

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



Monografía para optar por el título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico.

Optimización y validación de un PCR en tiempo real para la detección y genotipificación de *Campylobacter spp* como bacteria causante de gastroenteritis.

**Autores:** Br. Cristina Eloisa Flores Martínez.

Br. Ariana Valentina Zapata Tórrez.

**Tutor:** MSc. Fredman González.  
Profesor asistente  
Dpto de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Ciencias Médicas  
UNAN-León

Octubre del 2023

¡A la libertad por la Universidad!

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



Monografía para optar por el título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico.

Optimización y validación de un PCR en tiempo real para la detección y genotipificación de *Campylobacter spp* como bacteria causante de gastroenteritis.

**Autores:** Br. Cristina Eloisa Flores Martínez.

Br. Ariana Valentina Zapata Tórrez.

**Tutor:** MSc. Fredman González.  
Profesor asistente  
Dpto de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Ciencias Médicas  
UNAN-León

Octubre del 2023

¡A la libertad por la Universidad!

### **Dedicatoria:**

Queremos dedicar esta tesis primeramente a Dios por ser nuestro guía, nuestra fuerza para lograr concluir la carrera y también por habernos otorgado una familia maravillosa que nos han brindado su apoyo.

A nuestros padres por sus consejos, su apoyo incondicional, su paciencia, sus oraciones y palabras de aliento.

Nuestros hermanos y tíos por motivarnos a alcázar nuestra meta.

A nuestro tutor por brindarnos su apoyo hasta concluir nuestra tesis.

A los docentes que han sido parte de nuestro aprendizaje ayudándonos a ser profesionales de éxito.

## **Agradecimientos:**

Primero queremos dar gracias a Dios por ayudarnos a finalizar esta etapa de nuestras vidas, llenas de muy buenas experiencias y muchos conocimientos que serán herramientas en nuestro futuro como profesionales y como personas.

Agradecer a nuestros padres por darnos la vida, por su ejemplo, su disciplina, sentido de la responsabilidad y sobre todo por su amor. A nuestros hermanos, los cuales nos han inspirado a esforzarnos y trabajar duro para alcanzar las metas que nos propongamos en la vida, gracias por su amistad, su apoyo en todo momento y su infaltable alegría.

Agradecer a nuestros abuelos por su presencia en el desarrollo de este trabajo

A nuestro tutor MSc. Fredman González quien con su experiencia como docente ha sido la guía idónea durante el proceso que ha llevado realizar esta tesis, nos ha brindado el tiempo necesario y la dedicación de brindar sus conocimientos para la mejora en la construcción de mi tesis para que llegue a ser felizmente culminada.

A los docentes que laboran en el Campus Médico, por haber trabajado duro y esmeradamente para educar una generación de la cual he tenido el privilegio de ser parte.

## Resumen:

### **Optimización y validación de un PCR en tiempo real para la detección y genotipificación de *Campylobacter spp* como bacteria causante de gastroenteritis.**

Autores: Ariana Zapata<sup>1</sup> Cristina Flores<sup>1</sup> Fredman Gonzalez<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Escuela de Bioanálisis clínico. Facultad de ciencias médicas. UNAN-León.

<sup>2</sup>Departamento de microbiología y parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-León.

**Introducción:** La Campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Campylobacter spp*, son frecuentes en menores de 2 años, pudiendo tener consecuencias mortales, se caracteriza por la presencia de diarrea (a menudo sanguinolentas). En países en vías de desarrollo, se emplean métodos rutinarios, costosos, que no son lo suficiente sensibles, ni específicos, capaces de determinar la etiología de la diarrea incluida la bacteria de *Campylobacter spp*.

**Objetivo:** Optimizar y validar la técnica de PCR en tiempo real para la detección y diferenciación de *Campylobacter spp*, como bacteria causante de gastroenteritis.

**Metodología:** Se realizó un estudio analítico experimental, en donde se optimizaron los parámetros termodinámicos, volumen de reacción y de muestras, así como, la determinación del límite de detección a través de la generación de una curva estándar, finalmente, para la validación se analizaron muestras diarreicas de infantes menores de 5 años para la detección de *Campylobacter spp* y especies patógenas *jejuni/coli*.

**Resultados:** la eficiencia del PCR en tiempo real optimizado fue de 107.1% ( $R^2=0.977$ ), con un rango dinámico de  $10^1$ - $10^5$  e.g (equivalente genómico) y un límite de detección 0.0000544 ng/ $\mu$ l ( $5.44 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ l), otros parámetros optimizados fueron el volumen de reacción, volumen de muestras y temperaturas de hibridación, obteniéndose que los volúmenes óptimos y temperatura de hibridación fueron 12.5  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l y 60°C respectivamente. A continuación, para determinar la genotipificación y validación de nuestro estudio utilizando la PCR, se analizaron 90 muestras en total, de las cuales 20 eran positivas para *Campylobacter spp* y siendo el 95% *Campylobacter jejuni/coli* y solo el 5% *Campylobacter no jejuni/coli*. **Conclusión:** Se optimizó y validó un PCR en tiempo real, que puede ser utilizado para investigaciones futuras y estudios epidemiológicos.

## **Abreviaciones.**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**PCR:** Reacción en cadena polimerasa

**µl:** Microlitro

**ng:** Nanogramo

**dL:** Decilitro

**ADNc:** ADN complementario

**mPCR:** PCR multiplex

**qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**AMPc:** Monofosfato de adenosina cíclico

**Fc:** Fragmento cristalizable

**Fab:** Fragmento de unión del anticuerpo

**dNTP:** Nucleótidos que sirven para generar las nuevas cadenas de ADN

**RT:** Transcripción Reversa.

**pb:** Pares de bases.

**Ct:** Umbral de Ciclos.

**Vf:** Volumen final

**e.g:** Equivalente genómico.

**RFU:** Unidades relativas de Fluorescencia.

## Índice

1. Introducción: .....	1
2. Antecedentes:.....	3
3. Planteamiento del problema: .....	5
4. Justificación: .....	6
5. Hipótesis:.....	7
6. Objetivos:.....	8
7. Marco Teórico:.....	9
7.1 <i>Campylobacter</i> :.....	10
7.2 Fisiopatología de la diarrea:.....	13
7.3 Mecanismo de acción de bacterias:.....	14
7.5 Factores de riesgo: .....	16
7.6 Métodos diagnósticos: .....	17
7.7 PCR convencional: .....	19
7.8 PCR en tiempo real:.....	20
7.9 Contaminación de PCR:.....	27
8. Diseño Metodológico: .....	30
8.1 Recolección y procesamiento de la muestra:.....	30
8.2 Determinación del límite de detección: .....	30
8.3. Preparación de muestras y estándares:.....	31
8.4 Extracción y purificación de ADN genómico: .....	32
8.5 Ensayo de RT-PCR: .....	35
8.6 Preparación del MasterMix y preparación del plato. ....	36
8.7 Mezcla para RT – PCR: .....	36
8.8 Programa de amplificación.....	36

8.9 Condiciones de optimización del PCR .....	36
8.10 Validación de PCR en tiempo real: .....	38
9. Resultados:.....	39
9.1 Determinación del Límite de detección: .....	39
9.2 Determinación de los Volúmenes de reacción: .....	40
9.3: Optimización de los Volúmenes de muestras: .....	41
9.4 Temperatura óptima de hibridación de los primers .....	42
10. Discusión:.....	46
11. Conclusiones:.....	49
12. Recomendaciones:.....	50
13. Bibliografía: .....	51
14. Anexos: .....	58

## 1. Introducción:

La gastroenteritis es una de las enfermedades más comunes en infantes y una de las principales causantes de mal nutrición y la segunda causa de muerte en niños menores, siendo este grupo los que se ven afectados de manera desproporcionada. Según la Organización mundial de la salud (OMS) se estima que existen alrededor de 1700 millones de casos de diarrea infantil, de los cuales 525,000 mueren anualmente.(1)

Las Infecciones gastrointestinales son provocadas por agentes patógenos de origen bacteriano, viral y parasitario. Siendo las de origen bacteriano las más comunes. Dentro de los patógenos bacterianos asociados a la gastroenteritis, se encuentran la bacteria *Campylobacter spp*, un basófilo en forma de espiral, el cual comprende 17 especies, ésta es considerada como el segundo patógeno bacteriano de mayor incidencia encontrado en niños menores. Estas bacterias invaden el intestino delgado adsorbiendo nutrientes, reproduciéndose, provocando deshidratación y diarrea (acuosa aguda, sangre aguda, crónica), con mayor afectación en la infancia.(2,3)

Es transmitido al ser humano por vía zoonótica, por contacto directo o indirecto, puesto que se transmite por productos alimenticios de origen animal, tales como carnes de aves, vacas y cerdos, y escasamente por medio de perros y gatos. Existen diferentes factores que favorecen las infecciones diarreicas por *Campylobacter spp*, como la desnutrición, mal absorción, la falta de lactancia materna, el grupo etario (niños menores de un año) puesto que sus defensas a un no están lo suficientemente desarrolladas para combatir contra un organismo invasor.(1,4)

Para el diagnóstico se utilizan diferentes análisis como: examen general de heces, coprocultivo, análisis serológicos, análisis de sangre (medición de electrolito), y métodos moleculares siendo el PCR el de mayor logro en el diagnóstico, ya que detecta el gen específico del agente. (5)

La PCR en tiempo real o cuantitativa (q-PCR), es una herramienta capaz de amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de ADN debido a la fluorescencia, la cual está correlacionada con la cantidad. (6)

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. El propósito del presente estudio es optimizar el PCR en tiempo real para detectar *Campylobacter spp* y su genotipo más virulento (*jejuni/coli*) como causante de infecciones diarreicas en infantes.  
(7)

## 2. Antecedentes:

Rivera (2011). Genotipificación y resistencia antimicrobiana de cepas de *Campylobacter spp* aislados en niños y aves de corral. analizaron 341 muestras, 291 humanas y 50 aviares. De las muestras, 220 de niños con síndrome diarreico agudo-SDA y 71 de niños sanos. A las 23 cepas obtenidas se les realizó serotipificación de Penner, genotipiación por RAPD-PCR. Se encontró *Campylobacter jejuni* sólo en pacientes con SDA en un 6,6% y en aves la prevalencia de *Campylobacter spp*, fue de 34%. Las cepas humanas fueron no tipificables por el método de Penner. Hubo resistencia cruzada a ácido nalidixico y ciprofloxacina en 33,3% cepas de origen humano y 11,8% animal. La especie que predominó en aves de corral y en humanos fue *C. jejuni*.(8)

Elfving (2014). Realizo PCR para identificar patógeno causante de diarrea infantil. Participaron 330 niños de Zanzíbar se realizaron un hisopado rectal 165 niños presentaban diarrea aguda. Se detectó al menos un agente en el 94% de los pacientes. La tasa más alta entre los pacientes fue la norovirus genogrupo II con 20% frente a 2,4%  $P < 0,0001$ , rotavirus 10% frente a 1,8% y *Cryptosporidium* 30% frente a 11%. para *Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)- estA* (33% frente a 24%, *ETEC- eltB* 44% frente a 46%, *Shigella spp* 35% frente a 33% y *Campylobacter spp* 35% frente a 33%. Se concluyó que el PCR es útil para identificar el agente en las muestras clínicas. (9)

Liu (2016). Optimizaron el PCR para la detección molecular y cuantificación de enteropatógenos. En muestras fecales e hisopados rectales que fueron tomadas de 129 niños con diarrea en el hospital de Tanzania. El ciclo de cuantificación (Cq) fue de 35, La concentración de cebadores de 900 nM y la concentración de sonda de 250 nM. El (Cq) más alto fueron los hisopados, con un promedio de 29,7 y una desviación estándar de 3,5. A diferencia de las heces que obtuvieron un 25,3 de promedio, 2,9 (Desviación estándar)  $P < 0.001$ . En las heces se detectó el 80% de patógenos con un valor de Cq  $< 30$ . Compararon la extracción de ácidos nucleicos total y separados (ADN, ARN) encontrando una sensibilidad de 92% y una especificidad de 98%. No hubo diferencia en los resultados positivos con el valor de Cq. El estudio demostró que la cuantificación de enteropatógenos extracción y amplificación de las muestras, son eficiente para analizar enfermedades de origen patógenas. (10)

Herrera (2020). Establecieron un RT-PCR para identificar *Campylobacter spp.* Conocer la carga, características clínicas y factores de riesgo en niños menores de un año en Nicaragua. Un estudio de caso control, analizaron 293 muestras de 173 niños en su primer año de vida. Se encontraron 59 (20.1%) muestras positivas, el 39 (66.1%) identificadas como *Campylobacter jejuni / coli*, el 55 (93%) se asociaron con diarrea, 14 (24%) se asociaron con vómitos, sangre en las heces en 6 (10%). Los casos de gastroenteritis fueron positivos 24 (26.7%) para *Campylobacter spp.*, en comparación con 5 (5.6%) de los controles. La diarrea por *Campylobacter spp.* fue 6.18 veces mayor en niños con diarrea que en niños controles. Se logró identificar las especies de *Campylobacter* por el método de RT-PCR. (3)

### 3. Planteamiento del problema:

¿Cuáles son las condiciones óptimas del PCR en tiempo real para la detección y diferenciación de *Campylobacter spp*, como bacteria causante de gastroenteritis?

#### **4. Justificación:**

Las infecciones en humanos causadas por *Campylobacter* son una problemática creciente con un gran impacto en la salud pública a nivel mundial, afectando en su mayoría a personas en países en vías de desarrollo como Nicaragua, siendo los niños menores de 5 años los más afectados llegando a causarles la muerte, generando que haya una necesidad de obtener un diagnóstico temprano para la identificación de estas.

A pesar que la *Campylobacter* es un patógeno importante en humanos los métodos diagnósticos son escasos, particularmente en países en desarrollo. Debido a la fragilidad de la *Campylobacter* y el hecho de que el diagnóstico presuntivo se basa en microscopia de campo oscuro y se necesiten medios de cultivo selectivos son de alto costo el sector salud debe utilizar muchos métodos diagnósticos para su identificación aumentando el costo del diagnóstico.

Muchos estudios han reportado una gran sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, entre ellos el PCR en tiempo real, ya que permite la amplificación de las secuencias de ADN a medida que la reacción avanza. Es por eso que en esta investigación se busca la optimización de esta prueba, describiendo los experimentos necesarios para una optimización de los procedimientos que forman esta prueba, y de esta manera estos se usen de referencia para futuros estudios sobre la presente investigación.

Este nuevo ensayo de optimización PCR en tiempo real permitirá la implementación de un diagnóstico sensible y específico disponible en el departamento de Microbiología de la UNAN León que permita brindar a la comunidad un diagnóstico certero de la etiología bacteriana de la diarrea aguda principalmente en niños.

## **5. Hipótesis:**

Las condiciones óptimas del PCR en tiempo real para *Campylobacter spp* son: temperatura de alineamiento de 60°C, concentración de primers de 10µM y volúmenes de muestra de 3µl.

## 6. Objetivos:

### Objetivo General:

- Optimizar y validar la técnica de PCR en tiempo real para la detección y diferenciación de *Campylobacter spp*, como bacteria causante de gastroenteritis.

### Objetivos específicos:

- Determinar el límite de detección, volumen final de Reacción y volumen de muestra de ADN necesario para la detección de *Campylobacter spp*.
- Indicar las características termodinámicas óptimas del presente PCR en tiempo real.
- Diferenciar los tipos de *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni/coli* y *Campylobacter no jejuni/coli* en muestras diarreicas de niños.
- Validar el ensaño de PCR en tiempo real para la detección de *Campylobacter spp* utilizando muestras fecales de niños con diarrea.

## 7. Marco Teórico:

La gastroenteritis es una inflamación y/o disfunción del intestino producida por virus, bacterias o parásitos, que da lugar a una alteración de su capacidad para regular la absorción y secreción de sales y agua, produciendo diarrea. Las toxinas pueden estar preformadas en los alimentos o bien ser liberadas por el agente causal una vez ingerido y tras invadir la mucosa desde la luz intestinal.(11)

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes, superadas sólo por las infecciones del tracto respiratorio, con 550 millones de personas que enferman y 230.000 que mueren cada año. Se ha estimado que, en Asia, África y Latinoamérica, dependiendo de factores socioeconómicos y nutricionales, los niños corren un riesgo especial de padecer enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos: 220 millones enferman y 96.000 mueren cada año; la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años por estas causas puede llegar al 50%. (1,12)

Pese a los avances en las últimas décadas en el manejo y prevención de diarrea (uso de suero de baja osmolaridad, uso de zinc, desarrollo de nuevas vacunas), esta sigue siendo la tercera causa de muerte en menores de 5 años. Además de los efectos en mortalidad, la diarrea infantil afecta el crecimiento y desarrollo. Los niños con episodios prolongados de diarrea o episodios a repetición tienen mayor probabilidad de desarrollar no solo desnutrición aguda (adelgazamiento), sino también desnutrición crónica (talla baja). Los episodios de diarrea a repetición en los primeros dos años de vida se correlacionan con menor neurodesarrollo, bajo rendimiento escolar y salarios menos remunerados en la edad adulta.

Los patógenos asociados con diarrea incluyen virus (*rotavirus*, *norovirus*, *astrovirus* y *adenovirus entéricos*), bacterias (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio*, entre otros), y parásitos (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*, *Microsporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*). La frecuencia relativa de cada patógeno varía dependiendo del grupo de edad, lugar y si el registro de casos es a nivel comunitario u hospitalario. (13)

Las causas de diarrea bacteriana más comunes son las producidas por las diversas categorías de *Escherichia coli* diarreogénico, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae* y *Clostridium difficile*, Actualmente se conocen 171 antígenos somáticos de *E. coli* y 56 antígenos flagelares, con 6 tipos diferentes productores de diarrea: enteropatógeno, enterotoxigénico, enteroinvasivo, enterohemorrágico, enteroagregativo y de adhesividad difusa, con excepción de *E. coli* enterohemorrágico (O157-H7). (14,15)

**Tabla 1:** Principales bacterias causantes de diarrea en niños.

Más importantes	Menos importantes
<i>Shigella sp</i>	<i>Salmonella spp</i>
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP)	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (ECEI)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Vibrio cholerae</i> (Muy importante en países en vías de desarrollo)

En Nicaragua se identifican predominantemente enfermedades gastrointestinales debido principalmente a infecciones e intoxicaciones bacterianas causadas por contaminación de los alimentos o el agua que han tenido contacto con heces. Los microorganismos responsables de estas enfermedades comprenden *coliformes fecales*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp* entre otras(16)

### 7.1 *Campylobacter*:

Taxonomía: La secuencia del ADN ribosómico 16S dentro del phylum Proteobacteria genera cinco clases diferenciadas, siendo una de ellas las Epsilonbacterias. Dentro de esta clase podemos encontrar la orden: Campylobacterales. El género de *Campylobacter* pertenece a la familia Campylobacteraceae. (17)

El género *Campylobacter* contiene 25 especies, siendo *C. jejuni* la especie de mayor importancia en el hombre; se encuentra como reservorio en el intestino de animales domésticos, principalmente aves de corral, por lo que se puede encontrar en alimentos destinados al consumo humano, tales como carne de pollos boiler y sus subproducto.(18)

Morfología: Los miembros del género *Campylobacter* son bacterias Gram negativas, microaerófilos con forma curva o espiral de la familia Campylobacteriaceae. *Campylobacter jejuni* (anteriormente conocida como *C. fetus subespecie. jejuni*) y *C. coli* se asocian con la enteritis en los animales domésticos y los humanos. Algunas cepas de *C. jejuni*, *C. fetus subespecie venerealis*, y *C. fetus subespecie fetus* (también conocida como *C. fetus subespecie intestinalis* y *Vibrio fetus var intestinalis*) causan infertilidad y abortos en el ganado ovino y bovino. Ocasionalmente, se puede aislar *C. fetus subespecie fetus* de humanos con septicemia. Otras especies de *Campylobacter*, entre ellas *C. lari*, *C. hyointestinalis* y *C. upsaliensis*, pueden causar enfermedades, pero parecen ser de poca importancia en los animales domésticos. Algunas especies no definidas de *Campylobacter* pueden estar implicadas en la ileitis proliferativa de los hámsteres, la enteritis proliferativa porcina y la colitis proliferativa de los hurones.(19)

El crecimiento y la sobrevivencia de *Campylobacter spp* depende de una serie de factores. Estos organismos son sensibles a las condiciones físicas del medio externo (actividad de agua, calor, radiación UV y sal) y no se multiplican fuera de los hospederos de sangre caliente.

Temperatura: El rango óptimo de crecimiento ocurre entre los 37°C y 42°C. Algunas especies de *Campylobacter* son termofílicas, no crecen bajo los 30°C, por ende, el número de *Campylobacter spp.* no crecería en alimentos mantenidos a temperatura ambiente (20-25°C). A pesar de que *Campylobacter spp.* no es capaz de crecer a temperaturas bajo los 30°C, bajo ciertas condiciones de humedad, sí sobrevive a temperaturas de refrigeración (4°C), donde se han encontrado células viables en alimentos después de 7 meses de almacenamiento. En cuanto a las temperaturas de congelación (-22°C), un estudio quiso examinar la supervivencia de *Campylobacter spp.* en piel de pollo naturalmente contaminada y carne picada, cuyos resultados indicaron que los números disminuyeron aproximadamente 1 log<sub>10</sub> durante el primer período de

24 horas, sin observarse una reducción adicional significativa mediante congelación prolongada. Aunque *Campylobacter spp.* sobreviven bien a temperaturas frías, son sensibles al calor y se inactivan fácilmente mediante el tratamiento de pasteurización o la cocción doméstica. El calentamiento a 55-60°C durante 1 minuto destruye fácilmente a *Campylobacter spp.*(20)

La actividad de la oxidasa está presente en todas las especies excepto para *C. gracilis*. No fermentan ni oxidan carbohidratos, sino que obtienen su energía a partir de aminoácidos, o intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos; siendo la mayoría de las cepas resistentes a la cefalotina.(21)

Respecto al metabolismo, son quimiorganotrofos respiratorias. La característica de ser microaerofílica se debe a que *C. jejuni* posee una enzima (Ribonucleotido reductasa) que es dependiente de oxígeno y necesaria en la síntesis de ADN.(22)

Morfología colonial: Las colonias tienden a ser incoloras o grises. Pueden ser acuosas y difusas o redondas y convexas, o ambas pueden aparecer. Se necesitan medios selectivos y la incubación debe ser en una atmósfera con poco O<sub>2</sub> (5%) con CO<sub>2</sub> (10%).(23)

Epidemiología: La Campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Campylobacter*. Es la causa más frecuente de gastroenteritis en el mundo desarrollado; ocasionando del 5% al 14% de los casos de diarrea en todo el mundo.

*Campylobacter jejuni* es la bacteria más frecuentemente aislada como agente causante de diarrea. Se ha observado que las infecciones por estas bacterias son de tipo estacional, sobre todo en climas templados donde ocurre dos veces al año en verano e invierno, reportándose además que produce dos tipos de diarrea: la diarrea inflamatoria con fiebre, moco y sangre en el excremento con un gran contenido de leucocitos, y la diarrea sin inflamación con excremento acuoso y ausencia de leucocitos y sangre.

Transmisión: La transmisión se considera principalmente de tipo ocupacional como los granjeros, carniceros y procesadores de alimentos de aves de corral. También se

considera que las mascotas son una fuente de transmisión que pueden infectar al humano.(24)

### Características Clínicas:

La forma más común de gastroenteritis se caracteriza por evacuaciones intestinales frecuentes, más o menos líquidas, denominadas diarrea. La diarrea está provocada por mecanismos patogénicos que atacan el intestino delgado proximal, porción del intestino en la que se produce más del 90% de la absorción fisiológica de fluidos. La forma más pura de diarrea acuosa es la producida por bacterias secretoras de enterotoxinas, como por ejemplo *Vibrio cholerae* o *Escherichia coli* (12)

El carácter y la intensidad de los síntomas de la gastroenteritis varían. Por lo general, el comienzo es súbito, con anorexia, náuseas, vómitos, cólicos abdominales y diarrea (con sangre y moco, o no). Puede haber malestar general y mialgias. El abdomen puede estar distendido y levemente doloroso a la palpación; en casos graves, puede haber defensa muscular. Pueden palparse asas intestinales distendidas por gas. Hay ruidos hidroaéreos hiperactivos en la auscultación aun sin diarrea (una característica diferencial importante respecto del íleo paralítico, en el que hay ausencia o disminución de ruidos hidroaéreos). Los vómitos y la diarrea persistentes pueden provocar depleción de líquido intravascular, con hipotensión y taquicardia. En los casos graves puede ocurrir shock hipovolémico con colapso vascular e insuficiencia renal oligúrica.

Si los vómitos son la principal causa de pérdida de líquido, puede observarse alcalosis metabólica hipoclorémica. Si es más prominente la diarrea, hay mayor probabilidad de acidosis metabólica. Tanto los vómitos como la diarrea pueden causar hipocalcemia. Puede producirse hiponatremia, en particular si se administran líquidos hipotónicos durante el tratamiento de reposición. (25)

### **7.2 Fisiopatología de la diarrea:**

La diarrea es una consecuencia de la disfunción en el transporte de agua y electrolitos a nivel del intestino. Como resultado de esta alteración se produce un aumento de la frecuencia, cantidad y volumen de las heces, así como un cambio en su consistencia por

el incremento de agua y electrólitos contenidos en ellas. Todo esto condiciona un riesgo, que es la deshidratación y los trastornos del equilibrio hidrominera.(26)

Fisiopatológicamente, la diarrea se ha clasificado según cuatro diferentes mecanismos:

**Diarrea osmótica:** relacionada con un aumento en la movilización de contenido acuoso hacia la luz intestinal, secundario a la presencia de una carga importante de solutos osmóticamente activos a ese nivel. Este es el mecanismo fundamental de la diarrea secundaria a intolerancia a azúcares o el uso de laxantes osmóticos (lactulosa).

**Diarrea secretora:** es el mecanismo que con más frecuencia ocasiona los episodios de diarrea en la edad pediátrica, (casi 70% de los casos). La diarrea producida por la toxina del cólera es su ejemplo más característico, en la cual la bacteria produce la toxina A que se une a receptores específicos en el enterocito, activando la adenilciclase que produce un aumento en los niveles del AMP-c intracelular. Este segundo mensajero es responsable del aumento de la secreción de Cl, que arrastra grandes volúmenes de agua y sodio.

**Diarrea invasiva:** el agente patógeno se adhiere al enterocito, alcanza el espacio intracelular, produce apoptosis de las uniones intercelulares, y se replica dentro de la célula o en el espacio intersticial, con una consecuente respuesta inflamatoria local y/o sistémica y lesión mucosal en grado variable. Este mecanismo ocurre en la diarrea por *Shigella spp*, *Campylobacter spp*, *E. histolytica* y *Clostridium spp*.

**Diarrea por alteración de la motilidad:** se presenta por aumento en la contractilidad intestinal (ej.: síndrome de intestino irritable) o por disminución del peristaltismo intestinal, lo cual puede producir sobrecrecimiento bacteriano que posteriormente ocasiona diarrea.(27)

### **7.3 Mecanismo de acción de bacterias:**

Los mecanismos de acción de los enteropatógenos involucrados son muy diversos, puesto que mientras los virus y los enteropatógenos enterotoxigénicos suelen inducir una

respuesta inflamatoria mínima, en las infecciones por bacterias enteroinvasivas, la respuesta inflamatoria intestinal que involucra activación y quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares, suele ser más intensa y puede expresarse en la presencia de deposiciones con moco y sangre, además de abundantes leucocitos en las heces o la presencia de lactoferrina fecal.

Las enterotoxinas bacterianas constituyen posiblemente la causa más estudiada de secreción intestinal. La toxina del cólera se une a una glucoproteína en la membrana celular e induce la secreción en unas pocas horas. La subunidad A de la toxina colérica se separa de la proteína G unida a la membrana, para liberar un fragmento que es capaz de atravesar la célula y activar el sistema adenilciclasa. También las cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* liberan una toxina termolábil (TL) que tiene una acción similar a la toxina del cólera, mientras que las toxinas termoestables de enterobacterias como la *Yersinia enterocolítica*, provocan secreción mediante la activación del sistema guanilciclasa. Otros organismos como virus y *Shigella spp* pueden invadir y dañar el epitelio intestinal directa o indirectamente a través de la liberación de agentes citotóxicos.(26)

La invasión a la mucosa ocurre con algunas bacterias como: *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *C. difficile*, algunos subtipos de *E. coli* que invaden la mucosa del intestino delgado o del colon y causan ulceración, sangrado, exudación de líquido rico en proteínas, y secreción de electrolitos y agua. El proceso invasivo y sus consecuencias pueden aparecer ya sea que el microorganismo produzca o no una enterotoxina. La diarrea resultante muestra evidencias de esta invasión e inflamación con leucocitos y eritrocitos en el examen microscópico y a veces con sangre macroscópica.(25)

La enfermedad gastrointestinal por *Campylobacter jejuni* se caracteriza por la aparición de una lesión histológica en la superficie mucosa del yeyuno, íleon y colon. La superficie mucosa aparece ulcerada, edematosa y hemorrágica, con abscesos en las criptas de las glándulas epiteliales e infiltración de la lámina propia por neutrófilos, células

mononucleares y eosinófilos. El proceso inflamatorio es compatible con la invasión del tejido intestinal por los microorganismos. (27)

### 7.5 Factores de riesgo:

En países en vías de desarrollo, grupos de investigadores de la OMS, han sugerido la existencia de factores de riesgo para tales episodios, y destacan fundamentalmente a la edad, malnutrición por defecto, inmunodeficiencia celular, destete precoz e introducción temprana de leches artificiales, infecciones previas y el uso injustificado de algunos medicamentos en la etapa aguda de la enfermedad diarreica. Sin lugar a dudas, tras estas "circunstancias" existen factores socio ambientales y culturales, y su identificación posibilitaría en alguna medida su modificación y la consiguiente reducción (**ver figura 1 y tabla 2**) (2)

**Figura1:** Triada Epidemiológica



**Tabla 2:** Factores de riesgo para el desarrollo de diarrea

RELACIONADO CON EL INDIVIDUO	RELACIONADO CON EL ENTORNO
Edad	Ingesta de agua contaminada
Ablactación temprana	Saneamiento deficiente
Lactancia materna inadecuada	Bajo nivel socioeconómico
Bajo peso	Patrones culturales adversos
Ausencia de inmunización	Habitar en zonas rurales

## **7.6 Métodos diagnósticos:**

Los métodos de diagnóstico convencionales utilizados en el diagnóstico de gastroenteritis incluyen:

**Técnicas de cultivo bacteriano:** que requieren varios días para obtener resultados, pruebas microscópicas para detección de huevos y parásitos, que requieren alta especialización del personal, y técnicas de detección de antígeno. Con frecuencia, cuando se consigue cultivar el agente etiológico productor del cuadro clínico, los síntomas ya se han resuelto y no es útil para el manejo del paciente.

**Técnicas de aglutinación en látex:** Se basan en el empleo de partículas de látex unidas al fragmento cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas. Los fragmentos de unión del anticuerpo (Fab) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra.

**Técnicas rápidas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo:** Los antígenos microbianos presentes en las muestras biológicas se pueden detectar y cuantificar mediante técnicas inmunológicas basadas en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo.

**Enzimoimmunoanálisis tipo ELISA:** Utilizan anticuerpos específicos del antígeno problema, unidos generalmente a los pocillos de una microplaca.(28)

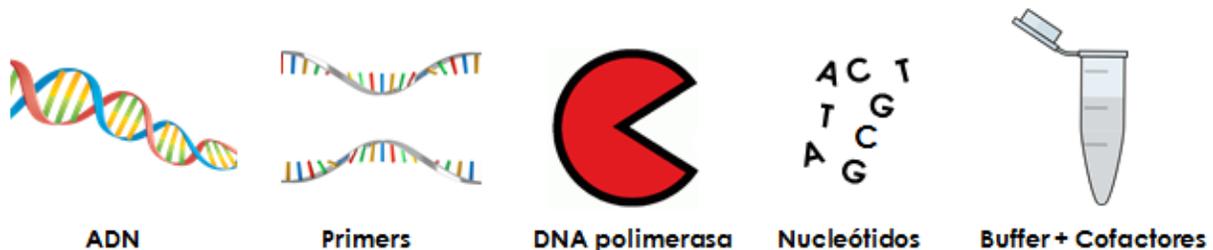
Los métodos diagnósticos moleculares en los laboratorios de microbiología clínica suponen un gran apoyo a la hora de obtener resultados sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible. Estos métodos no sustituyen, sino que complementan los ya usados métodos microbiológicos tradicionales. De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha adquirido un gran valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes etiológicos, y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez. Desde hace algunos años, ha tomado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiples, reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés. En el presente trabajo, se recogen las aplicaciones más relevantes de la PCR múltiple en la microbiología clínica.(28,29)

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. Consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando unos *primers* o cebadores (secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación, que tienen una longitud de 15-30 nucleótidos y son complementarios a la región del ADN que se quiere amplificar). Se basa en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación). (30)

La temperatura de la muestra se sube y baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas.(31)

En esta técnica se reproduce lo que tiene lugar en el interior de la célula. La muestra de ADN se añade en un tubo eppendorf junto con los *primers*, los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima (normalmente magnesio). Una vez introducidos todos los reactivos necesarios para el desarrollo de la técnica, se someterán a una serie de ciclos (25-40 ciclos), con cambios de temperatura característicos y que permitirán amplificar la región concreta del ADN de la muestra (Ver figura 1).

**Figura 2.** Materiales necesarios para una PCR (30).



La PCR ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad(31,32)

Hoy en día existen numerosas variaciones de la reacción en cadena de la polimerasa, según el objetivo y los requisitos que se tenga. Las más habituales son:

-PCR Convencional: Amplificación de un segmento de ADN, detección por empleo de agarosa

-PCR Transcriptasa reversa (RT-PCR): Amplificación de ARN a través de síntesis de cADN.

-PCR En Tiempo Real (qPCR): Mide la cantidad de ADN en la muestra usando colorante fluorescente (Sybr Green o sonda).

-PCR Anidada: Se realiza una 2ª reacción de PCR, con 2 cebadores nuevos que hibrida dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando lugar a productos de PCR más cortos.

-PCR con Adaptadores: Se ligan a sus fragmentos de restricción unos adaptadores sintéticos con extremos compatibles con los de la muestra.

-PCR Asimétrica: Se añaden cantidades diferentes de ambos cebadores, uno se agota y solo se sigue amplificando la hebra donde se hibrida el otro cebador

- PCR alelo específica (AS-PCR): Permite identificar polimorfismos que predisponen a padecer una enfermedad. (31,33)

-PCR múltiples: Son aquellas, en general, que en el proceso de amplificación participan más de dos iniciadores amplificando en un único tubo varias secuencias dianas, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes. Lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias (33)

### **7.7 PCR convencional:**

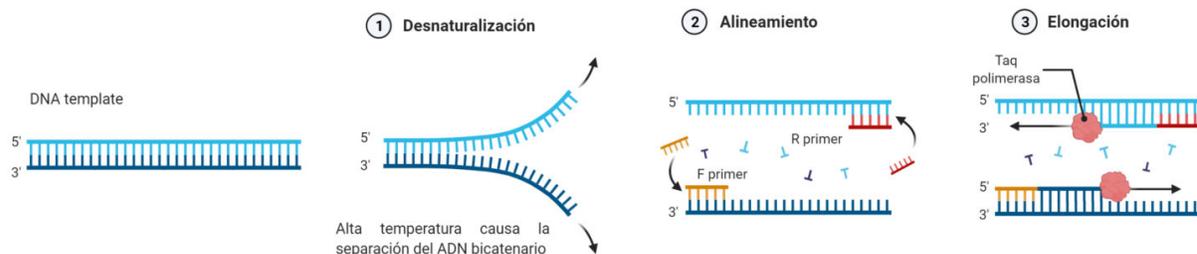
Los ingredientes clave para una reacción de PCR son *Taq* polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos (los bloques básicos del ADN). Los ingredientes se colocan en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN.

En su forma más básica, cada ciclo de PCR consta de tres pasos básicos (ver figura 2):

1. **Desnaturalización:** la reacción se calienta bastante (96°C) para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.
2. **Templado:** la reacción se enfría (55 – 65°C) para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.
3. **Extensión:** la temperatura de la reacción se eleva (72°C) para que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

El resultado neto después del primer ciclo de amplificación es dos copias "degeneradas" (de diferente longitud) del ADN original. El proceso se repite un número determinado de veces, consiguiendo un aumento o amplificación exponencial de copias del fragmento de ADN (29,34,35)

**Figura 3:** Representación esquemática del proceso de la PCR. (36)



La qRT-PCR se diferencia de la PCR convencional en varios puntos. El más importante es que mediante la amplificación con PCR sólo podemos observar el punto final. Es decir, podemos observar si hay o no expresión del gen de interés (CUALITATIVA). La qRT-PCR nos permite saber cuánto hay de cada gen estudiado (CUANTITATIVO).

### 7.8 PCR en tiempo real:

La PCR cuantitativa es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la amplificación (segmentos de ADN, comúnmente llamado amplicón). La medición es por ciclo, por lo que se le denomina PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa (qPCR) se

hace posible gracias a que el amplicón es marcado con un fluoróforo que tras ser excitado a cierta longitud de onda es detectado por los sensores del termociclador, lo que permite cuantificar la fluorescencia emitida. (37)

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de la polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha.(38)

**Polimerasa Termoestable:** Las enzimas ADN polimerasa tienen importantes actividades que le permiten cumplir distintas funciones:

-Actividad polimerasa 5'3': la adición de un nuevo nucleótido en el extremo 3' de una hebra, determinara principalmente la velocidad de una enzima.

-Actividad de exonucleasa 5'3': la polimerasa es capaz de escindir nucleótidos en la dirección de la polimerización (extremo 5'), lo que le permite realizar la reparación del ADN.

-Actividad de exonucleasa 3'5': la polimerasa es capaz de escindir nucleótidos que se acaban de introducir y corregir errores en el extremo 3' de una molécula, lo que determinaría la precisión (o actividad correctora) de una enzima.

-Desplazamiento de cadena: la polimerasa es capaz de desplazar el ADN corriente abajo que se encuentra durante la síntesis. Si la polimerasa también tiene actividad de exonucleasa 5'→3', el ADN desplazado se destruye; si no se mantiene intacto.

-Tolerancia dU: la polimerasa puede usar plantillas que contienen uracilo o puede usar dUTP durante la polimerización. La adición de uracilo es una técnica común para prevenir la contaminación cruzada.

**Primer:** La concentración de primers en una mezcla de reacción que debe ser ajustada para cada par de primers, ya que pueden tener eficiencias de amplificación variables. Debido a esto, en muchas ocasiones, un producto de amplificación puede observarse

bien definido mientras que otros apenas pueden visualizarse e incluso en algunos casos no se observa el amplicón.

Idealmente, todos los juegos de primers permitirían amplificaciones eficientes para su respectivo marcador, sin embargo, la presencia en metodologías múltiples de más de un par puede también incrementar la posibilidad de obtener productos inespecíficos que pudieran llegar a ser mejor amplificados que los dirigidos a la secuencia blanco. Algunos primers poseen un porcentaje de amplificación muy alto (eficiencia) y como resultado las plantillas pueden saturarse en fase de meseta, consumiendo componentes de reacción y distorsionando los tiempos de alineamiento y extensión.(32)

**Diseño de cebadores para PCR en tiempo real:** Un requisito previo para el éxito de la PCR. Los cebadores para la PCR en tiempo real deben tener una longitud de 21 a 30 nucleótidos múltiplex es el diseño de pares de cebadores óptimos.

- a) Longitud del Cebador: Los cebadores usados para la reacción de amplificación varían entre 18 y 24 pb; los cebadores más cortos pueden no proporcionar la adecuada especificidad y los más largos no incrementan la especificidad y son más caros de sintetizar.
- b) Secuencia: La composición de nucleótidos de los cebadores utilizados en el protocolo de amplificación determina directamente la temperatura de hibridación.

Los cebadores para la PCR en tiempo real deben tener un contenido de GC del 50 al 60 %, evita regiones ricas en (A+T) y (C+G). La probabilidad de que un cebador tenga más de un sitio de unión específico dentro de un genoma es significativamente menor para los cebadores más largos. Además, los cebadores más largos permiten la hibridación a temperaturas ligeramente más altas donde la actividad de la ADN Taq polimerasa es mayor.(39)

La mayoría de las PCR en tiempo real de amplio rango utilizan un solo par de cebadores universales para identificar bacterias mediante la amplificación del ADN ribosómico 16S (16S 0072DNA), dado el alto nivel de homología de este gen en toda la diversidad de especies bacterianas.

## **Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr:**

En las bacterias encontramos con que el loci del ADNr contiene los genes que codifican los tres tipos de subunidades estructurales de sus ribosomas: 5S, 16S y 23S ARNr, cuya información genética se organiza en el genoma en forma de operones. Dichos genes se encuentran separados entre sí por regiones de distinto tamaño y secuencia, en función del género y especie de la bacteria en cuestión. De entre las regiones que separan los genes, la ISR (Intergenic Spacer Region) situada entre los genes que codifican para el ARNr 16S y el 23S destaca por ser una de las que presenta mayor variabilidad.

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500nt (número de nucleótidos), codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla.

Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de ARNr contienen segmentos bien definidos de diferente variabilidad evolutiva, que a nivel de la molécula 16S ARNr se denominan como regiones universales (U), semiconservativas (S) y variables (V). Independientemente de la especie, el ARNr posee la misma función, lo que nos indica que los genes correspondientes se encuentran bajo la misma presión evolutiva. Debido a ello el análisis de la secuencia del ARNr se hace muy adecuado en estudios filogenéticos y evolutivos. (40)

En la última década, como resultado del uso generalizado de PCR y secuenciación de ADN, la secuenciación de ADNr 16S ha desempeñado un papel fundamental en la identificación precisa de aislados bacterianos y el descubrimiento de nuevas bacterias en laboratorios de microbiología clínica. Para la identificación bacteriana, la secuenciación del ADNr 16S es particularmente importante en el caso de bacterias con perfiles fenotípicos inusuales, bacterias raras, bacterias de crecimiento lento, bacterias no cultivables e infecciones con cultivos negativos. No solo ha proporcionado información sobre las etiologías de las enfermedades infecciosas, sino que también ayuda a los

médicos a elegir antibióticos y a determinar la duración del tratamiento y los procedimientos de control.

La gran mayoría de la información molecular de bacterias de la que hoy en día disponemos se basa principalmente en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S. Debido en gran parte a su carácter conservativo y a su menor tamaño relativo al compararlo con el gen que codifica el ARNr 23S, convirtieron inicialmente a este gen, en la estructura génica idónea sobre la que perfilar la taxonomía de la vida procariota.(40)

La región intergénica 16S-23S ARNr del gen 16S. se obtienen mediante la amplificación, empleando cebadores hasta encontrar la combinación óptima de temperatura y ciclos. Colaborando con la identificación taxonómico bacteriano.(40). Además del ADNr 16S, el gen que codifica la subunidad grande del ARN ribosomal (ADNr 23S) también ha sido objeto del desarrollo de métodos de PCR para la detección bacteriana, pero solo un número limitado de estudios evaluó la utilidad de los cebadores bacterianos basados en 23S. (41,42)

**Temperatura de annealing (Ta):** La temperatura de fusión o de melting (Tm) de los cebadores utilizados para la PCR en tiempo real debe ser de 60°C. Para obtener resultados óptimos se recomienda utilizar pares de cebadores con una Tm de  $\geq 68$  °C. Por encima de 68 °C, las diferencias en los valores de Tm de diferentes pares de cebadores no suelen afectar al rendimiento. La Tm se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:  $Tm = 2^{\circ}C \times (\text{número de [A+T]}) + 4^{\circ}C \times (\text{número de [G+C]})$ .

Si la temperatura de hibridación es demasiado alta, los cebadores de oligonucleótidos hibridan mal, si es que lo hacen, con la plantilla y el rendimiento de ADN amplificado es muy bajo. Si la temperatura de hibridación es demasiado baja, puede ocurrir la hibridación no específica de los cebadores, lo que resulta en la amplificación de segmentos de ADN no deseados. La hibridación generalmente se realiza entre 3 °C y 5 °C por debajo de la temperatura de fusión calculada a la que los cebadores de oligonucleótidos se disocian de su ADN molde. Existen muchas fórmulas para determinar la temperatura de fusión teórica. Por ello, es recomendable usar el gradiente de temperatura del termociclador para determinar la temperatura de hibridación óptima.

Siempre que sea posible, se debe diseñar pares de cebadores con valores de  $T_m$  similares. La funcionalidad y la especificidad de todos los pares de cebadores deben comprobarse en reacciones individuales antes de combinarlos en un ensayo de PCR el tiempo relativo.

La temperatura de fusión ( $T_m$ , temperature melting) es la temperatura a la que el 50% del cebador y su secuencia complementaria forman un dúplex, y se puede calcular de varias maneras. El método más simple para estimar la  $T_m$  del cebador es por el número de nucleótidos presentes en el oligo de ADN, usando la fórmula:  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ . Depende directamente de la longitud y composición de la molécula de ADN. Una hebra más larga y un mayor contenido de guanina-citosina (GC) son favorables para una temperatura de fusión más alta.

La temperatura de fusión es un factor extremadamente importante en PCR, porque con un valor alejado de la temperatura ideal se pueden generar resultados indeseables, como la baja tasa de replicación. Es importante que las  $T_m$  de los primers sean lo más parecidas entre sí.

**Ciclaje:** Se debe tener en consideración que la mayoría de las modificaciones que afectan la reacción están directamente relacionadas con los factores que afectan alineamiento y extensión. La temperatura de alineamiento resulta más dependiente de un correcto balance entre primers. Por su parte, la temperatura de extensión lo es de la actividad enzimática y dNTPs. (32)

**dNTPs:** La concentración de dNTP debe variar según el tamaño de la secuencia target a amplificar. En una PCR en tiempo real las concentraciones de dNTP pueden incrementarse en forma gradual de 50 a 1200 mM cada uno. Los mejores resultados fueron a 200 y 400 mM de cada dNTP, valores por encima de los cuales la amplificación se inhibe rápidamente. Se permite una concentración más baja de dNTP (50 mM) pero se obtiene menor cantidad de productos. En contraste, un aumento de las concentraciones de dNTP puede inhibir rápidamente la PCR, ya que estos unen magnesio.

**MgCl<sub>2</sub>:** Una concentración recomendada de cloruro de magnesio en una PCR estándar es de 1,5 mM a concentraciones de dNTP de alrededor de 200µM cada uno. El aumento de la concentración de Mg<sup>2+</sup> tiene el efecto neto de disminuir la severidad de la unión de los cebadores y, por lo tanto, una baja especificidad de la reacción; las bajas concentraciones de Mg<sup>2+</sup> pueden originar una pobre eficiencia de la reacción. La concentración de Mg<sup>2+</sup> debe calcularse como función de la concentración de nucleótidos; para la mayoría de protocolos 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> es una concentración óptima, sin embargo, debe probarse un rango de concentración de Mg<sup>2+</sup> entre 0.5 y 3.0mM por encima de la concentración de nucleótidos.

**Elongación:** Se realiza con temperaturas de 68°C-72°C, a la que la polimerasa va añadiendo los diferentes nucleótidos libres, en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como templado, desde el extremo 3' de los partidores.

**Sondas:** Oligonucleótido que contiene un fluoróforo en su extremo 5' y un apagador (quencher) en su extremo 3'. Los extremos de esta molécula son complementarios entre sí, encontrándose en forma de horquilla y el fluoróforo apagado. Al unirse la sonda al templado, fluoróforo y apagador se alejan, produciéndose la fluorescencia.

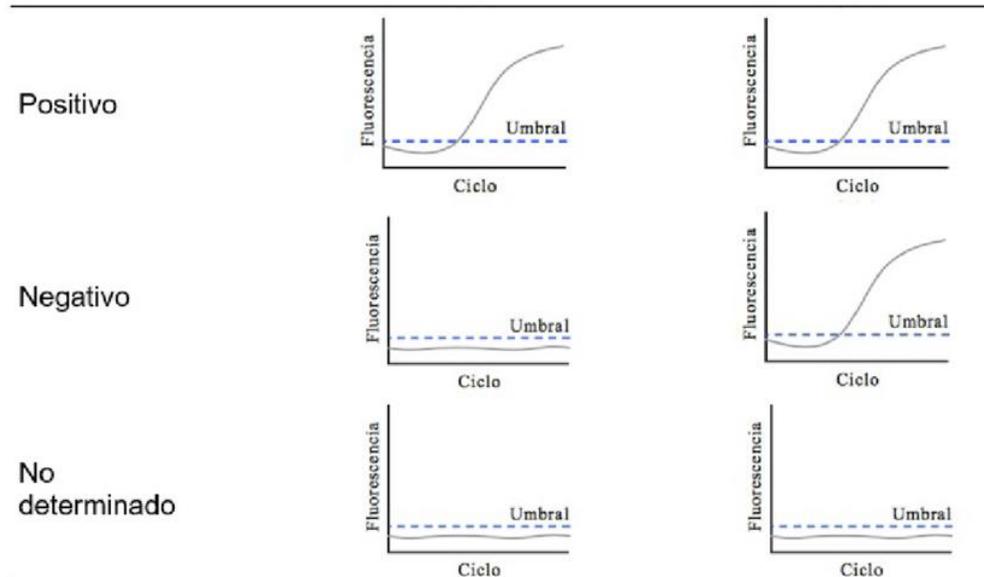
Al igual que en una PCR convencional, hacen falta primers (Forward y Reverse), un buffer de trabajo con los cofactores necesarios y dNTPs en exceso, una Taq DNA polimerasa y, generalmente, una sonda específica (TaqMan-MGB) que es la que aporta el componente fluorescente. Las sondas Taqman-MGB son pequeños oligonucleótidos complementarios a la secuencia comprendida entre los dos primers (AMPLICÓN), y que llevan unidos dos moléculas químicas. Cada una, en uno de sus dos extremos. En el extremo 5', se sitúa un fluoróforo (Reporter, R) (FAM es uno de los más frecuentes) y en el extremo 3' de la misma sonda, un apagador de esa fluorescencia (Quencher, Q). En la hebra intacta, la distancia entre estas dos moléculas es tal que el quencher apaga la fluorescencia del reporter. Sin embargo, cuando esta sonda está rota (cosa que ocurre por la acción 5'-exonucleasa de la polimerasa), se separan y el reporter emite fluorescencia.

Las sondas tienen una región homologa con el gel Diana y por tanto cuando la secuencia Diana está presente en la mezcla de hibrida. A medida que la Taq polimerasa comienza a formar una nueva cadena de ADN en la etapa de extensión, provoca una degradación de la sonda por la actividad nucleasa del extremo 5' y el reporter de fluoresceína, se separa del quencher como resultado de lo cual se genera la señal de fluoresceína.

A medida que continua este procedimiento, en cada ciclo aumenta el número de moléculas de señal, provocando el aumento de la fluoresceína que se relaciona positivamente con la amplificación de la Diana.

**Concentración de Buffer:** Los buffers para ser usados en PCR facilitan la amplificación de múltiples productos de PCR y presentan una equilibrada concentración de sales y aditivos para garantizar eficiencias comparables para la hibridación y extensión de todos los cebadores en la reacción. (34,43–45)

**Figura 4.** Representación esquemática de interpretación de resultados en PCR el tiempo real.(46)



**7.9 Contaminación de PCR:** La contaminación de las reacciones de PCR es un problema inherente para los laboratorios que realizan este procedimiento, ya que, al ser una técnica tan sensible, esta reconoce cualquier tipo de ADN indeseado. Sin embargo, hay una serie de medidas para controlar o minimizar esta contaminación, y el grado de

rigor que se requiere en un laboratorio a menudo se determina según el formato de PCR y de extracción que se utilice.

### **Recomendaciones para disminuir la contaminación:**

#### Generales:

-Los reactivos de la mastermix de PCR y las muestras de DNA deben prepararse siempre en la sala Pre-PCR. Una vez finalizada una amplificación de DNA, en ningún caso se debe abrir o introducir viales de nuevo en la sala de Pre-PCR, ya que estos podrían contaminar fácilmente los reactivos, consumibles o equipos de preparación de muestras.

-Es importante utilizar guantes no utilizados durante periodos de tiempo prolongados mientras realizamos una PCR. Si se tiene la sospecha que puede haber tenido contacto en una superficie u objeto contaminado con DNA exógeno, se requiere el cambio de los guantes.

-Descontaminar la superficie utilizada para preparar las reacciones de PCR y los materiales (gradillas, micropipetas, lápices, contenedores de desechos, coolers, guantes)

#### Específicos:

Controles del proceso Incorporar uno o más de los siguientes controles, para tener un mejor control y detección oportuna de las contaminaciones. Cada uno de los controles mencionados debe trabajarse en un tubo separado y ser sometido a PCR.

a.- Control de extracción: Utilizar un reactivo, por ejemplo, agua estéril libre de nucleasas, y manipularlo como una muestra biológica más durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos. Luego de la PCR y electroforesis debe arrojar un resultado negativo.

b.- Control de reactivos: Preparar la mezcla de reactivos en el área limpia y mantener el tubo cerrado durante el resto del proceso. Permite chequear los reactivos que se están utilizando para la preparación de las mezclas de PCR. Luego de la PCR y electroforesis debe arrojar un resultado negativo.

c.- Control de manipulación: Agregar agua en uno o más microtubos en lugar de templado durante el proceso de carga en la preparación de la PCR. Permite chequear la manipulación, por parte del operador, de las muestras con templados. Luego de la PCR y electroforesis debe arrojar un resultado negativo.

d.- Control de réplica: Para todo laboratorio que trabaje con PCR de tiempo real, además de utilizar los controles antes mencionados, se sugiere trabajar cada muestra utilizando réplicas para descartar posibles falsos positivos, dada la alta sensibilidad de la (34,47)

## **8. Diseño Metodológico:**

**Tipo de estudio:** Analítico experimental

**Área de estudio:** El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de investigación de enfermedades infecciosas en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León.

**Muestra:** Se analizó un panel de heces fecales diarreicas de niños que pertenecían a estudios de investigación sobre gastroenteritis infecciosas que se desarrollan en el Centro de investigación de enfermedades infecciosas en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León, a las que se les realizó una prueba de PCR en tiempo real para la detección de bacterias causantes de gastroenteritis, también se utilizaron muestras negativas como controles.

**Muestreo:** No probabilístico por conveniencia.

**Fuente de información:** Primaria

### **8.1 Recolección y procesamiento de la muestra:**

A continuación, se describe el procedimiento que se llevó a cabo por los proyectos de investigación que se desarrollaron en el Centro, donde se recolectaron estas muestras biológicas que serán utilizadas como paneles positivos y negativos para la optimización de nuestro PCR.

Procesamiento y Almacenamiento de la muestra: Las muestras diarreicas se almacenaron en crioviales de 2.0 ml con PBS 1X hasta su análisis. Al llegar el día de análisis fueron colocadas a  $-10^{\circ}$  C y por último a  $+4^{\circ}$  C por una hora respectivamente antes de su procesamiento.

### **8.2 Determinación del límite de detección:**

Para este proceso se utilizó el *Kit de ensayo Qubit™ dsDNA HS*

**Tabla 3. Contenido y almacenamiento de reactivos.**

Componentes	Cat. No. Q32851 (100 ensayos)	Cat. No. Q32854 (500 ensayos)	Concentración	Almacenamiento
<b>Rx Qubit™ dsDNA HS (Componente A)</b>	250µL	1.25mL	200X in DMSO	2°C to 8°C Desiccate Protect from light
<b>Buffer Qubit™ dsDNA HS (Componente B)</b>	50mL	250mL	No se aplica	≤30°C
<b>Estándar Qubit™ dsDNA HS #1 (Componente C)</b>	1mL	5mL	0 ng/µL in TE buffer	2°C to 8°C [2]
<b>Estándar Qubit™ dsDNA HS #2 (Componente D)</b>	1mL	5mL	10 ng/µL in TE buffer	

### 8.3. Preparación de muestras y estándares:

1. Configure la cantidad requerida de tubos Qubit™ para estándares y muestras. El ensayo Qubit™ dsDNA HS requiere 2 estándares.

*Nota:* Utilice únicamente tubos de PCR de 0,5 ml, transparentes y de pared fina (n.º de catálogo Q32856). para el fluorómetro Qubit™ 4 y tiras de tubos de 8 x 200 µL (cat. N° Q33252) para el fluorómetro Qubit™ Flex.

2. Etiquete las tapas de los tubos.

*Nota:* No etiquete el costado del tubo, ya que esto podría interferir con la lectura de la muestra. Etiquete correctamente la tapa de cada tubo estándar. La calibración del fluorómetro Qubit™ requiere que los estándares se inserten en el instrumento en el orden correcto.

3. Prepare la solución de trabajo de Qubit™ diluyendo el reactivo Qubit™ dsDNA HS 1:200 en el tampón Qubit™ dsDNA HS. Utilice un plástico limpio tubo cada vez que prepare la solución de trabajo Qubit™.

4. Agregue la solución de trabajo Qubit™ a cada tubo de modo que el volumen final sea de 200 µL.

	<b>Tubos de ensayo estándar</b>	<b>Tubos de ensayo de la muestra</b>
<i>Volumen de solución de trabajo.</i>	190 µL	180–199 µL
<i>Volumen estándar</i>	10 µL	--
<i>Volumen de muestra</i>	--	1–20 µ
<i>Volumen total</i>	200 µL	200 µ

*Nota:* El volumen final en cada tubo debe ser de 200 µL. Cada tubo estándar requiere 190 µL de solución de trabajo Qubit™ y cada tubo de muestra requiere entre 180 y 199 µL. Prepare suficiente solución de trabajo Qubit™ para acomodar todos los estándares y muestras.

5. Agregue 10 µL de cada estándar Qubit™ al tubo apropiado.

6. Agregue de 1 a 20 µL de cada muestra de usuario al tubo apropiado.

*Nota:* Si agrega de 1 a 2 µL de muestra, utilice una pipeta de 2 µL para obtener mejores resultados.

7. Agite vigorosamente durante 3 a 5 segundos. Tenga cuidado de no crear burbujas.

8. Deje que todos los tubos se incuben a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego proceda a leer los estándares y las muestras.

#### **8.4 Extracción y purificación de ADN genómico:**

Se utilizó el método de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit.

Paso 1: Se incorporaron glass beads 212-300 µm a este método de extracción con el objetivo de facilitar un poco más la maceración de las muestras de heces.

Paso 2: Todas las muestras fueron colocadas en Coolrack antes de utilizarlas, con el fin de mantener las muestras a temperaturas óptimas de viabilidad.

Paso 3: Se agregaron 0.03 gramos de 212-300  $\mu\text{m}$  glass beads en crioviales de 1.8 ml.

Paso 4: Posteriormente se pesó 180-220 mg de la muestra de heces y se añadieron en crioviales de 1.8 ml.

**NOTA:** A) En algunos casos se emplearon heces re suspendidas en PBS 1X, se extraían 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión y se añadían en crioviales de 1.8 ml (Que contienen el buffer InhibitEX y las glass beads).

Paso 5: Se añadió 1.0 ml de buffer InhibitEX a cada criovial con la muestra.

Paso 6: Se colocaron los crioviales con la suspensión, en Vortex BEAD MILL (Fisher) por 1 minutos.

Paso 7: Se calentaron la suspensión a 70°C por 5 minutos en baño maría.

Paso 8: Fueron mezcladas por BEAD MILL por 15 segundos y se centrifugaron la muestra a 14,000 rpm por 1 minutos.

Paso 9: Se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K en un nuevo criovial de 1.8 ml y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido en el paso 7.

Paso 10: Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AL y se Vortea por 15 segundos.

Paso 11: Se incubaron a 70°C por 10 minutos en baño maría. Posteriormente se centrifugaron brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo.

Paso 12: Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) al lisado y se mezclaron por vortex. Se centrifugaron brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo.

Paso 13: Cuidadosamente se agregaron 600  $\mu\text{L}$  del lisado obtenido en el paso 11 a la columna mini spin previamente. Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Se colocaron las columnas en un nuevo tubo colector de 2 ml y se descartaron los tubos que contenían el filtrado.

Paso 14: Se abrieron cuidadosamente las columnas y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW1. Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Se

colocaron las columnas en nuevos tubos colectores de 2 ml y se descartaron los tubos que contenía el filtrado.

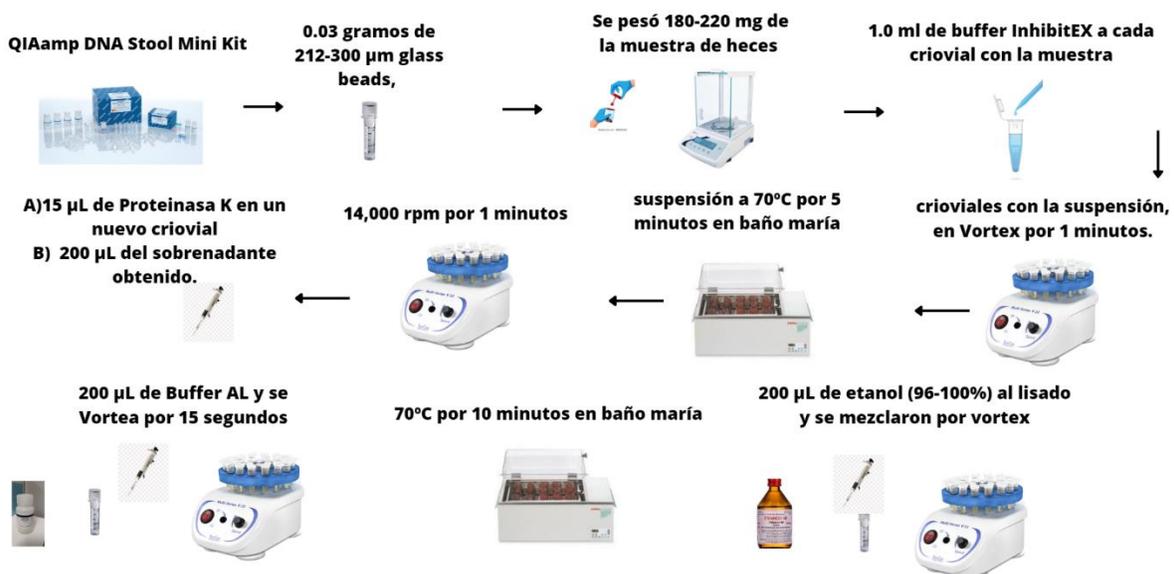
Paso 15: Se abrieron cuidadosamente las columnas y agregaron 500  $\mu$ L de Buffer AW2. Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 3 minutos. Se colocaron las columnas en nuevos tubos colectores de 2 ml y descartaron los tubos que contenían el filtrado.

**Nota:** Se centrifugaron a 14,000 rpm por 3 minutos nuevamente. Este paso ayudó a eliminar restos de Buffer AW2.

Paso 16: Al finalizar se transfirieron las columnas de QIAamp a un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetado. Se abrieron cuidadosamente las columnas y se añadieron 200  $\mu$ L de Buffer ATE directamente en la membrana. Se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto para eludir el ADN.

Paso 17: El ADN eludido fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

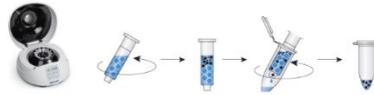
**Figura 5.** Representación de Extracción y purificación de ADN genómico.



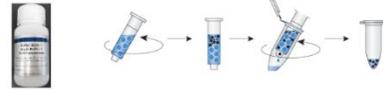
se agregaron 600 µL del lisado a la columna mini spin previamente



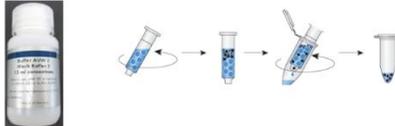
Se cerraron las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto.



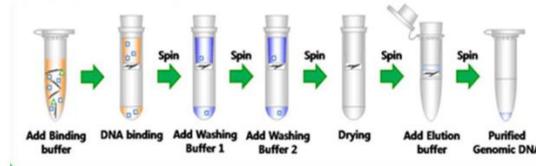
Se agregaron 500 µL de Buffer AW1 y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto.



Se agregaron 500 µL de Buffer AW2 y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto.



Al finalizar se transfirieron las columnas de QIAamp a un tubo eppendorf previamente etiquetado. Se añadieron 200 µL de Buffer ATE directamente en la membrana.



## 8.5 Ensayo de RT-PCR:

Identificación de *Campylobacter spp* y *C. jejuni/coli*.

Para el análisis por el método de RT-PCR se utilizaron Primers y Sondas descritas a continuación:

**Tabla 4:** Descripción de Primers

ENSAYO	PRIMER & PROBE SEQUENCES (5' ◇ 3')
<b>CAMPYLOBACTER SPP</b>	Forward primer, CTGCTAAACCATAGAAATAAAATTTCTCAC Reverse primer, CTTTGAAGGTAATTTAGATATGGATAATCG Sonda, 56-FAM/CAG AGA ACA /ZEN/ ATC CGA ACT GGG ACA /3IABkFQ/
<b>CAMPYLOBACTER COLI</b>	Forward primer, CTG CTA AAC CAT AGA AAT AAA ATT TCT CAC Reverse primer, CTT TGA AGG TAA TTT AGA TAT GGA TAA TCG
<b>CAMPYLOBACTER JEJUNI</b>	Sonda, a 56-JOEN/CAT TTT GAC /ZEN/ GAT TTT TGG CTT GA/3IABkFQ

### **8.6 Preparación del MasterMix y preparación del plato.**

Se mezclarán los Primers, las sondas, el agua libre de nucleasas y el MasterMix 2.0 para obtener volúmenes de 24 µl, 22 µl y 20 µl para *Campylobacter spp* y *C. jejuni/coli*. Se homogenizó la mezcla y se centrifugó brevemente antes de agregar la muestra. Se siguieron las indicaciones a continuación:

- 1) En el cuarto blanco, se descongelaron los reactivos y se colocaron en coolrack.
- 2) Se centrifugaron brevemente los Primers y Sondas y se colocaron en coolrack.
- 3) Se determinaron el número de reacciones (N) por ensayo. Fue necesario hacer reacciones extras para controles mezcla y por efecto de dilución.
- 4) La mezcla se prepara a como se indica.

### **8.7 Mezcla para RT – PCR:**

- Reacción de 25 µl: 12.5 µl de Bio-Rad iQ Multiplex Powermix. Concentración y volumen de primers/probe ajustable. Agua libre de Nucleótido ajustable a volumen de 25 µl.
- Reacción de 12.5 µl: 6.5 µl de Bio-Rad iQ Multiplex Powermix. Concentración y volumen de primers/probe ajustable. Agua libre de Nucleótido ajustable a volumen de 12 µl.

### **8.8 Programa de amplificación.**

Se utilizó el equipo para RT – PCR LightCycler® 96 System Instrument de la compañía ROCHE para la amplificación y el análisis de las muestras.

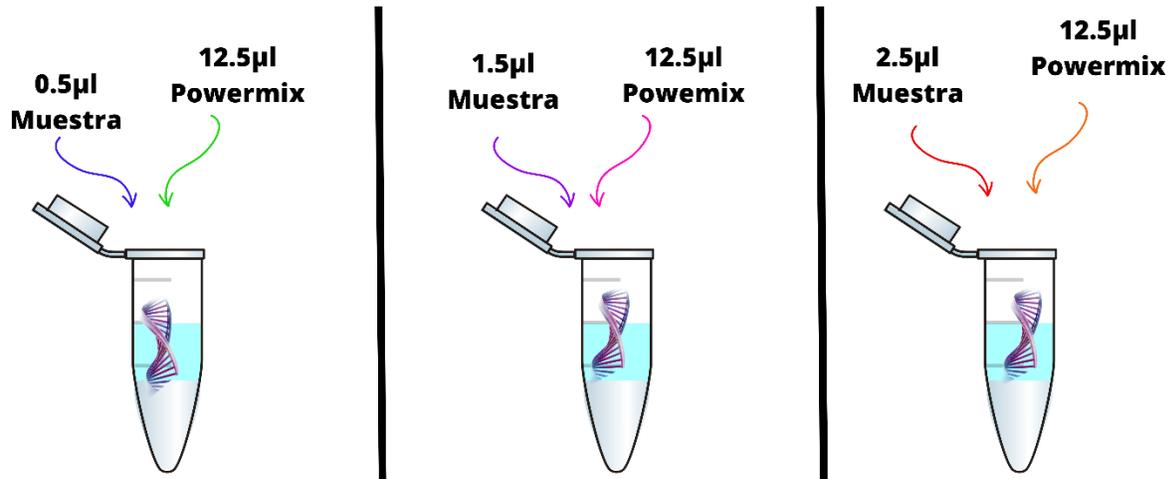
### **8.9 Condiciones de optimización del PCR**

Se utilizaron primer descritos en la tabla No 3, para proceder con la mezcla de estos y la mezcla del powermix con las muestras (ver figura 6 y 7), y exponerlas a las temperaturas de hibridación presentadas en la figura No 8.

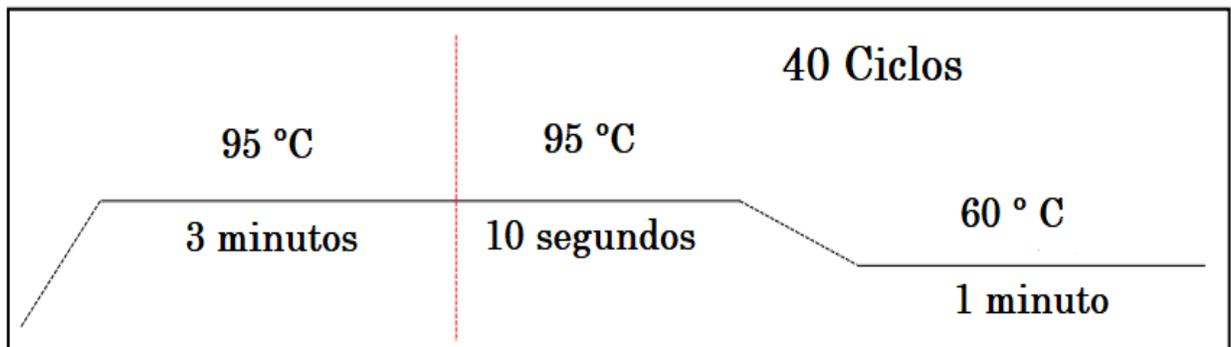
**Figura 6.** Volumen de reacción para detección de *Campylobacter spp* y *C. jejuni/coli*.



**Figura 7.** Volumen de muestras para la detección de *Campylobacter spp* y *C. jejuni/coli*:



**Figura 8.** Condiciones de optimización de las temperaturas de alineamiento utilizados en los PCR para detección de los genes bacterianos.



### **8.10 Validación de PCR en tiempo real:**

Para la validación del ensayo de PCR en tiempo real optimizado se procedió a investigar la presencia de *Campylobacter spp* en muestras biológicas de niños con diarrea que se encuentran bajo vigilancia en el centro de investigación de enfermedades infecciosas, para ello un total de 90 muestras de niños fueron elegidas al azar de estudios de gastroenteritis por *Sapovirus* y se procedió a la detección de *Campylobacter* utilizando los primers del método optimizado.

#### **Aspectos éticos:**

- El presente estudio no involucra la participación de pacientes humanos.
- La información de la procedencia de las muestras, identificación y caracterización de las mismas no han sido ni serán utilizadas,
- Las muestras utilizadas de este estudio han sido de proyectos de investigación que se desarrollan en el CEI (Centro de Investigaciones Infecciosas) que cuentan con la aprobación del comité de ética local.
- Únicamente utilizaremos el resultado de análisis previo que indica su positividad o negatividad.
- El presente estudio se rige bajo las consideraciones del protocolo de Helsinki.

## 9. Resultados:

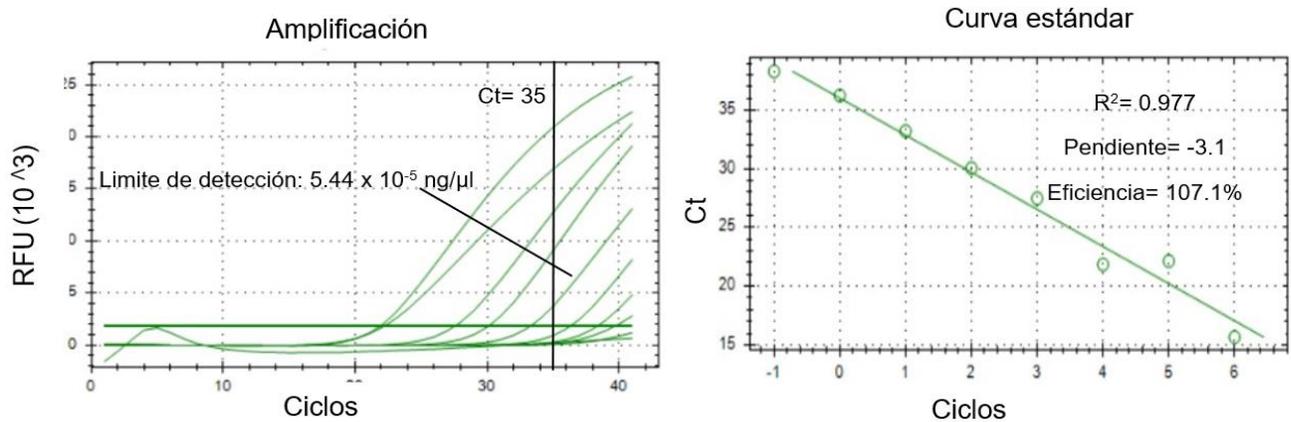
En el presente estudio se estandarizaron parámetros necesarios para la optimización de un PCR en tiempo real para la detección de *Campylobacter* en muestras diarreicas, también se generaron las condiciones necesarias para la identificación de las especies de *Campylobacter* pudiéndolos diferenciar en *Jejuni/coli* o no *Jejuni/coli*.

La optimización consistió en determinar el límite de detección, volúmenes óptimos de muestras para la amplificación de los ácidos nucleicos, volúmenes de reacción para identificar la viabilidad de las reacciones del PCR, así como la validación de este ensayo utilizando muestras diarreicas de niños de la Ciudad de León con el propósito de demostrar la utilidad del ensayo para la detección clínica de pacientes con Campylobacteriosis, estudios epidemiológicos u otras investigaciones científicas futuras.

### 9.1 Determinación del Límite de detección:

Para la determinación del límite de detección se utilizó el genoma de la cepa bacteriana de *Campylobacter jejuni* sub. cepa *jejuni* RM 3193 (ATCC BAA 1234-D5), se cuantificó la concentración de ADN del control positivo para este estudio, utilizando el método Qubit™ dsDNA HS Assay Kit y se obtuvo como resultado que la concentración de ADN fue de 5.44 ng/μl por microlitro, este ensayo se hizo por triplicado para determinar la concentración real y evitar errores en la determinación de la concentración de ADN (Ver Anexo 1). Posteriormente a partir de la concentración del ADN presente en la muestra, se realizó una curva estándar para evaluar el límite de detección del PCR en tiempo real, los resultados muestran un rango dinámico de  $10^1$ - $10^5$  e.g (equivalente genómico) y un límite de detección determinado para *Campylobacter* de 0.0000544 ng/μl ( $5.44 \times 10^{-5}$  ng/μl). El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) entre el número de amplicones y  $\Delta Rn$  fue de 0.977. La eficiencia del ensayo fue de 107.1 con una pendiente del serogrupo de -3.1.

**Figura 9.** Límite de detección del ensayo del PCR en tiempo real para la cuantificación de *Campylobacter spp.*



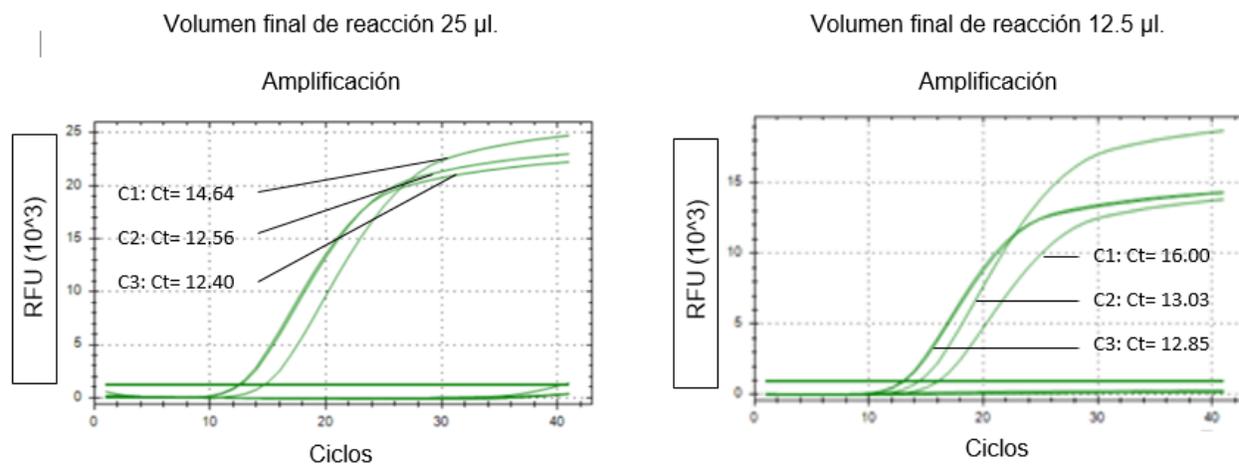
RFU (unidades relativas de Fluorescencia). Mide el pico umbral máximo a lo largo de una gráfica utilizando fluorescencia para la detección. RFU (10<sup>3</sup>) significa que la altura máxima umbral fue de 1000. Este nivel se basa en las especificaciones del fabricante.

Ct (cycle threshold) es el número de ciclo en donde la señal fluorescente cruza el umbral. La Amplificación indica que la prueba es capaz de detectar la presencia diana molecular.

## 9.2 Determinación de los Volúmenes de reacción:

Determinación del volumen final de reacción, que se puede utilizar en el PCR. Se evaluaron dos volúmenes finales uno de 25  $\mu$ l sugerido por el fabricante y el otro volumen a la mitad 12.5  $\mu$ l para evaluar la posibilidad de optimizar los recursos en los reactivos. La **figura 8** muestra los resultados obtenidos utilizando tres controles positivos de *Campylobacter* control 1 (C1), control 2 (C2), control 3 (C3). Las variaciones en los valores de Ct se observan en la **tabla 5** donde el C1 varía 1.36 en su valor de Ct en la reacción de 25  $\mu$ l y 12.5  $\mu$ l y en relación al C2 y C3 la variación en los valores de Ct no es mayor de 1.

**Figura 10.** Amplificación de PCR en tiempo real con volumen final de 25  $\mu$ l y 12.5  $\mu$ l.



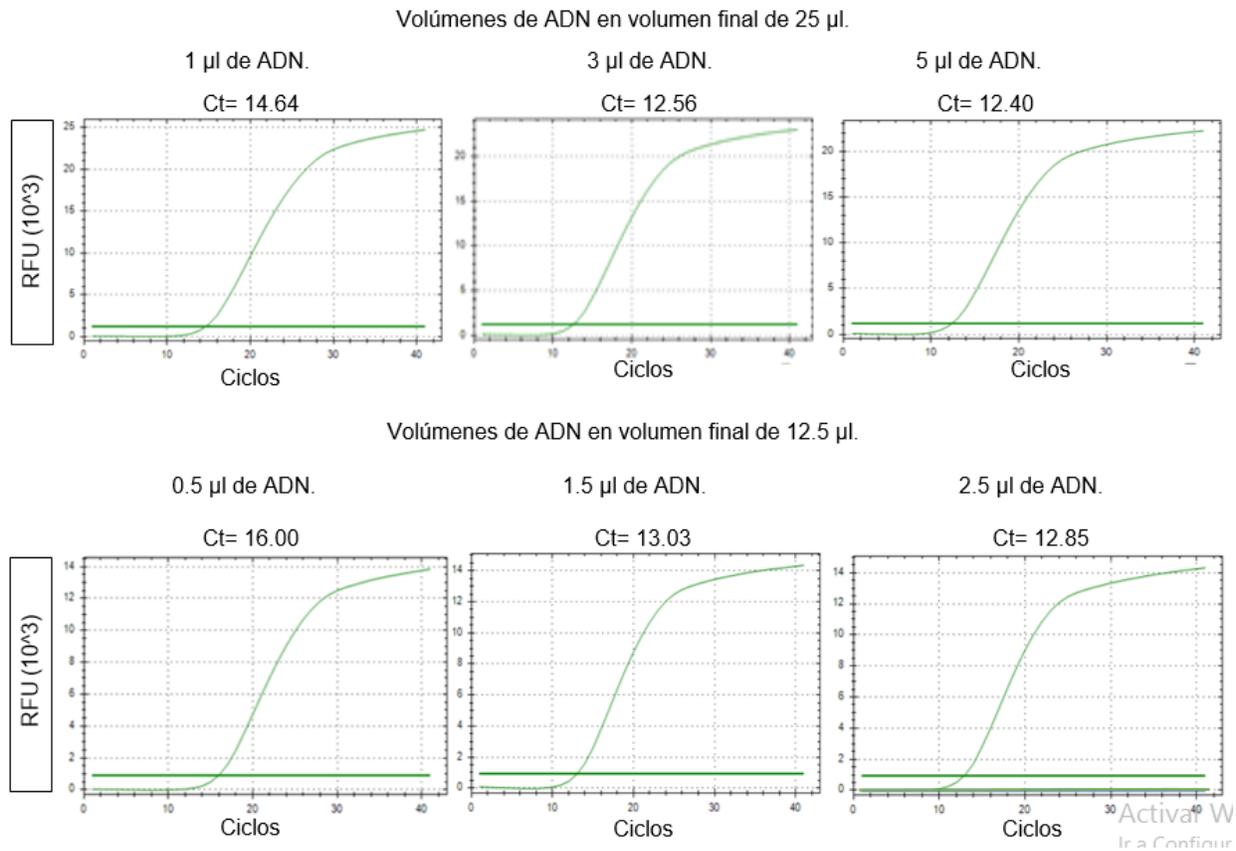
**Tabla 5.** Valores de Ct en volúmenes de reacción de 25  $\mu$ l y 12.5  $\mu$ l.

Volúmenes de Reacción			
Volumen final de Reacción 25 $\mu$ l	Volumen final de Reacción 12.5 $\mu$ l	$\neq$ Ct (Diferencia de Ct)	Promedio $\neq$ Ct
<b>C1: 14.64</b>	C1: 16.00	1.36	0.76
<b>C2: 12.56</b>	C2: 13.03	0.47	
<b>C3: 12.40</b>	C3: 12.85	0.45	

### 9.3: Optimización de los Volúmenes de muestras:

Con el propósito de establecer volúmenes de muestra necesaria para la detección de *Campylobacter*, realizamos diferentes volúmenes (0.5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l, 2.5  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, 5  $\mu$ l), de las muestras controles positivos con altas concentraciones de ADN, con el método de PCR, manteniendo las condiciones estandarizadas con las mismas concentraciones de primers, temperatura (60°C). Los resultados se pueden observar a través de la amplificación que se muestra en la **figura 11**.

**Figura 11.** Amplificación de diferentes volúmenes de muestras.

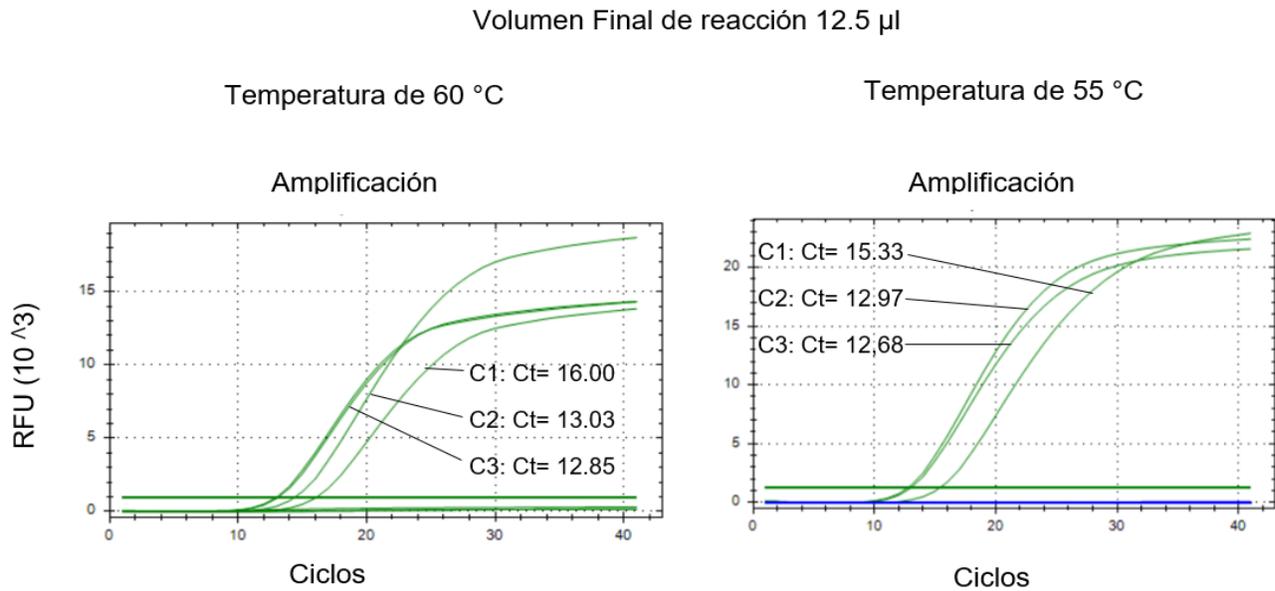


Volúmenes de muestra de 3  $\mu$ l a 5  $\mu$ l presentan valores de Ct similares sin embargo utilizar volumen de muestra de 1  $\mu$ l el valor aumenta dos veces. Al utilizar volúmenes de muestra mayores de 1.5  $\mu$ l en volumen final de reacción de 12.5  $\mu$ l la variación en los valores de Ct < 1 sin embargo utilizar valor de 0.5,  $\mu$ l influye en el valor de Ct aumenta hasta tres veces.

#### **9.4 Temperatura óptima de hibridación de los primers**

Con el fin de determinar la Temperatura óptima de los Cebadores, así como la cantidad de Ct, se realizaron experimentos, en donde se utilizaron temperaturas de 60°C y 55°C. Se evaluaron tres controles positivos, en el cual se observan variaciones en los valores de Ct cada control, siendo el C1 varia 0.67, el C2 varia 0.06 y el C3 varia 0.17, el termino general la variación del Ct es 0.09.

**Figura 12.** Amplificaciones con diferentes temperaturas de alineamiento.



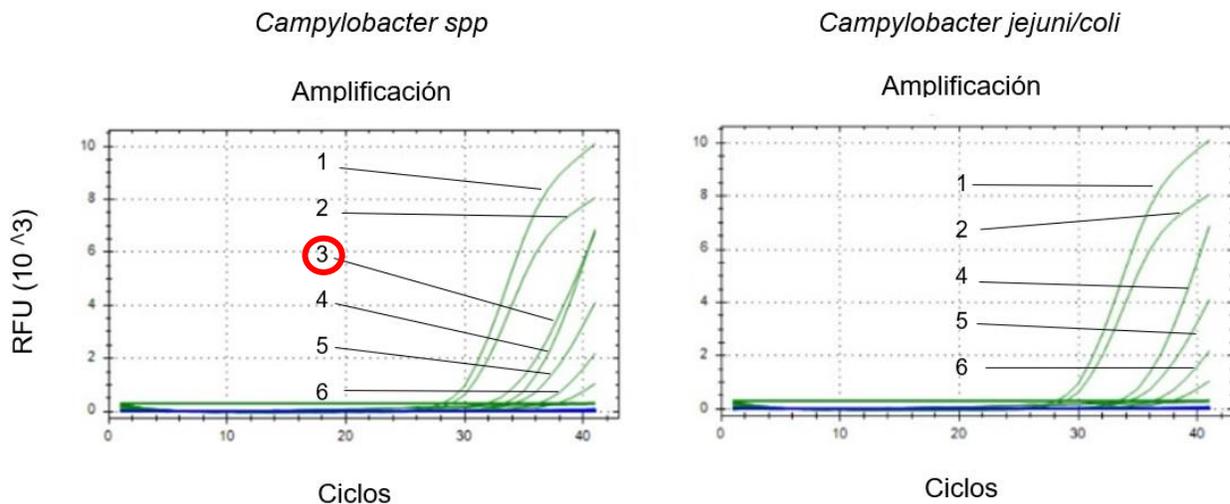
**Tabla 6.** Valores de Ct en relación con la variación de temperaturas.

Volumen final de reacción: 12.5 µl			
Temperatura 60°C	Temperatura 55°C	≠Ct	Promedio ≠Ct
<b>C1: 16.00</b>	C1: 15.33	0.67	0.9
<b>C2: 13.03</b>	C2: 12.97	0.06	
<b>C3: 12.85</b>	C3: 12.68	0.17	

### 9.5 Genotipificación de *Campylobacter spp.*

Para la determinación de los genotipos de *Campylobacter* se utilizaron controles de *Campylobacter jejuni/coli* y *Campylobacter no jejuni/coli* las condiciones de termodinámicas y de amplificación de PCR de diferenciación de especies son las siguientes: Temperatura de 60°C, 12.5 µl de volumen final de reacción y 1.5 µl de muestras. En este ensayo también se utilizaron primers específicos de *Campylobacter jejuni/coli* ya descritos en la sección de Diseño metodológico (ver sección de Diseño metodológico **tabla 4**).

**Figura 13.** Genotipificación de *Campylobacter spp.*



La figura nos muestra las amplificaciones de 6 controles positivos para *Campylobacter jejuni/coli* en muestras clínicas, toda muestra que de positivo para la detección de *Campylobacter spp* utilizando el gen 16s será analizada utilizando primers específicos para *Campylobacter jejuni/coli*, aquellas que den negativas serán categorizadas como *Campylobacter no jejuni/coli*.

### 9.6 Validación del ensayo de PCR en tiempo real.

Para la validación de este ensayo fueron analizadas un total de 90 muestras diarreicas que se encuentran en el Biobanco del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas, de niños menores de 5 años con gastroenteritis pertenecientes a estudios que se desarrollaron en el centro, en donde 20 de ellas resultaron positivas para *Campylobacter spp*, de las cuales el 95% son positivas para *Campylobacter jejuni/coli* y el 5% para *Campylobacter no jejuni/coli*.

**Tabla 7.** Detección de *Campylobacter spp* por PCR en tiempo real 90 muestras diarreicas.

Cantidad de muestras	Positivas para <i>Campylobacter spp</i>	Positivas a <i>Campylobacter jejuni/coli</i>		Positivas a <i>Campylobacter no jejuni/coli</i>	
		N	%	n	%
90	20				
		19	95%	1	5%

## 10. Discusión:

La elevada prevalencia de diarrea por *Campylobacter* en niños, su duración y sus altas complicaciones, le confieren a esta bacteria gran importancia desde el punto de vista clínico, puesto no se conoce con exactitud su distribución por la limitada oferta de métodos diagnósticos etiológicos de la diarrea. En países en vías de desarrollo, se emplean métodos rutinarios, costosos y que no son lo suficiente sensibles, ni específicos, para la detección etiológica de la diarrea incluida la bacteria de *Campylobacter spp*, lo que dificulta su diagnóstico.

La estandarización del método PCR en tiempo real genera metodología de diagnóstico en los laboratorios para detectar el material genético de un microorganismo. Este estudio optimizo este método molecular para el diagnóstico de *Campylobacter spp*, los parámetros optimizados fueron los más relevantes y necesarios en este tipo de ensayo, por lo tanto, los métodos optimizados en este estudio podrán dar mayor entendimiento de la prevalencia e incidencia de esta bacteria en niños.

Dado que tanto ADN como ARN se pueden detectar a nivel extracelular y que ambos tienen un potencial papel en el diagnóstico no invasivo de diferentes patologías. La concentración de ADN utilizando el método Qubit™ dsDNA HS Assay Kit fue de 5.44 ng/μl por microlitro, posteriormente este ADN fue sometido a un ensayo de PCR en tiempo real en donde se observó un rango dinámico de  $10^1$ - $10^5$  e.g (equivalente genómico) y un límite de detección determinado para *Campylobacter* de 0.0000544 ng/μl ( $5.44 \times 10^{-5}$  ng/μl) un valor de  $R^2$  de 0.977. La eficiencia del ensayo fue de 107.1% con una pendiente del serogrupo de -3.1. La pendiente ideal es de -3.3, sin embargo, una pendiente entre -3.1 y -3.6 generalmente es aceptable, obteniendo resultados similares a Eliana y colaboradores. (48)

Optimizamos el volumen de Reacción el cual constituye una parte principal en el análisis, proporcionando volúmenes adecuados para el procesamiento de la muestra. Los volúmenes de reacción en nuestro estudio tuvieron una variación de  $Ct = 0.76$ . Al utilizar muestras clínicas con volumen final de reacción de 25 μl, el valor de corte establecido para determinar la positividad o negatividad de las muestras fue  $Ct \leq 35$ , al igual que en otros métodos convencionales GE Healthcare UK Limited (49). Utilizando un volumen

final de reacción de 12.5 µl, en este ensayo se estableció al igual que el volumen final de reacción de 25µl un valor de corte de Ct ≤35. La utilidad de un menor volumen de reacción permite optimizar los recursos y analizar mayor cantidad de muestras, sin comprometer la calidad del diagnóstico, certeza en los análisis y confiabilidad de los resultados.

Otro parámetro optimizado fue el volumen de muestra. El material genético en una muestra define el valor umbral del número de ciclos, cuando aumenta el volumen de la muestra el valor de Ct disminuye aumentando los verdaderos positivos. El volumen de muestra que se estableció fue de 1.5 µl de ADN. Mostrando una amplificación con valor de Ct= 13.03. cuyo resultado se encuentra dentro del valor detectable de Ct ≤ 35. Fernando Rodríguez y colaboradores realizaron su estudio en diferentes volúmenes de muestras, encontrando que los valores de Ct obtenidos con mayor concentración de ADN (10 ng/µl) correspondieron a ciclos tempranos (50) aportando validez. Generando resultados confiables y minimiza la cantidad de muestra.

Uno de los aspectos que garantiza la especificidad de la PCR depende de la temperatura empleada en la fase de hibridación. A mayor temperatura más dificultada se ve la unión entre el cebador y la cadena molde. En el experimento optimizado se pueden observar valores de Ct muy similares cuya diferencia entre cada uno solo es de 0.9 en promedio, y a pesar de que los valores de Ct de las muestras con temperaturas de 55°C son menores, la temperatura de hibridación óptima determinada para este estudio fue de 60°C, obteniendo resultados parecidos a la investigación de Ivanova y colaboradores los cuales realizaron un estudio en donde la temperatura óptima para valores de Ct confiables fue de 58°C(51), además de acuerdo a experimentos realizados por Lievens y colaboradores (52), disminuir la temperatura de Ct afecta la especificidad del método de PCR.

La *Campylobacter spp* es uno de los patógenos intestinales más frecuentes, tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, el conocimiento de las especies prevalentes, así como la identificación de las cepas aisladas brindan gran información epidemiológica y permite tomar medidas contra las fuentes de contagio, en la presente investigación se logró identificar la presencia de *Campylobacter jejuni/coli* y

*Campylobacter no jejuni/coli* en muestras diarreicas de niños, obteniendo resultados similares a St Jean y colaboradores (53) en donde se encontraron las especies *Campylobacter jejuni/coli* y *Campylobacter no jejuni/coli* en muestras diarreicas de niños menores de 5 años.

La aplicación de los parámetros optimizados junto a la información generada mediante estos mismos, permitió demostrar la validez del PCR en tiempo real utilizando estos parámetros para identificar la presencia *Campylobacter spp* en muestras diarreicas, dando como resultado 20 muestras positivas, siendo de estas un 95% de *Campylobacter jejuni/coli* y un 5% a *Campylobacter no jejuni/coli*, estudios sobre Campylobacteriosis, su distribución y capacidad infecciosa son presentados por Herrera y colaboradores (3) donde indicaron que las infecciones por *Campylobacter spp* contribuyen sustancialmente a la gastroenteritis infantil en León, Nicaragua, con especies *jejuni/coli* frecuentemente detectadas con un 66.1%.

## 11. Conclusiones:

1. Se optimizó un PCR en tiempo real para la detección de *Campylobacter spp* y diferenciación de especies de *Campylobacter jejuni/coli* y *Campylobacter no jejuni/coli*
2. El límite de detección para *Campylobacter* fue de 0.0000544 ng/μl ( $5.44 \times 10^{-5}$  ng/μl), un valor de  $R^2$  de 0.977. La eficiencia del ensayo fue de 107.1% con una pendiente del serogrupo de -3.1.
3. El volumen final de reacción para el análisis de PCR puede ser utilizado en 12.5 μl.
4. La temperatura de hibridación óptima fue de 60°C y el volumen de muestra con mejores resultados fue de 1.5 μl.
5. El ensayo fue validado con 90 muestras diarreicas pudiendo detectar la presencia de *Campylobacter spp* en 20 muestras, siendo 95% de estas *Campylobacter jejuni/coli*.

## **12. Recomendaciones:**

- Aplicar el método a muestras clínicas de pacientes con diarreas en diferentes grupos etarios, así como a pacientes en diferentes zonas, para ampliar el alcance epidemiológico de *Campylobacter spp.*
- Publicar este estudio como un aporte a la salud pública que puede contribuir en conjunto con otras metodologías para investigar el impacto de las bacterias causantes de gastroenteritis en la población nicaragüense.
- Considerar los resultados obtenidos en este ensayo para que el método pueda utilizarse para el diagnóstico local de las infecciones causadas por bacterias e informar a las autoridades del MINSA y en especial a los responsables de detección de enteropatógenos del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

### 13. Bibliografía:

1. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. [citado 7 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
2. Silva-Díaz H, Bustamante-Canelo O, Aguilar-Gamboazsu FR, Mera-Villasis K, Ipanaque-Chozo J, Seclen-Bernabe E, et al. Enteropatógenos predominantes en diarreas agudas y variables asociadas en niños atendidos en el Hospital Regional Lambayeque, Perú. *Horizonte Médico (Lima)*. enero de 2017;17(1):38-44.
3. Herrera García RJ. Factores de riesgos de Campylobacteriosis en niños menores de 1 año de edad de la ciudad de León, Nicaragua. [Internet] [Caso – Control anidado.]. [León, Nicaragua]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2020. Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/8133/1/245243.pdf>
4. Fuentes Díaz Z, Rodríguez Salazar O, Salazar Diez M, Rodríguez Hernández O. Factores de riesgo de las enfermedades diarreicas agudas en menores de cinco años. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. abril de 2008;12(2):0-0.
5. Díaz Mora JJ, Echezuria M L, Petit de Molero N, Cardozo V MA, Arias G A, Rísquez P A. Diarrea aguda: Epidemiología, concepto, clasificación, clínica, diagnóstico, vacuna contra rotavirus. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. marzo de 2014;77(1):29-40.
6. Barrera G, Murcia J, Cerón J, Cuartas P, Guzmán C, Villamizar L. PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*. diciembre de 2016;18(2):24-31.
7. Cruz E, Jaramillo B, Barreto A. PCR en tiempo real [Internet]. Universidad de las Americas; 2015 [citado 15 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.slideshare.net/Alejatoxik/pcr-en-tiempo-real-55369307>

8. Rivera F N, Bustos B R, Montenegro H S, Sandoval M M, Castillo N J, Fernández J H, et al. Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp aisladas en niños y en aves de corral. *Revista chilena de infectología*. diciembre de 2011;28(6):555-62.
9. Elfving K, Andersson M, Msellem MI, Welinder-Olsson C, Petzold M, Björkman A, et al. Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. *J Clin Microbiol*. marzo de 2014;52(3):916-23.
10. Liu J. *Plos One*. [citado 7 de junio de 2023]. Optimization of Quantitative PCR Methods for Enteropathogen Detection | PLOS ONE. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158199>
11. <https://www.cun.es> [Internet]. [citado 7 de mayo de 2023]. Gastroenteritis infecciosa | Diagnóstico y tratamiento | CUN. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/gastroenteritis-infecciosa-aguda>
12. Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. agosto de 2009;27(7):406-11.
13. Riveros M, Ochoa TJ. Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2 de abril de 2015;32(1):157.
14. El Farmacéutico [Internet]. [citado 19 de mayo de 2023]. Diarrea. Disponible en: [https://www.elfarmaceutico.es/tendencias/te-interesa/diarrea\\_106088\\_102.html](https://www.elfarmaceutico.es/tendencias/te-interesa/diarrea_106088_102.html)
15. Bustos Gonzales DrA. *Diarreas Bacterianas*. 2012. junio de 2012;5.
16. Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico [Internet]. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN; 2009 p. 194. (INFORME TÉCNICO SOBRE INGENIERÍA AGRÍCOLA Y ALIMENTARIA). Disponible en: <https://www.fao.org/3/i0480s/i0480s.pdf>

17. Gupta RS. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacterales). BMC Genomics. 2006;7:167.
18. Mardones P G, López M J, Mardones P G, López M J. IMPLICANCIAS DE Campylobacter spp. COMO PATÓGENO ALIMENTARIO. Chilean journal of agricultural & animal sciences. mayo de 2017;33(1):73-83.
19. Spickler AR. Campilobacteriosis. CFSPH. 2005;6.
20. Campylobacter spp. [Internet]. Chile: Ministerio de Agricultura; 2017 p. 11. (N°01/2017). Report No.: 1. Disponible en: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-01-Campylobacter-spp-v01.pdf>
21. Lapierre A. L. Factores de virulencia asociados a especies zoonóticas de Campylobacter spp. Avances en Ciencias Veterinarias [Internet]. 2 de septiembre de 2013 [citado 15 de agosto de 2023];28(1). Disponible en: <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/27866>
22. Sellars MJ, Hall SJ, Kelly DJ. Growth of Campylobacter jejuni supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. J Bacteriol. agosto de 2002;184(15):4187-96.
23. Bolaños E. slideshare. 2015 [citado 15 de agosto de 2023]. Microbiología Campylobacter, Helicobacter. Disponible en: <https://www.slideshare.net/ezequielbolaos/microbiologia-campylobacter-helicobacter>
24. García EC. Campylobacter y enfermedades asociadas.
25. Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [citado 4 de junio de 2023]. Generalidades sobre la gastroenteritis - Trastornos gastrointestinales. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/trastornos-gastrointestinales/gastroenteritis/generalidades-sobre-la-gastroenteritis>

26. Corteguera R, L R. Fisiopatología de la diarrea aguda. Revista Cubana de Pediatría. junio de 1999;71(2):86-115.
27. Díaz Mora JJ, Madera M, Pérez Y, García M, León K, Torres E M. Generalidades en diarrea aguda. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría. diciembre de 2009;72(4):139-45.
28. Balsalobre-Arenas L, Alarcón-Cavero T. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1 de junio de 2017;35(6):367-76.
29. Muñoz, Muñoz M. DETECCIÓN DE PATÓGENOS ENTÉRICOS CON PCR MULTIPLEX EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS QUE ACUDAN POR DIARREA AGUDA AL SERVICIO DE URGENCIAS. EXPERIENCIA DEL CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO [Internet]. Universidas Autonoma de Agua Calientes; 2020. Disponible en: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/1822/441128.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. Diz Mellado OM, NPunto. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. 15 de septiembre de 2020;100(100):1-100.
31. Investigación RS. Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. [Internet]. ▷ RSI - Revista Sanitaria de Investigación. 2021 [citado 7 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/diagnostico-y-tipos-de-pcr-revision-bibliografica/>
32. Bolivar AM, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol).

33. Tipos DE PCR - TIPO DE PCR PCR convencional PCR transcriptasa reversa PCR en tiempo real (qPCR) PCR - Studocu [Internet]. [citado 7 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.studocu.com/gt/document/universidad-mariano-galvez-de-guatemala/biotecnologia/tipos-de-pcr/5048380>
34. Ramírez Granados RP. Escherichia coli O157: Pasos hacia la Optimización de un PCR Múltiplex para la Detección e Identificación de cepas Verocitotóxicas. [Internet] [Experimental Optimización de Método Molecular.]. [Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2011. Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/5134/1/219576.pdf>
35. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (artículo) | Khan Academy [Internet]. [citado 7 de mayo de 2023]. Disponible en: [https://es.khanacademy.org/\\_render](https://es.khanacademy.org/_render)
36. Labbox. LA TÉCNICA DE LA PCR (INTRODUCCIÓN Y PRINCIPIOS BÁSICOS) [Internet]. Labbox España. 2022 [citado 22 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://esp.labbox.com/la-tecnica-de-la-pcr-introduccion-y-principios-basicos/>
37. Gutierrez Lopez LC. PCR tiempo real [Internet]. labsergen. 2022. Disponible en: <http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/genomics/?services=rtPCR>
38. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. 2004. 2004;22(299-305):305.
39. Riveroll Aguirre F. Diseño De Primers Para PCR [Internet]. 2022 [citado 15 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://friveroll.github.io/posts/dise%C3%B1o-de-primers-para-pcr/>
40. Iriarte M, Esther L. Estudio del gen del ARN ribosomal 23S.
41. Del Rosario Rodicio M, Del Carmen Mendoza M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1 de enero de 2004;22(4):238-45.

42. Gaibani P, Mariconti M, Bua G, Bonora S, Sassera D, Landini MP, et al. Development of a Broad-Range 23S rDNA Real-Time PCR Assay for the Detection and Quantification of Pathogenic Bacteria in Human Whole Blood and Plasma Specimens. *Biomed Res Int.* 2013;2013:264651.
43. González Amarfil CB, Gómez, Nidia N, Silvia M. PCR multiplex: práctica y aplicaciones clínicas. *Recist Bioanalista.* 2023;133(34):16.
44. de Madrid UC. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS EN LA TÉCNICA DE LA qRTPCR (quantitive Real Time-Polymerasa Chain Reaction). [Internet]. Disponible en: [https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-pr%C3%A1ctica%20DISE%91O%20EXPERIMENTAL%20Y%20AN%C3%81LISIS%20DE%20DATOS%20EN%20LA%20T%C3%89CNICA%20DE%20LA%20RT%20qPCR%20\(1\).pdf](https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-pr%C3%A1ctica%20DISE%91O%20EXPERIMENTAL%20Y%20AN%C3%81LISIS%20DE%20DATOS%20EN%20LA%20T%C3%89CNICA%20DE%20LA%20RT%20qPCR%20(1).pdf)
45. Capítulo 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa by DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN EN LINEA - UDLA - Issuu [Internet]. 2022 [citado 10 de junio de 2023]. Disponible en: [https://issuu.com/universidaddelasamericas8/docs/capitulo\\_4.\\_reaccio\\_n\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](https://issuu.com/universidaddelasamericas8/docs/capitulo_4._reaccio_n_en_cadena_de_la_polimerasa)
46. ResearchGate [Internet]. [citado 4 de junio de 2023]. Interpretación de resultados obtenidos en la PCR Múltiple: se... Disponible en: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Interpretacion-de-resultados-obtenidos-en-la-PCR-Multiple-se-determinaron\\_fig1\\_342392226](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Interpretacion-de-resultados-obtenidos-en-la-PCR-Multiple-se-determinaron_fig1_342392226)
47. RECOMENDACIONES PARA LABORATORIOS QUE REALIZAN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): ÁREAS Y FLUJOS DE TRABAJO. - PDF Free Download [Internet]. [citado 3 de junio de 2023]. Disponible en: <https://docplayer.es/11499742-Recomendaciones-para-laboratorios-que-realizan-la-tecnica-de-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr-areas-y-flujos-de-trabajo.html>
48. Wojtyla K. A mis padres, Rafael Espinoza y Eliana Torrez, por su amor y sabiduría.

49. GE Healthcare [Internet]. 2007. illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads.
50. Phandanouvong L V, Betancourt L L, Rodriguez V F. Determinación y cuantificación de bacterias acidolácticas por PCR en tiempo real. Revista MVZ Córdoba. enero de 2010;15(1):1897-906.
51. Ivanova M, Singh R, Dharmasena M, Gong C, Krastanov A, Jiang X. Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. Poultry Science. 1 de junio de 2014;93(6):1587-97.
52. Lievens A, Jacchia S, Kagkli D, Savini C, Querci M. Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. PLOS ONE. 5 de mayo de 2016;11(5):e0153317.
53. St Jean DT, Herrera R, Pérez C, Gutiérrez L, Vielot NA, González F, et al. Clinical Characteristics, Risk Factors, and Population Attributable Fraction for Campylobacteriosis in a Nicaraguan Birth Cohort. Am J Trop Med Hyg. 25 de enero de 2021;104(4):1215-21.

#### 14. Anexos:

**Figura 12.** Método de *Qubit™ dsDNA HS* para la cuantificación de ADN de *Campylobacter spp*, el ensayo se realizó por triplicado y los valores se muestran en la figura, el promedio de las tres lecturas da como resultado 5.44 ng/μl capacidad de ADN.



### Operacionalización de variables:

Variable	Concepto	Indicador	Valor
<b>Temperatura de Alineamiento</b>	Es la temperatura en la cual los primers se alinean al DNA template.	Ficha de laboratorio	50°C, 55°C, 60°C
<b>Volumen de reacción</b>	Cantidad de muestra y sonda necesaria para una reacción	Ficha de laboratorio	0.5 µM, 1.5 µM, 2.5 µM
<b>Sondas</b>	Secuencia de ADN o ARN de cadena simple que se utiliza para encontrar su secuencia complementaria en el genoma de una muestra	Ficha de laboratorio	2.5 5 7.5
<b>Resultados</b>	Se refiere a efecto, consecuencia o conclusión de una acción, un proceso, un cálculo.	Ficha de laboratorio	Positivo Negativo
<b>Volumen de la muestra</b>	Es la cantidad de espacio que ocupa	Ficha de laboratorio	1 µl ,3 µl, 5 µl
<b>Validación</b>	Capacidad el método de detectar la positividad o negatividad de un grupo de muestras	Ficha de laboratorio	Positivo Negativo

**Ficha de Laboratorio:**

<b>Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-León</b>		
Optimización de un PCR en tiempo real para la detección <i>Campylobacter spp (cadF)</i> , como bacterias causantes de gastroenteritis.		
<b>Ficha de laboratorio para laboratorio para la documentación de los resultados obtenidos</b>		
<b>Experimentos</b>	<b>Variables</b>	<b>Resultados</b>
Experimento 1	Búsqueda de las temperaturas de alineamiento optimas	60°C
Experimento 2	Búsqueda de Volúmenes de reacción	12.5 µl
Experimento 3	Determinación de Volúmenes óptimos de las muestras	1.5 µl
Experimentos 4	Búsqueda del límite de detección	$5.44 \times 10^{-5}$ ng/µl
Experimento 5	Genotipificación de <i>Campylobacter spp</i>	<i>Campylobacter Jejuni/coli</i> 95% <i>Campylobacter no jejuni/coli</i> 5%