

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"

## Diseño y aplicación de un método molecular para el diagnóstico del virus influenza A (H1N1) pandémico en Cuba

*Odalys Valdés Ramírez,<sup>I</sup> Alexander Piñón Ramos,<sup>II</sup> Belsy Acosta Herrera,<sup>III</sup> Clara Savón Valdés,<sup>IV</sup> Grehete González Muñoz,<sup>V</sup> Amely Arencibia García,<sup>VI</sup> Elías Guilarte García,<sup>VII</sup> Guelsys González Báez,<sup>VIII</sup> Suset Oropeza Fernández,<sup>IX</sup> Bárbara Hernández Espinosa,<sup>X</sup> Ángel Goyenechea Hernández<sup>XI</sup>*

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** entre marzo y abril de 2009 se produjeron en México brotes de enfermedad respiratoria, debido a un nuevo virus de influenza proveniente del cerdo, el cual se diseminó rápidamente mediante la transmisión humano-humano. Los métodos moleculares usados en la actualidad eran inadecuados, porque la composición del genoma del nuevo virus era muy diferente del virus influenza A (H1N1) que había circulado hasta el momento. En su composición, estaba formado por segmentos de genes de origen aviar, humano y cerdo. **OBJETIVO:** teniendo en cuenta las secuencias publicadas, se diseñó un juego de cebadores específicos para el gen de la hemaglutinina, con la finalidad de evaluar un nuevo ensayo de TR-RCP para detectar el nuevo virus pandémico en Cuba. **MÉTODOS:** se procesó un total de 3 197 muestras clínicas de casos sospechosos de infección por el virus influenza A (H1N1) pandémico (pdm) mediante un ensayo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa. **RESULTADOS:** el ensayo optimizado permitió obtener una banda de 292 pb, sin reacciones inespecíficas. El nuevo método resultó ser útil en el diagnóstico y subtipado del virus de influenza H1N1 pdm. El producto amplificado fue analizado por secuenciación nucleotídica y se confirmó la identificación del virus. **CONCLUSIONES:** con la introducción de este nuevo ensayo para la vigilancia de influenza, se fortalece la capacidad diagnóstica del Laboratorio Nacional de Referencia.

**Palabras clave:** transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa, diagnóstico molecular, influenza A (H1N1) pdm.

### INTRODUCCIÓN

A finales del mes de marzo y principio del mes de abril de 2009, se produjeron en México brotes de enfermedad respiratoria, con un incremento de

la enfermedad tipo influenza en el reporte de casos, de algunas áreas del país. El 23 de abril, fue identificado un nuevo virus de influenza A/H1N1 procedente del cerdo, hallazgo que fue notificado a la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

<sup>I</sup> Licenciada en Bioquímica. Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Titular. Instructora. Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Licenciado en Microbiología. Master en Virología. Investigador Agregado. Instructor. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Doctor en Medicina. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Profesor Asistente. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup> Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora en Ciencias Biológicas. Investigador Titular. Profesora Titular. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>V</sup> Licenciada en Microbiología. Máster en Virología. Investigadora Auxiliar. Asistente. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>VI</sup> Licenciada en Microbiología. Reserva Científica. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>VII</sup> Doctor en Medicina. Especialista de I Grado en Medicina General Integral. Residente de Microbiología. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>VIII</sup> Técnico Medio en Química Industrial. Auxiliar Técnico Docente. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>IX</sup> Doctor en Medicina. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>X</sup> Técnico Medio en Microbiología. Auxiliar Técnico Docente. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>XI</sup> Doctor en Medicina. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Profesor Auxiliar. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.

Este virus se diseminó rápidamente a otros países y no se había detectado antes en humanos; contenía genes provenientes de linajes de virus de influenza aviar, porcino y humano.<sup>1-3</sup>

La influenza es una enfermedad del tracto respiratorio, altamente contagiosa, la cual puede causar una elevada morbilidad y mortalidad, sobre todo en adultos mayores y en pacientes inmunocomprometidos; es ocasionada por los virus influenza. Existen 3 tipos de virus, A, B y C y se conoce que alrededor de 500 millones de personas en el mundo, se infectan cada año y mueren entre 250 y 500 mil personas.<sup>4</sup>

Los virus influenza A se clasifican en diferentes subtipos basados en la composición antigénica de las glicoproteínas de su envoltura.<sup>5</sup> Hasta la actualidad, se conocen 16 subtipos de hemaglutinina (HA) y 9 subtipos de neuraminidasa (NA); solo 3 subtipos de HA y 2 subtipos de NA infectan al humano. Las aves migratorias y acuáticas sirven como reservorios naturales de todos los subtipos de influenza A y los cerdos poseen receptores en la células epiteliales del tracto respiratorio para subtipos virales aviáres y humanos.<sup>6,7</sup> Desde 1997, existe el reporte de casos humanos confirmados de infección causada por diferentes subtipos de influenza aviar y esta situación ha determinado la preparación de los sistemas nacionales de salud para enfrentar una pandemia por el virus influenza aviar H5N1.<sup>8-10</sup>

El establecimiento de métodos adecuados en el diagnóstico de virus emergentes con potencial pandémico se hace necesario, para la identificación temprana de casos, el empleo de la terapia antiviral efectiva y la implementación de una estrategia adecuada en el control de la infección, lo cual evita el uso inapropiado de antibióticos. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) constituye un método de diagnóstico rápido y sensible comparado con las técnicas tradicionales, incluido el aislamiento viral en cultivo de células. Aunque su costo es elevado, los resultados se obtienen en

poco tiempo. Por otro lado, las perspectivas futuras de una realización más simple y automatizada, la convierten en una excelente herramienta de diagnóstico y en la técnica base para la caracterización genética de estos virus. En su diseño hay que tener presente la gran capacidad de variación de estos virus, por lo que, en la identificación de los diferentes subtipos de influenza A se buscan regiones más conservadas dentro de cada gen de la HA o de la NA.

Hasta el presente, el laboratorio contaba con capacidad diagnóstica para detectar los virus de influenza A (aviar y humanos) e identificar los subtipos H1N1 estacional, H3N2, H5N1, H7N7 y H9N2, por lo que nos propusimos desarrollar un nuevo ensayo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) capaz de detectar el virus influenza A H1N1 pandémico (H1N1 pdm), de origen porcino.

## MÉTODOS

*Diseño de cebadores:* para identificar el virus de la influenza A H1N1 pdm mediante la TR-RCP se diseñó un juego de cebadores basados en secuencias conservadas del gen de la HA de la influenza A H1N1 pdm. Las secuencias conservadas fueron seleccionadas por comparación y alineamiento de 20 secuencias del gen de la HA, que estaban publicadas hasta ese momento, en la base de datos Epiflu Database.<sup>11</sup> El alineamiento se realizó de forma computarizada empleando el programa CLUSTAL X (version 1.83). En la tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores sintéticos específicos empleados en la TR-RCP.

*Preparación de los controles:* para evaluar la sensibilidad y especificidad de la TR-RCP, se prepararon controles adicionales, que consistieron en dos diluciones que contenían 10 y 100 moléculas de ácido nucleico del virus sincitial respiratorio (VSR), adenovirus (Adv) y virus influenza A, B y

**TABLA 1.** Cebadores utilizados en la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa específicos para el gen de la hemaglutinina del virus prototipo influenza A/California/04/2009 H1N1 pdm

Nombre	Posición	Producto amplificado	Secuencia
NPHS +	162-187	292 pb	5' TAACGGGAAACTATGCAAACCTAAGA 3'
NPHA -	432-454		5' TGCCGTTACACCTTGTTCGAG 3'

C, clonados en pGEM-T Vector System I (Promega). También, se incluyeron como controles, el ácido nucleico de muestras clínicas que fueron positivas a influenza A (H1N1, H3N2) por TR-RCP anidada de tipado. En todos los casos la extracción del ácido nucleico viral se realizó utilizando el método de ticionato de guanidium, descrito previamente.<sup>12</sup>

*Optimización del ensayo de TR-RCP:* la TR-RCP fue llevada a cabo en un tubo de reacción empleando el estuche comercial OneStep TR-PCR Kit (Qiagen, Germany). Los volúmenes y concentraciones de los diferentes componentes de la reacción se usaron siguiendo las indicaciones del productor. Para la optimización del ensayo se realizaron curvas de temperatura (53, 55 y 57 °C) y tiempo de hibridación (30 s, 45 s y 1 min), concentración de los cebadores (0,5, 10 y 20 pmol), temperatura (68 y 72 °C) y tiempo de extensión (30 s y 1 min). A cada una de las mezclas de reacción se le adicionaron 5 µL del ácido nucleico extraído. Se incluyeron controles negativos en cada experimento, que consistieron en agua (H<sub>2</sub>O) libre de RNasa (Sigma, EE. UU.), plásmidos recombinantes que contenían fragmentos del VSR, Adv e influenza A, B, C; y 2 muestras clínicas positivas a influenza A (H1N1 y H3N2). Como control positivo se incluyeron diluciones seriadas en base 10, desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-7</sup> del ácido ribo-nucleico (ARN) sintético de influenza A H1N1 pdm, donado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de China.

*Muestras clínicas:* muestras de exudado nasofaríngeo, aspirado bronquial y tejido de pulmón, procedentes de pacientes con sospecha clínica de influenza A H1N1 pdm, fueron recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorios en el período del 5 mayo al 16 septiembre de 2009. Las muestras fueron colectadas en medio de transporte virológico (UTM-RT) y una vez recepcionadas en el laboratorio fueron dispensadas, guardadas a -8 °C y una alícuota de cada muestra fue procesada inmediatamente. Las muestras de tejido de pulmón fueron cortadas en pequeños fragmentos, almacenadas a -8 °C, en RNAlater (Qiagen, Germany), y un fragmento de tejido de cada muestra fue procesado inmediatamente.

*Extracción de ARN:* el ARN viral fue extraído directamente de 140 mL de la muestra clínica, en

el caso de las muestras de tejido de pulmón la extracción se realizó a partir de 140 mL del sobrenadante del tejido homogenizado. La extracción fue llevada a cabo con el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Confirmación de los resultados:* el producto amplificado de la TR-RCP fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa 2 %, teñido con bromuro de etidio, utilizando un marcador de Peso Molecular (100 pb DNA ladder, Promega). Para confirmar que el producto amplificado de la nueva TR-RCP, empleada en el diagnóstico de influenza A H1N1 pdm era el esperado, se realizó la secuenciación nucleotídica de un grupo de muestras positivas en un secuenciador automático Becman Coulter, modelo CEQTM8800. Las secuencias nucleotídicas se compararon mediante un BLAST con secuencias del virus que estaban disponibles en la base de dato Epiflu Database.

## RESULTADOS

*Diseño de los cebadores y optimización del ensayo de TR-RCP:* el diseño de los cebadores se realizó con el programa Go-Oli-Go primer design software (Pharmacia Biotech Europe GMBH, Freiburg, Germany). En el alineamiento de las secuencias empleadas en el diseño de los cebadores, también se incluyeron secuencias del gen de la HA de influenza A (H1N1, H3N2) y de influenza A del cerdo, con el objetivo de obtener cebadores que fueran específicos del gen de la HA de influenza A H1N1 pdm.

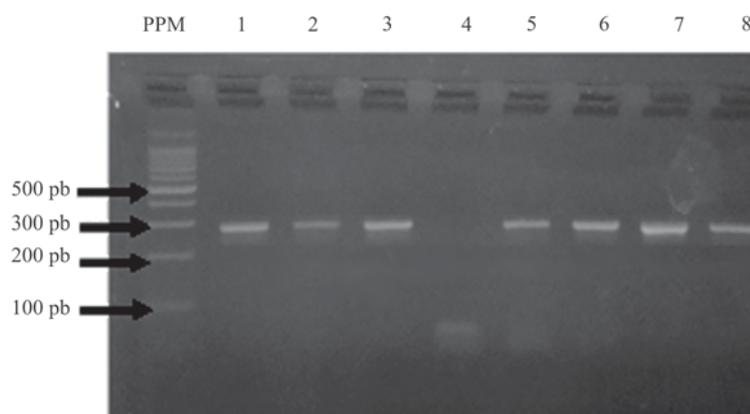
Se optimizaron las condiciones de temperatura y tiempo, en los pasos de hibridación y extensión, así como las concentraciones de los cebadores. Las condiciones óptimas para la TR-RCP se muestran en la tabla 2. De las diferentes

**TABLA 2.** Condiciones para la reacción de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa optimizada

Ciclaje TR-RCP	
48 °C - 30 min	
95 °C - 15 min	
95 °C - 30 s	
57 °C - 30 s	45 ciclos
68 °C - 30 s	
68 °C - 10 min	
4 °C	

PPM: patrón de peso molecular, 1-3 y 5-7: productos de la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa de muestras clínicas positivas a influenza A H1N1 pandémica, 4: control negativo, 8: control positivo.

**Fig.** Productos de amplificación de la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa en gel de agarosa 2 %.



concentraciones de cebadores empleadas en la TR-RCP, 20 pmol resultó óptima para amplificar un segmento del gen de la HA de la influenza A H1N1 pdm.

La evaluación de la sensibilidad se llevó a cabo usando diluciones seriadas del ARN sintético de influenza A H1N1 pdm donado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de China. El límite de detección del ARN, empleando la TR-RCP optimizada fue de  $10^{-5}$  (datos no mostrados). Se evaluó la especificidad del ensayo de TR-RCP utilizando ácido nucleico de controles positivos del VSR, Adv, influenza A, B y C e influenza A (H1N1, H3N2). No se detectó producto amplificado en ninguno de los controles antes mencionados.

*Aplicación del ensayo usando muestras respiratorias:* la TR-RCP optimizada se aplicó a un total de 3 197 muestras clínicas. El juego de cebadores específico del gen de la HA de la influenza A H1N1 pdm, amplificó un fragmento de 292 pb. Los resultados se muestran en la figura. De las muestras clínicas positivas, 50 % resultó confirmado por análisis y comparación de secuencias. Se encontró una elevada identidad nucleotídica (98-100 %) cuando las secuencias del producto de la TR-RCP se compararon con secuencias del gen de la HA del mismo subtipo.

## DISCUSIÓN

La vigilancia y la investigación epidemiológica de las enfermedades respiratorias, constituyen herramientas necesarias para disminuir la morbilidad

y mortalidad por enfermedades infecciosas, lo que influye en el cuidado de la salud a escala mundial. Aun cuando la producción de vacunas efectivas contra los virus influenza no previene la enfermedad del todo, los riesgos asociados a ella son comúnmente reducidos.<sup>13</sup> Además de la vigilancia, el diagnóstico rápido con tratamiento es la clave del control de las epidemias.<sup>14</sup> Debido a que los síntomas y signos clínicos de las enfermedades respiratorias no son suficientes para realizar el diagnóstico definitivo de pacientes con influenza, es necesario contar con ensayos rápidos, específicos y sensibles.<sup>15,16</sup>

Los métodos convencionales para subtipar los virus de influenza requieren de la propagación del virus en cultivo de tejido o en embrión de pollo y, seguidamente, el subtipado se realiza mediante la inmunofluorescencia (IF) o por métodos serológicos. Este procedimiento puede tomar hasta una semana, en dependencia del virus. Por otro lado, el subtipado también puede realizarse de modo directo a partir de la muestra clínica, mediante la IF, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de subtipo. Esta última metodología, a pesar de que es un método de diagnóstico rápido, tiene baja sensibilidad. En contraste, la TR-RCP es capaz de identificar y subtipar el virus de manera directa de la muestra clínica en un corto período de tiempo.<sup>17-19</sup>

En el presente estudio, un nuevo ensayo de TR-RCP capaz de identificar la influenza A H1N1 pdm fue desarrollado y evaluado. Los cebadores fueron diseñados de una región conservada del gen de la HA de este subtipo. El ensayo optimizado permitió obtener una banda intensa, nítida y

reproducibile. El límite de detección del ARN fue de  $10^{-5}$ , no se detectaron reacciones inespecíficas. La optimización de todos los parámetros en los ensayos de TR-RCP es de suma importancia en el diagnóstico de una entidad, porque hay que tener en cuenta diferentes factores, que pueden afectar la sensibilidad y especificidad de su desarrollo. La realización del ensayo en un solo paso, reduce los riesgos de contaminación, que están asociados a los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos anidados. Sin embargo, tiene la desventaja de que la sensibilidad de la técnica puede ser afectada. En este sentido, además de la optimización de los factores que intervienen en la TR-RCP, el tamaño del producto amplificado es determinante, ya que mientras menor sea el mismo, mayor es el rendimiento del producto obtenido.<sup>20,21</sup> En este método se tuvo en cuenta la importancia de este parámetro y con esta finalidad el diseño de los cebadores permitió obtener un segmento del gen HA de 292 pb.

El ensayo resultó ser útil en el diagnóstico y subtipado del nuevo virus en los casos sospechosos de infección por el virus pandémico y en contactos de estos pacientes, lo que desempeñó un papel importante en el control de la transmisión de la enfermedad. La aplicación de este método permitió realizar el análisis del producto amplificado por secuenciación nucleotídica, confirmando la identificación del virus

En resumen, la aplicación de un ensayo de TR-RCP para la detección del nuevo virus pandémico desarrollado en el laboratorio permitió la identificación y el subtipado rápido y seguro desde el comienzo de la epidemia, alertando de manera oportuna a las autoridades de salud para la toma de acciones en la prevención y el control de la enfermedad. Con la introducción de este protocolo al algoritmo diagnóstico para la vigilancia de los virus influenza y otros virus respiratorios en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", se incrementa la capacidad actual de diagnóstico y permite ubicar a Cuba en un escalón de avanzada en lo que se refiere a la vigilancia y la investigación de las enfermedades respiratorias agudas de origen viral.

#### AGRADECIMIENTOS

A los investigadores, doctora Heidy Díaz de Arce y doctor Lester Josué Pérez Rodríguez del

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Cuba, por su contribución en el diseño de los cebadores. También al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de China por la donación del control positivo de influenza A (H1N1) pdm al laboratorio.

#### Design and implementation of a molecular method for influenza A virus (H1N1) in Cuba

#### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** from March through April of 2009, Mexico notified outbreaks of respiratory illness, due to a new influenza virus of swine origin, which spread over rapidly via human-to-human transmission. The molecular methods currently in use were not suitable because the genome composition based on gene segments of swine, avian and human origin was quite different from the influenza A virus (H1N1) circulating at that time. **OBJECTIVE:** based on the published sequences, a set of specific primers for the HA gene was designed to evaluate a new RT-PCR assay. **METHODS:** the RT-PCR assay processed 3 197 clinical samples from suspected cases of pandemic influenza A (H1N1) infection. **RESULTS:** the novel optimized method obtained a 262 pb segment, without unspecific reactions. The new method proved to be useful in the diagnosis and subtyping of pandemic H1N1 influenza virus. The amplified product was verified by nucleotide sequencing, thus confirming the virus. **CONCLUSIONS:** the introduction of this new assay for the laboratory surveillance of influenza virus strengthens the diagnostic capacity of the National Reference Laboratory.

**Key words:** reverse transcription–polymerase chain reaction, molecular diagnosis, pandemic influenza A (H1N1).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;18;360(25):2605-15.
2. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* 2009;459(7250):1122-5.
3. Lalle E, Bordini L, Castillego C, Meschi S, Selleri M, Carletti F, et al. Design and clinical application of a molecular method for detection and typing of the influenza A/H1N1pdm virus. *J Virol Methods.* 2009;163(2):486-8.
4. Bridges CB, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Singleton JA. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2002;12;51(RR-3):1-31.
5. Spackman E, Suarez DL. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol.* 2008;436:19-26.
6. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawakita Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):152-79.
7. Lin JH, Tseng CP, Chen YJ, Lin CY, Chang SS, Wu HS, et al. Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic

- screening for virus variants by high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1090-7.
8. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 1998;351(9101):472-7.
  9. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet.* 1999;354(9182):916-7.
  10. Tweed SA, Skowroski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W, et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(12):2196-9.
  11. Epiflu-database-supports-AH1N1-influenza. Available in: <http://platform.gisaid.org>. and <http://www.isb-sib.ch/news-events/news/318—epiflu-database-supports-ah1n1-influenza-research.html>
  12. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods.* 1995;53:25-36.
  13. Gomolin IH, Kathalia RK. Influenza. How to prevent and control nursing home outbreaks. *Geriatrics.* 2002;57(1):28-30,3-4.
  14. Lee PP. Prevention and control of influenza. *South Med J.* 2003;96(8):751-7.
  15. Church DL, Davies HD, Mitton C, Semeniuk H, Logue M, Maxwell C, et al. Clinical and economic evaluation of rapid influenza a virus testing in nursing homes in calgary, Canada. *Clin Infect Dis.* 2002;15;34(6):790-5.
  16. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 2004;430(6996):209-13.
  17. Likitnukul S, Boonsiri K, Tangsuksant Y. Evaluation of sensitivity and specificity of rapid influenza diagnostic tests for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(11):1038-9.
  18. Tenorio-Abreu A, Eiros JM, Rodriguez E, Bermejo JF, Dominguez-Gil M, Vega T, et al. [Influenza surveillance by molecular methods.]. *Rev Esp Quimioter.* 2009;22(4):214-20.
  19. Vidal LR, Siqueira MM, Nogueira MB, Raboni SM, Pereira LA, Takahashi GR, et al. The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(2):180-5.
  20. Nakamura S, Katamine S, Yamamoto T, Foung S, Kurata T, Hirabayashi Y, et al. Amplification and detection of a single molecule of human immunodeficiency virus RNA. *Virus Genes.* 1993;4:325-38.
  21. Simple-Approach-For-Optimization-Of-RT-PCR [en línea]; 2009. Available in: <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/1319/Simple-Approach-For-Optimization-Of-RT-PCR.html>

Recibido: 19 de octubre de 2010. Aprobado: 18 de noviembre de 2010.

*Odalys Valdés Ramírez.* Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

AP 601, Marianao 13, La Habana, Cuba. Teléf.: 2553549. Correo electrónico: [odalys@ipk.sld.cu](mailto:odalys@ipk.sld.cu)