

1 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente protocolo experimental contempla la amplificación del DNA de las bacterias y virus causantes de las ETS *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y VPH mediante PCR tiempo final, proveniente de muestras humanas.

11.1 EQUIPO UTILIZADO

Para centrifuga las muestras se utilizó una microcentrífuga marca Biofuge Fresco. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó un termociclador marca AXYGEN/MAXYGENE modelo MAXYGENE GRADIENT, No. de catálogo THERM-1000. Para tomar las fotografías de los productos de electroforesis se utilizó una cámara para ultravioleta SP2600, marca Kodak.

11.2 TIPO Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Se usaron 50 muestras de mucosa, 38 obtenidas del cervix y 12 de uretra masculina obtenida por la técnica estándar de Obtención de Muestras Biológicas. Para esto se usó el kit de toma de muestra COLL DEVICE HC2 DNA de Qiagen® usando un escobillón de raspado ginecológico para mujeres y un hisopo para la uretra masculina y el medio de conservación y transporte de dicho kit. Los donadores de muestra fueron pacientes que asistieron a la clínica bajo sospecha de infección de alguna ETS. Así mismo, se hace la consideración de que los pacientes masculinos han infectado a su pareja sexual.

11.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó el kit para extracción de DNA QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen®, el kit para análisis de ETS STD/HPV de Seeplex para amplificar las muestras de DNA y un

termociclador marca AXYGEN/MAXYGENE modelo MAXYGENE GRADIENT, No. De catálogo THERM-1000 para la amplificación de la muestra.

Para la extracción de muestra de los pacientes, se siguió el protocolo establecido en el manual del kit COLL DEVICE HC2 DNA Qiagen®:

En caso de que el paciente sea del sexo femenino, se elimina cualquier exceso de moco con una gasa impregnada con solución salina isotónica estéril, posteriormente se toma el escobillón provisto en el kit, se raspa con él las paredes vaginales, procurando tomar la mayor cantidad de muestra posible. Se guarda el escobillón en la solución transportadora hasta su posterior uso, almacenándolo a una temperatura de 4°C.

En caso de que el paciente sea del sexo masculino, se toma el hisopo provisto en el kit, y se introduce cuidadosamente en la uretra del paciente, rotándolo un poco mientras entra. Se llega a una profundidad aproximada de 1cm para posteriormente extraerlo y guardarlo en la solución transportadora hasta su posterior uso, almacenándolo a temperatura ambiente.

Para la extracción de DNA, se siguió el protocolo establecido en el manual del kit DNA QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN:

Se toman 400µl de la muestra biológica en un microtubo, se agregan 20µl de Proteinasas K y 400µl de buffer "AL" a la mezcla. Se agita en vortex por 15 segundos. Posteriormente se incuba la muestra a 56°C por 10 minutos. Se centrifuga brevemente para eliminar gotas de la tapa. Acto seguido se agregan 400µl de etanol 96° y se agita en vortex de nuevo. Se centrifuga brevemente para eliminar gotas de la tapa. Luego se agregan 700µl de la mezcla del paso 4 a una columna Mini Spin. Se centrifuga a 8,000rpm por 1 minuto. Se descarta el filtrado y se repite este paso con el resto de la mezcla. Se agregan 500µl del Buffer "AW1" y se centrifuga a 8,000rpm por 1 minuto. Se descarta el filtrado y se agregan 500µl del Buffer "AW2" y se centrifuga a 14,000rpm por 3 minutos. Se descarta el filtrado y se coloca la columna Mini Spin en un nuevo microtubo. Se agregan 150µl de Buffer "AE". Se incuba por un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga posteriormente a 8,000rpm por 1 minuto. Se guarda el DNA a -20°C hasta su posterior uso.

1.4 AMPLIFICACIÓN DEL DNA

Para la amplificación del DNA obtenido, se siguió el protocolo establecido en el manual del kit ETS STD/HPV de Seeplex:

Se prepara el PCR Mastermix previamente. Para cada muestra se necesitan:

- a) 4 μ l 5X HPV/STD4 ACE Pm
- b) 3 μ l 8-Mop Solution
- c) 10 μ l 2X Multiplex Master Mix

Se agita en vortex por 5 segundos y luego se centrifuga brevemente, para luego agregar 3 μ l de la muestra y 17 μ l del PCR Mastermix en cada microtubo para PCR. Posteriormente se precalienta el termociclador a 94°C. Luego se comienza la reacción de PCR siguiendo el siguiente programa:

- d) 1 ciclo a 94°C por 15 minutos
- e) 40 ciclos con:
 - I. 94°C por 30 segundos.
 - II. 60°C por 1:30 minutos.
 - III. 72°C por 1:30 minutos.
- f) 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

Se irradia con luz UV por 20 minutos para detener la reacción de PCR, y se corre un gel de electroforesis con los productos de PCR y el marcador de referencia incluido en el kit, siguiendo la siguiente referencia para el gel resultante:

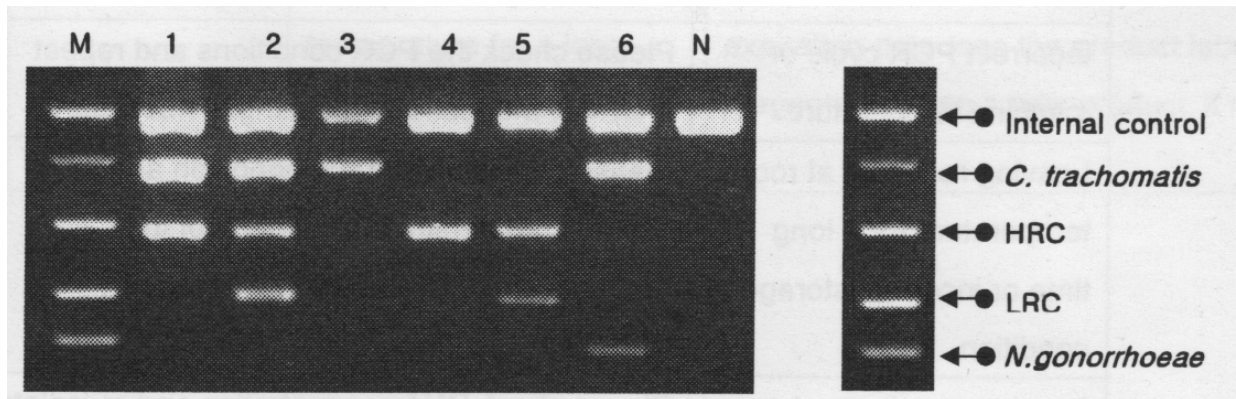


Figura 1: Gel de electroforesis con el producto de la reacción de PCR, un gel de agarosa al 2% para resolver productos de PCR de muestras contaminadas con VPH, *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*. La primera columna muestra el marcador positivo, la columna 1 muestra un paciente positivo para *C. trachomatis* y VPH de alto riesgo, la segunda columna un paciente positivo para *C. trachomatis* y VPH de alto y bajo riesgo, la tercera columna un paciente positivo para *C. trachomatis*, la cuarta columna un paciente positivo para VPH de alto riesgo, la quinta columna un paciente positivo para VPH de alto y bajo riesgo, la sexta columna un paciente positivo para *C. trachomatis* y *N.gonorrhoeae*, y la última columna es el control negativo. Los pesos moleculares de los diferentes productos en el marcador son, en orden descendente y en pares de bases, 1000, 711, 465, 302 y 214 respectivamente.

(Seeplex, 2010)

11.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con la prueba de X^2 para realizar el análisis estadístico y obtener la frecuencia de las enfermedades en la población. Esta prueba mide la discrepancia entre una distribución observada y una esperada, indicando en qué medida las

diferencias existen entre ambas; también se utiliza para probar la independencia de dos variables entre si. La fórmula para X^2 es la siguiente:

$$X^2 = \sum \frac{(\text{observados} - \text{esperados})^2}{\text{esperados}}$$

En donde observados se refiere a la cantidad de datos obtenidos para un parámetro y esperados se refiere a la cantidad teórica que deberían de tener los datos. En los análisis de esta tesis, el valor esperado en cada experimento es el promedio de los datos obtenidos de todos los parámetros analizados.