posteriormente, las muestras de ARN total fueron rehidratadas con 20 ul de agua libre de nucleasas, agregando también 0.5 ul de ARN sin (5 U/ ul), para proteger las muestras de ARN de las proteasas que puedan haber quedado durante el proceso de extracción, finalmente se almaceno a -70 C hasta su uso.

2.2.3 Cuantificación del ARN extraído

La concentración del ARN extraído se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm y 280nm. Por otra parte, la determinación de la pureza del ARN se obtuvo mediante la relación 260/280.

2.2.4 Diseño de la técnica de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La técnica principal para el desarrollo de este trabajo, fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR en inglés, Polymerasa Chain Reaction), esta fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente (disponible en: <http://es.wikipedia.org>).

La técnica se desarrolla en tres pasos. En el primero ocurre la desnaturalización de las dos cadenas que forman la molécula de ADN

que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas. Cada una de estas cadenas actuara como molde para fabricar su complementaria. A continuación, se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a la región específica que se desea amplificar dentro de la cadena de ADN, esto se conoce como hibridación. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa, el cual se repite muchas veces, obteniéndose un aumento en el número de copias del fragmento en estudio, lo que se conoce como amplificación (disponible en: <http://es.wikipedia.org>).

Existen variantes de esta técnica, una de ellas es la RT-PCR, en la cual actúa primero la enzima Reverso Transcriptasa (RT) haciendo transcripción reversa de la cadena de ARN (en este caso el ARN del virus fiebre amarilla) a una molécula de ADN copia, para que esta pueda ser amplificada posteriormente por la ADN polimerasa.

Para la optimización o estandarización de la técnica de RT-PCR se procedió a realizar variaciones en las concentraciones de los diferentes componentes del sistema. Se realizó una curva de concentración del cebador oligonucleótido (primers), una curva de concentración de ARN viral y una curva de concentración de sulfato de magnesio (MgSO₄) para el cebador oligonucleótido, observando en cada caso la concentración que presento la mejor banda y que represento la mejor amplificación (con el fin de poner a punto la técnica y lograr la amplificación de una región NS5 del genoma viral). La mezcla de reactivos para realizar las curvas de estandarización del sistema RT-PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 ul. Se emplearon controles negativos (Sobrenadantes de cultivo celular sin virus fiebre amarilla), controles positivos (sobrenadante de cultivo con virus fiebre

amarilla) para la detección de posibles contaminantes en el proceso y controles de RT-PCR (mezcla de reactivos de RT-PCR sin muestra) para saber si el sistema funciono bien.

Para obtener la secuencia de los cebadores para amplificar la región deseada, se empleó el programa informático oligo explorer versión 1.2. La secuencia de partida de la región NS5 del genoma viral para la elaboración del cebador se obtuvo de la base de datos GenBank (disponible: www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para comenzar a trabajar y realizar el RT-PCR de la curva de concentración del cebador oligonucleótido, se utilizó como referencia las mismas cantidades de reactivos del sistema RT-PCR para amplificar virus Dengue de acuerdo a Lanciotti y cols., (1992).

2.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

Una vez obtenidos los ADNc amplificados, se monitorio el producto de RT-PCR en geles de agarosa al 2% corrido en una cámara de electroforesis horizontal y teñido con bromuro de etidio, visualizadas posteriormente en un Trasn luminador de luz UV; de manera de verificar las bandas de los fragmentos de ADN. Mediante la electroforesis se determinó el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos de ADN expresados en pares de base (pb) de las muestras procesadas, tomando como referencia un marcador de tamaño con PM conocido. La banda obtenida en el RT-PCR fue de 503 pb para Virus Fiebre Amarilla.

RESULTADOS

3.1 Diseño del cebador oligonucleótido.

En el diseño del cebador oligonucleótido para la amplificación de una región del gen NS5, se consideraron ciertas características de acuerdo a las condiciones de un buen cebador, **de** este modo se tomó en cuenta el tamaño del cebador de aproximadamente 23 oligonucleótidos, la temperatura de fusión (T_m) que estuviera comprendida entre 55 °C y 65 °C y un porcentaje guanina citocina de 40 y 45%.

Tabla 1. Cebador que se utilizó para copiar y amplificar secuencias del gen NS5 por RT-PCR.

| Nombre del Cebador y Sentido Genético | Secuencia Nucleotídica (5'→ 3') | Región del Genoma | Fragmento Obtenido (pb) |
|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------------|
| NS5FV 8658(+) | GAATGGCAATGACTGACACAAC | NS5 | 503 |
| NS5FV 9160(-) | CACTCCTCCTCCTGAGTTBTTCC | | |

B= A/G/C.

3.2 Estandarización de las condiciones de reacción de la RT-PCR para la detección del Virus Fiebre Amarilla.

Se realizaron ensayos de amplificación (RT-PCR) con el oligonucleótido específico para una región del gen NS5 de 503 pb a diferentes concentraciones de $MgSO_4$, desde 0.2 mM hasta 1 mM, observándose que la mejor banda se obtuvo a la concentración de 0.8mM. (Figura 3).

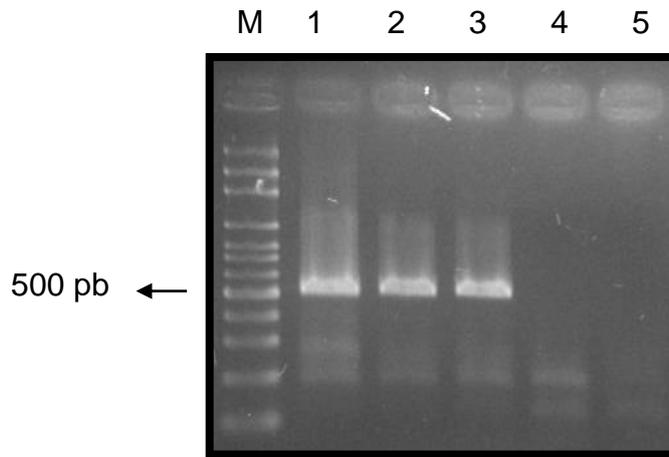


Figura 3: Amplificación del gen NS5 de Virus Fiebre Amarilla en función de la concentración de MgSO₄. M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), carriles 1-5 con diferentes concentraciones de MgSO₄, carril 1 con 1 mM, carril 2 con 0.8 mM, carril 3 con 0.6 mM, carril 4 con 0.4 mM y carril 5 con 0.2 mM.

Para encontrar la concentración óptima a la que trabajan los cebadores, se realizaron curvas en un rango de concentración que oscilo desde 0.06 pmol hasta 0.2 pmol, observándose que la banda de mejor grosor en el gel fue a la concentración de 0.06 pmol. (Figura 4)

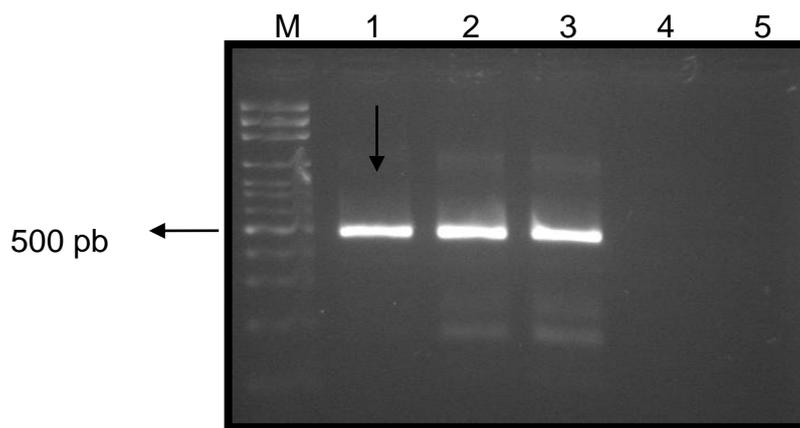


Figura 4: Diferentes concentraciones de cebador oligonucleótido. M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), carril 1 con 0.06 pmol, carril 2 con 0.08 pmol, carril 3 con 0.12 pmol, carril 4 y 5 control de reactivos.

Así mismo para establecer la concentración ideal de ARN viral se ensayó un rango de concentraciones desde 6 ng/ml hasta 30 ng/ml y se observó que la mejor concentración fue de 12 ng/ml. (Figura 5).

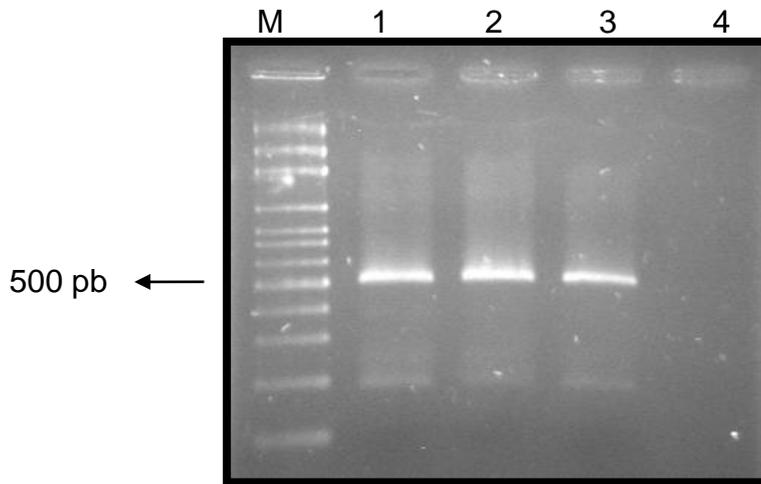


Figura 5: Amplificación del gen NS5 de Virus Fiebre Amarilla en función de la concentración de ARN viral. M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), carriles 1-5 con diferentes concentraciones de ARN viral, carril 1 con 6ng/ul, carril 2 con 12 ng/ul, carril 3 con 18 ng/ul, carril 4 control de reactivos.

Se realizaron ensayos de amplificación para establecer la temperatura de hibridación óptima en la cual se unen los cebadores, manteniendo la concentración de $MgSO_4$ a 0.8 mM. (Figura 6).

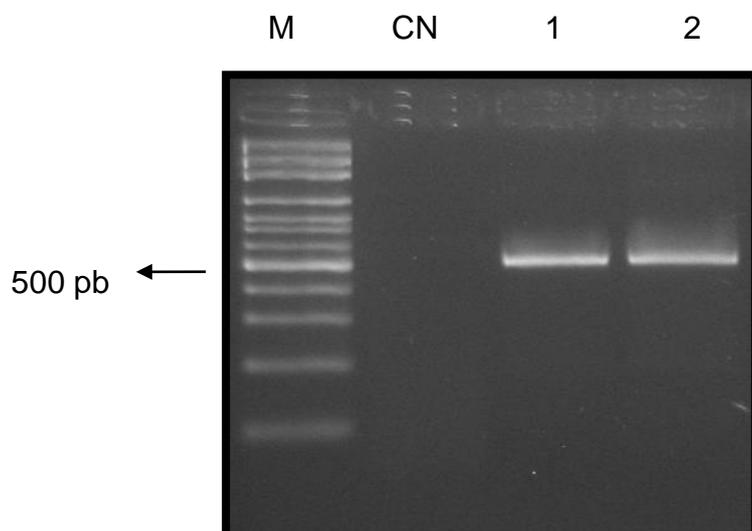


Figura 6: Determinación de la temperatura óptima de unión para los cebadores.

M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), carril control negativo, carril 1 con 59 °C, carril 2 con 61 °C.

La temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos fue de 61°C (Figura 6). Los ciclos de temperatura para la amplificación óptima fueron:

Trasncrpcion Reversa:

45 °C por 45 min.

Amplificación por PCR:

94 °C por 15 min.

| | | | |
|-------------------|------------------|---|-----------|
| Desnaturalización | 94 °C por 30 seg | } | 40 ciclos |
| Hibridación | 61 °C por 1 min. | | |
| Extension | 72 °C por 2 min. | | |

Extensión final: 72 °C por 10 min.

Durante toda la noche 4 °C

El producto de la RT-PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% a 75 V por 35 minutos en buffer TAE 1X, para monitorear el producto obtenido, posteriormente los geles fueron incubados en una solución de 5ug/ml de bromuro de etidio por 15 minutos y visualizados en una cámara de luz ultravioleta, de modo de verificar las bandas de los fragmentos de ADNc y evaluar su pureza.

Se utilizó el Kit Acces RT-PCR System de los laboratorios promega. La mezcla de reactivos de la RT-PCR se señala en la Tabla 2, que fue diseñada para un volumen final de 25 ul.

Tabla 2. Componentes estandarizados para realizar la RT- PCR.

| Reactivos | 1X (ul) |
|------------------------------------|----------------|
| Agua libre de nucleasas | 12.45 |
| Buffer AMV/Tfl (5 X) | 5 |
| MgSO ₄ (10 m M) | 2 |
| DNTPS (10 m M) | 0.5 |
| ADN Polimerasa (Taq. Tfl) (5 U/ul) | 0.5 |
| Transcriptasa Reversa (TR) (5U/ul) | 0.5 |
| NS5FV 8658(+) | 1.5 |
| NS5FV 9160(-) | 1.5 |
| Muestra de ARN | 1 |
| Inhibidor de ARNasas (5 U/ul) | 0.05 |

Como se observó, la técnica RT-PCR utilizó los cebadores específicos previamente reportados para la amplificación solo de Virus Fiebre Amarilla, no teniendo amplificación cruzada con otros *flavivirus* ensayados

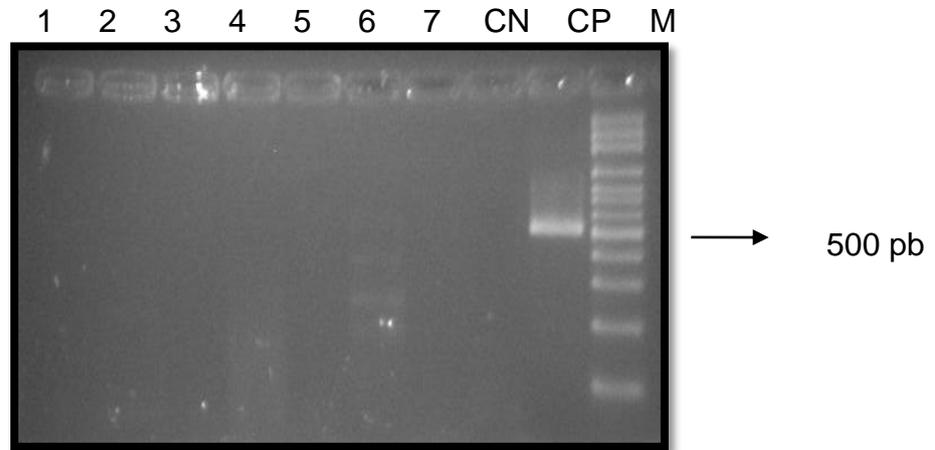


Figura 7: Especificidad del sistema RT-PCR. M: marcador de tamaño molecular (100 pb, Promega), carril CP: control positivo, carril CN: control negativo, carril 1 con VON P10S, carril 2 con VON P12G, carril 3 con VON P124, carril 4 con Dengue 1, carril 5 con Dengue 2, carril 6 con Dengue 3 y carril 7 con Dengue 4.

DISCUSION

En el presente estudio, mediante el diseño, estandarización y la aplicación de la RT-PCR, se logró detectar el virus de la Fiebre Amarilla en sobrenadantes de cultivo del virus, amplificando una banda de 503 pb muy evidente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. A continuación, se discutirán, cada uno de los resultados más relevantes obtenidos en esta investigación.

Uno de los aspectos que influye directamente sobre las condiciones de reacción, es la concentración de magnesio utilizada. Se obtuvo para la amplificación de la región NS5 del genoma del virus, una concentración de 0,8 mM de sulfato de magnesio en la amplificación de 502 pb para 5 unidades de Taq polimerasa y 10mM de dNTPS. Esto difiere de otros reportes en donde las diferencias encontradas pueden explicarse por enzimas de diferente origen y distintas concentraciones de dNTPS utilizadas (Figuereido y cols. 1998, Scaramozzino y cols. 2001, Sambrook y cols., 1989).

Otro aspecto importante es que se demostró que la sensibilidad de la técnica es alta, lográndose una buena detección con 150 ng de ARN, siendo el óptimo con 300 ng. En comparación con otros datos de la literatura, nuestra técnica permite detectar la señal hasta con 3 (Mather y cols., 2008) y 5 veces menos (Méndez y cols., (2007).

Otro aspecto fundamental en el logro de alta sensibilidad, fue que los cebadores diseñados poseen una temperatura de fusión alta lo que resulta a su vez en una temperatura de hibridación alta (61°C), que incide directamente en una reducción considerable de las uniones inespecíficas de los cebadores.

Por otra parte, se demostró que la especificidad de la técnica es alta ya que se detectó claramente la secuencia específica del gen NS5 del Virus Fiebre Amarilla y no se observó reacción cruzada ni con ADNc de los cuatro serotipos del virus dengue (alta circulación en nuestro medio) ni con el Virus del Oeste Nilo (VON); ambos flavivirus genéticamente relacionados con la Fiebre Amarilla. Esto indica el gran potencial de la técnica para hacer una identificación acertada en muestras provenientes de zonas donde estos virus son endémicos.

Otro punto importante a destacar es que actualmente, para la confirmación de la presencia del virus de Fiebre amarilla hay que aislar el virus de células infectadas, lo que lleva un tiempo considerable. Para el caso de epizootias, esto significa hacer primero una cacería de monos enfermos y segundo, una toma y traslado de muestra del sitio al laboratorio en condiciones muy estrictas. Por ello, sólo en pocos casos se ha podido aislar el virus. Por el contrario, mediante la técnica de RT-PCR estandarizada en este trabajo, se puede detectar el ARN viral proveniente de cualquier fuente (humano, monos, mosquito) rápidamente. Además, se podría hacer en laboratorios regionales con personal entrenado y con dotación de equipos necesarios para tal fin, lo que simplificaría las medidas para toma y traslado de muestras.

Esto significa que el diseño y la aplicación de técnicas moleculares relativamente rápidas tales como la RT-PCR para la detección del Virus Fiebre Amarilla, se convierte en un complemento esencial para una vigilancia epidemiológica y entomológica eficiente.

Como estrategia de control, para evitar la reurbanización de la enfermedad, la vigilancia en zonas de alto riesgo debe incluir, no sólo la implementación de sitios centinela que permitan determinar la presencia de casos humanos, sino también un seguimiento de epizootias que representen riesgo de infección en áreas selváticas. Así, la detección precoz del virus de la fiebre amarilla mediante RT-PCR, en

tejidos provenientes de monos muertos, además de ser una clara evidencia de la actividad selvática viral, constituye un sistema de alerta temprana que indica la necesidad de intensificar medidas de control, como vacunación en las áreas cercanas, estudio de vectores tanto selváticos como urbanos y búsqueda activa de casos que puedan desencadenar un brote o epidemia.

CONCLUSIONES

- ❖ La extracción de ARN a partir de los cultivos celulares obtenidos en células Vero, fue satisfactoria obteniéndose una concentración de 12 ng/μl con una pureza de 1,95.
- ❖ Los componentes del sistema RT-PCR fueron optimizados, obteniéndose una concentración de MgSO₄ de 0,8 mM y una concentración de cebadores de 0,06 pmol.
- ❖ La temperatura óptima de hibridación fue de 61⁰C.
- ❖ La técnica molecular diseñada para la detección y amplificación del virus de la fiebre amarilla fue específica y sensible, no presentando inconvenientes de contaminación, ni falsos positivos.

RECOMENDACIONES

- ❖ Evaluar la sensibilidad del sistema en muestras de tejido de monos infectados y, si es posible, en suero humano.
- ❖ Implementar la RT- PCR para vigilancia en zonas de alto riesgo, para detección temprana o seguimiento de epizootias que representen riesgo de infección en área selvática.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C. y Gomez, I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Medigraphif artemisa en línea*, 16 (29), 113 – 137.
- Binder, A. (1997). Determination of melting temperatures. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.uni-graz.at/binder.html> . [Consulta: Septiembre 12, 200].
- Burke, D. y Monath, T. (2001). *Flaviviruses*. (2^{da} ed.). U.S.A: Fields virology.
- Carrera, A., Garrido, P., Castillo, O. (2003). *Vacuna antiamarilica: vacunas preventivas, principios y aplicaciones*. (2^{da} Ed.). Barcelona: meroson.
- Deubel, V., Laile, M., Hynot, J. y Chungue, E. (1990). Identificación de dengue and fever yellow sequences by genomics amplification. *Journal of Virology*, 30(2), 41-54
- Diamond, M. (2003). Evasion of innate and adaptative Inmunity by flavivirus. *Inmunology and cell biology*, 81(24), 196 – 206.
- Figueiredo, L., Batista, W., Kashima, S. y Nassar, E. (1998). Identification of brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription – polymerase chain reaction method using *flavivirus* universal primers. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 59 (3), 357-362.
- Gen Bank: www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Heyman, D. (2005). *El control de las enfermedades transmisibles*. (18^{va} ed.). México: Publicación Científica y Técnica.
- Kuno, G., Chang, G., Tsuchinya, K., Karabatsos. N., Croop. C. (1998). Filogenia del género *Flavivirus*. *Journal of Virology*, 72 (1), 73-83.
- Lanciotti, R., Calisher, CH., Gubler, D., Chang, G. y Vorndam, V. (1992). Rapid detection and typin of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 545-551.
- Mathew, C. (1999). *Bioquímica*. (2^{da} ed.). España: Mac Graw Hill.

- Mather, S., y Forrester N. (2008). Universal primers that amplify subgroups. *Virology Journal*, 5(16), 186-190.
- Mendel, G., Bennett, J. y Dolin, R. (2002). *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica*. (5^{ta} Ed.). España: Medica Panamericana.
- Méndez, J., Parra, E. y Rey, M. (2007). Proteínas virales y caracterización de *flavivirus*. *Revista Biomédica*, 27(3), 5-6.
- Monod, J. y François, J. (1996). *Biología Molecular*. (10^{ma} ed.). México: Ciencia y desarrollo.
- MSDS. (2003). Fiebre amarilla en Venezuela [Documento en línea]. Disponible: <http://www.revibel.org.com/38>. [Consulta: Agosto 12, 2008].
- MSDS. (2004). *Manual de vigilancia epidemiológica de síndromes febril icterico agudo y febril hemorrágico agudo*. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.ministeriosalud.org/vge>. [Consulta: abril 15, 2008].
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. y Rossmann, M. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Microbiology*, 3 (8), 13 – 22.
- Muñoz, E., Morón, C., Kemper, R., Moran, R. (2004). Inmunohistoquímica en el diagnóstico de fiebre amarilla. *Revista Biomedica*, 65 (3), 194-198.
- Navarro, F., Heras, C., Bergonzoli, G., Castellano, L., Castellanos, P., Campos, J. (2004). *Vigilancia Epidemiológica*. (1^{ra} ed.). España: Mac Graw- Hill Interamericana.
- OPS. (2004). Variabilidad genética del Virus Fiebre Amarilla: genes de la Fiebre Amarilla [Revista en línea], 16. Disponible: <http://actualidad.terra.ecisociedad/articulo/intensifica-camparafa-2167064.htm>. [Consulta: julio 20, 2008].
- Panduro, A. (2000). *Biología Molecular en la Clínica*. (2^{da} ed.). México: Mc Graw Hill- Interamericana.
- Pierre, V., Drouet, M. y Deubel, V. (1994). Identificación de mosquitos-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcripción polimerasa chain reaction. *Journal Virology*, 145 (4) 93-104.
- Philip, C. (1992). Transmisión de yellow fever virus by *Aedes aegypti* and comments on some other mosquito virus relationships. *The*

american Society of Tropical Medicine and Hygiene, 11(5), 697-701.

Prada, J. y Castellanos, J. (2006). Genes de susceptibilidad/ resistencia a flavivirus, implicaciones en la severidad de la infección. *Journal of Virologia*, 13 (6), 265-275.

Salvatella, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y su papel como vectores en las americas. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.reviberoammicol.com/1999-16/216220.pdf>. [Consulta: Septiembre 25, 2008].

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning Laboratory Manual*. (2 Ed.). U.S.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

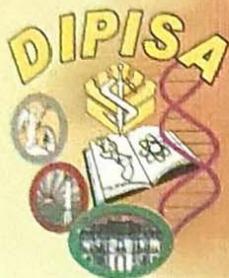
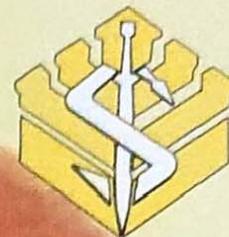
Scaramozzino, N., Crance, J., Jouan, A., DeBRIEL, D., Stoll, F. y Garin, D. (2001). Comparison of *flavivirus* universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription – PCR assay for detection of *flaviviruses* targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of clinical microbiology*, 39 (5), 1922-1927.

Wikipedia. <http://es.Wikipedia.org>

Zhou, Y., Ray, D., Dong, H., Ren, S., Li, Z., y LI, Z. (2007) Structure and Funtion of flavivirus NS5 methyltrasnferase. *Journal of Virlogy*, 8 (81), 3891-3903.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE SALUD
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y PRODUCCIÓN INTELECTUAL
SEDE ARAGUA
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA PROYECTO Y TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



XI JORNADAS DE INVESTIGACIÓN EN PREGRADO
"Msc. María Milagros Cortéz"



*El Comité Científico de las
 XI Jornadas de Investigación en Pregrado de la
 Escuela de Bioanálisis Sede Aragua
 "Msc. María Milagros Cortéz"*

Confiere:

*Mención Honorífica
 en Tercera Clase*

Al trabajo de investigación titulado:

*Amplificación de una región del gen NS5 del virus fiebre
 amarilla mediante RT-PCR*

Autores:

Ismar Ruiz

Tutor Científico:

Prof(a). Flor Herrera

Maracay, 28 al 30 de Octubre de 2009

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
 UNIVERSIDAD DE CARABOBO
DECANATO
 Facultad de Ciencias de la Salud
 Decano: **Prof. José Corado**
 Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
 UNIVERSIDAD DE CARABOBO
 Facultad de Ciencias de la Salud
Prof(a). María Victoria Méndez
 Directora de la Escuela de Bioanálisis Sede Aragua

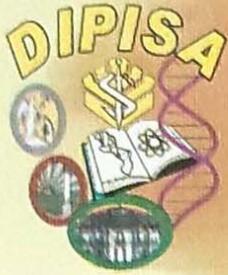
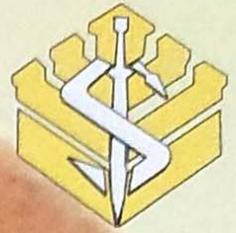
REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
 UNIVERSIDAD DE CARABOBO
 Sede Aragua
 Facultad de Ciencias de la Salud
Prof. Juan J. Luis León
 Director de Investigación y Producción Intelectual - Sede Aragua

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
 UNIVERSIDAD DE CARABOBO
 Sede Aragua
 Facultad de Ciencias de la Salud
Prof(a). Glenda Rojas
 Coordinadora de la Asignatura Trabajo de Investigación

"MÁXIMO EVENTO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA DE LA ESCUELA DE BIOANÁLISIS SEDE ARAGUA"



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
 FACULTAD DE CIENCIAS DE SALUD
 DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y PRODUCCIÓN INTELECTUAL
 SEDE ARAGUA
 ESCUELA DE BIOANÁLISIS
 DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
 ASIGNATURA PROYECTO Y TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



29 JORNADAS DE
 INVESTIGACIÓN
 EN PREGRADO
 "Msc. María Milagros Cortéz"



Otorgan el presente

Certificado

A la

Br. Ysmar Ruiz

Por su participación como Expositora
 del Trabajo de Investigación titulado

*Amplificación de una región del gen NS5
 del virus Fiebre Amarilla mediante
 la técnica de transcripción inversa
 acoplada a la reacción en cadena
 de la polimerasa*

Maracay, 28 al 30 de Octubre de 2009

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
 UNIVERSIDAD DE CARABOBO
DECANATO
 Prof. José Corrado
 Decano de la Facultad de
 Ciencias de la Salud

Prof(a) María Victoria Méndez
 Directora de la Escuela de
 Bioanálisis Sede Aragua

Prof. Juan J. Luis-León
 Director de Investigación
 y Producción Intelectual - Sede Aragua

Prof(a) Glenda Rojas
 Coordinadora de la Asignatura
 Trabajo de Investigación

"MÁXIMO EVENTO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA DE LA ESCUELA DE BIOANÁLISIS SEDE ARAGUA"