



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LOS AGENTES TORCH POR  
LA TECNICA DE PCR EN MUJERES DE ETAPA FERTIL DEL CANTON  
QUITO**

**AUTOR: CANDO DUMANCELA, CHRISTIAN GUILLERMO**

**DIRECTOR: Ph.D. JIMÉNEZ ARIAS, ANA PATRICIA**

**SANGOLQUÍ**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGIA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, "DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LOS AGENTES TORCH POR LA TÉCNICA DE PCR EN MUJERES DE ETAPA FÉRTIL DEL CANTÓN QUITO" fue realizado por el señor **Cando Dumancela, Christian Guillermo**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Julio 2018

Firma: .....

**Ph.D. JIMÉNEZ ARIAS, PATRICIA**

C. C. ....1713475364...



## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

### CARRERA DE BIOTECNOLOGIA

#### AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Cando Dumancela, Christian Guillermo**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LOS AGENTES TORCH POR LA TÉCNICA DE PCR EN MUJERES DE ETAPA FÉRTIL DEL CANTÓN QUITO** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, Julio 2018

Firma: .....

**Cando Dumancela, Christian Guillermo**

C. C. ....1712517729.....



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGIA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **Cando Dumancela, Christian Guillermo** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LOS AGENTES TORCH POR LA TÉCNICA DE PCR EN MUJERES DE ETAPA FÉRTIL DEL CANTÓN QUITO**: en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, Julio 2018

Firma: 

**Cando Dumancela, Christian Guillermo**

C. C. 1412517729

## DEDICATORIA

A mi Padre Infinito, por ser el motor de mi vida, quien lucha mis batallas y me levanta en mis caídas, su tiempo es perfecto y su amor no tiene fin.

A mi familia, por ser el motivo de mis alegrías y mi orgullo cada día, especialmente a mi madre por ser amorosamente ejemplar y valerosa.

A Stephanie, por ser mi inspiración cada día, por creer en mi y compartir el mismo amor por la ciencia y la investigación.

*De la noche, su magia,*

*del día, la emoción,*

*de la lluvia, su ritmo,*

*del prado, su color*

*de mi mundo..., de mi mundo solo Tu*

Gracias mis seres amados, por apoyarme en cada momento, soy un hombre bendecido pues todo cuanto me hizo falta lo obtuve gracias a Uds.

Christian Guillermo Cando Dumancela

## AGRADECIMIENTO

A mi madre por su ejemplo, dedicación, amor, pero sobre todo por su sacrificio que me permite alcanzar mis metas y recorrer nuevos caminos.

A mis hermanas Gabriela y Paola, con quienes he compartido momentos memorables, gracias siempre por su amor y apoyo, a mi hermano del alma Luis, por ser un ejemplo de lucha y sacrificio constante, gracias por tu apoyo.

A mis sobrinos, Benja, Dome y Leo, quienes me llenan de alegría y vuelven de colores mi mundo cada día, gracias por alegrar mi alma.

A mi papito Juan y mama Lolita, por todo su amor y cariño, también a mis tíos de quienes siempre recibí un gran consejo y ejemplo, a mis primos por tanta alegría.

A mi amada Stephanie, quien llena mi vida de magia inspirándome cada día, gracias por tu apoyo, en cada paso que doy siento tu amor incondicional.

A mis amigos con quienes compartimos el amor por la ciencia, Saul, Jasson, Flor, Leo, Dianita, Majito, gracias por su apoyo y las conversaciones enriquecedoras.

A mi familia extendida, Pato, Miry, Mayrita y Aharon, por su apoyo y cariño incondicional.

A la Universidad Central del Ecuador y las autoridades del Centro de Biomedicina quienes confiaron en mi para la realización de este proyecto y así despertaron en mí, el amor por la biomedicina, especialmente a Sandrita y Marcita.

A la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil y mis grandes amigos del Instituto de Biomedicina, quienes supieron ayudarme a explotar mis habilidades hasta llevarlos a otro nivel,

gracias siempre, por tanto, por haberme hecho sentir en casa, especialmente a Peter, Saul, Flor, Rita, Ceci, Mafer, Florencio.

A los amigos de toda la vida, Mauro, Willy, Juanjo, Mario, Elito, Marita, Rodri, Maggy, Marta, Nico, Juanka, Mauro Xavier. Gracias por siempre su apoyo, sus consejos y por brindarme alegría

A mi papa Galito, que desde el cielo me cuida, espero poder llenarte de orgullo, te recuerdo siempre con una sonrisa.

A mis queridos profesores y docentes, quienes con paciencia compartieron su conocimiento especialmente al Ing Vergara, Dr. Grijalva, Dra. Jiménez, Dra. Segovia, Msc Jadan, Almita, Pablo, Taty, Kari gracias porque lo que hago ahora me encanta por toda la pasión que Uds. pusieron al transmitirme ese conocimiento.

A mi Directora de Proyecto la Dra. Patricia Jiménez, por su gran soporte y predisposición para que este proyecto salga adelante y vea la luz después de una larga y compleja travesía.

A todos Uds. mi agradecimiento y mi compromiso para día a día dar lo mejor de mi como ser humano y como profesional.

Christian Guillermo Cando Dumancela

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN .....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema .....	1
1.2 Justificación del problema.....	7
1.3 Objetivos de la investigación .....	9
1.3.1 Objetivo general .....	9
1.3.2 Objetivos específicos.....	9
1.4 Marco Teórico .....	10
1.4.1 Síndrome de TORCH.....	10
1.4.2 Parásito <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
1.4.3 Herpesvirus.....	15
1.4.4 CITOMEGALOVIRUS (CMV).....	18
1.4.5 HERPES SIMPLEX (VIRUS HSV) .....	20
1.4.6 VARICELLA ZÓSTER (VIRUS VVZ) .....	22
1.4.7 EPSTEIN BARR (VIRUS EBV) .....	24
1.4.8 Genoma de los Herpesvirus.....	25
1.4.9 Diagnóstico molecular del TORCH .....	26
1.4.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR .....	28



1.4.11 Identificación de los agentes TORCH.....	35
1.5 Sistema de Hipótesis .....	36
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
2.1 Formulación del problema .....	37
2.2 Zona de estudio .....	38
2.2.1 Obtención de Muestras.....	38
2.2.2 Trabajo de Laboratorio.....	38
2.3 Periodo de Investigación .....	38
2.4 Protocolo general de Investigación .....	39
2.5 Criterio de Inclusión de Muestras .....	39
2.6 Criterio de Exclusión de Muestras .....	40
2.7 Procedimientos .....	40
2.7.1 Cálculo del tamaño de muestra .....	40
2.7.2 Selección de Voluntarias.....	40
2.7.3 Toma de muestras.....	41
2.7.4 Codificación de los voluntarios participantes .....	42
2.7.5 Conservación y transporte al laboratorio .....	42
2.7.6 Almacenamiento de las muestras .....	42
2.7.7 Ensayos preliminares de extracción de ADN por el método de Salting Out .....	43
2.7.8 Extracción de material genético .....	44
2.7.9 Amplificación de material genético de los agentes TORCH .....	48
2.7.10 Valores de la Amplificación.....	54
2.7.11 Criterios para el diagnóstico de las muestras .....	54
2.7.12 Identificación de los agentes TORCH.....	57
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
3.1 Conformación del grupo de estudio .....	60
3.2 Ensayos preliminares de extracción de ADN con el método de Salting-Out.....	60
3.2.1 Calidad de ADN obtenido a partir de sangre periférica .....	60
3.2.2 Cuantificación del material genético obtenido.....	61
3.3 Identificación Molecular de TORCH.....	63

3.3.1 Identificación molecular de Toxoplasma .....	63
3.3.2 Identificación molecular de Herpesvirus.....	65
3.4 Prevalencia de TORCH encontrada .....	67
3.4.1 Prevalencia de Toxoplasma.....	68
3.4.2 Prevalencia de Herpesvirus .....	69
3.5 Coinfecciones TORCH encontradas .....	75
3.6 Ausencia de TORCH en las muestras .....	78
CAPÍTULO 4: DISCUSION.....	79
4.1 Extracción de ADN .....	79
4.2 Prevalencia de TORCH.....	80
4.2.1Prevalencia de Toxoplasma.....	81
4.2.2 Prevalencia de Herpesvirus .....	82
4.3 Coinfecciones TORCH encontradas .....	88
4.4 Ausencia de TORCH en las muestras .....	90
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	92
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....	95
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA .....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Características de los Herpesvirus</i> .....	15
<b>Tabla 2</b> <i>Secuencias de primers para Toxoplasma en PCR</i> .....	48
<b>Tabla 3</b> <i>Secuencias de primers para Toxoplasma en Nest- PCR</i> .....	48
<b>Tabla 4</b> <i>Master Mix para 1 muestra en la PCR de Tg.</i> .....	49
<b>Tabla 5</b> <i>Master Mix para 1 muestra en la Nest - PCR de Tgi</i> .....	49
<b>Tabla 6</b> <i>Secuencias de primers para los Herpesvirus en PCR.</i> .....	51
<b>Tabla 7</b> <i>Secuencias de primers para Herpesvirus en Nest- PCR</i> .....	51
<b>Tabla 8</b> <i>Concentraciones de primers1 de Herpesvirus en la PCR</i> .....	52
<b>Tabla 9</b> <i>Concentraciones de primer2 de Herpesvirus en la PCR</i> .....	52
<b>Tabla 10</b> <i>Concentraciones de primers1 de los Herpesvirus en la Nest – PCR</i> .....	52
<b>Tabla 11</b> <i>Concentraciones de primers2 de los Herpesvirus e la Nest – PCR</i> .....	53
<b>Tabla 12</b> <i>Master Mix para 1 muestra empleada para la PCR de los Herpesvirus</i> .....	53
<b>Tabla 13</b> <i>Master Mix para 1 muestra empleada en la Nest - PCR de los Herpesvirus</i> .....	54
<b>Tabla 14</b> <i>Criterios para identificación de muestras positivas para Toxoplasma gondii</i> .....	55
<b>Tabla 15</b> <i>Criterios para identificación de muestras negativas para Toxoplasma gondii</i> .....	55
<b>Tabla 16</b> <i>Criterios para identificación de muestras positivas para Herpesvirus</i> .....	56
<b>Tabla 17</b> <i>Criterios para identificación de muestras negativas para Herpesvirus</i> .....	56
<b>Tabla 18</b> <i>Criterios para identificación de resultado inviable para los agentes TORCH</i> .....	57
<b>Tabla 19</b> <i>Concentración de ADN mediante espectrofotometria.</i> .....	62
<b>Tabla 20</b> <i>Prevalencia de TORCH, en base a los casos positivos del presente estudio</i> .....	67
<b>Tabla 21</b> <i>Prevalencia de Toxoplasma gondii por zonas y edades</i> .....	68
<b>Tabla 22</b> <i>Prevalencia de Herpes simplex virus Tipo 1 por zonas y edades.</i> .....	70
<b>Tabla 23</b> <i>Prevalencia de Citomegalovirus por zonas y edades</i> .....	71
<b>Tabla 24</b> <i>Prevalencia de Epstein Barr virus por zonas y edades'</i> .....	72
<b>Tabla 25</b> <i>Prevalencia de Varicella zooster vrus por zonas y edades</i> .....	74
<b>Tabla 26</b> <i>Coinfecciones TORCH identificadas por zonas y edades.</i> .....	76
<b>Tabla 27</b> <i>Muestras negativas para TORCH identificadas por zonas y edades.</i> .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Frecuentes vías de Infección Humana con <i>Toxoplasma gondii</i> .....	13
<b>Figura 2</b> Estructura de una partícula viral .....	18
<b>Figura 3</b> Organización genética de los Herpesvirus.....	26
<b>Figura 4</b> Pasos de la Reacción en cadena de la polimerasa PCR. ....	31
<b>Figura 5</b> Nest- PCR. ....	34
<b>Figura 6</b> Esquema de la Multiplex PCR mPCR. ....	35

## RESUMEN

El síndrome de TORCH es una infección materna que afecta tanto el feto como el recién nacido y es provocado por agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos y parásitos, como los Herpesvirus y el parásito *Toxoplasma gondii*, tradicionalmente estos agentes se identifican por pruebas serológicas sanguíneas como ELISA, actualmente se han desarrollado técnicas moleculares como PCR y RT-PCR de líquido amniótico y cefalorraquídeo pero que pueden poner en riesgo al feto, en ambos casos los agentes se identifican cuando existen complicaciones en el embarazo, esta investigación propone la identificación molecular de estos agentes a partir de muestras sanguíneas en mujeres de etapa fértil para su diagnóstico oportuno previa la decisión de embarazo. Como resultado de esta investigación se estableció una combinación de variantes de PCR; Nest-PCR para el parásito del Toxoplasma y Multiplex (Nest-PCR) para los Herpesvirus (HSV-1, CMV, EBV, VVZ), y se determinó que el 90% de la población de estudio alberga algún agente TORCH, siendo los agentes HSV-1, Tg, CMV los que tienen mayor prevalencia con un 61%, 52% y 36% respectivamente, siendo recurrente en las mujeres más jóvenes, identificando así una población de riesgo para desarrollar infecciones TORCH.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **INFECCIONES TORCH**
- **MUJER FERTIL**
- **PREVALENCIA**

## ABSTRACT

TORCH syndrome is a maternal infection that affects both fetus and newborn, is caused by infectious agents such as herpesviruses and parasites as *Toxoplasma gondii*, these agents are identified traditionally by immunological blood-tests such as ELISA, currently molecular techniques such as PCR and RT-PCR of amniotic fluid, in both cases the agents are identified during pregnancy's complications, this research proposes the molecular identification of these agents in fertile women's blood samples for their timely diagnosis prior to pregnancy. As results of this investigation, PCR variants was established; Nest-PCR for the Toxoplasma parasite and Multiplex (Nest-PCR) for the Herpesviruses (HSV-1, CMV, EBV, VVZ), and it was determined that 90% of the study population harbors some TORCH agent, being HSV-1, Tg, CMV the highest prevalence with 61%, 52% and 36% respectively, being recurrent in younger women, thus identifying a population at risk for developing TORCH infections during pregnancy.

### KEYWORDS:

- TORCH INFECTIONS
- FERTILE WOMEN
- PREVALENCE

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

Durante el embarazo, pueden ocurrir infecciones bacterianas, micóticas, virales y parasitarias que pueden transmitirse desde la madre al feto, a estas se denominan infecciones congénitas (Cofré, Delpiano, Labraña, & Reyes, 2016), las infecciones congénitas que ocurren hasta la semana 21 de edad gestacional pueden causar daños irreversibles en el feto, pues hasta este periodo se da lugar a la formación de órganos del feto. (Lopez & Moro, 2013) (Castillo, 2015)

La incidencia de infecciones congénitas es alta y afectan hasta un 2.5% del total de los recién nacidos vivos, aunque un número importante de estos son asintomáticos, pueden desarrollar la infección después del parto (Lopez & Moro, 2013),

El síndrome de TORCH es una infección materna que afecta al feto en gestación y corresponde a un conjunto de síntomas y signos que presenta tanto el feto como el recién nacido afectado por la infección congénita de agentes infecciosos: principalmente virus y parásitos (Valdez & Bocaranda, 2014)

La sigla TORCH fue definida en 1971 para designar al grupo de agentes causales del síndrome y estos son: *Toxoplasma gondii*, Rubéola virus, **Citomegalovirus**, **Herpes simplex**

**virus** y **otros** (virus hepatitis B y C, retrovirus, enterovirus, adenovirus, treponema pallidum, Tuberculosis, **varicela-zoster virus**, *Epstein-Barr virus*, parvovirus B19, virus de la inmunodeficiencia humana y sífilis) (Alfaro, 2013) (Instituto Guatemalteco de Seguridad Social IGSS, 2015)

Anteriormente para el diagnóstico del TORCH se tomaban en cuenta las historias clínicas familiar y materna completas y se procedía con el diagnóstico mediante pruebas inmunológicas específicas para cada agente (Diaz M. P., 2007). Actualmente algunos agentes como el Toxoplasma, el Herpesvirus Tipo 1 y el Citomegalovirus son identificados mediante técnicas moleculares como la RT-PCR en líquido amniótico (Instituto Guatemalteco de Seguridad Social IGSS, 2015), (Rajnish, Siddhartha, & Sudipta, 2018).

La prevalencia de estas infecciones varía de un área geográfica a otra. De hecho, se ha reportado una alta prevalencia de esta infección alrededor de mujeres embarazadas y mujeres en edad fértil de diferentes partes de América Latina, Centro América, Europa del este, medio oriente, y el sur este de Asia (Al-Tantawi, 2014) y se estima según la OMS que al menos el 50% de la población mundial en el año 2025 será seropositivo para los agentes TORCH, siendo los herpesvirus y el toxoplasma los más recurrentes.

La Toxoplasmosis es una de las enfermedades zoonóticas más conocidas y extendidas alrededor del mundo (Lorenzi, Khan, & Namasivayan, 2016), se estima actualmente que entre 41 - 69% de la población del continente americano están infectados con el parásito *Toxoplasma*



*gondii* (Mimica, Muñoz-Zanz, & Torres, 2015). De acuerdo con la experiencia mundial se producen dos casos congénitos de toxoplasmosis por cada 1.000 partos. (Simgamsetty, Padmaja, Bindu, & Ramesh, 2015)

La seroprevalencia de la Toxoplasmosis varía considerablemente. De hecho, en Estados Unidos, se identificó que el 15% de las mujeres en edad fértil (15 a 44) eran portadoras de *Toxoplasma gondii*, con una incidencia de toxoplasmosis congénita de 2000 a 4000 casos por año. (Paquet, Trois-Rivières, Yudin, & Toronto, 2015).

En América Latina, la toxoplasmosis humana se sabe que es altamente endémica en México, Centro y Sur América, y de las islas del Caribe, con anticuerpos detectables en hasta el 65% de la población mayor de 40 años (Sánchez, Monsalve, Estevez, & Aguilar, 2016)

En poblaciones andinas amerindias de sur américa, la distribución geográfica y prevalencia de *Toxoplasma gondii*, es desconocida, (Kaplan, Yost, Farrell, & Greenberg, 2013) aunque se conoce de una alta prevalencia (40% - 95%) en Panamá, Colombia y Brasil (Etheredge & Mortensen, 2015)

Estudios desarrollados como el de (Ramos L. , 2013) en Chile y el de (Instituto Guatemalteco de Seguridad Social IGSS, 2015) en Guatemala, indican que entre un 25% a 50% de las mujeres en edad fértil son seropositivos para Toxoplasmosis y herpesvirus generando

infecciones congénitas en hasta el 2% en los recién nacidos; de estos el 70% de las infecciones congénitas fueron provocados por el virus del herpes simple, alrededor del 38% por citomegalovirus, el 17% por el virus de la varicela zoster, 12 % por Epstein- Bar virus y alrededor del 50% por *Toxoplasma*; mientras que para rubeola solo indican que los niveles, en las mujeres susceptibles, han disminuido ya que desde 1990 existe la vacuna anti rubeola

El estudio realizado por (Mosalve Castillo, 2013) en Venezuela donde seleccionaron 109 muestras de un total de 151 mujeres en edades comprendidas entre 14 y 40 años. El 85,5% presentó anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*, el 95,4% para rubéola, el 75,2% para Citomegalovirus y el 97,2 para el virus herpes simple 1 y 2. Se observa que el 21,1% y el 30,2% presentó relación entre la variable aborto y las infecciones por citomegalvirus y virus herpes simple 1 y 2, respectivamente.

La toxoplasmosis congénita ha sido un problema de salud pública subestimado en el Ecuador, como también lo es en Colombia en donde el Estudio Nacional de Salud demostró que 47% de la población posee anticuerpos contra *T. gondii* (Fernández, 2014).

La prevalencia de infección por toxoplasmosis en las diferentes áreas geográficas del Ecuador (IgG por inmunofluorescencia) es: Costa (Esmeraldas) 90.1%; Sierra (Quito) 46.5%, (Ambato) 21.6% y (Azogues) 36.4%; Oriente (Río Napo) 60.9%. (Lalama, 2014), otro estudio más reciente reporta que el 36% de mujeres en edad fértil es seroprevalente *Toxoplasma* (Sanchez, Araujo, & Barba, 2018) a el estudio de (Tamayo, Tayupanta, & Escobar, 2015) indica

que la prevalencia de Toxoplasmosis en el Ecuador alcanza el 72.3%, siendo uno de los más altos en América Latina.

Cabe recalcar que estas cifras son para toxoplasmosis, mientras que para los demás componentes del TORCH como Citomegalovirus, Rubéola, Epstein-Barr Virus y HSV1 no se encuentran cifras de manera específica en el Ecuador con excepción del virus del HSV-2 al cual la OMS le dedica gran interés.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que todos los años más de 20 millones de personas contraen herpes y/o herpes genitales, en EEUU el 22% de las personas mayores de 12 años es seropositivo para HSV-1, con mayor porcentaje en mujeres (26%) que en hombres (18%) y un 47% de las personas mayores de 35 años son seropositivos para HSV-2 con un porcentaje mayor en hombres 53% y en mujeres 42% según (OMS, 2015)

La infección por VHS-1 afecta a más del 60% de la población mundial menor de 50 años (Harris, 2016). El número de pacientes seropositivos se incrementa durante la adolescencia desde 13% a más de 50% en la edad adulta (Bohorquez, 2017).

La seroprevalencia VHS-1 es alta en América Central y del Sur, los niveles de infección se estiman en un 45% a 80%. En Colombia se ha encontrado una prevalencia de 72%, mientras que en México la prevalencia de VHS-1 es de un 78% de la población general. (Harris, 2016)

En América latina se estima que más del 50% de la población menor a 50 años está infectada por el VHS-1, la infección es más frecuente en mujeres ya que afecta al 58% de mujeres menores de 50 años (OMS, 2015)

En el Ecuador el 54% de pacientes herpéticos son mujeres (Gavilanez, 2015), y aunque la prevalencia de los agentes virales del TORCH no se analizan de manera individual, las infecciones víricas de transmisión directa y con reactivación en inmunodepresión alcanza el 58% según (Ministerio de salud Publica MSP, 2017)

Hasta hace una década las pruebas diagnósticas para TORCH estaban dirigidas a identificar enfermedades de transmisión vertical, en este caso gestantes susceptibles a rubéola y descartar la posible ocurrencia de rubéola congénita, para lo cual se recomienda realizar pruebas de IgG y no IgM. (INEC en colaboración con ONU Mujeres, 2014).

Actualmente se utiliza la RT-PCR para el diagnóstico de algunos agentes TORCH más comunes como Toxoplasma, Rubeola, Herpes Tipo 1 y 2, y varicela, pero el diagnóstico se realiza en mujeres gestantes en las primeras 10 semanas de embarazo a partir de líquido amniótico (Rajnish, Siddhartha, & Sudipta, 2018), aunque en el Ecuador esta práctica está restringida a pacientes con amenaza de aborto y las muestras son analizadas incluso en países como Colombia (Diaz & Diaz, 2017)

## 1.2 Justificación del problema

El síndrome del TORCH genera gran interés en la vigilancia epidemiológica, sobre todo porque ha aumentado la frecuencia de nacimientos en infantes hijos de madres afectadas por algunos de sus agentes no diagnosticados oportunamente.

Estudios estadísticos referentes al toxoplasma identifica que, en el Ecuador en la zona litoral o costa, 74% de las mujeres alrededor de los 20 años ya son seropositivas. En Quito los datos oscilan entre 42% a 50%, otros datos no publicados, en la región interandina, sugieren diversas tasas inferiores como Riobamba y Cuenca con 36%. Así el porcentaje de infección de la población adulta total ecuatoriana, oscilaría alrededor del 50%. Estas cifras indican una alta prevalencia y a su vez un contacto con el protozooario en alguna época de la vida (Fernández, Montaña, Basantes, & Ponce, 2014), (Sanchez, Araujo, & Barba, 2018)

La prevalencia mundial causada por los herpes virus ha aumentado de forma sorprendente en el transcurso de las últimas décadas, registrándose más del 75% de la población adulta entre 35-55 años presentan anticuerpos frente al HSV-1, el 60% de la población general es seropositivo para Citomegalvirus, alrededor del 40% es seropositivo para el herpes Zooster y en algunas zonas de la India y África el 32% de la población es seropositiva para el EBV. Se ha reportado también que el 70% de las infecciones congénitas fueron provocados por el virus del herpes simple, alrededor del 38% por citomegalovirus, el 17% por el virus de la varicela zooster,

12 % por Epstein- Bar virus (Harrison, 2014) y alrededor del 40% de las infecciones neonatales es causada por toxoplasmosis en el embarazo (Ramos L. , 2013). (Castillo, 2015)

El Ministerio de Salud Pública (MSP) del Ecuador, reporta 16.162 casos por infección del VHS-2 desde el año 2001 al 2010 y en la Provincia de Loja 172 casos con una tasa de 1,34 en 100.000 habitantes (Mundo, 2012), en otro estudio (Lopez P., 2017) reporta un elevado número de pacientes con CMV durante su periodo de embarazo. Estas cifras alarmaron al sector de la salud ya que sin duda la inadecuada aplicación de medidas de prevención, condiciones culturales, educativas, socioeconómicas, hábitos sexuales, características demográficas, sanitarias y escaso conocimiento acerca de esta temática, contribuyen al incremento de esta infección en la población ecuatoriana especialmente en jóvenes y adultos.

Es importante combinar información oportuna sobre los agentes TORCH y los daños que pueden ocasionar en la salud, sobretodo en la mujer y el feto durante el embarazo y un mecanismo de diagnóstico que los permita identificar oportunamente y recomendar tratamientos efectivos.

### 1.3 Objetivos de la investigación

#### 1.3.1 Objetivo general

Identificar agentes TORCH por la técnica de Nest-PCR y multiplex PCR en mujeres en etapa fértil del cantón Quito.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo para la extracción de ADN total a partir de muestras de sangre periférica.
- Implementar técnicas de *Nest-PCR* y *multiplex PCR* para la identificación molecular de los agentes TORCH.
- Identificar la prevalencia de agentes TORCH presentes en las muestras analizadas.
- Reconocer las zonas de Quito donde se concentra la mayor cantidad de muestras positivas para los agentes TORCH.
- Identificar el grupo de edad más vulnerable para desarrollar infecciones por agentes TORCH

## 1.4 Marco Teórico

### 1.4.1 Síndrome de TORCH

El síndrome TORCH agrupa a un conjunto de signos y síntomas que afectan a la madre y al feto durante y después del embarazo (Cofré, Delpiano, & Labraña, 2016) es producida por diversos agentes etiológicos tanto virales como parasitarios y micóticos. (Castillo, 2015)

La sigla TORCH designa a este grupo de agentes causales del síndrome, entre estos se cuentan: *Toxoplasma gondii*, virus Rubéola, Citomegalovirus, virus Herpes simplex y Otros (virus hepatitis B y C, retrovirus, enterovirus, adenovirus, treponema pallidum, *M. tuberculosis*, virus varicela-zoster, virus Epstein-Barr, parvovirus B19, virus de la inmunodeficiencia humana, cándida, etc.) (Nahmias, Walls, & Stewart, 1971) (Neu, Ducchon, & Zaccharia, 2015)

El agente etiológico causante del Síndrome TORCH puede acceder al feto por medio de tres vías y estas son:

- 1-. *Vía hematológica*: El microorganismo invade el torrente circulatorio materno, atraviesa la placenta y a través de la sangre del cordón umbilical llega al feto.
- 2-. *Vía canal del parto*: El microorganismo infecta el tracto genital de la madre y durante el parto el recién nacido toma contacto con él.



3-. *Vía ascendente*: El microorganismo infecta el tracto genital materno y asciende hasta la cavidad intrauterina provocando corioamnionitis, rotura prematura de membranas e infecta al feto.

La infección materna causada por estos agentes puede expresarse clínicamente de diferentes maneras en el embrión o en el feto. La severidad en las manifestaciones del cuadro clínico va a depender de la resistencia inmunológica previa del huésped en que claramente la primoinfección es más grave que la reinfección o la reactivación de una infección (LLavaca, 2014) (Pan American Health Organization / World Health Organization, 2016).

El síndrome Torch se puede expresar de las siguientes formas:

- Reabsorción embrionaria
- Aborto
- Infección placentaria con infección fetal
- Retardo del crecimiento intrauterino con infección fetal
- Parto prematuro con infección fetal
- Mortinato
- Recién nacido infectado sintomático
- Recién nacido infectado asintomático

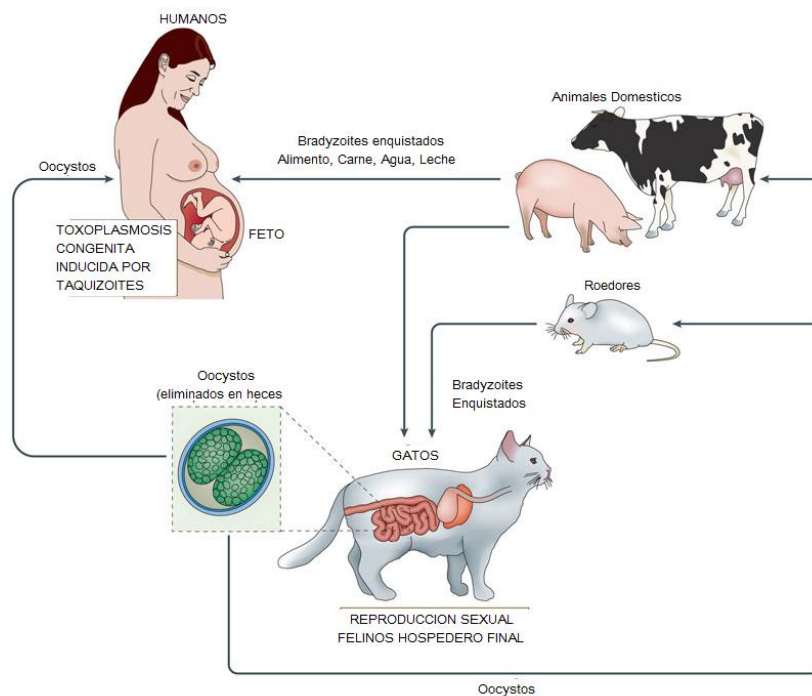
Las infecciones TORCH en las que se centrará esta investigación son las producidas por el parásito *Toxoplasma gondii* y las ocasionadas por los Herpes virus como Citomegalovirus, Herpes virus tipo 1, Varicela Zooster, y Epstein-Barr Virus.

#### 1.4.2 Parásito *Toxoplasma gondii*

El parásito *Toxoplasma gondii* (Tg) es un protozoo que se incluye dentro de la familia Sarcocystidae, que puede infectar prácticamente a todos los mamíferos, pudiendo ocasionar enfermedades consideradas leves pudiendo complicarse hasta llevar a la muerte a su portador cuando no se lo identifica y trata oportunamente (Lorenzi, Khan, & Namasivayan, 2016)

Los huéspedes definitivos de *Toxoplasma gondii* son miembros de la familia Felidae mismos que arrojan millones de ooquistes (parásitos de Tg inmaduros) en sus heces después de la infección primaria estos no presentan manifestaciones clínicas. (Marawan, Jerzy, & Haydee, 2014). Los huéspedes intermediarios; mamíferos (incluyendo los humanos) y aves de sangre caliente, pueden alojar bradizoítos que es una forma del parásito casi madura que se alojan en el músculo esquelético y el cerebro (Dubey & Jones, 2015). Los huéspedes intermediarios pueden adquirir la infección por el consumo de carne cruda o poco cocinada de otros huéspedes intermediarios, o por la ingestión de ooquistes del medio ambiente (Montealegre, Valbuena, & Cortéz, 2015).

La alta prevalencia de toxoplasmosis en países subdesarrollados se ve influenciado directamente por el pobre saneamiento ambiental, la incorrecta eliminación de excretas de los gatos, niveles socioeconómicos bajos y la edad (Lalama, 2014).



**Figura 1:** Frecuentes vías de Infección Humana con *Toxoplasma gondii*.

Fuente: (Yarovinsky, 2009)

El parásito *Toxoplasma gondii* tiene un genoma de aproximadamente 80 Mb de tamaño y consta de 11 cromosomas, el Gen *B1* es ampliamente usado en el diagnóstico molecular debido a que se repite 35 veces en su genoma aumentando así la sensibilidad en la detección.. (Veronesi, Santoro, & Milardi, 2017)

En los seres humanos el *Toxoplasma gondii* causa preocupación debido a la posibilidad de transmisión del parásito al feto si la madre se ha infectado durante el embarazo. La toxoplasmosis comúnmente se manifiesta como una enfermedad leve, similar a la gripe con fiebre leve, mialgia, malestar y cefalea, pero la infección primaria en los seres humanos también puede causar aborto

espontáneo, retraso mental y psicomotor, coriorretinitis, encefalitis y hepatitis. (Marawan, Jerzy, & Haydee, 2014)

#### **1.4.2.1 Infecciones perinatales por toxoplasma**

La seroprevalencia de la infección por *Toxoplasma gondii* aumenta con la edad y no varía mucho entre los sexos, la incidencia de la infección varía según el grupo de población y la ubicación geográfica (Lalama, 2014). La prevalencia de la toxoplasmosis congénita se extiende en América Latina de 1 a 20 por cada 1000 nacidos vivos (Pan American Health Organization / World Health Organization, 2016).

La transmisión de *Toxoplasma gondii* de la madre al feto en el embarazo “parasitemia” se da vía hematológica o transplacentaria, debido a que el microorganismo invade el torrente circulatorio materno, atraviesa la placenta y a través de la sangre del cordón umbilical llega al feto (Cavagion & Garcia, 2017). Por lo que se conoce que la frecuencia de transmisión de la madre al feto y la severidad de la enfermedad en el feto, están inversamente relacionados. La infección materna temprana (primer o segundo trimestre) lleva una baja probabilidad de infección fetal (9% a 27%), pero si se produce, puede dar lugar a la toxoplasmosis congénita grave, y puede causar la muerte del feto en el útero y aborto espontáneo, mientras que la infección materna tardía (tercer trimestre) es más propensa a conducir a la infección del feto (hasta un 60%), pero el daño fetal es menos probable y, si se produce, este es menos grave. (Pan American Health Organization / World Health Organization, 2016).

### 1.4.3 Herpesvirus

Los Herpesvirus constituyen un grupo grande de virus con ADN genómico (Knipe & Fields, 2015), se dividen en tres subfamilias: alphaherpesvirinae, betaherpesvirinae y gammaherpesvirinae, esta clasificación se basa en aspectos moleculares como la organización genómica y la secuenciación de nucleótidos y aminoácidos, y en parte en propiedades biológicas como la replicación, período de latencia y activación, especificidad de huéspedes y potencial patógeno.

**Tabla 1**

*Características de los Herpesvirus*

FAMILIA	SUBFAMILIA	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLO
<b>HERPESVIRIDAE</b>	Alphaherpesvirinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Variabilidad de huéspedes.</li> <li>- Ciclo de replicación relativamente corto</li> <li>- Difusión rápida a nivel de los cultivos celulares</li> <li>- Destrucción efectiva de la célula infectada.</li> <li>- Capacidad de establecer una latencia primaria, aunque no exclusiva, a nivel de los ganglios sensitivos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV1 y HSV2)</li> <li>-Virus de la Varicela Zoster (VZV).</li> </ul>
	Betaherpesvirinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Poseen una morfología típica.</li> <li>-El genoma de DNA es grande.</li> <li>-Poseen la capacidad de establecer infecciones virales persistentes y latentes.</li> <li>-Son especie específicos.</li> <li>-Crecen muy lentamente en cultivos celulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citomegalovirus (CMV)</li> <li>- Herpesvirus humanos 6 y 7 (HHV6 y 7).</li> </ul>
	Gammaherpesvirinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se replican y permanecen en forma latente en los linfocitos.</li> <li>- Pueden causar linfomas, leucemias y trastornos linfoproliferativos en animales de experimentación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus de Epstein-Barr (EBV)</li> </ul>

Fuente: (Knipe & Fields, 2015)

### 1.4.3.1 Características generales de los Herpesvirus

Dentro de estas características se encuentran:

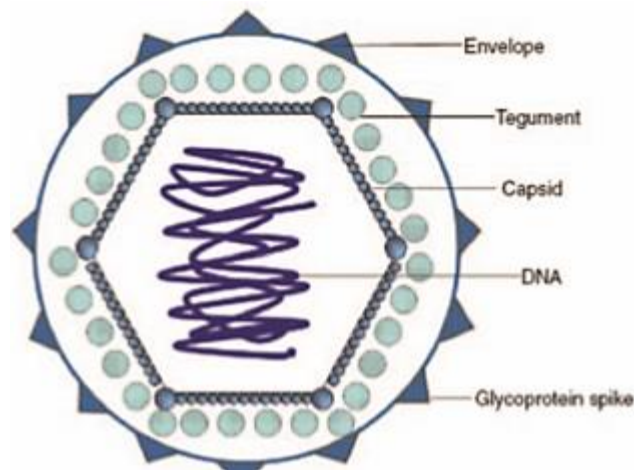
- Codifican la síntesis de enzimas que están involucradas en el metabolismo del ácido nucleico.
- La síntesis de DNA y el ensamblaje con la cápside se produce en el núcleo (las cápsides adquieren su envoltura cuando emergen a través de la membrana nuclear).
- La producción de las nuevas progenies virales se acompaña invariablemente de muerte celular.
- Los virus permanecen en sus huéspedes naturales y son responsables de infecciones latentes y de reactivaciones a menudo asintomáticas.
- Son virus frágiles y se transmiten por contacto directo entre los individuos.
- Son mucho más frecuentes y se asocian a signos clínicos.

### 1.4.3.2 Estructura general de los Herpesvirus

La partícula viral comprende:

- Un core que contiene ADN viral. Este ADN es bicatenario y lineal, de peso molecular superior a  $80 \times 10^6$  Daltons y está enrollado alrededor de una bobina proteica.
- Una cápside icosaédrica de 100 nm de diámetro constituida de 162 capsómeros.
- Un tegumento constituido por proteínas virales, de estructura fibrilar, que asegura la unión entre la cápside y la envoltura.

- Una envoltura que determina el tamaño definitivo del virus (150 a 200 nm). Esta envoltura está constituida de una doble capa lipídica derivada de las membranas celulares. Las proteínas y las glicoproteínas virales insertadas en la envoltura forman las espículas, de las cuales algunas son responsables de la fijación del virus a las células.



**Figura 2** Estructura de una partícula viral  
Fuente: (Pousa & Bascones, 2011)

#### 1.4.4 CITOMEGALOVIRUS (CMV)

El citomegalovirus pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Betaherpesvirinae, el aumento de tamaño que se observa en las células infectadas producto del debilitamiento del citoesqueleto hace alusión a su nombre. (Drago, Lug, & Nowak, 2015). El Citomegalovirus es la principal causa de mononucleosis infecciosa y debido a que ataca a las glándulas salivales su infección puede ser grave o fatal para los pacientes que sufren inmunodeficiencia y en el embarazo afecta al feto ( Estripeauta, Moreno, & Ahumada, 2016)

El CMV es un virus de ADN con un tamaño entre los 200-300 nm, es el herpes virus más grande y el virus patógeno humano de mayor tamaño, el virión está conformado por una nucleocápside de 64 nm que contiene el genoma de ADN linear de doble filamento de 235 Kb conformado por alrededor de 165 genes, el genoma del CMV codifica aproximadamente 200 proteínas y está rodeado de una cápside icosaédrica de 162 capsómeros, dividido en dos



segmentos separados por regiones repetidas cortas denominados UL y US (Bosa, 2014). Estructuralmente el CMV es el herpes virus más complejo, esto se refleja en la gran cantidad de proteínas codificadas por el genoma viral ( Estripeauta, Moreno, & Ahumada, 2016)

El CMV ingresa a las células permisivas por endocitosis y libera su ADN en el citoplasma e inicia una serie de eventos complejos. El ADN ahora circular, así como otros componentes del virus, son transportados al núcleo a través de microtúbulos citoplasmáticos donde se llevará a cabo la transcripción y la replicación; ésta se realiza en las primeras 12 horas y demora hasta 24 horas y se ha dividido en tres ciclos, el inmediato, el temprano y el tardío basados en la aparición de diferentes proteínas específicas. (Crough & Khanna, 2016)

El periodo inmediato ocurre en las primeras 4 horas post infección y se caracteriza por la producción de proteínas reguladoras de la infección, así como productoras de alteraciones en el ciclo celular. En la fase temprana se producen proteínas que contribuyen al inicio de la replicación del ADN y la síntesis de proteínas estructurales; durante la fase tardía se sintetizan proteínas estructurales para el virión y para su liberación de la célula por exocitosis. (Medina, Pérez-Sartori, Caltenco, & Aguado, 2015)

CMV al igual que otros herpesvirus, logra entrar en una fase de latencia en el núcleo celular (Bosa, 2014), expresando sólo unos pocos genes, evadiendo así exitosamente los mecanismos de defensa del organismo, pero manteniendo la capacidad de reemerger y producir infecciones líticas (Crough & Khanna, 2016).

#### **1.4.4.1 Infecciones perinatales por Citomegalovirus (CMV)**

Entre los virus más comunes que se transmiten a través de la placenta está el citomegalovirus CMV (Bosa, 2014) el cual también se transmite a través del contacto directo con una persona portadora del virus en la saliva, la orina u otros líquidos corporales (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2015).

En los últimos años la infección congénita de CMV es tratada frecuentemente en la medicina perinatal, pediatría, y virología debido a que una vez que el CMV se aloja en las células permisivas, se mantendrá en el organismo de por vida. En China, la incidencia de la infección por CMV, representa más de 90% en mujeres embarazadas, mientras que, la incidencia en los bebés es 1% (Yamamoto, Figueiredo, & Mussi-Pinhata, 2017). Igualmente varios estudios a nivel mundial demuestran que aproximadamente el 10% de los recién nacidos con infección congénita de CMV son sintomáticos y tienen síntomas clínicos al nacer, mientras que el 90% son asintomáticos (Fowler, McCollister, Dahle, & Boppana, 2016) (Lopez P., 2017)

#### **1.4.5 HERPES SIMPLEX (VIRUS HSV)**

El herpes simple virus HSV, es el agente causante de la infección herpética o herpes, es el patógeno más importante de la familia Herpesviridae y fue el primer virus de herpes aislado (Campadelli, Menotti, & Avitabile, 2014), Existen dos serotipos de virus Herpes Simplex: Virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV1) y virus herpes simplex tipo 2 (HSV2). En lo relacionado a su

morfología, estos poseen una forma de organización idéntica entre sus genomas. Sin embargo, estos dos serotipos no poseen más que un 50% de homología, distinguiéndose por su poder patógeno, epidemiología y la localización de las manifestaciones clínicas cutáneo mucosas habituales (Cánepa, 2015), el genoma de los virus de herpes tiene capacidad para codificar de 40 a 80 proteínas (MedLine Plus, 2016)

Los genes del HSV se clasifican en pre-tempranos, tempranos y tardíos. La transcripción del genoma y la síntesis de proteínas virales se hacen en forma secuencial en tres fases reguladas por proteínas virales (Cánepa, 2015) . En la primera fase se expresan los genes pre-tempranos donde la función de las proteínas pre-tempranas es unirse al ADN para regular la transcripción del resto del genoma. En la segunda fase se expresan los genes tempranos que codifican por proteínas virales involucradas en la síntesis del ADN, entre ellas la polimerasa viral y factores de transcripción. Finalmente, en la tercera fase se sintetizan las proteínas tardías, que son principalmente estructurales (Knipe & Fields, 2015).

#### **1.4.5.1 Infecciones perinatales por Herpes simplex virus**

El herpes simple se contagia por contacto directo, sin embargo, no todos los contagiados presentan síntomas. Por lo que estos pueden presentarse en varios brotes de HSV al año, haciéndose menos frecuentes con el transcurso del tiempo. El herpes activo en la madre es un factor de riesgo siendo en gran porcentaje asintomático, pero en caso de presentar síntomas puede

ser muy peligroso en recién nacidos (Pan American Health Organization / World Health Organization, 2016).

La mayoría de las infecciones neonatales se deben al HSV-2 en 65 -70% de los casos y entre el 30 y el 35% se deben al HSV-1. La incidencia de infección por herpes simple tipo 1 en recién nacidos es de 1 por cada 3.000, causando cegueras, dermatitis severas, retraso psicomotriz (Cánepa, 2015).

#### **1.4.6 VARICELLA ZÓSTER (VIRUS VVZ)**

El virus varicela zóster de la subfamilia alphaherpesviridae infecta a los seres humanos y a otros mamíferos, causando varicela en la infección primogenia y que provoca herpes zóster y neuralgia herpética en su reactivación (Cisneros & Herrero, 2014) (Gospic & Vuković, 2017).

El VVZ está estrechamente relacionado con el virus del herpes simple con el que comparte homología genómica ya que comparten 5 genes y varios bloques genéticos conservados (Grose, 2015) (Cánepa, 2015). Su ADN es una molécula lineal de doble cadena con una longitud de 125.000 nucleótidos, la cápside está rodeada de numerosas proteínas que desempeñan un papel fundamental en el proceso de reproducción del virus en la célula infectada (Davison & Scott, 2016).

#### 1.4.6.1 INFECCIONES PERINATALES POR VARICELLA ZÓSTER VIRUS

El aparecimiento de la varicela en el embarazo es excepcional debido al índice de inmunidad de la mujer mayor de 17 años que llega al 90% en países tropicales (Grose, 2015), por lo que afecta a tan solo un caso de cada 6000 o 7000 embarazos. De suceder la infección, el virus es transmitido al feto por vía transplacentaria en el momento de la viremia (Pan American Health Organization / World Health Organization, 2016), (Cánepa, 2015).

La aparición de la varicela en las primeras 19 semanas del embarazo puede ser responsable de embriofetopatías excepcionales: lesiones cicatrízales cutáneas, hipoplasia de miembros, anomalías oculares, retardo psicomotor.

Entre las 20-38 semanas de gestación la varicela parece no ser agresiva con el feto y este nacer normal. La aparición de un zoster en los meses o en los años siguientes revela a veces la infección latente contraída in útero.

La varicela en la etapa final del embarazo es nuevamente un factor de riesgo para el recién nacido.

- Si infecta entre 6-14 días antes del parto, los anticuerpos maternos transmitidos aportan una protección relativa. El niño hace una varicela menor alrededor del 5º día.

- Si la infección sobreviene a menos de 5 días antes del parto, no ha habido transmisión de anticuerpos. El recién nacido puede hacer una forma grave diseminada, entre el 6° y el 10° día de vida que lo puede llevar a la muerte.

#### **1.4.7 EPSTEIN BARR (VIRUS EBV)**

El virus de Epstein-Barr (EBV) pertenece a la subfamilia Gammaherpesvirinae y es el agente de la mononucleosis infecciosa (Hannaoui, Erika, Sulbarán, & Campos, 2015), causando fiebre, garganta irritada, fatiga extrema y glándulas linfáticas inflamadas, la infección por el virus de Epstein-Barr se presenta a nivel mundial con una incidencia del 48% en personas que sobrepasan los 40 años (Bellas & Santón, 2017).

Una partícula madura del virus de Epstein-Barr tiene un diámetro de entre 120 a 180 nm, está constituido por una molécula de ADN bicatenario de una longitud aproximada de 192 kb que codifica aproximadamente 100 proteínas y contiene alrededor de 85 genes (Isom, Wigdahl, & Howett, 2014).

La molécula de ADN está flanqueada en ambos extremos por un número variable de repeticiones terminales, cada una de ellas de una longitud aproximada de 500 pb (Hu, Zabarovsky, Chen, Cao, & Ernberg, 1998), la recombinación entre estas repeticiones terminales origina la formación de una molécula extra cromosómica cerrada denominada episoma, que es la estructura que el virus adopta en el núcleo de las células infectadas de forma latente (Pathmanathan, Prasad, Chandrik, & Sadler, 2016).

El EBV induce linfomas en los pacientes inmunodeprimidos y se asocia a dos tumores, el linfoma de Burkitt y el carcinoma rinofaríngeo (Sugimoto, Ando, Oshimi, & Tamayose, 2015).

#### **1.4.7.1 INFECCIONES PERINATALES POR EPSTEIN-BARR VIRUS**

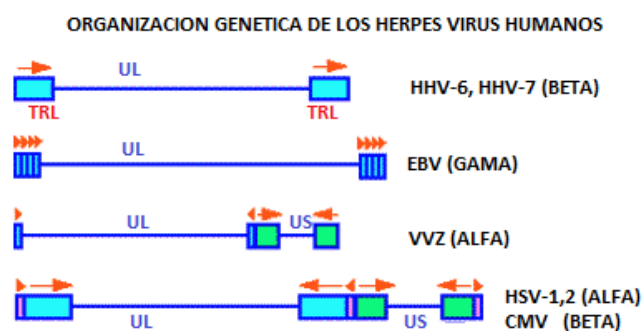
La reactivación del virus Epstein Barr en el embarazo se asocia con el bajo peso de los bebés al nacer, con la microcefalia y baja longitud corporal en el bebé, podría conducir a nacimientos prematuros o a la muerte del feto según la doctora Anne Eskild del Instituto Noruego de Salud Pública, en Oslo.

La muerte del feto está asociado con la reactivación del EBV en el primer trimestre de embarazo, si el EBV se reactiva durante el segundo trimestre se asocia con ceguera, falta de desarrollo psicomotriz, en el tercer trimestre no es frecuente un daño severo, puesto que los signos y síntomas son visibles después del primer año de edad, cuando es notorio la disminución del campo visual, el bajo desarrollo psicomotriz. (Notisalud, 2016), y también el desarrollo de leucemia en los infantes (Delgado & Pérez, 2014).

#### **1.4.8 Genoma de los Herpesvirus**

Los herpesvirus poseen una región única larga, usualmente de 100 kb, la cual codifica alrededor de 100 genes (Durzyńska, Pacholska, & Kaczmarek, 2013) alrededor del 95% del genoma son regiones conservadas presentes en todo los herpes virus, el 5% está dividido entre genes de virulencia y genes de replicación en células hospederas (Roizman & Ward, 2015) (Wada, Mizoguchi, Ito, Kawada, & Yamauchi, 2015).

Los herpesvirus tienen un número de elementos de repetición, internos y terminales. El tamaño y número de estos elementos de repetición varía, en el caso del HSV-1, HSV-2, VZV y CMV, existen dos bloques de secuencias únicas, designadas UL (Unique long) y Us (Unique Short), cada una de las cuales está unida por repetidores terminales, mientras que HHV-6, HHV-7, HHV-8 y EBV poseen una única región (Roizman & Ward, 2015).



**Figura 3:** Organización genética de los Herpesvirus.  
Fuente: Editado de (Roizman & Ward, 2015)

#### 1.4.9 Diagnóstico molecular del TORCH

Actualmente la confirmación de infecciones causadas por los agentes TORCH son detectados por pruebas ELISA de sus antígenos virales, cultivos virales y métodos indirectos como la determinación de inmunoglobulinas en la mayoría de centros hospitalarios del Ecuador (APROFE, 2016), (Sanchez, Araujo, & Barba, 2018). Lastimosamente estos métodos tienen una sensibilidad y especificidad baja y bajo este contexto el diagnóstico molecular constituye una alternativa que brinda mayor sensibilidad y especificidad. (Campo, Discuviche, & Blanco, 2014) (Fonseca & Robayo, 2016) (Lin, Chen, & Kuo, 2016) (Hala, Hudad, & Abadi, 2018)



Los métodos moleculares se basan en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN de varios virus de la familia Herpesviridae (HSV 1 y 2, VVZ, CMV, EBV) y esto se debe al 80% de homología de genes del VHS 1 y 2 con otros miembros de la familia Herpesviridae (Campo, Discuviche, & Blanco, 2014) (Hala, Hudad, & Abadi, 2018) siendo las regiones de baja homología las que permiten la identificación de cada virus de la familia Herpesviridae a través de primers específicos (Wada, Mizoguchi, Ito, Kawada, & Yamauchi, 2015) (Lin, Leibovitch, Almira, & Jacobson, 2016). En esta casuística se ha detectado la presencia de VHS 1 y 2 en 59 muestras de LCR con 7 casos de coinfección por VHS 1 y VZV. La presencia de más de un agente viral de la familia herpes es un hallazgo de los métodos moleculares y ya ha sido descrita previamente<sup>5</sup>. La doble infección se demuestra por la positividad observada simultáneamente en análisis de serología y biología molecular para VHS 1 y VZV. La amplificación por RPC del gen timidina kinasa es otra estrategia de diagnóstico molecular de HSV tipo 1 y 2. Esta estrategia se basa en la similitud de hasta 60% del gen timidina kinasa entre VHS 1 y 2. Los partidores utilizados en este ensayo reconocen secuencias homologas entre ambos virus pero que flanquean una región con divergencias internas. Estas divergencias son reconocidas por enzimas de restricción que cortan en forma específica VHS 1 y 2 (Figura 1). Este método utiliza además una tercera enzima HaeIII, que reconoce ambos virus herpes y sirve como control de amplificación. La especificidad de esta metodología ha sido evaluada en muestras de cultivos virales y la sensibilidad se ha calculado en 50 copias virales. En la Tabla 2 se muestra nuestra experiencia clínica de la amplificación del gen timidina kinasa por RPC para el diagnóstico de VHS tipo 1 y 2. Se observa que en lesiones dermatológicas esta metodología es altamente sensible y específica; sin embargo, en muestras de LCR se observan falsos negativos. La incapacidad de demostrar la presencia de VHS tipo 1 se debería a la precocidad de la toma de la muestra (< 48 horas) ya que

la literatura reporta que la eficiencia de los métodos moleculares está en relación al momento de evolución de la encefalitis<sup>6</sup>. En una serie de 10 pacientes adultos con encefalitis viral aguda por VHS tipo 1, la amplificación por RPC demostró virus herpes inicialmente sólo en pacientes con evolución mayor a 48 horas (8 casos). En los 2 casos que no logró demostrar la presencia del virus, ambos tenían evolución menor a 48 horas. Al obtener nuevas muestras de LCR, 4 días más tarde en uno y 7 días en el otro caso, ambos resultaron positivos. Estos datos son concordantes con nuestros resultados de falso negativo en un caso con menos de 48 horas de evolución y sugerirían que los métodos moleculares, aunque son un aporte al diagnóstico de la encefalitis viral, no son capaces de la detección de VHS 1 en las etapas iniciales de la encefalitis viral (Lin, Leibovitch, Almira, & Jacobson, 2016).

#### **1.4.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR**

La PCR, concebida inicialmente por Kary Mullis en 1985, permite la amplificación in vitro de una secuencia de ADN específica partiendo de pequeñas cantidades de templado (Torres, y otros, 1995). La PCR consiste en una amplificación enzimática de fragmentos de ADN por dos oligonucleótidos o cebadores (primers) que hibridan a cadenas opuestas del templado, con los terminales 3' frente a frente. La enzima ADN polimerasa inicia la síntesis de una nueva cadena, partiendo del terminal 3' de cada cebador. La repetición de ciclos de temperatura denatura el templado, hibrida los cebadores y prolonga la cadena por intervención de la ADN polimerasa. Los productos de la amplificación de cada cebador pueden actuar como templado para la siguiente amplificación, resultando en una multiplicación exponencial de ADN (definidos

por el terminal 5' de cada cebador) (Surzycki, 1999). Desde la implementación de la técnica se han desarrollado diferentes modificaciones y aplicaciones.

Los componentes son descritos a continuación

**Enzima ADN Polimerasa:** La ADN polimerasa es la enzima encargada de la adición de nucleótidos en sentido 5'-3', catalizando un ataque nucleofílico del átomo de fósforo del desoxirribonucleótido (dNTP) al terminal 3' OH del cebador, dando lugar a la unión covalente fosfodiéster entre ambos, permitiendo la elongación de la cadena complementaria al molde en la reacción (Torres, y otros, 1995). Inicialmente, la enzima utilizada para catalizar la reacción correspondía a un fragmento de la E. coli Polimerasa I, debía agregarse una alícuota fresca en cada ciclo pues la enzima era inactivada en cada paso de desnaturalización. Posteriormente, se realizaron ensayos que permitieron la automatización del protocolo usando un tipo de polimerasa termoestable extraída de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa). La temperatura que requiere la enzima para su máxima actividad se encuentra entre 75 y 80°C: La concentración de la enzima en la reacción debe ser la adecuada (1 a 5 unidades por 100 µl de reacción), pues cantidades excesivas pueden resultar en amplificación de productos inespecíficos (Surzycki, 1999).

**ADN templado:** una de las principales ventajas de la PCR es la posibilidad de usar concentraciones muy pequeñas de ADN molde relativamente impuro y/o degradado y obtener amplificaciones exitosas. A pesar de que la contaminación aparentemente no representaría un obstáculo, existen ciertos contaminantes que pueden disminuir la eficiencia del método (urea, SDS, acetato de sodio, entre otros). Muchos de estos contaminantes pueden ser removidos mediante lavados con etanol al 70% o re precipitando el extracto con acetato de amonio (Surzycki, 1999). La concentración ideal de templado para la reacción depende de la muestra

analizada y grado de purificación de esta, pero en general oscila entre 300 nanogramos a 1 microgramo de ADN genómico (Torres y otros 1995).

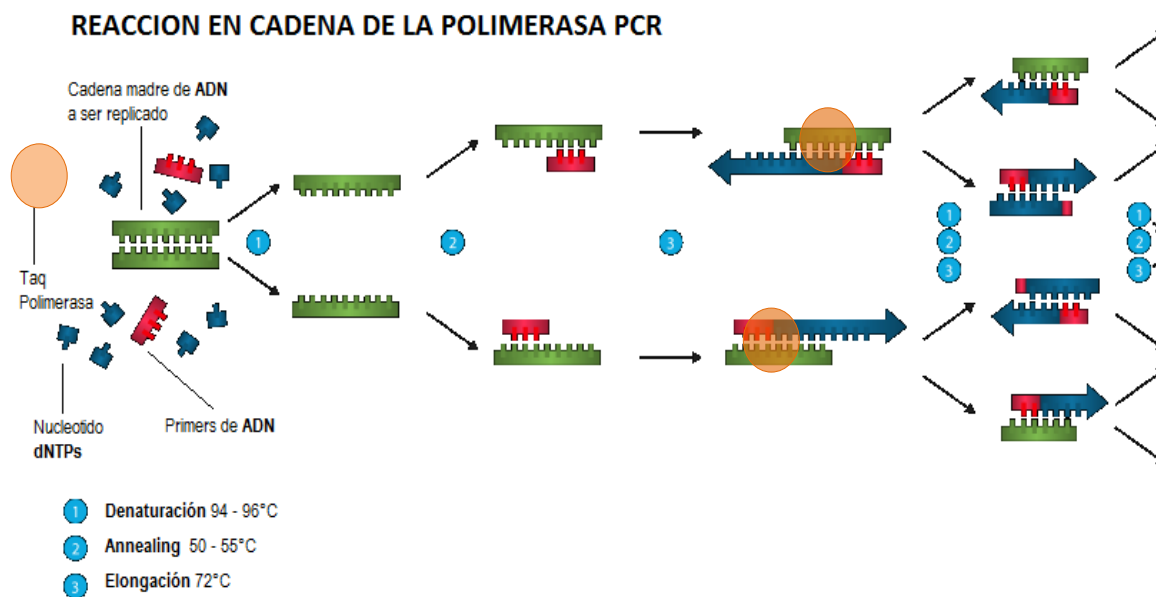
**Cebadores, primers o iniciadores:** deben seleccionarse dos iniciadores que hibriden regiones del ADN molde, y que estén localizados a los extremos de la región de interés y que sean “únicos” para obtención el fragmento deseado. La longitud del oligonucleótido debe ser de 15 a 30 nucleótidos (Torres, y otros, 1995). En lo posible, los iniciadores deben tener un contenido de GC de 40 a 60%, aproximadamente. El contenido de GC, en los dos cebadores, debe ser similar y no debe corresponder a secuencias palindrómicas. La distancia de los iniciadores en la secuencia es variable, sin embargo, la experiencia muestra que fragmentos cortos amplifican mejor que fragmentos largos mostrando que la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente a distancias mayores a 3 Kbp. La reacción de PCR requiere un exceso molar en la concentración de primers, usualmente entre 0,2 a 1  $\mu\text{M}$  (Surzycki S. , 2007)

**Solución tamponadora:** la solución buffer estándar para la reacción comprende Tris-HCl en concentración 10 a 50 mM: El pH óptimo para la mayoría de las polimerasas termófilas se encuentra entre 8 a 9. La solución incluye una sal, que puede corresponder a un ion de potasio o sodio, para facilitar el correcto alineamiento de los cebadores (Surzycki S. , 2007).

#### **1.4.10.1      Proceso de amplificación**

El número de copias de ADN que serán obtenidas tras la reacción dependerán del número repeticiones o ciclos que se realicen (entre 25 y 40). Los tiempos de ciclado deben ser lo más cortos posibles para reducir el tiempo de reacción, previniendo de esta manera la

inactivación enzimática e incrementando la especificidad de la reacción (Surzycki, 2007). Los pasos del ciclado (Figura 2) se detallan a continuación:



**Figura 4:** Pasos de la Reacción en cadena de la polimerasa PCR.  
Fuente: Editado de: (Bogetto & Waidne, 2000)

#### 1.4.10.1.1 Proceso de denaturación

En este paso, se efectúa la separación de las bandas de ADN maternas. El proceso de desnaturalización ocurre en un tiempo muy corto (entre 30 y 60 segundos). La temperatura del ciclo se encuentra usualmente entre 94 y 95° C (Surzycki S. , 2007).

#### **1.4.10.1.2 Paso de hibridación**

En este paso, los cebadores hibridan a la cadena madre desnaturalizada. El tiempo requerido para este paso se encuentra entre 30 y 60 segundos. La temperatura de hibridación depende del contenido de GC de los cebadores y debe ser cuidadosamente ajustada. Bajas temperaturas de hibridación pueden dar como resultado hibridación de los cebadores a blancos inespecíficos, mientras que altas temperaturas pueden interrumpir la alineación y, consecuentemente, la síntesis de ADN. Para la mayoría de los cebadores esta temperatura se encuentra entre 50 y 55° C (Surzycki S. , 2007).

#### **1.4.10.1.3 Paso de elongación**

La ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN, extendiéndose desde el terminal 3' del cebador alineado. El tiempo que dura la extensión de la nueva cadena depende de la longitud de la secuencia que debe ser amplificada. En óptimas condiciones, la enzima Taq polimerasa es capaz de añadir entre 60 a 100 bases nitrogenadas por segundo. Con este antecedente, el tiempo de elongación de la cadena está teóricamente calculado entre 15 a 20 segundos por cada Kbp del fragmento deseado. La temperatura de amplificación estándar está calculada en 72° C (Surzycki S. , 2007).

### **1.4.10.2 Tipos de PCR**

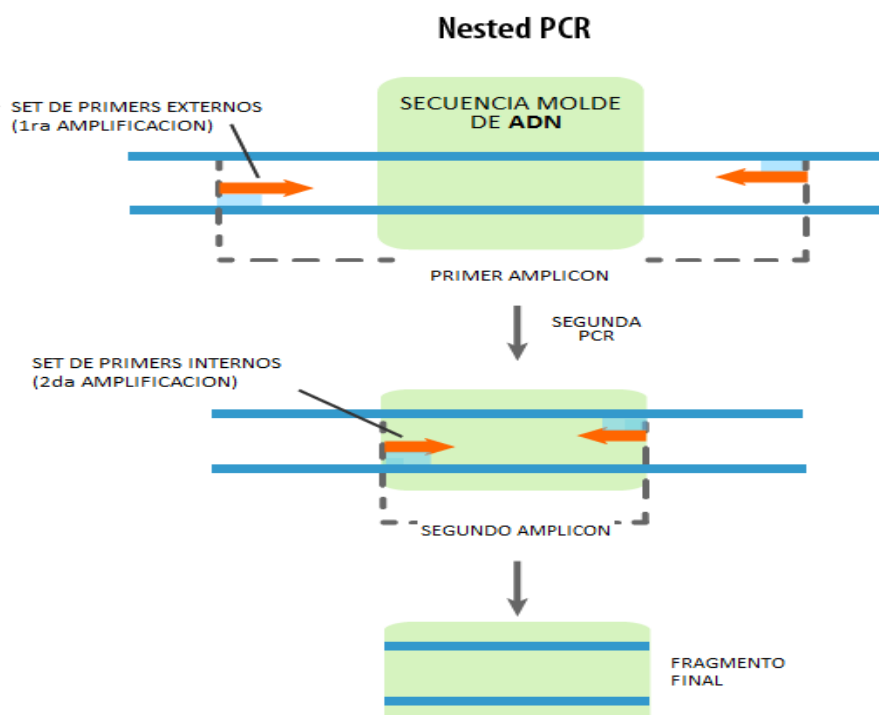
Entre las técnicas más importantes de PCR empleadas para este estudio se encuentran las siguientes.

#### **1.4.10.2.1 PCR Convencional**

Corresponde a la PCR tal como fue concebida en sus inicios, los cambios que pueden presentarse entre uno y otro método responden a las necesidades de amplificación.

#### **1.4.10.2.2 PCR Anidada Nest PCR**

La PCR anidada (Figura 1-7) consiste en dos reacciones de amplificación. En la primera reacción se obtiene un fragmento de tamaño deseado usando dos primers (Campillo, 2011). La segunda reacción consiste en la amplificación de un fragmento de menor tamaño que el inicial usando, como ADN molde, el amplificado de la primera reacción y nuevos primers que están contenidos en el fragmento inicial. Este método aumenta la sensibilidad del ensayo (García, y otros, 1999), para esta investigación se aplicó esta técnica dos veces, una PCR anidada para la identificación de ADN parasitario con el *Toxoplasma* y otra para la identificación de ADN Viral correspondiente a los Herpesvirus de interés.



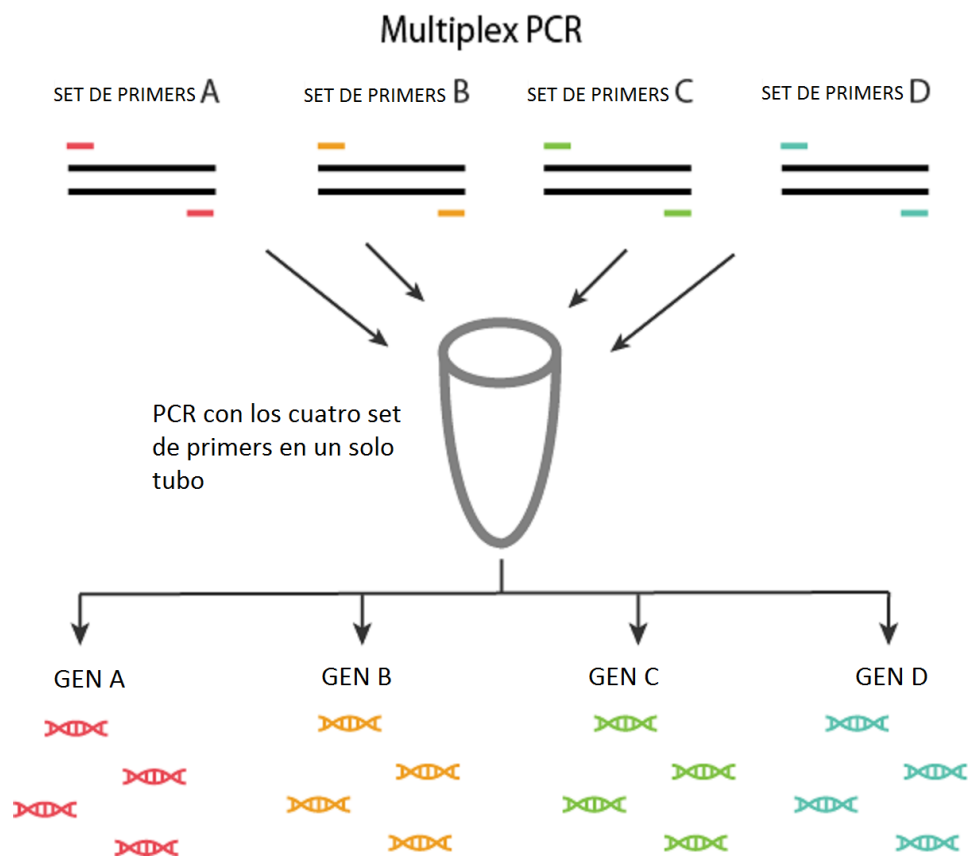
**Figura 5:** Nest- PCR.

Fuente: Editado de: (Hurtado, Aduriz, & Moreno, 2001)

#### 1.4.10.2.3 MULTIPLEX PCR mPCR

La Multiplex PCR anidada (Figura 1-7) consiste en una amplificación enzimática de fragmentos de ADN por varios pares de cebadores (primers) que hibridan a cadenas opuestas del templado, su importancia crece por la factibilidad de aumentar en una sola reacción la detección simultánea de varios agentes aprovechando la similitud de los cuadros clínicos (Shemis, El-Abd, Ramadan, & El-Sayed, 2012). En esta investigación se utilizó la combinación de las variantes de la Multiplex PCR y Nest- PCR para la identificación de ADN Viral correspondiente a los Herpesvirus de interés.





**Figura 6:** Esquema de la Multiplex PCR mPCR.  
Fuente: Editado de (Chamberlain, Gibbs, Rainer, & Nguyen, 1998)

#### 1.4.11 Identificación de los agentes TORCH

Los fragmentos que se obtienen por la técnica de la PCR son separados por tamaños y pesos mediante electroforesis.

En la Nest- PCR el fragmento de interés pesa 98 pb., mientras que, en la Multiplex, Nest-PCR, los fragmentos pesan 68 pb., 100 pb., 120 pb. y 140 pb.

## **1.5 Sistema de Hipótesis**

Las técnicas de biología molecular son sensibles y específicas para la identificación de los agentes TORCH a partir de muestras de sangre periférica.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Formulación del problema

Este estudio se realizó gracias a la colaboración financiera y técnica del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, con la aprobación y apoyo del Dr. José Rivera Buse MD, Director del Centro de Biomedicina; Lic. Sandra Vivero y Dr. Enrique Terán MD. PhD.

El Instituto de Biomedicina de la UCSG, cooperó con el presente estudio mediante capacitación en técnicas de extracción y amplificación de ADN, con la aprobación del Dr. Peter Chedraui Msc. Ph.D. y la dirección del Biol. Gustavo Saúl Escobar, Msc.

Para la obtención de controles positivos se contó con la colaboración del Hospital Gineco Obstetra Enrique Sotomayor y la dirección del Dr. Enrique Hidalgo Msc. Ph.D y gestión del Dr. Peter Chedraui Msc. Ph.D.

## **2.2 Zona de estudio**

### **2.2.1 Obtención de Muestras**

La toma de muestras se realizó a estudiantes mujeres estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador, que cumplieran con los parámetros de inclusión y quienes aceptaron participar previa firma de consentimiento informado revisado por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito, el estudio conto con 146 voluntarias.

### **2.2.2 Trabajo de Laboratorio**

El trabajo de laboratorio se realizó en la ciudad de Quito en los Laboratorios del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, situados en el Campus de Medicina, en Sodiro N14-121 e Iquique.

## **2.3 Periodo de Investigación**

El período de desarrollo de la investigación estuvo comprendido entre agosto del 2010 hasta junio del 2012.

## **2.4 Protocolo general de Investigación**

Este estudio fue aprobado previamente por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito y antes de la toma de muestra cada uno de los voluntarios leyó y firmó el respectivo consentimiento informado.

## **2.5 Criterio de Inclusión de Muestras**

Para este estudio se incluyeron las muestras de personas que aceptaron participar en esta investigación previa firma del consentimiento informado, que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- a) Sexo femenino.
- b) Edad comprendida entre 18 años y 35 años.
- c) No presentar embarazo en desarrollo.
- d) Vivir en el Cantón Quito.
- e) Nacionalidad Ecuatoriana.

## **2.6 Criterio de Exclusión de Muestras**

Se excluyeron del estudio a las muestras de personas que no desearon ser parte de la investigación y que no cumplieron con los criterios de inclusión mencionados anteriormente.

## **2.7 Procedimientos**

### **2.7.1 Cálculo del tamaño de muestra**

Debido a que los Herpes virus y el Toxoplasma tienen alta prevalencia en países de zona tropical se recomendó un tamaño de población de estudio no menor a 120 muestras y no mayor a 160 muestras.

### **2.7.2 Selección de Voluntarias**

Se seleccionaron voluntarias, que cumplan con los criterios de inclusión, y que hayan aceptado participar en la investigación mediante la firma del consentimiento informado.

### 2.7.3 Toma de muestras

A continuación, se detalla el procedimiento a seguir, previo a la obtención de la muestra de la voluntaria.

1. Etiquetar adecuadamente el tubo con EDTA.
2. Ponerse guantes.
3. Localizar la vena que se va a puncionar y realizar presión con el torniquete en el antebrazo.
4. Desinfectar con una torunda la zona de punción.
5. Insertar la aguja vacutainer unida a la campana de extracción y el tubo EDTA correspondiente.
6. Extraer 4 ml de sangre y retirar el tubo EDTA.
7. Retirar la aguja vacutainer y desinfectar con una torunda la zona de punción.
8. Almacenar la muestra en refrigeración hasta trasladar todas las muestras al Instituto de Biomedicina.
9. Trasladar al laboratorio el tubo EDTA con la muestra en un recipiente con refrigerante o hielo.

#### **2.7.4 Codificación de los voluntarios participantes**

Los códigos se asignaron en forma ordenada y ascendente, de acuerdo con el avance en la recolección de las muestras. Para el código designado a cada voluntaria se utilizó la numeración arábica de tres dígitos, desde 001 hasta 146.

#### **2.7.5 Conservación y transporte al laboratorio**

Los tubos con las respectivas muestras se transportaron en un contenedor aislante del calor, conteniendo paquetes de gel congelante, con el propósito de garantizar la cadena de frío (4°C), el tiempo máximo transcurrido desde la toma de muestra hasta el centro de biomedicina fue de 2 horas.

#### **2.7.6 Almacenamiento de las muestras**

El almacenamiento de las muestras de sangre fue a 4°C, para mantener la cadena de frío hasta el momento de realizar la extracción de ADN.



### **2.7.7 Ensayos preliminares de extracción de ADN por el método de Salting Out**

Se realizaron varios ensayos para la obtención de ADN por el método de Salting-Out. Se estandarizó el protocolo descrito en la sección 2.7.8 mediante ensayos con muestras pertenecientes al grupo de estudio, con el producto final se determinó la cantidad y calidad de ADN extraído mediante espectrofotometría.

También se visualizó el material genético extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% preparados en TBE 1X.

En cada pocillo se colocó 7uL de ADN extraído por la técnica de Salting-Out y 2uL de loading buffer 10X (Invitrogen), se utilizó esta cantidad de buffer debido a una estandarización previa en el laboratorio del Centro de Biomedicina, no se utilizó un marcador molecular para este gel, debido a que no se formaron fragmentos de ADN y solo se deseaba visualizar material genético total.

La corrida electroforética se realizó en buffer TBE 1X a 100V por 35min

### 2.7.8 Extracción de material genético

El proceso de extracción de ADN corresponde a una serie de pasos modificados de Salting Out estandarizados para esta investigación, la purificación del material genético obtenido que se llevan a cabo en el Centro de Biomedicina de la Universidad Central.

1. De la muestra tomar 1000uL, y colocar en un tubo estéril eppendorff de 1.8ml, previamente etiquetado.
2. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10000 r.p.m.
3. Retirar el plasma, con una micropipeta de 1000ul estéril; sin agitar el tapón celular (cuidado con los glóbulos blancos).
4. Llenar el tubo con buffer de lisis de eritrocitos o agua ultra pura (1ml), agitar suavemente hasta que se resuspenda el botón celular.
5. Colocar la muestra a 4°C por 5 minutos.
6. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10000 RPM
7. Descartar el sobrenadante (600uL) con micropipeta estéril, evitando tomar los núcleos
8. Agregar buffer de lisis de eritrocitos o agua ultra pura (1ml), dar Vortex por 10 seg, Centrifugar la muestra por 10 minutos a 10000 RPM, (Repetir este pasó 3 veces, hasta que el botón celular quede limpio).
9. Descartar el sobrenadante (600uL) con micropipeta estéril, evitando tomar los núcleos.
10. Resuspender en :
  - a) 500 ul de buffer de lisis de leucocitos
  - b) 10 ul de Proteinasa K (PK) 10mg/ml

c) 50 ul de DUODECIL sulfato de sodio (SDS) al 10 %

11. Incubar la muestra en baño maría 56 °C por 2 horas.

### **2.7.8.1 Purificación de la Muestra**

Eventualmente, los extractos crudos pueden contener alguna sustancia que afecte la amplificación del material genético.

Para tal efecto, se utilizará el método de fenol-cloroformo, posteriormente se adicionará etanol absoluto para precipitación de ADN y lavado con etanol al 70%. La muestra se diluye en agua grado PCR para su posterior aplicación.

1. A la suspensión del proceso anterior agregar 200 ul de Cloruro de Sodio (CLNa), 5M, a la muestra
2. Agitar suavemente la muestra (cabeza-cola) por 2 minutos, (no Vortex).
3. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 12000 RPM

***El ADN se encuentra a partir de este paso en el sobrenadante.***

4. Recuperar el sobrenadante (500uL) y pasarlo a un nuevo tubo estéril previamente etiquetado (no llevar nada del precipitado).
5. Añadir Fenol (250uL) y Cloroformo-Isoamyl alcohol (250uL); dar vortex no más de 10 seg, y centrifugar por 15 minutos a 12000 RPM.

6. Recuperar el sobrenadante (400uL) y pasarlo a otro tubo eppendorff rotulado y agregar un volumen igual de cloroformo, dar vortex por 10 segundos y centrifugar por 2 minutos a 12000 RPM (para limpiar el ADN).
7. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo eppendorff rotulado y añadir (300 ul) de Isopropanol (frio), invertir la muestra suavemente hasta que la medusa del ADN se observe.
8. Centrifugar la muestra por 2 minutos a 10000 RPM.
9. Retirar el sobrenadante tener cuidado de no llevarse la medusa de DNA y añadir (500ul) de etanol al 70% (frio).
10. Centrifugar el tubo Eppendorff por 2 minutos a 10000 RPM y descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder la medusa de ADN
11. Dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente o baño maría seco a 37°C por 1 hora, resuspender la medusa en TE 100uL, por 15 min a 56°C

### **2.7.8.2 Cuantificación del ADN**

Se evaluó la calidad de la muestra mediante la medición de su densidad óptica a 260 y 280 y la relación entre ellas en el espectrofotómetro Biochrom WPA Biowave (DNA Life Science, Quito) facilitado por el laboratorio de Biología Molecular del Hospital del Seguro HCAM. El procedimiento por seguir es el que se detalla a continuación:

1. Se inició el equipo y se lo calibró con un blanco de agua grado PCR.

2. Se realizó una primera medición con estándares de tirosina y triptofano a 280 nm con valores conocidos para garantizar la calibración.
3. Por otro lado, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 90  $\mu\text{L}$  de agua grado PCR en una celda para espectrofotómetro, llegando a una dilución 1/10.
4. Las celdas preparadas fueron colocadas dentro del equipo y se realizó la medición correspondiente para cada una de ellas.
5. Se tomó nota de los resultados obtenidos tras las mediciones y se los almacenó en un reporte.

### **2.7.8.3 Valoración cualitativa del ADN**

#### **2.7.8.3.1 Evaluación de integridad de material extraído por electroforesis**

Se evaluó la integridad del material genético corriendo las muestras en geles de agarosa al 2,5% siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- 1 Se pesó 1,5 g de agarosa y se disolvió en 50 mL de TBE al 1X
- 2 Se disolvió el gel por calentamiento en microondas
- 3 Una vez disuelto el gel, se esperó hasta que llegue a una temperatura que sea tolerable al tacto.
- 4 Se agregó 3  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio, se agitó para homogenizar y se dejó polimerizar por 20 min.

## 2.7.9 Amplificación de material genético de los agentes TORCH

### 2.7.9.1 Amplificación de ADN del parásito *Toxoplasma Gondii*

Para la amplificación del material genético de *Toxoplasma* realizara una PCR y con el producto de esta una Nest-PCR, que permitirá potencializar la identificación molecular del parásito, para las amplificaciones se utilizara los siguientes primers.

Primers para la PCR de *Toxoplasma gondii*, que permite obtener un fragmento de 200bp

**Tabla 2**

*Secuencias de primers para Toxoplasma en PCR*

SECUENCIAS PARA TOXOPLASMA PCR	
<b>T1 F</b>	5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'
<b>T4 R</b>	5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Primers para la Nest-PCR de *Toxoplasma gondii*, para obtener un fragmento de 98bp.

**Tabla 3**

*Secuencias de primers para Toxoplasma en Nest- PCR*

SECUENCIAS PARA TOXOPLASMA Nest-PCR	
<b>T2 F</b>	5'-TGCATAGGTTGCAGTCACTG-3'
<b>T3 R</b>	5'-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3'

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Para la primera amplificación se utilizarán los primers T1 y T4 en el master mix.

**Tabla 4***Master Mix para 1 muestra en la PCR de Tg.*

MASTER MIX	C1		V1		C2		V2	
Agua	X	GBM	8.48	ul		GBM	15	Ul
Buffer PCR (s/MgCl <sub>2</sub> )	10	X	1.5	ul	1	X	15	Ul
MgCl <sub>2</sub> 50Mm	50	mM	0.6	ul	2	mM	15	Ul
Mezcla dNTPs	25	mM	0.12	ul	0.2	mM	15	Ul
Primer T1	10	uM	1.5	ul	1	uM	15	Ul
Primer T4	10	uM	1.5	ul	1	uM	15	Ul
Tag Polimerasa	5	U/ul	0.3	ul	1.5	U/ul	15	Ul
ADN / C+ / C- Agua	1		ul					

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Para la Nest-PCR se utilizaran los primers T2 y T3 de la siguiente manera en el master mix.

**Tabla 5***Master Mix para 1 muestra en la Nest - PCR de Tgi*

MASTER MIX	C1		V1		C2		V2	
Agua	X	GBM	17.02	ul		GBM	30	Ul
Buffer PCR (s/MgCl <sub>2</sub> )	10	X	3	ul	1	X	30	Ul
MgCl <sub>2</sub> 50Mm	50	mM	1.5	ul	2.5	mM	30	Ul
Mezcla dNTPs	25	mM	0.24	ul	0.2	mM	30	Ul
Primer T2	10	uM	3	ul	1	uM	30	Ul
Primer T3	10	uM	3	ul	1	uM	30	Ul
Tag Polimerasa	5	U/ul	0.2	ul	1	U/ul	30	Ul
Producto PCR	2		ul					

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Para la amplificación de ADN del parásito se seguirá el programa de termociclado implementado en el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

### Protocolo PCR

- Paso de Denaturación inicial a 95°C durante 5 minutos.

- 35 Ciclos para la amplificación
  - Denaturación a 94°C por 1 min.
  - Alineación a 55°C por 1 min.
  - Extensión a 72°C por 1 min.
- Paso de extensión final a 72°C por 5 minutos.

#### **Protocolo Nest-PCR**

- Paso de Denaturación inicial a 95°C durante 5 minutos.
- 30 Ciclos para la amplificación
  - Denaturación a 94°C por 1 min.
  - Alineación a 53°C por 1 min.
  - Extensión a 72°C por 1 min.
- Paso de extensión final a 72°C por 5 minutos.

#### **2.7.9.2 Amplificación de ADN de los Herpesvirus**

Para la amplificación del ADN de Herpes virus se realizara una multiplex PCR y luego una Nest-PCR, que permitira pontecializar la identificacion molecular de los virus, para las amplificaciones se utilizaran los siguientes primers.

Primers para la PCR de los Herpesvirus, y el tamaño de su respectivo fragmento



**Tabla 6***Secuencias de primers para los Herpesvirus en PCR.*

SECUENCIAS PARA HERPES SIMPLE VIRUS TIPO 1 PCR		FRAGMENTO
HSV-1 1F	5'-CGCATCATCTACGGGGACACGGA-3'	320 pb
HSV-1 1R	5'-ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT-3'	
SECUENCIAS PARA CITOMEGALOVIRUS PCR		FRAGMENTO
CMV 1F	5'-CGGGTCATCTACGGGGACACGGA-3'	250 pb
CMV 1R	5'-ACTTTGCCGATGTAACGTTTCTT-3'	
SECUENCIAS PARA VARICELA ZOOSTER VIRUS PCR		FRAGMENTO
VVZ 1F	5'AAGGTTATATATGGAGATACGGA 3'	420 pb
VVZ 1R	5'ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT 3'	
SECUENCIAS PARA EPSTEIN-BAR VIRUS PCR		FRAGMENTO
ÉBV 1F	5'CGAGTCATCTACGGGGACACGGA 3	150 pb
EBV 1R	5' AGCACCCCCACATATCTCTTCTT 3	

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Primers para la Nest-PCR de los Herpesvirus, y tamaño de fragmento

**Tabla 7***Secuencias de primers para Herpesvirus en Nest- PCR*

SECUENCIAS PARA HERPES SIMPLE VIRUS TIPO 1 Nest- PCR		FRAGMENTO
HSV-1 2F	5'-GTGTTGTGCCGCGGTCTCAC-3'	140 pb
HSV-1 2R	5'-GGTGAACGTCTTTTCGAACTC-3'	
SECUENCIAS PARA CITOMEGALOVIRUS PCR		FRAGMENTO
CMV 2F	5'-GGGCCCAGCCTGGCGCACTA-3'	100
CMV 2R	5'-GACGAAGACCTTTTCAAACCTC-3'	
SECUENCIAS PARA VARICELA ZOOSTER VIRUS PCR		FRAGMENTO
VVZ 2F	5'-TGAGGGGATAGCTAAAATCG 3	120 pb
VVZ 2R	5'-TATAAAAGTTTTTCACACTC 3'	
SECUENCIAS PARA EPSTEIN-BAR VIRUS Nest-PCR		FRAGMENTO
VEB 2F	5'ACCCGGAGCCTGTTTGTAGC 3'	68 pb
VEB 2R	5'GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC 3	

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Con la finalidad de eliminar errores de pipeteo con los primers tanto para la PCR como para la Nest – PCR se decidió realizar un mix con primers delanteros y reversos.

Mix de primers delanteros para la PCR, a los que se denominara “Herp 1 F”

**Tabla 8**

*Concentraciones y volúmenes de los primers delanteros para la PCR de los Herpesvirus.*

Mix PRIMERS	C1		V1		C2		V2	
HSV-1 1F	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	ul
CMV 1F	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	ul
VVZ 1F	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	ul
EBV 1 F	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	Ul
Agua PCR	x		1.5	ul		X	2.5	Ul

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Mix de primers reversos para la PCR, a los que se denominara “Herp 1 R”

**Tabla 9**

*Concentraciones y volúmenes de los primers reversos de PCR de los Herpesvirus*

Mix PRIMERS	C1		V1		C2		V2	
HSV-1 1R	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	Ul
CMV 1R	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	Ul
VVZ 1R	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	Ul
EBV 1 R	10	mM	0.25	ul	1	mM	2.5	Ul
Agua PCR	x		1.5			x	2.5	Ul

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Mix de primers delanteros para la Nest - PCR, a los que se denominara “Herp 2 F”

**Tabla 10**

*Concentraciones y volúmenes de los primers delanteros de Nest-mPCR de los herpesvirus*

Mix PRIMERS	C1		V1		C2		V2	
HSV-1 2F	10	mM	0.35	ul	1	mM	3.5	ul
CMV 2F	10	mM	0.35	ul	1	mM	3.5	ul
VVZ 2F	10	mM	0.35	ul	1	mM	3.5	ul
EBV 2F	10	mM	0.35	ul	1	mM	3.5	ul
Agua PCR	x		2.1			x	3.5	ul

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Mix de primers reversos para la Nest- PCR, a los que se denominara “Herp 2 R”

**Tabla 11**

*Concentraciones y volúmenes de los primers reversos de Nest-mPCR de los herpesvirus*

Mix PRIMERS	C1		V1		C2		V2	
<b>HSV-1 2R</b>	<b>10</b>	<i>mM</i>	0.35	<i>ul</i>	1	<i>mM</i>	3.5	<i>ul</i>
<b>CMV 2R</b>	<b>10</b>	<i>mM</i>	0.35	<i>ul</i>	1	<i>mM</i>	3.5	<i>ul</i>
<b>VVZ 2R</b>	<b>10</b>	<i>mM</i>	0.35	<i>ul</i>	1	<i>mM</i>	3.5	<i>ul</i>
<b>EBV 2R</b>	<b>10</b>	<i>mM</i>	0.35	<i>ul</i>	1	<i>mM</i>	3.5	<i>ul</i>
<b>Agua PCR</b>	<b>x</b>		2.1			<b>x</b>	3.5	<i>ul</i>

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Para la PCR se utilizarán los primers Herp 1F y Herp 1R en el master mix.

**Tabla 12**

*Master Mix para 1 muestra empleada para la PCR de los Herpesvirus*

Master Mix	C1		V1		C2		V2	
<b>Agua</b>	<b>X</b>	<i>GBM</i>	11.8	<i>Ul</i>		<i>GBM</i>	20	<i>ul</i>
<b>Buffer PCR (s/MgCl<sub>2</sub>)</b>	<b>10</b>	<i>X</i>	2	<i>Ul</i>	1	<i>X</i>	20	<i>ul</i>
<b>MgCl<sub>2</sub> 50Mm</b>	<b>50</b>	<i>mM</i>	0.4	<i>Ul</i>	1	<i>mM</i>	20	<i>ul</i>
<b>Mezcla dNTPs</b>	<b>25</b>	<i>mM</i>	0.4	<i>Ul</i>	0.5	<i>mM</i>	20	<i>ul</i>
<b>Herp 1F</b>	<b>10</b>	<i>uM</i>	2	<i>ul</i>	1	<i>uM</i>	20	<i>ul</i>
<b>Herp 2F</b>	<b>10</b>	<i>uM</i>	2	<i>ul</i>	1	<i>uM</i>	20	<i>ul</i>
<b>Tag Polimerasa</b>	<b>5</b>	<i>U/ul</i>	0.4	<i>ul</i>	1	<i>U/ul</i>	20	<i>ul</i>
<b>ADN / C+ / C-</b>			1	<i>ul</i>				

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

Para la Nest-PCR se utilizaran los primers Herp. 2F y Herp 2R en el master mix.

**Tabla 13***Master Mix para 1 muestra empleada en la Nest - PCR de los Herpesvirus*

Master Mix	C1		V1		C2		V2
Agua	X	GBM	17.02	ul	GBM	30	Ul
Buffer PCR (s/MgCl <sub>2</sub> )	10	X	3	ul	1	X	Ul
MgCl <sub>2</sub> 50Mm	50	mM	1.5	ul	2.5	mM	Ul
Mezcla dNTPs	25	mM	0.24	ul	0.2	mM	Ul
Primer T2	10	uM	3	ul	1	Um	Ul
Primer T3	10	uM	3	ul	1	uM	Ul
Tag Polimerasa	5	U/ul	0.24	ul	0.4	U/ul	Ul
Producto PCR		2		ul			

Fuente: (Instituto de Biomedicina, 2016)

### 2.7.10 Valores de la Amplificación

Todas las amplificaciones se visualizaron en geles de agarosa al 2,5%, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.7.7.3.1. El marcador de peso molecular utilizado fue el de 100 pb, (Invitrogen<sup>TM</sup>, Quito) y marcador de bajo peso molecular de (BioLabs<sup>®</sup>Inc, Quito).

### 2.7.11 Criterios para el diagnóstico de las muestras

El criterio para la identificación molecular de los agentes TORCH se basa en la visualización del producto de la Nest-PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.

#### 2.7.11.1 Muestras positivas para identificación del parásito *Toxoplasma gondii*.

Una muestra se valoró como positiva para la identificación de *Toxoplasma gondii*, siempre y cuando, cumpla con los criterios incluidos en la **Tabla 14**.

**Tabla 14***Criterios para identificación de muestras positivas para Toxoplasma gondii*

PCR	MUESTRA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	DIAGNOSTICO	ACCIÓN
PRIMER PRODUCTO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSO	NEST-PCR
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO		
	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO		
	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO		
PRODUCTO NEST-PCR	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	<b>MUESTRA POSITIVA</b>	FIN DE ACCIONES

**2.7.11.2 Muestras negativas para identificación del parásito *Toxoplasma gondii*.**

Una muestra se valoró como negativa para la identificación de *Toxoplasma gondii*, siempre y cuando, cumpla con los criterios incluidos en la **Tabla 15**.

**Tabla 15***Criterios para identificación de muestras negativas para Toxoplasma gondii*

PCR	MUESTRA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	DIAGNOSTICO	ACCION
PRIMER PRODUCTO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSO	NEST-PCR
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO		
PRODUCTO NEST-PCR	NEGATIVA	POSITIVO	NEGATIVA	<b>MUESTRA NEGATIVA</b>	FIN DE ACCIONES

**2.7.11.3 Muestras positivas para identificación de los Herpesvirus**

Una muestra se valoró como positiva para la identificación de Herpesvirus, siempre y cuando, cumpla con los criterios incluidos en la **Tabla 16**.

**Tabla 16***Criterios para identificación de muestras positivas para Herpesvirus*

<b>MULTIPLEX PCR</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>CONTROL POSITIVO</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>	<b>DIAGNOSTICO</b>	<b>ACCIÓN</b>
	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO		
PRIMER	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INCONCLUSO	NEST-PCR
PRODUCTO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO		
	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO		
PRODUCTO NEST-PCR	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	<b>MUESTRA POSITIVA</b>	FIN DE ACCIONES

**2.7.11.4 Muestras negativas para identificación Herpesvirus.**

Una muestra se valoró como negativa para la identificación de Herpesvirus, siempre y cuando, cumpla con los criterios incluidos en la **Tabla 17**

**Tabla 17***Criterios para identificación de muestras negativas para Herpesvirus*

<b>MULTIPLEX PCR</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>CONTROL POSITIVO</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>	<b>DIAGNOSTICO</b>	<b>ACCION</b>
PRIMER	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	INCONCLUSO	NEST-PCR
PRODUCTO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO		
PRODUCTO NEST-PCR	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	<b>MUESTRA NEGATIVA</b>	FIN DE ACCIONES

**2.7.11.5 Muestras no viables para el diagnóstico de TORCH**

Una muestra se valoró no viable para la identificación de los agentes TORCH, siempre y cuando, cumpla con los criterios incluidos en la **Tabla 18**.

**Tabla 18***Criterios para identificación de resultado inviable para los agentes TORCH*

PCR	MUESTRA	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	DIAGNOSTICO	ACCION
PRIMER PRODUCTO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	ERROR EN LA IDENTIFICACION	REPETIR PCR
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO		
	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO		
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	INCONCLUSO	NEST-PCR
	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO		
	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO		
PRODUCTO NEST-PCR	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<b>ERROR EN LA IDENTIFICACION</b>	REPETIR PCR
	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO		
	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO		
	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO		

### 2.7.12 Identificación de los agentes TORCH

Para la visualización de los agentes TORCH tanto para el *Toxoplasma gondii* como para los Herpesvirus se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 2,5% y 3% respectivamente, teñidos con bromuro de etidio como se detalla a continuación.

#### 2.7.12.1 Identificación del *Toxoplasma gondii*

- 1 Se pesó 2,5g de agarosa y se disolvió en 100ml de buffer TBE 1X.
- 2 Se calentó casi hasta ebullición en microondas por 1:30 con agitaciones cada 30 segundos.  
Hasta que la agarosa se disolvió completamente en el buffer TBE.
- 3 Se agregó 4uL de bromuro de etidio (10ug/mL) y se homogenizo. Se dejó solidificar en un molde con peine, durante 20min.

- 4 Se colocó el gel en una cubeta electroforética, y se agregó buffer TBE1X con suficiente volumen para cubrir el gel.
- 5 Se colocó 8uL de un marcador de peso molecular de 100pb en el primer pocillo de cada gel como referencia para determinar el tamaño de cada fragmento digerido.
- 6 Para cargar las muestras se utilizó 2uL de loading buffer 10X (Invitrogen) y 8uL del producto de la Nest-PCR de las muestras de Toxoplasma, cargando un total de 10uL por carril.
- 7 La electroforesis se realizó a una carga de 90V durante 50 min.
- 8 Para la visualización de los fragmentos se utilizó un foto-documentador UV.

#### **2.7.12.2 Identificación de los Herpesvirus**

- 1 Se pesó 3 g de agarosa y se disolvió en 100ml de buffer TBE 1X.
- 2 Se calentó casi hasta ebullición en microondas por 2:00 min con agitaciones cada 20 segundos. Hasta que la agarosa se disolvió completamente en el buffer TBE.
- 3 Se agregó 4uL de bromuro de etidio (10ug/mL) y se homogenizo. Se dejó solidificar en un molde con peine, durante 20min.
- 4 Se colocó el gel en una cubeta electroforética, y se agregó buffer TBE1X con suficiente volumen para cubrir el gel.
- 5 Se colocó 8uL de un marcador de peso molecular de 100pb en el primer pocillo de cada gel como referencia para determinar el tamaño de cada fragmento digerido.



- 6 Para cargar las muestras se utilizó 2uL de loading buffer 10X (Invitrogen) y 8uL del producto de la Nest-PCR de las muestras de Herpesvirus, cargando un total de 10uL por carril.
- 7 La electroforesis se realizó a una carga de 90V durante 45min posteriormente a 120 V durante 20 min.
- 8 Para la visualización de los fragmentos se utilizó un foto-documentador UV.

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS**

### **3.1 Conformación del grupo de estudio**

Esta investigación conto con la participación de 146 voluntarias, evidenciándolo mediante la firma de un consentimiento informado. Las voluntarias contestaron todas ser habitantes del Cantón Quito distribuidas de la siguiente manera; viven al sur de la ciudad el 36.3 %, el 23.29% al norte de la ciudad, 15,74% reside en el centro de la ciudad y el 24,66% vive en los sectores de los valles que comprende el Cantón Quito. La edad del grupo estuvo comprendida entre los 18 y 35 años y la edad promedio de las participantes fue 23.61 años.

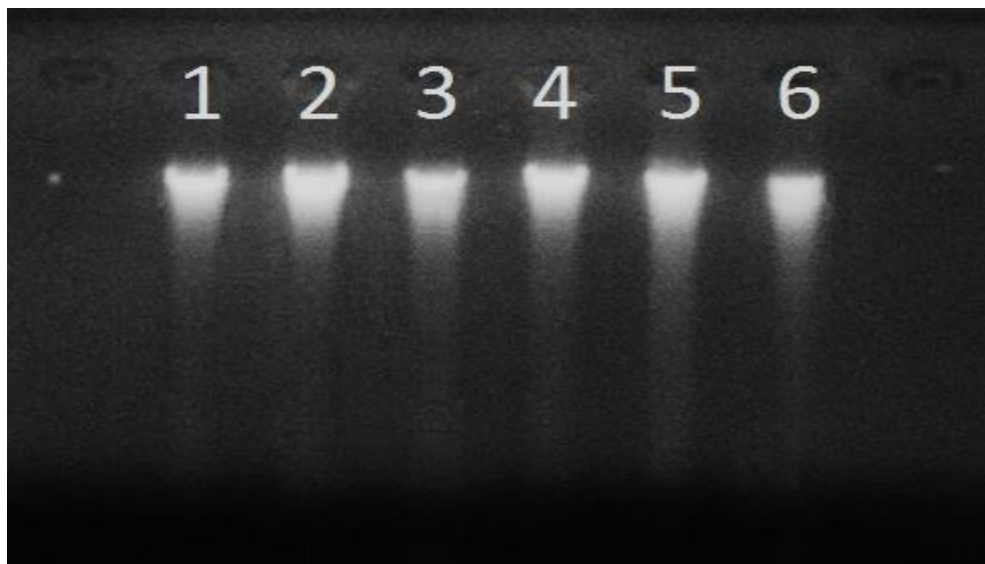
### **3.2 Ensayos preliminares de extracción de ADN con el método de Salting-Out**

Mediante varios ensayos se determinó la eficiencia del método de extracción de ADN, modificando la concentración de las sales en el método de Salting-Out, en el total de las muestras colectadas el primer día, es decir 6 muestras y así se estableció la calidad y la cantidad del material genético a ser analizado.

#### **3.2.1 Calidad de ADN obtenido a partir de sangre periférica**

El material genético obtenido de 6 muestras del grupo de estudio fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para determinar su calidad, se siguió el protocolo descrito en la sección 2.7.8.3.1.

En la **Imagen 1** se observa bandas intensas y definidas y esto nos permite validar nuestro protocolo de extracción de ADN, la intensidad y la migración de las bandas es uniforme.



**Imagen 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de muestras de ADN extraído a partir de sangre total.

Los carriles 1-6 corresponden a muestras, el carril C representa el control de extracción

### 3.2.2 Cuantificación del material genético obtenido

Para determinar la concentración de ADN, se realizó mediciones a 260 y 280 nm y utilizando estos datos en la ecuación derivada (Kalb & Bernoohr, 1977), se puede determinar la concentración de ADN, despreciando la cantidad de proteína presente.

$$N \left( \frac{ng}{ul} \right) = 60 * A_{260} - 40 * A_{280}$$

**Ecuación 1.** Ecuación utilizada para determinar la concentración de ADN

Fuente: (Kalb & Bernoohr, 1977)

Dónde: A260 y A280 son los valores de las absorbancias a 260 y 280 nanómetros de longitud de onda, y N es la concentración de ADN en ng/μl, La relación A260/A280 indica una contaminación con proteínas superior al 60% (Surzycki S. , 2000) Se obtuvieron las siguientes mediciones:

**Tabla 19**

*Mediciones espectrofotométricas y concentración de ADN en las muestras para identificación de los agentes TORCH.*

MUESTRA	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	[ ] ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
1	0.789	0.448	29.42	1.76
2	0.825	0.473	30.58	1.74
3	0.857	0.491	31.78	1.75
4	0.831	0.545	28.06	1.52
5	0.811	0.523	27.74	1.55
6	0.747	0.404	28.66	1.85
<b>PROMEDIO</b>	0.810	0.481	29.37	1.70

La columna A260 indica la absorbancia a 260nm la columna A280 indica la medición a 280nm, la columna [ ] ng/μl indica la concentración de ADN y la columna final nos indica el radio a A260/A280

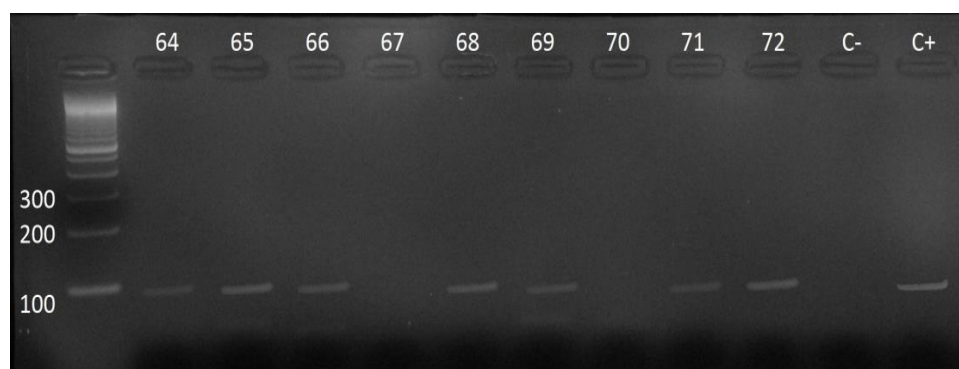
La concentración promedio de las muestras fue de 29,37ng/μl, en volúmenes de 200μl, dicha concentración de material genético permitió la amplificación de este por las técnicas de PCR.

### 3.3 Identificación Molecular de TORCH

Con los productos de la Nest-PCR y la Multiplex Nest-PCR, se corrieron las respectivas electroforesis para identificar la presencia de los agentes TORCH en las muestras del grupo de estudio.

#### 3.3.1 Identificación molecular de Toxoplasma

La identificación del ADN del parásito *Toxoplasma gondii* se realizó mediante la visualización del amplicon en un gel de agarosa al 2.5%.



**Imagen 2** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio con productos de la Nest-PCR para la identificación del agente *Toxoplasma gondii* a partir de sangre periférica.

El primer carril corresponde a un marcador de 100pb, los carriles 64 a al 72 contienen muestras, el carril C- corresponde a un control negativo, el carril C+ es un control positivo para el agente Tg que pesa 98pb.

El control positivo para la identificación de *Toxoplasma* fue obtenido de pacientes diagnosticados con Toxoplasmosis mediante pruebas inmunológicas cuyo material genético fue identificado mediante la técnica de PCR en líquido Cefalorraquídeo y se conservó muestras de

plasma y suero, en el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil UCSG.

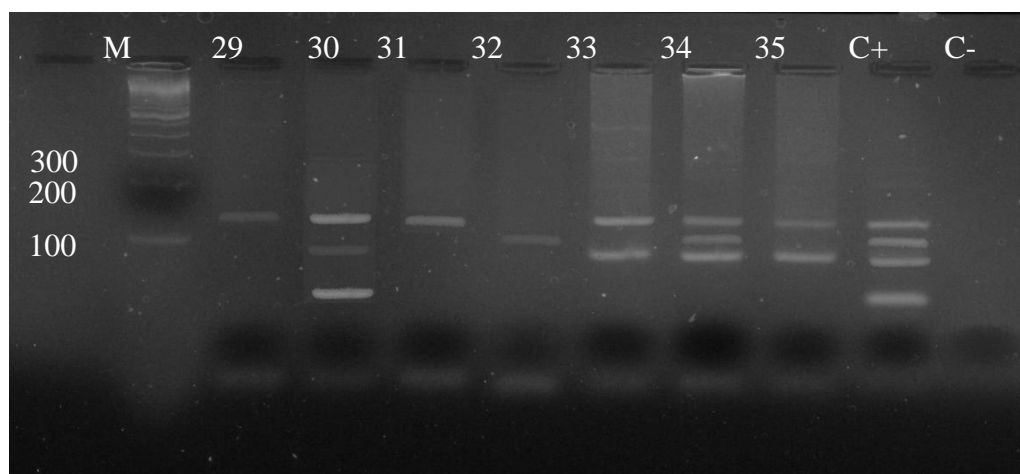
El producto de la nest-PCR de las muestras 64, 65, 66, 68, 69, 71, 72, es un fragmento de casi 100 pb, evidenciando la presencia del material genético del agente *Toxoplasma gondii* en ellas, los fragmentos identificados están comprendido por 98 pb, el Control positivo C+ también amplificó una banda de 98 pb. de mayor intensidad tal como fue previsto.

El control negativo C- no amplificó ningún fragmento validando de esta manera el protocolo descrito en la sección 2.7.9.1, las muestras 67 y 70, tampoco amplificaron fragmentos evidenciando así la ausencia del material genético del parásito *Toxoplasma gondii* en estas muestras.

En base a este análisis se reportaron como positivas para Tg las muestras 64,65,66, 68.69, 71, 72 y se reportaron como negativas las muestras 67 y 70, los controles positivo y negativo validan el protocolo para identificación del agente *Toxoplasma gondii* mediante la técnica de la Nest-PCR.

### 3.3.2 Identificación molecular de Herpesvirus

La identificación del ADN de los Herpesvirus se realizó mediante la visualización de un gel sometido a electroforesis según se establecido en la sección 2.7.12.2.



**Imagen 3** Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio con productos de la Nest-PCR para la identificación de Herpesvirus a partir de sangre periférica.

El primer carril corresponde a un marcador de 100pb, los carriles 29 a al 35 contienen muestras, el carril C+ es un control positivo para los Herpesvirus, sus pesos son para VHS 140pb, VVZ 120pb, CMV 98 pb y VEB 66pb mientras que el carril C- corresponde a un control negativo,

El control positivo es un pool de muestras positivas en la identificación de Herpesvirus, el control de VHS y CMV fue obtenido de pacientes herpéticos diagnosticados mediante pruebas inmunológicas en el hospital Inmunológico Luis Vernaza de la ciudad de Guayaquil cuyo material genético fue identificado mediante la técnica de PCR en sangre total, el virus varicela zooster VVZ se obtuvo de una muestra de una paciente diagnosticada con Herpes zooster activo en chequeo médico de rutina en la ciudad de Guayaquil, el VEB se obtuvo de un paciente

diagnosticado con el linfoma de Burk en el Instituto de Biomedicina de la UCSG, de quienes se conservó muestras de plasma y suero, en el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil UCSG.

El producto de la Nest-PCR de las muestras 29, 30, 31, 33, 34, 35 comprenden amplicones correspondientes al fragmento superior del control positivo, este fragmento tiene 140 pb y corresponde al virus herpes simple tipo 1 HSV-1, las muestras 32, 34 tienen amplicones correspondientes al segundo fragmento desde la parte superior del control positivo cuyo peso molecular es 120 pb y corresponde al agente varicella zooster virus VVZ, las muestras 30, 33, 34, 35 tienen amplicones de alrededor de 100 pb correspondiente al Citomegalovirus que pesa 98 pb, la muestra 30 finalmente también amplifica otro fragmento correspondiente al amplicon inferior del control positivo que pesa 66pb y corresponde al Epstein-Barr virus EBV, el Control positivo C+ está comprendido por cuatro amplicones como fue previsto.

El control negativo C- no amplificó ningún fragmento validando de esta manera el protocolo descrito en la sección 2.7.9.2,

En base a este análisis se reportaron como positivas para herpesvirus todas las muestras analizadas, divididas de la siguiente manera la muestra 29 es positiva para HSV-1, la muestra 30 es positiva para HSV-1, CMV, y EBV, la muestra 31 es positiva para HSV-1, la muestra 32 es



positiva para VVZ, las muestra 33 y 35 son positivas para HSV-1 y CMV, la muestra 34 se identificó como positiva para HSV-1, VVZ y CMV.

### 3.4 Prevalencia de TORCH encontrada

Se analizaron 146 muestras procedentes de mujeres de edad fértil del cantón Quito, para la identificación del material genético de los agentes TORCH, de las cuales 131 muestras de voluntarias se diagnosticaron como positivas, equivalente al 90% de la población de estudio, según se detalla en la **Tabla 20**.

**Tabla 20**

*Prevalencia de TORCH, en base a los casos positivos del presente estudio*

CASOS POSITIVOS		
AGENTES	CASOS	PORCENTAJE
TOXOPLASMA	76	52.05%
HERPESVIRUS	118	80.82%
Tg + Herpesvirus	131	89.73%

### 3.4.1 Prevalencia de Toxoplasma

De las 146 muestras analizadas se identificó material genético del agente *Toxoplasma gondii* en 76 muestras que corresponde al 52.1% del total de la población, las muestras se distribuyeron según la **Tabla 21**.

**Tabla 21**

*Prevalencia de Toxoplasma gondii por zonas y edades*

<b>Prevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i></b>					
	POBLACION	MUESTRAS	CASOS POSITIVOS	% DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA	% DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS
ZONAS	SUR	53	22	41.5%	28.9%
	CENTRO	23	16	69.6%	21.1%
	NORTE	34	17	50.0%	22.4%
	VALLES	36	21	58.3%	27.6%
<b>TOTAL ZONAS</b>		<b>146</b>	<b>76</b>	<b>52.1%</b>	<b>100.0%</b>
EIDADES	18-22	65	18	27.7%	23.7%
	23-27	60	41	68.3%	53.9%
	28-31	13	9	69.2%	11.8%
	32-35	8	8	100.0%	10.5%
<b>TOTAL EIDADES</b>		<b>146</b>	<b>76</b>	<b>52.1%</b>	<b>100.0%</b>

La columna MUESTRAS obedece al numero de muestras totales por cada zona y por cada grupo de edad, la columna CASOS POSITIVOS refiere al numero de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, en la columna % DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA se refleja el porcentaje del total de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, mientras que en la columna % DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS se muestran los porcentajes del total de casos positivos por cada zona y grupo de edades

De los 146 muestras analizadas, se identificó 76 muestras positivas para el agente *Toxoplasma gondii* correspondientes al 52.1% de la población total, de las muestras positivas se identificó que el 28,9% provienen del sur de la ciudad, el 27,6% corresponde a voluntarias de los valles, el 21.1% y el 22.4% corresponden a voluntarias del centro y sur de la ciudad, mientras que el 100% de las voluntarias con edades entre 32-35 años son positivas para el agente toxoplasma, el 69,2% de muestras de voluntarias en edades comprendidas entre 28-31 años, el 68,3% de las voluntarias entre 23 -27 son positivas para toxoplasma, mientras que en el 27.7% de las muestras de voluntarias de 18 – 22 años también se diagnosticaron como positivas para el agente *Toxoplasma gondii*.

El 100% de las muestras de mujeres de 32 a 35 años se diagnosticaron como positivas para *Toxoplasma gondii*, pero estas muestras positivas apenas representan el 10.5% de las muestras positivas totales, mientras que el 53,9% de las muestras positivas corresponden a mujeres voluntarias en edades entre 22 a 27 años.

### **3.4.2 Prevalencia de Herpesvirus**

Se identificó la presencia de material genético de herpesvirus en las muestras analizadas, los cuales se distribuyeron según el siguiente análisis.

#### **3.4.2.1 Prevalencia de Herpes simple Tipo 1**

**Tabla 22***Prevalencia de Herpes simplex virus Tipo 1 por zonas y edades.*

<b>Prevalencia de Herpes Simple Tipo 1 HSV-1</b>					
	POBLACION	MUESTRAS	POSITIVO	% DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA	% DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS
ZONAS	SUR	53	33	62.3%	37.1%
	CENTRO	23	15	65.2%	16.9%
	NORTE	34	19	55.9%	21.3%
	VALLES	36	22	61.1%	24.7%
<b>TOTAL ZONAS</b>		<b>146</b>	<b>89</b>	<b>61.0%</b>	<b>100.0%</b>
EIDADES	18-22	65	35	53.8%	39.3%
	23-27	60	40	66.7%	44.9%
	28-31	13	10	76.9%	11.2%
	32-35	8	4	50.0%	4.5%
<b>TOTAL EIDADES</b>		<b>146</b>	<b>89</b>	<b>61.0%</b>	<b>100.0%</b>

La columna MUESTRAS obedece al numero de muestras totales por cada zona y por cada grupo de edad, la columna CASOS POSITIVOS refiere al numero de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, en la columna % DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA se refleja el porcentaje del total de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, mientras que en la columna % DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS se muestran los porcentajes del total de casos positivos por cada zona y grupo de edades.

Se identificó 89 muestras positivas para el Herpesvirus simple Tipo 1 correspondientes al 61.% de las muestras totales, el porcentaje de población con mayor incidencia para el HSV – 1 está comprendida entre 28 a 31 años, le sigue la población comprendida entre 21 – 27 años con un 66.7%, con un 53.8% está comprendida la población entre 18 a 22 años, y finalmente el 50% de la población de 32 a 35 años tiene Herpes virus simple tipo 1, aunque cabe recalcar que el

44,9% de las muestras positivas corresponden a mujeres de edades comprendidas entre los 23 a 27 años, siendo la población con mayor riesgo de contraer HSV-1, la población positiva para HSV-1 de 32 a 35 años apenas representa el 4,5% de las muestras positivas totales.

### 3.4.2.2 Prevalencia de Citomegalovirus

**Tabla 23**

*Prevalencia de Citomegalovirus por zonas y edades*

<b>Prevalencia de Citomegalovirus CMV</b>					
	POBLACION	MUESTRAS	POSITIVO	% DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA	% DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS
ZONAS	SUR	53	20	37.7%	37.7%
	CENTRO	23	8	34.8%	15.1%
	NORTE	34	12	35.3%	22.6%
	VALLES	36	13	36.1%	24.5%
<b>TOTAL ZONAS</b>		<b>146</b>	<b>53</b>	<b>36.3%</b>	<b>100.0%</b>
EIDADES	18-22	65	20	30.8%	37.7%
	23-27	60	25	41.7%	47.2%
	28-31	13	7	53.8%	13.2%
	32-35	8	1	12.5%	1.9%
<b>TOTAL EIDADES</b>		<b>146</b>	<b>53</b>	<b>36.3%</b>	<b>100.0%</b>

La columna MUESTRAS obedece al numero de muestras totales por cada zona y por cada grupo de edad, la columna CASOS POSITIVOS refiere al numero de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, en la columna % DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA se refleja el porcentaje del total de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, mientras que en la columna % DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS se muestran los porcentajes del total de casos positivos por cada zona y grupo de edades.

Se diagnosticaron como positivas de Citomegalovirus a 53 muestras, y se destaca que el porcentaje de muestras positivas por zonas es el siguiente, el 37.7% corresponde al Sur de Quito, el 34.8% al Centro de Quito, el 35.3% al norte de la ciudad y el 36.1% corresponde a parroquias rurales del DMQ, en términos generales la mayor concentración de muestras positivas para Citomegalovirus corresponde a la población del sur de la ciudad con un 37.7%, seguida por las muestras que provienen de parroquias rurales con un 24.5%, la menor concentración de CMV está en el centro de la ciudad que representa apenas al 15.1% de las muestras positivas totales.

De un total de 60 muestras que corresponden a mujeres de 23 a 27 años, 25 fueron diagnosticadas como positivas lo que representa el 41.7% de esta población, pero que representa el 47.2% de las muestras positivas totales para CMV, apenas se diagnosticó a 1 muestra de 8 como positiva en la edad comprendida entre 32 – 35 años, lo que representa el 12.5% de esta población pero apenas representa el 1.9% del total de casos positivos para este herpesvirus.

### 3.4.2.3 Prevalencia de Epstein Barr Virus EBV

**Tabla 24**

*Prevalencia de Epstein Barr virus por zonas y edades'*

Prevalencia de Epstein Barr Virus EBV					
POBLACION	MUESTRAS	POSITIVO	% DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA	% DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS	
ZONAS	SUR	53	8	15.1%	40%
	CENTRO	23	3	13.0%	15%
	NORTE	34	2	5.9%	10%
	VALLES	36	7	19.4%	35%
<b>TOTAL ZONAS</b>	<b>146</b>	<b>20</b>	<b>13.7%</b>	<b>100%</b>	

E <span>DADES</span>	18-22	65	6	9.2%	30%
	23-27	60	8	13.3%	40%
	28-31	13	2	15.4%	10%
	32-35	8	4	50.0%	20%
<b>TOTAL EDADES</b>		<b>146</b>	<b>20</b>	<b>13.7%</b>	<b>100%</b>

La columna MUESTRAS obedece al numero de muestras totales por cada zona y por cada grupo de edad, la columna CASOS POSITIVOS refiere al numero de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, en la columna % DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA se refleja el porcentaje del total de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, mientras que en la columna % DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS se muestran los porcentajes del total de casos positivos por cada zona y grupo de edades.

Se identificaron 20 muestras para el Epstein-Barr virus lo que corresponde al 13.7% del total de la población de estudio, en el sur de la ciudad un total de 8 muestras se diagnosticaron como positivas, representando el 15.1% de la población del sur de la ciudad pero representa el 40% del total de muestras positivas, el 13% de la población del centro de la ciudad se diagnosticó como positiva y representan el 15% del total de casos positivos, el 5.9% de la población estudiada del norte de la ciudad tiene EBV y representa el 10% de las muestras positivas totales, mientras que en el 19.4% de la muestra correspondiente a los valles se identificó EBV, y representa el 35 % del total de casos positivos.

El 50% de las muestras de mujeres de 32 a 35 años se diagnosticaron como positivas para EBV, el 15.4% de muestras de entre 28 a 31 años es positiva, al igual que el 13.3% de la

población de entre 23 y 27 años y el 9.2% de la población de entre 18 a 22 años, el 70% del total de muestras positivas corresponde a muestras de voluntarias de edades de entre 18 a 27 años, mientras que el 30% restante corresponde al resto de muestras.

#### 3.4.2.4 Prevalencia de Varicella zooster virus VVZ

**Tabla 25**

*Prevalencia de Varicella zooster virus por zonas y edades*

<b>Prevalencia de Virus Varicella zooster VVZ</b>					
<b>POBLACION</b>	<b>MUESTRAS</b>	<b>POSITIVO</b>	<b>% DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA</b>	<b>% DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS</b>	
ZONAS	SUR	53	13	24.5%	39.4%
	CENTRO	23	6	26.1%	18.2%
	NORTE	34	7	20.6%	21.2%
	VALLES	36	7	19.4%	21.2%
<b>TOTAL ZONAS</b>	<b>146</b>	<b>33</b>	<b>22.6%</b>	<b>100.0%</b>	
EIDADES	18-22	65	10	15.4%	30.3%
	23-27	60	13	21.7%	39.4%
	28-31	13	5	38.5%	15.2%
	32-35	8	5	62.5%	15.2%
<b>TOTAL EIDADES</b>	<b>146</b>	<b>33</b>	<b>22.6%</b>	<b>100.0%</b>	

La columna MUESTRAS obedece al número de muestras totales por cada zona y por cada grupo de edad, la columna CASOS POSITIVOS refiere al número de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, en la columna % DE CASOS POSITIVOS POR MUESTRA se refleja el porcentaje del total de casos positivos en cada zona y en cada grupo de edad, mientras que en la columna % DEL TOTAL DE CASOS POSITIVOS se muestran los porcentajes del total de casos positivos por cada zona y grupo de edades.



Se identificaron 33 muestras con Varicella Zooster que representa el 22.6% de las muestras totales analizadas, donde el 39% del total de muestras positivas provenía del sur de Quito, el 18,2% del Centro de la ciudad, y el 21.2% provenía tanto del norte de la ciudad como de los valles aledaños.

En base a los grupos de edades se identificó que el 15.4% de la población de edad 18-22 años tiene VVZ, el 21.7% de la edad 23-27 años también es positiva al igual que el 38.5% de la población de 28 a 31 años, mientras que el 62% de la población de 32 a 35 años es positiva a VVZ. De las muestras positivas el 39,4% correspondía a muestras de voluntarias de 23 a 27 años, identificando a esta edad como la de mayor concentración de VVZ.

### **3.5 Coinfecciones TORCH encontradas**

Se realizó la determinación de coinfecciones en las 146 muestras procedentes de voluntarias de edad fértil y de diferentes zonas del cantón Quito,

**Tabla 26**  
*Coinfecciones TORCH identificadas por zonas y edades.*

AGENTES		CASOS	ZONAS				EDADES			
			SUR	CENTRO	NORTE	VALLES	18-22	23-27	28-31	32-35
Tg	HSV1	39	11	8	8	12	5	24	6	4
	CMV	22	4	5	4	9	0	16	4	2
	VVZ	18	8	2	2	6	1	8	4	5
	EBV	13	5	2	1	5	0	7	2	4
HSV-1	CMV	53	20	8	12	13	20	25	7	1
	VVZ	22	9	5	2	6	6	9	4	3
	EBV	18	7	3	1	7	6	6	2	4
CMV	VVZ	14	4	3	2	5	4	6	3	1
	EBV	10	4	2	1	3	4	4	1	1
VVZ	EBV	10	4	1	1	4	2	3	2	3
<b>COINFECCION DOBLE</b>		<b>219</b>	<b>76</b>	<b>39</b>	<b>34</b>	<b>70</b>	<b>48</b>	<b>108</b>	<b>35</b>	<b>28</b>
Tg / HSV-1	CMV	21	4	5	4	8	3	13	4	1
	VVZ	12	6	1	0	5	0	6	3	3
	EBV	12	4	2	1	5	0	6	2	4
Tg / CMV	VVZ	7	4	1	0	2	0	4	2	1
	EBV	6	2	2	1	1	0	4	1	1
Tg / VVZ	EBV	7	4	0	0	3	0	2	2	3
HSV-1 / CMV	VVZ	14	4	3	2	5	4	6	3	1
	EBV	10	4	2	1	3	4	4	1	1
HSV / VVZ	EBV	9	4	1	0	4	2	2	2	3
CMV / VVZ	EBV	6	2	1	0	3	2	2	1	1
<b>COINFECCION TRIPLE</b>		<b>104</b>	<b>38</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>39</b>	<b>15</b>	<b>49</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
Tg / HSV-1	CMV / VVZ	7	2	1	0	4	0	4	2	1
	CMV / EBV	6	2	1	1	2	0	4	1	1
	VVZ / EBV	7	4	0	0	3	0	2	2	3
Tg / CMV	VVZ / EBV	4	2	0	0	2	0	2	1	1
HSV-1 / CMV	VVZ / EBV	6	2	1	0	3	2	2	1	1
<b>TOTAL CUADRUPLE</b>		<b>30</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
Tg	HERPES	4	2	0	0	2	0	2	1	1
<b>TOTAL COINFECCIONES</b>		<b>357</b>	<b>128</b>	<b>60</b>	<b>44</b>	<b>125</b>	<b>65</b>	<b>173</b>	<b>64</b>	<b>55</b>

En la columna AGENTES, podemos identificar la combinacion de agentes en la coinfeccion, la columna CASOS obedece al numero de coinfecciones según la combinacion de agentes, la columna ZONA se identifican los casos de coinfecciones por cada zona de Quito y en la columna EDAD, se identifican las coinfecciones existentes en cada grupo de edad.

De los 357 coinfecciones identificadas, 219 casos equivalente al 61.3%, son causadas por dos agentes, la mayoría de estas provenían de muestras del sur de la ciudad y de los valles en edad comprendida entre los 23 y 27 años.

Las coinfecciones entre tres agentes representan el 29.1% con 108 casos, donde la mayoría de las muestras provino del sur y de los valles aledaños y se concentraron en edades comprendidas entre los 23 y 27 años.

Se registraron 30 casos de coinfecciones cuádruples equivalente al 8.4% donde nuevamente la mayor concentración de estas fue en el sur de la ciudad y en los valles aledaños en edades comprendidas entre 23 a 27 años.

Apenas el 1.1% de las muestras analizadas correspondientes a 4 muestras registro una coinfección total con los agentes TORCH analizados, las muestras provinieron del sur de la ciudad y de los valles aledaños, únicamente en el grupo más joven de estudio de 18 a 22 años no se registraron estas coinfecciones.

### 3.6 Ausencia de TORCH en las muestras

Existieron varias muestras diagnosticadas positivas para algún agente TORCH, y negativas para otros, las muestras con ausencia total de los agentes TORCH se detallan en la

**Tabla 27.**

**Tabla 27**

*Muestras negativas para TORCH identificadas por zonas y edades.*

MUESTRAS NEGATIVAS									
DIAGNOSTICO	CASOS	ZONAS				EDADES			
		SUR	CENTRO	NORTE	VALLES	18-22	23-27	28-31	32-35
TORCH NEGATIVO	15	7	0	3	8	14	1	0	0

En la columna DIAGNOSTICO, podemos identificar la identificación negativa de los agentes TORCH, la columna CASOS obedece al número de casos negativos para los agentes TORCH en la población total, en las columnas ZONA se identifican los casos diagnosticados negativos por cada zona de Quito y en las columnas EDAD, se identifican las muestras negativas existentes en cada grupo de edad.

De las 146 muestras analizadas 15 equivalente al 10.3% se diagnosticaron negativas para todos los agentes TORCH, la mayoría de los casos se registraron en el sur y en los valles aledaños, la edad donde se concentró casi la totalidad de los casos fue de 18 a 22 años, con 14 casos.

## CAPÍTULO 4: DISCUSION

### 4.1 Extracción de ADN

Se observó mayor concentración de material genético en las bandas electroforéticas cuando se aumentó la concentración de NaCl de 4M a 5M que comprende el buffer de lisis de eritrocitos para los lavados iniciales, debido a que la población de estudio pertenecía a la ciudad de Quito donde existe en sus habitantes una mayor concentración de hemoglobina por aumento de glóbulos rojos (Gonzales, Tápia, & Gavilanes, 2013), de tal manera al aumentar la concentración en el buffer de eritrocitos se liberó de manera más rápida la hemoglobina en menos lavados, evitando así que la misma afecta al proceso de extracción de ADN.

Debido a que la molécula de ADN presenta una absorbancia máxima a 260nm y las proteínas presentan una absorbancia máxima a 280 nm. (Kalb & Bernoohr, 1977) determinaron el grado de contaminación del material genético mediante una relación entre  $A_{260}/A_{280}$ . Un radio de 2.0 indica que no existe contaminación con proteína en la muestra, mientras que una relación entre 1.8 y 1.9 indica una contaminación con proteína del 60% y 40% respectivamente (Surzycki S. , 2000)

La concentración real de ADN de las muestras se calculó en base a la ecuación de Kalb y Bernoohr que corresponde a la Ecuación 1. Esta ecuación, nos permite una determinación más

exacta al radio A260/A280. La concentración promedio de ADN a partir de sangre periférica fue de 29.37ng/μl, esta concentración es aceptable para iniciar la PCR y la subsecuente Nest-PCR para la identificación de los agentes TORCH

El radio A260/A280 promedio de las seis muestras analizadas fue de 1.70 ng/ul, según se indica en la **Tabla 19**, los valores son homogéneos y nos permite afirmar que la contaminación del material genético con proteínas es mayor al 60%, las misma no afecto la amplificación de material genético en la Nest-PCR

## **4.2 Prevalencia de TORCH**

Para identificar la presencia de los agentes TORCH se realizaron dos Nest-PCR, una para la identificación del parásito Toxoplasma y una Multiplex Nest-PCR para los Herpesvirus, se identificó la presencia de material genético de al menos un agente en 131 muestras correspondiente al 90% de la población de estudio, esta información concuerda con otras investigaciones como las realizadas por (Apt, 2014), (Bialas, Swamy , & Permar, 2015), en las que se afirma que la prevalencia de al menos uno de los agentes puede llegar hasta el 98% en algunas regiones del mundo.

#### 4.2.1 Prevalencia de *Toxoplasma*

Se determinó la presencia de *Toxoplasma gondii* mediante la amplificación de un fragmento de 98pb por medio de una Nest-PCR, se determinó que 76 muestras son positivas para *Toxoplasma gondii* que corresponden al 52.1% de las muestras analizadas indicada en la **Tabla 20**, según el estudio de (Jacome & Narváez, 2014). En América Latina la prevalencia de *Toxoplasma gondii* varía entre el 38 y el 62 % de la población mayor de 25 años.

Si bien la prevalencia de *Toxoplasma* en este estudio concuerda con los reportados por (Jacome & Narváez, 2014) (Costa, Monsalve, & Castellano, 2014) (Etheredge & Mortensen, 2015), es una cifra alta para una ciudad sobre los 2700 msnm, donde la temperatura promedio es 17°C, debido a que las prevalencias altas de toxoplasma son más frecuentes en zonas tropicales con temperaturas mayores a 25°C, pudiendo esta prevalencia verse influenciada por otras causas como el nivel socio-económico, hábitos alimenticios según (Durlach, Kaufer, Carral, Freuler, & Ceriotto, 2015).

De los 76 casos positivos para toxoplasma el 67% provenía de las zonas sur y valles, mientras que el 33% restante pertenecía al norte y centro de la ciudad, según el MSP, la mayor concentración de gatos entre domésticos y no domésticos en Quito se encuentran al sur de la ciudad y en zonas rurales (PP Digital, 2016), en base a esto podemos indicar que existe una relación directa aunque no comprobada entre el número de gatos en algunas zonas de la ciudad

con el *Toxoplasma gondii*, por el pobre saneamiento ambiental y la eliminación de excretas de los felinos y el nivel socioeconómico (Lalama, 2014).

La mayor prevalencia de *Toxoplasma* se identificó en voluntarias en edad de 31 a 35 años donde se estableció que el 100% de las muestras tienen *Toxoplasma* seguido por el 69,2% de las voluntarias en edades entre 28 a 31 años, el 68,3% de pacientes entre 22 y 27 años y apenas el 27.8% de las voluntarias entre 18 a 21 años de edad, esto nos permite afirmar que el riesgo de contraer toxoplasma se incrementa con el avance de la edad, tal como indica (Apt, 2014).

#### **4.2.2 Prevalencia de Herpesvirus**

Para identificar la presencia de los Herpesvirus se realizó la amplificación de varios fragmentos correspondientes a cuatro especies de herpesvirus mediante una multiplex PCR y una posterior Multiplex Nest-PCR, se identificó la presencia de material genético de al menos una especie de herpes en 118 de 146 muestras, es decir en un 80,82% de la población de estudio, según (OMS, 2015) la prevalencia de herpes en países en vías de desarrollo como el Ecuador es de 67 a 98% en la población general, estos valores se incrementan en población femenina con un nivel socioeconómico bajo y la actividad sexual de la población.

La alta prevalencia de los herpes virus en el grupo de estudio podría indicar que existe un gran problema con los programas de educación para evitar enfermedades de contagio directo, y posteriormente afectar a un gran grupo de mujeres durante un embarazo futuro debido a que los



herpes virus son virus oportunistas que afectan principalmente a la población femenina y que pueden reactivarse en etapas de inmunodepresión o en algunas etapas del embarazo (Alfaro, 2013)

#### **4.2.2.1 Prevalencia de Herpes simple Tipo 1**

Mediante la amplificación de un fragmento de 140 pb posterior a una Multiplex Nest-PCR se identificó la presencia del agente Herpes virus Tipo 1 en 89 muestras que corresponden al 61% de la población de estudio, según la OMS, el 86% de la población mundial está infectada por el virus del herpes simple de tipo 1 (OMS, 2015), siendo más frecuente en países de clima tropical donde puede alcanzar hasta un 90% de prevalencia, en ciudades andinas se estima que entre el 60 y el 70% de la población ha presentado alguna infección bucal producida por el HSV-1 (Barrientos, Velosa, & Rodríguez, 2014), colocando a Quito con estos resultados como una de las ciudades con menor prevalencia en la región.

La mayor prevalencia de herpes según la investigación de (Barrientos, Velosa, & Rodríguez, 2014) se encuentra en la población con edad comprendida entre 22 – 27 años con el 39% de casos positivos, mientras que en la investigación presente se determinó el 44.% para ese rango de edad, en base a esto podemos decir que Quito tiene la mayor prevalencia de HSV-1 en la población de 22 a 27 años y que según las estadísticas es el periodo de edad donde ocurre el mayor número de embarazos en el Ecuador con un 52% según (INEC en colaboración con ONU

Mujeres, 2014), esto nos lleva a afirmar que existe una gran probabilidad de la activación del HSV-1 en mujeres embarazadas entre 20 y 29 años.

La mayor concentración de casos positivos para el HSV-1 fue en las edades comprendidas entre 18 y 27 años representando casi el 80% del total de los casos según la **Tabla 22**, estos datos concuerdan con investigaciones como la de (Barrientos, Velosa, & Rodríguez, 2014), donde se manifiesta que el HVS-1 actualmente es más frecuente en poblaciones jóvenes principalmente entre los 17 y 25 años debido al inicio de relaciones sentimentales a edades más tempranas con quienes se intercambian secreciones como saliva, el cual es el principal vector de contagio para el HSV-1 (Cofré, Delpiano, Labraña, & Reyes, Síndrome de TORCH: enfoque racional del diagnóstico y tratamiento pre y post natal. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Neonatales , 2016).

#### **4.2.2.2 Prevalencia de Citomegalovirus**

La prevalencia de CMV en el grupo de estudio fue de 36%, este valor es menor al reportado por (Cannon, Schmid, & Hyde, 2012) y (Lereuz-Ville, Magnay, & Courdec, 2017) que en la población general latina, la prevalencia de CMV varía entre el 40 y 60%, pudiendo llegar entre el 80 y 100% en población de nivel socio económico bajo, esto puede deberse a que las muestras se obtuvieron de voluntarias en su mayoría universitarias de las carreras de medicina, lo que sugiere que la muestra en su mayoría correspondería a mujeres que corresponden a un nivel

socio económico medio alto, principalmente porque un número muy bajo de estudiantes de nivel socio económico bajo accede a carreras universitarias en América latina (Carrasco & Espinoza, 2014), (Marin, Carvalho, & Sousa, 2016).

A diferencia de los demás herpesvirus el CMV se lo puede adquirir a lo largo de toda la vida y el riesgo de contraerlo aumenta con la edad (Monto, 2011), (Marin, Carvalho, & Sousa, 2016), se reactiva en etapas de inmunodepresión, la infección por CMV es común entre mujeres de edad fértil, su prevalencia oscila entre 45 y 100 (Lanzieri, Dollard, & Bialeik, 2014), pudiendo afectar a la madre y el feto en el embarazo (Contreras, Escaff, Salinas, & Saavedra, 2005) (Manicklal, Van Niekerk, & Kroon, 2015), por lo cual en Quito es necesario fortalecer programas de planificación familiar donde se incluya el diagnóstico del CMV antes y durante el embarazo.

Alrededor del 85% de casos positivos para CMV están comprendidos en las edades de 18 a 27 años, según la **Tabla 24**, esto sugiere que si bien es cierto el CMV se puede adquirir a lo largo de la vida, actualmente está apareciendo en edades más tempranas y afectando principalmente a mujeres en edad fértil.

#### 4.2.2.3 Prevalencia de Varicela Zooster Virus.

Para la identificación del virus de la varicela zooster se amplificó un fragmento de 120 pb mediante la técnica de Multiplex Nest-PCR, donde se identificaron 33 casos positivos que representa el 22.6% de la población de estudio, según un estudio de (Miranda, Farfán, Barrientos, & Lara, 2013) en Perú el 80% de los casos de varicela corresponden a varicela infantil (0-5 años) y el 20% son casos de herpes zooster. La prevalencia en Perú alcanza hasta el 27% y en México alcanza hasta un 30% en la población general (Vasquez, Cravioto, & Guarneros, 2017), en contraste este estudio reporta una prevalencia menor.

La prevalencia de este virus ha disminuido en América Latina debido al sistema de vacunación gratuita y obligatorio contra la varicela por parte de los gobiernos como los de Colombia, Argentina, Brasil, Ecuador, Paraguay, Uruguay, Costa Rica, Estados Unidos, Japón, Alemania, Grecia (Diario La Republica, 2016).

Según la (OPS, 2016), los programas de inmunización contra varios agentes virales dio inicio en 1975, en el Ecuador se presume que entre el 85 a 90% de menores de 5 años fue inmunizado hasta 1985 y hasta el año 1995 se obtuvo entre 95% al 99% de menores de 5 años, la eficiencia clínica de la vacuna para la varicela zooster (CEPA AOK) alcanza entre el 70 y 100%, y brinda inmunidad por más de 25 años (MSP, 2015). Las voluntarias de este estudio nacieron entre los años de 1980 a 1995 periodo en el cual el programa de inmunización estaba

desarrollado, partiendo de que la eficiencia de la vacuna varía entre el 70 al 100% se considera que el 22% de prevalencia en las muestras obtenidas están acorde a la realidad nacional y al programa de vacunación.

La dosis de cepa AOK contra la varicela son exclusivamente para la inmunización mediante la generación de anticuerpos, en esta vacuna se utiliza un virus atenuado eliminando los genes de la virulencia (AEP, 2014) el fragmento amplificado de 120 pb en este estudio corresponde a un segmento de la cadena corta del VVZ relacionado con la virulencia y replicación de la misma, por lo tanto el producto de la PCR no hace referencia a un fragmento amplificado de la vacuna, evitado falsos positivos.

#### **4.2.2.4 Prevalencia de Epstein Barr Virus**

En los países occidentales, al menos el 90% de la población mayor de 40 años tiene inmunidad frente a este virus (Crespo & Paniagua, 2014) habiéndose adquirido en la gran mayoría de las veces a través de una infección por secreciones orales y por transmisión vertical de madre a hijo durante el embarazo (Ramos & Pérez , 2015), si bien la prevalencia de este virus en esta investigación alcanza el 13.7%, se debe a que la carga viral necesaria para la identificación por la técnica de PCR debe ser alta, es decir solo identificaría el material genético de pacientes con EBV activos o terminando el proceso infeccioso.

El EBV es el causante de más del 40% de abortos en gestantes debido a la transmisión vertical en las primeras 16 semanas de embarazo (Ramos & Pérez , 2015), por lo tanto el diagnóstico de este virus es importante cuando se planifique un embarazo a corto tiempo.

Según (Crespo & Paniagua, 2014) la población con mayor riesgo de contraer EBV son los jóvenes entre 16 y 25 años debido a que en promedio en esta edad se incrementan las relaciones sentimentales con intercambio de secreciones bucales, esta afirmación concuerda con la investigación presente debido a que alrededor del 70% de los casos positivos correspondían a este periodo de edad.

#### **4.3 Coinfecciones TORCH encontradas**

El *Toxoplasma gondii* y el HSV-1 son los agentes TORCH con mayor prevalencia reportados a nivel mundial (Apt, 2014) , en esta investigación se reportaron 39 casos de coinfección entre Tg y HSV-1, siendo la coinfección entre un parásito y virus más frecuente dentro del TORCH (Cofré, Delpiano, Labraña, & Reyes, 2016), al ser Quito la capital de un país ubicado en la zona tórrida las probabilidades de adquirir Tg aumenta, al igual que el HSV-1 que es herpesvirus con mayor prevalencia en países de la zona tórrida (Sánchez, Monsalve, Estevez, & Aguilar, 2016).

Las condiciones que facilitan la proliferación de estos agentes en común es el estrato socioeconómico bajo (Luchsinger, Luzoro, & Martínez, 2015), debido a que en estas zonas aumenta la probabilidad de consumir carne de animales con toxoplasmosis (Dubey & Jones, 2015) y existe mayor probabilidad de contraer algún tipo de herpesvirus (Marin, Carvalho, & Sousa, 2016), las zonas del cantón Quito donde existe una mayor concentración de animales son las afueras del Distrito Metropolitano de Quito, y que en su mayoría se encuentran en el sur de la ciudad y en los valles aledaños, y es justamente en estas zonas donde se concentra la mayor cantidad de casos reportados para esta coinfección según la **Tabla 26**.

La coinfección más frecuente entre dos agentes del TORCH fue la de HSV-1 y CMV, con 53 casos, siendo la población más vulnerable entre las edades de 18 a 27 años de edad, según la **Tabla 26**, y es justamente el periodo de mayor fertilidad de la mujer (Gracia, 2015), por lo cual los riesgos de infecciones TORCH causadas por estos dos agentes se incrementan y ponen en riesgo tanto a la madre como al feto en el embarazo.

La coinfección HSV-1 y CMV puede verse influenciada debido a que el HSV-1 se lo adquiere principalmente en los primeros años de vida (Tunbäck, Bergstöm, & Claesson, 2007), mientras que el CMV se lo puede adquirir a lo largo de toda la vida en periodos de inmunodepresión (Monto, 2011) y es el CMV después del HSV-1 el herpesvirus con mayor prevalencia a nivel mundial. (Bialas, Swamy, & Permar, 2015).

A medida que aumenta los agentes en las coinfecciones disminuyen las mismas, puesto que se necesitan que se cumplan varias condiciones para que el agente oportunista ingrese al huésped como son, edad, sexo, hábitos alimenticios, factores socioeconómicos, e incluso el número de parejas sentimentales. (Barrientos, Velosa, & Rodríguez, 2014) (Bellas & Santón, 2017), de tal manera que se observaron 219 coinfecciones entre dos agentes, 104 casos de coinfecciones entre tres agentes, 30 casos de coinfecciones de cuatro agentes y 4 casos con una presencia total de los 5 agentes TORCH analizados en esta investigación.

Las coinfecciones totales que involucran a los agentes Tg y HSV-1 son las más recurrentes puesto que entre ellas se encuentran casi el 90% de las coinfecciones totales según la **Tabla 26**, debido a que estos son los agentes con mayor prevalencia dentro del TORCH.

#### **4.4 Ausencia de TORCH en las muestras**

En el 10 % de las muestras analizadas no se identificaron ninguno de los agentes TORCH, si partimos que la prevalencia de estos agentes a nivel mundial alcanza entre el 90 y el 95% de la población, podemos indicar que la prevalencia del TORCH en las muestras analizadas alcanzó el 90%, siendo Quito una de las ciudades que cumple con las estadísticas reportadas por la (OMS, 2015).



La mayor concentración de casos negativos para el TORCH, se dio en participantes con edades comprendidas entre los 18 y 21 años de edad, es decir el grupo más joven de los grupos de estudio, esto se debe a que uno de los factores que incrementan el riesgo de adquirir un infección causada con el TORCH es la edad, puesto que a mayor edad aumenta el riesgo (Jacome & Narváez, 2014) (Luchsinger, Luzoro, & Martínez, 2015)

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La estandarización del proceso de extracción de ADN por Salting Out, permitió la obtención del material genético total de las muestras de este estudio con una concentración promedio de 29.37ng/μl, y una relación A260/A280 de 1,7, el nivel de contaminación proteica superior al 60% no afectó la amplificación de los agentes TORCH en las muestras.

La técnica de Nest-PCR propuesta para la identificación del agente *Toxoplasma gondii* permitió conocer la prevalencia del agente en la población de estudio, este resultado permitirá reconocer a la población en riesgo ante este agente y donde se encuentra la mayor concentración de esta en el cantón Quito.

La combinación de variantes moleculares propuesta para la identificación de los Herpesvirus permitió reportar la prevalencia de dichos agentes en la población femenina en etapa fértil del cantón Quito, estos resultados se utilizaron para reconocer las edades de mayor riesgo y la concentración de la población afectada en los sectores Quito.

La prevalencia del agente *Toxoplasma gondii* en la población Quiteña alcanzó el 52.1% según este estudio, siendo este valor menor al reportado por (Fernández, Montaña, Basantes, &

Ponce, 2014), quien indica que la prevalencia de Toxoplasma en Quito es del 72%, pero con una muestra menor a la de este estudio.

La prevalencia de los agentes pertenecientes a los herpesvirus alcanzo el 70% en la población de estudio dividido de la siguiente manera: HSV-1 (61%), CMV (36.3%), VVZ (22.6%), EBV (13.7%), estos valores no concuerdan con los reportados por (Luchsinger, Luzoro, & Martínez, 2015), (Mosalve Castillo, 2013), (Cofré, Delpiano, & Labraña, 2016) quienes reportan una prevalencia más alta en varios agentes de los herpesvirus pero en población general y población con VIH y no hace relación específica a la prevalencia en edad fértil.

Se determinó que el 90% de las participantes de este estudio albergan algún agente TORCH, siendo los agentes HSV-1, Tg, CMV los que tienen mayor prevalencia con un 61%, 52% y 36% respectivamente, así mismo son sus coinfecciones las que tienen mayor prevalencia en el grupo de estudio.

Se identificó en el grupo de estudio que la edad comprendida entre los 18 y 27 años es la que presenta mayor prevalencia de agentes TORCH, alcanzando un 75% de todos los casos positivos, siendo este a su vez el rango de edad de mayor fertilidad femenina (Gracia, 2015) se evidencia un grupo vulnerable a las infecciones TORCH en el embarazo

Las zonas con mayor prevalencia para cualquier agente TORCH en el cantón Quito es la zona sur de la ciudad y la comprendida en los valles, pues abarcan alrededor del 70% de todos los casos positivos para los agentes de estudio.

Las mujeres entre 18 y 27 años de las zonas del sur y valles de Quito son las que tienen mayor probabilidad de desarrollar infecciones TORCH durante el embarazo, si no se toman medidas necesarias como la recomendación de una prueba de identificación molecular de los agentes TORCH previo al embarazo.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

Retomar el uso del método de Salting Out para la obtención de material genético en investigaciones que partan de muestras sanguíneas, puesto que permitirá abaratar costos sin afectar la calidad de ADN obtenido en el proceso de extracción.

Realizar estudios que permitan conocer la prevalencia de los agentes TORCH a nivel nacional, por provincias y en al menos las tres ciudades con mayor población debido a que son poblaciones con mayor riesgo y de esta manera conocer si existen o no diferencias significativas con el presente estudio.

Determinar la prevalencia de los agentes TORCH en una población con un mayor rango de edad, tanto en población sana como en población inmuno-deprimida y corroborar diferencias significativas dentro de estas poblaciones de estudio.

Determinar la correlación de agentes TORCH con problemas antes, durante y después del embarazo en los principales hospitales materno-infantil del Ecuador y conocer la incidencia directa de estos agentes tanto en la madre como en el feto o recién nacido.

Realizar estudios posteriores que permitan identificar si los agentes TORCH que afectan a la población ecuatoriana pertenecen a las mismas cepas víricas identificadas en otras partes del mundo y por medio de los cuales se desarrollan antivirales o antiparasitarios.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA

- AEP. (2014). *Vacuna varicela*. Journals Pediatría, Comité asesor de vacunas (pág. 327). Madrid: CAV-AEP.
- Alfaro, C. (28 de Julio de 2013). *Síndrome de Torch: Toxoplasma, Herpes, Citomegalovirus y Rubéola*. Recuperado el 2 de Agosto de 2017, de Monografías: <http://www.monografias.com>
- Al-Tantawi, N. T. (2014). *Toxoplasmosis and female infertility: is there a correlation?* Am. J. Epidem. Infect. Dis, 29-32.
- APROFE. (2016). *Infecciones durante el embarazo y prevención de discapacidades*, Cuidado y salud en el embarazo (págs. 28-31). Quito: Abya Yala.
- Apt, W. (2014). Apt W. *Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo*. Revista Medica Clinica Condes 25, 485-528.
- Aurelius, E., Johansson, B., Skoldenberg, B., & Staland, A. (2001). *Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid*. Lancet, 189-192.
- Barrientos, S., Velosa, J., & Rodríguez, A. (2014). *Prevalence of Recurrent Herpes Labialis in Population of 18-30 years of Age in Bogota, Colombia*. Universidad Odontologica, 67-71.
- Bellas, C., & Santón, G. (17 de 08 de 2017). *Virus Epstein-Barr (vEb) y neoplasia*. Obtenido de <http://www.conganat.org/linfo.tortosa/conf/cap2/gralidad.htm>
- Bialas, K., Swamy, G., & Permar, S. (2015). *Perinatal cytomegalovirus and varicella zoster virus infections: epidemiology, prevention and treatment*. Clinical Perinatol 42, 61-75.
- Bogetto, P., & Waidne, L. (2000). *Helpful tips for PCR*. FOCUS, 12-17.

- Bohorquez, S. (2017). *Correlación entre el estado de infección por hsv-1 y células inflamatorias en ganglios trigeminales humanos*. Portafolio de servicios Sistema de Investigación Universidad Nacional de Colombia, 26-32.
- Bosa, R. (2014). *Citomegalovirus: de la infección neonatal a las infecciones en pacientes trasplantados y de la Citomegalia a la biología molecular*. Revista Clínica de la Escuela de Medicina, 13 - 19.
- Campadelli, G., Menotti, L., & Avitabile, G. (2014). *Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell*. Virology, 12-16.
- Campo, D., Discuviche, M., & Blanco, P. (2014). *Detección de Toxoplasma gondii por amplificación del gen B1 en carnes de consumo humano*. Infectio.
- Cánepa, E. (2015). Herpesvirus. Virologia Medica, 86-92.
- Cannon, M., Schmid, D., & Hyde, T. (2012). *Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection*. Revista Medica Virologia, 202-213.
- Carrasco, E., & Espinoza, J. (2014). *Career choice among low socioeconomic-status newcomers in highly selective chilean universities*. Scielo Analitics Calidad de Educacion , 49-62.
- Castillo, N. (2015). *Crecimiento y desarrollo fetal*. New Association Academic, Journal Public Global of Medicine, 12-19.
- Cavagión, L., & Garcia, M. (2017). *Prevención de la toxoplasmosis durante el embarazo: un abordaje desde la planificación estratégica en el Centro de Salud Brown, General Pico, La Pampa*. Portal de revistas academicas y scientificas, 1515 - 1583.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (6 de 12 de 2015). *Enfermedades en el embarazo*. Departamento de Salud y Servicios Humanos GobiernoUSA.gov. Recuperado el 23 de 5 de 2018, de Herpes virus: <http://www.cdc.gov/cm/overview-sp.html>



- Chamberlain, J., Gibbs, R., Rainer, J., & Nguyen, P. (1998). *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic acids research, 16-23.
- Cisneros, J., & Herrero, M. (2014). *Hepatitis por virus del grupo herpes*. Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica, 392 - 398.
- Cofré, F., & Delpiano, L. (2016). *Síndrome de TORCH: enfoque racional del diagnóstico y tratamiento pre y post natal*. Sociedad Chilena de Infectología, 191-216.
- Cofré, F., Delpiano, L., Labraña, Y., & Reyes, A. (2016). *Síndrome de TORCH: enfoque racional del diagnóstico y tratamiento pre y post natal*. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Neonatales . Sociedad Chilena de Infectología, 2016, 146-179.
- Cofré, F., Delpiano, L., Labraña, Y., & Reyes, A. (2016). *Síndrome de TORCH; enfoque racional del diagnóstico pre y post natal*. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Neonatales. Sociedad chilena de Infectología, 191-216.
- Contreras, M., Escaff, V., Salinas, P., & Saavedra, J. (2005). *Detección de marcadores virales y parasitarios en adolescentes embarazadas y sus recién nacidos en riesgo*. Revista Chilena de Obstetricia Ginecologica, 85-97.
- Correa, R., Cedeño, I., & Escobar, C. (2008). *Increased urban seroprevalence of Toxoplasma gondii infecting swine in Panama*. Veterinary Parasitology, 9-11.
- Costa, L., Monsalve, F., & Castellano, E. (2014). *Seroprevalencia contra agentes ToRCH en mujeres indígenas en edad fértil, estado Zulia, Venezuela*. Revista Biomédica 32, 519 - 526.
- Crespo, M., & Paniagua, M. (2014). *Epidemiología de la infección por virus de Epstein-Barr en el trasplante cardíaco. Tratamiento y prevención*. Transplantes de organos solidos, 89-114.

- Crough , T., & Khanna, R. (2016). *Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside*. Clin Microbiol Rev, 76-92.
- Davison, A., & Scott, J. (2016). *The Complete DNA Sequence of Varicella-Zoster Virus*. Journals Virology and Genetics, 179 - 186.
- Delgado, A., & Pérez, A. (2014). *Infecciones víricas de transmisión vertical*. En K. Reinoso, O. Puente, G. Montalvo, & A. Delgado, Grandes síndromes pediátricos (págs. 29 - 62.). Barcelona: Torrens.
- Diario La Republica. (16 de 10 de 2016). *Varicela: cinco datos que no conocías*. La Republica de Peru, pág. 13.
- Diaz, M. P. (2007). *TORCH*. Texto del Area de Pediatría, 121-127.
- Diaz, R., & Diaz, L. (2017). *Factores fetales asociados a retardo del crecimiento intrauterino (RCIU) en hijos de adolescentes*. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, 12-22.
- Drago, F., Lug, T., & Nowak, M. (2015). *Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans in India*. Dermatology ProQuest Health and Medical, 203 - 209.
- Dubey, J. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, 313.
- Dubey, J. P., & Jones, J. L. (2015). *Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States*. Int J Parasitol, 1257 – 1278.
- Durlach, R., Kaufer, F., Carral, L., Freuler, C., & Ceriotto, G. (2015). *Consenso argentino de toxoplasmosis congénita*. Medicina congenita, 75-87.
- Durzyńska, J., Pacholska, J., & Kaczmarek, M. (2013). *Multiplex PCR for identification of herpes virus infections in adolescents*. Journals of Medical Virology, 2023-2029.

- Etheredge, G., & Mortensen, M. (2015). *Human Toxoplasma infection in Panama*. *Am J Trop Med Hyg*, 448-457.
- Fernández, T., Montaña, M., Basantes, S., & Ponce, J. (2014). *Estudio seroepidemiológico para estimar el riesgo de infección congénita por Toxoplasma gondii en Guayaquil, Ecuador*. Obtenido de <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/31131>
- Fonseca, D., & Robayo, M. (2016). *Diagnostico de Toxoplasma*. *Salud Pública Colombiana*, 63-64.
- Fowler, K., McCollister, F., Dahle, A., & Boppana, S. (2016). *Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection*. *J Padiatr*, 624 - 630.
- Gavilanez, P. (16 de 11 de 2015). *El mundo está a merced del herpes simple*. *El Comercio*, pág. SALUD 1.
- Gonzales, G., Tápia, V., & Gavilanes, H. (2013). *Hemoglobina, hematocrito y adaptación a la altura: su relación con los cambios hormonales y el periodo de residencia multigeneracional*. *Revista Medica Peruana*, 80-93.
- Gospic, K., & Vukovic, H. (2017). *Herpes zoster—case report*. *Medicina familiaris Croatica: journal of the Croatian Association of Family medicine*, 74 - 79.
- Gracia, S. (27 de 02 de 2015). *Diario Femenino*. Recuperado el 31 de 08 de 2017, de <https://www.diariofemenino.com/familia/embarazo/articulos/cual-es-la-edad-mas-fertil-en-una-mujer/>
- Grose, C. (2015). *Pangaea and the Out-of-Africa Model of Varicella-Zoster Virus Evolution and Phylogeography*. *Journals of Virology*, 9558 - 9565.

- Hala, A., Hudad, D., & Abadi, M. (2018). *Prevalence and diagnosis of genital herpes by immunological and molecular study*. iraqi Academic Scientific Journal, 24-76.
- Hannaoui, R., Erika, J., Sulbarán, M., & Campos, M. (2015). *Características clínicas y parámetros hematológicos de pacientes con fiebre dengue y mononucleosis infecciosa*. Kasmara Journals of infectology, 93 - 101.
- Harris, M. (2016). *Se calcula que dos terceras partes de la población mundial menor de 50 años está infectada por el virus del herpes simple de tipo 1*. Ginebra: 69 Asamblea Mundial de la Salud.
- Harrison, R. (2014). *Principios de medicina interna*. International Edición. Mc. Graw Hill.
- Hu, L., Zabarovsky, E., Chen, F., Cao, S., & Ernberg, I. (1998). *Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP-1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma*. Journals of Genetics and Virology, 149-156.
- Hurtado, A., Aduriz, G., & Moreno, B. (2001). *Single tube nested PCR for the detection of Toxoplasma gondii in fetal tissues from naturally aborted ewes*. Veterinary parasitology, 17-27.
- INEC en colaboración con ONU Mujeres. (2014). *Comisión de Transición hacia la Definición de la Institucionalidad Pública que garantice la Igualdad entre Hombres y Mujeres*. Mujeres y hombres del Ecuador en Cifras IV, 55.
- Instituto de Biomedicina, U. (2016). *Diagnostico Molecular de Toxoplasma*. Servicios Ginecologicos de la UCSG. Guayaquil, Ecuador.
- Instituto Guatemalteco de Seguridad Social IGSS. (2015). *Manejo de TORCH en el embarazo*. Guatemala: Guías de Práctica Clínica Basadas en Evidencia Vol 45.

- Isom, H., Wigdahl, B., & Howett, M. (2014). *Molecular pathology of human oncogenic viruses: Epstein-Barr virus Cellular and molecular pathogenesis*. Lippincott-Raven Publishers, 341 -356.
- Jacome, J., & Narváez, L. (2014). *Prevalencia de infección por toxoplasma gondii en mujeres embarazadas, en valledupar*. Santa Marta: Universidad del Magdalena en convenio con la Universidad Nacional de Colombia.
- Johnson, G., Nelson, S., Petric, M., & Tellier, R. (2000). *PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses*. 2000; 38: 3274-9. J Clin Microbiol, 3274-3279.
- Kalb, v., & Bernoohr, R. (1977). *A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts*. Anal Biochemistry, 362-371.
- Kaplan, J. L., Yost, J., Farrell, L., & Greenberg, H. H. (2013). *Infectious disease patterns in the Waorani, an isolated Amerindian population*. Am J Trop Med Hyg, 298-312.
- Knipe, D., & Fields, B. (2015). *Herpesvirus*. Virology 16th edition, 73-74.
- Lalama, M. (01 de 08 de 2014). *Toxoplasmosis*, Farmacología Virtual. Obtenido de [http://www.farmacologiavirtual.org/index.php?option=com\\_content&view=article&catid=2:protocolos-terapeuticos&id=188:toxoplasmosis-](http://www.farmacologiavirtual.org/index.php?option=com_content&view=article&catid=2:protocolos-terapeuticos&id=188:toxoplasmosis)
- Lanzieri, T., Dollard, S., & Bialek, S. (2014). *Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries*. Clinicalkey, 44 48.
- Lereuz-Ville, M., Magnay, J., & Courdec, S. (2017). *Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and Nonprimary Maternal Infection: A Prospective Neonatal Screening Study Using Polymerase Chain Reaction in Saliva*. Clinical Infectious diseases, 398 - 404.

- Lin, C., Leibovitch, M., Almira, I., & Jacobson, S. (2016). *Human herpesvirus multiplex ddPCR detection in brain tissue from low- and high-grade astrocytoma cases and controls*. *Infectious Agents and cancer*, 348-354.
- Lin, M., Chen, X., & Kuo, T. (2016). *Real-Time PCR for Quantitative Detection of Toxoplasma gondii*. *Journals of Clinical Microbiology*, 4121–4125.
- LLavaca, A. (2014). *Síndrome de TORCH*. *Revista Medica Chilena* Vol. 32, 76 - 49.
- Lopez, J., & Moro, C. (2013). *Infecciones perinatales y congenitas*. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría*, 153 - 159.
- Lopez, P. (2017). *Detección de citomegalo virus cmv mediante pcr rt en mujeres embarazadas en el hospital enrique sotomayor de la ciudad de Guayaquil*. *Universidad de Guayaquil*, 47.
- Lorenzi, H., Khan, A., & Namasivayan, k. (2016). *Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic Toxoplasma gondii genomes*. *Nature Communications*, 10147.
- Luchsinger, V., Luzoro, A., & Martínez, M. (2015). *High seroprevalence of cytomegalovirus, herpes simplex type 1 virus and Epstein Barr virus infection among human immunodeficiency virus-infected adults*. *Revista medica Chilena*, 809-816.
- Manicklal, S., Van Niekerk, S., & Kroon, M. (2015). *Birth Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Among Infants of HIV-Infected Women on Prenatal Antiretroviral Prophylaxis in South Africa*. *Clinical Infectious Diseases*, 1467 . 1478.
- Marawan, A. M., Jerzy, B., & Haydee, D. (2014). *Toxoplasma gondii Seropositivity and Co-Infection with TORCH Pathogens in High-Risk Patients from Qatar*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 626.

- Marin, L., Carvalho, M., & Sousa, S. (2016). *Prevalence and clinical aspects of CMV congenital Infection in a low-income population*. *Virology Journal*, 148.
- Medina, J., Pérez-Sartori, G., Caltenco, R., & Aguado, A. (2015). *Immunologic Response and Pathogenic Mechanisms of Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients*. *Trends Transplant*, 103 - 112.
- MedLine Plus. (25 de Agosto de 2016). *Genoma de Herpesvirus*. Biblioteca Medica de EEUU. Recuperado el 23 de 5 de 2018, <https://medlineplus.gov/spanish/herpessimplex.html>
- Mimica, M., Muñoz-Zanz, M., & Torres, L. (2015). *Toxoplasmosis, a parasitic zoonoses prevalent in Chile: count and challenges*. *Revista de infectologia chilena*, 258-264.
- Ministerio de salud Publica MSP. (2017). *Gaceta epidemiologica semanal 17*. Quito: subsecretariadevigilanciadelasaludpública direccion nacional de vigilancia epidemiologica.
- Miranda, E., Farfán, S., Barrientos, S., & Lara, L. (2013). *Epidemiology characteristics of chickenpox hospitalizations at Peru Children's Hospital,2001-2011*. *Anales de Facultad de Medicina*, 97-99.
- Montealegre, I., Valbuena, Y., & Cortéz, D. (2015). *Seroprevalencia de la toxoplasmosis y factores relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos en trabajadores de plantas de beneficio animal en cinco ciudades capitales de Colombia*. *Int J Parasitol*, 1217 - 1258.
- Monto, H. (2011). *The history of cytomegalovirus and its diseases*. *Med Microbiol Immunol*, 65-73.

- Mosalve Castillo, F. M. (01 de 08 de 2013). *Seroprevalencia contra agentes ToRCH en mujeres indígenas en edad fértil, estado Zulia, Venezuela*. Obtenido de <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/749>
- MSP. (2015). *Varicela*. En D. d. Publica, Manual de Normas Tecnico-Administrativas y Procedimientos de Vacunacion y Vigilancia Epidemiologica del Programa Ampliado de Inmunizaciones PAI (págs. 49-53). Quito: Nova.
- Mundo, E. (01 de 11 de 2012). *Más de 500 millones de personas infectadas por herpes genital*. Obtenido de <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2008/10/01/medicina/1222886139.html>
- Murray, P. (2000). *Infecciones Congenitas*. Microbiología Médica, 73 -75.
- Nahmias, A., Walls, K., & Stewart, J. (1971). *The TORCH complex-perinatal infections associated with toxoplasma and rubella, cytomegol-and herpes simplex viruses*. *Pediatry Research*, 48.
- Neu, N., Ducchon, J., & Zaccharia, P. (2015). *TORCH infections*. *Clinics in perinatology*, 77-103.
- Notisalud. (9 de 2 de 2016). *Reactivación del EBV amenaza la salud del bebé*. Obtenido de <https://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/196093.reactivacion-del-ebv-amenaza-la-salud-del-bebe.html>
- OMS. (28 de Octubre de 2015). *Herpesvirus*. Organizacion Mundial de la Salud. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/herpes/es/>
- OMS. (2015). *Virus del Herpes Simple*. New York.
- OPS. (2016). *Perfiles Ecuador*. En *Salud, Inmunizacion Integral de la Familia* (págs. 289-304). Mexico: OMS.



- Pan American Health Organization / World Health Organization. (2016). *Perinatal infections. Transmitted by the mother to her infants. educational material for health personnel.*
- Paquet, C., Trois-Rivières, Q., Yudin, M., & Toronto, O. (2015). *Toxoplasmosis in Pregnancy: Prevention, Screening, and Treatment.* J Obstet Gynaecol Can, S1-S7.
- Pathmanathan, R., Prasad, U., Chandrik, G., & Sadler, R. (2016). *Clonal proliferation of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma.* New England Journals of Medicine, 338-342.
- Pérez, A. (17 de 09 de 2012). *Masectomia herpetica.* Obtenido de [http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/cirugia/mastectomia/que\\_es](http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/cirugia/mastectomia/que_es)
- Pousa, X., & Bascones, A. (2011). *Herpesvirus.* Odontostomatol , 11-24.
- PP Digital. (17 de 02 de 2016). *El Ministerio de Salud Pública (MSP) busca proteger a mascotas y a las ciudadanía contra la rabia.* Obtenido de <http://www.ppdigital.com.ec/noticias/ciudadania/4/en-ecuador-se-inmunizara-a-perros-y-gatos>
- Rajnish, K., Siddhartha, M., & Sudipta, S. (2018). *A review on TORCH: groups of congenital infection during pregnancy.* Journal of Scientific and Innovative Research, 258 - 264.
- Ramos, L. (04 de 07 de 2013). *Infecciones Perinatales.* Recuperado el 23 de 10 de 2016, de Scrib: <http://es.scribd.com/doc/39276896/infecciones-perinatales>
- Ramos, M., & Pérez , C. (2015). *Prevalencia de la infección por virus de Epstein Barr (VEB) en mujeres gestantes y con aborto, durante las primeras semanas de embarazo.* Revista Biomedica de la Universidad de los Andes, 73-76.

- Roizman, B., & Ward, P. (2015). *Características generales de los herpesvirus*. Trends Genetics and Fields Virology 3rd Edition Chapter 71 (págs. 1096-1018). Rochester: University of Rochester.
- Ryan, K., & Ray, C. (2008). *Toxoplasmosis of animal and man*. Sherris Medical Microbiology Vol 4, 722-727.
- Sanchez, R., Araujo, L., & Barba, M. (2018). *Prevalencia de toxoplasmosis en estudiantes de la Universidad Nacional de Chimborazo en Ecuador*. Cuba Salud, 96.
- Sánchez, Y., Monsalve, F., Estevez, J., & Aguilar, M. (2016). *Seroepidemiology of toxoplasmosis in amerindians from western Venezuela*. Am. J. Trop. Med. Hyg, 131-135.
- Sebastian, D., Zuhara, K., & Sekaran, K. (2012). *Influence of TORCH infections in first trimester miscarriage in the Malabar region of Kerala*. African Journals of medicine, 47-53.
- Shemis, M., El-Abd, D., Ramadan, I., & El-Sayed, M. (2012). *Evaluation of multiplex nested polymerase chain reaction for routine hepatitis C virus genotyping in egyptian patients*. El Cairo: Hapat Mon. 2012; 12: 265-70.
- Shett, A. (2011). *Congenital and Perinatal Infections: Throwing New Light with an Old TORCH*. Indian J Pediatrics, 78-87.
- Singamsetty, S., Padmaja, Y., Bindu, Y., & Ramesh, M. (2015). *Study of seroprevalance of Toxoplasma gondii, Rubella virus and Cytomegalovirus (ToRC) infections in antenatal women presented with bad obstetric history and comparative evaluation of Nanoplex ToRCH screen ELISA kit with vidas* . International Journal of Research in Medical Sciences , 1203-1208.
- Sugimoto, K., Ando, M., Oshimi, K., & Tamayose, K. (2015). *Mononucleosis syndrome and acute monocytic leukemia*. European Journal of Haematology, 236 - 238.

- Surzycki, S. (2000). *General Aspects of DNA Isolation and Purification*. Basic Techniques in Molecular Biology (págs. 22-25). Berlin: Springer, 22 - 25.
- Surzycki, S. (2007). *PCR Analysis*. En S. Surzycki, Basic Techniques in Molecular Biology (págs. 410-414). Berlin: Springer.
- Tamayo, M., Tayupanta, D., & Escobar, J. (2015). *Programa de Control y Prevención de Toxoplasmosis en el Ecuador*. Quito: UCE.
- Tenorio, A., Echevarría, J., Casa, I., & Echevarría M. (2000). *Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction*. J Virol Methods, 261-268.
- Toledo, C. (2017). *Herpes*. Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. Obtenido de [http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0718-2864201200010008&script=sci\\_arttext](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0718-2864201200010008&script=sci_arttext)
- Tronstein, E. J. (2011). *Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection*. JAMA.
- Tunbäck, P., Bergstöm, T., & Claesson, B. (2007). *Early acquisition of herpes simplex virus type 1 antibodies in children – A longitudinal serological study*. Journals of Clinical Virology, 26-30.
- Valdez, A., & Bocaranda, P. (2014). *Síndrome de TORCH y sus consecuencias en las áreas de neonatología*. Guías de diagnóstico y tratamiento en Neonatología, 22-25.
- Van der Sande, M., Kaye, S., Miles, D., & Waight, P. (2007). *Risk factors for and clinical outcome of congenital cytomegalovirus infection in a Peri-Urban West-African Birth Cohort*. PLoS ONE, 492.
- Vasquez, M., Cravioto, P., & Guarneros, D. (2017). *Varicella and herpes zoster: challenges for public health*. Scielo Mexico, 59 - 65.

- Veronesi, F., Santoro, A., & Milardi, G. (2017). *Comparison of PCR assays targeting the multi-copy targets B1 gene and 529 bp repetitive element for detection of Toxoplasma gondii in swine muscle*. Food Microbiology, 63.
- Wada, K., Mizoguchi, S., Ito, Y., Kawada, J., & Yamauchi, Y. (2015). *Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7*. Microbiology Immunology, 32-39.
- Yamamoto, A., Figueiredo, L., & Mussi-Pinhata, M. (2017). *Prevalence and clinical aspects of congenital cytomegalovirus infection*. Journals of Pediatrics, 82-87.
- Yarovinsky, F. (2009). *Effects in herpetic patients*. Nature Reviews. Recuperado el 20 de Junio de 2010, de [http://www.nature.com/nri/journal/v14/n2/box/nri3598\\_BX1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v14/n2/box/nri3598_BX1.html)