UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INTERPRETACIÓN DE LA TÉCNICA PCR-TR PARA LA DETERMINACIÓN DE SU REPRODUCIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD CON EL HISTOPLASMA CAPSULATUM.

MERA CUMBICUS KATHERINE ROCIO
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2020

UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

INTERPRETACIÓN DE LA TÉCNICA PCR-TR PARA LA DETERMINACIÓN DE SU REPRODUCIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD CON EL HISTOPLASMA CAPSULATUM.

MERA CUMBICUS KATHERINE ROCIO
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2020

UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

INTERPRETACIÓN DE LA TÉCNICA PCR-TR PARA LA DETERMINACIÓN DE SU REPRODUCIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD CON EL HISTOPLASMA CAPSULATUM.

MERA CUMBICUS KATHERINE ROCIO
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH

MACHALA, 09 DE DICIEMBRE DE 2020

MACHALA
09 de diciembre de 2020

trabajo practico para revisión

por Katherine Mera Cumbicus

Fecha de entrega: 19-nov-2020 09:54a.m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 1451110012
Nombre del archivo: Katherine_Mera.docx (37.2K)
Total de palabras: 5428
Total de caracteres: 29111

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, MERA CUMBICUS KATHERINE ROCIO, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado Interpretación de la técnica PCR-TR para la determinación de su reproducibilidad, especificidad y sensibilidad con el Histoplasma capsulatum., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 09 de diciembre de 2020

MERA CUMBICUS KATHERINE ROCIO
0704561836

RESÚMEN

Las aves del orden *Columbiforme* (palomas) son vectores de Histoplasma capsulatum, hongo de estudio clínico, causante de la enfermedad Histoplasmosis, importado de las zonas endémicas de América Central, del Sur, África y Asia, aunque en la actualidad esta enfermedad se encuentra esparcida por todos los continentes, debido a la migración y el turismo.

El objetivo de esta investigación fue Interpretar la técnica PCR-TR mediante análisis bibliográfico para la determinación de la reproducibilidad, especificidad y sensibilidad a *Histoplasma capsulatum* con la amplificación del ADN ribosomal.

Para cumplir este objetivo se utilizó tanto métodos como técnicas de fuentes bibliográficas primarias y secundarias acerca del proceso PCR-TR y de los programas para la elaboración de iniciadores y sondas Lightcycler Probe Design Software, Fluorescence Resonance Energy Transfer, el método Dneasy Plant Mini Kit, entre otros.

Como resultado se logró evaluar la reproducibilidad, especificidad y sensibilidad de la técnica en el *Histoplasma capsulatum* mediante curvas de regresión, melting, análisis de inmunodifusion y serología.

Lo que nos permite concluir que la técnica PCR-TR es una gran utilidad en la determinación del *Histoplasma capsulatum* logrando convertirse en una herramienta útil que fortalece al diagnóstico.

Palabras clave: *Histoplasma capsulatum*, PCR-TR, reproducibilidad, especificidad, sensibilidad

ABSTRACT

Birds of the order *Columbiforme* (pigeons) are vectors of *Histoplasma capsulatum*, a fungus of clinical study, causing the disease Histoplasmosis, imported from endemic areas of Central and South America, Africa and Asia, although at present this disease is spread over all continents, due to migration and tourism.

The aim of this research was to interpret the PCR-TR technique through bibliographic analysis to determine the reproducibility, specificity and sensitivity to *Histoplasma capsulatum* with the amplification of ribosomal DNA

To fulfill this objective, both methods and techniques from primary and secondary bibliographic sources of the PCR-TR process, and from the programs for the elaboration of initiators and probes Lightcycler Probe Design Software, Fluorescence Resonance Energy Transfer, the Dneasy Plant Mini Kit method, among others

As a result, it was possible to evaluate the reproducibility, specificity and sensibility of the technique in the Histoplasma capsulatum with regression curves, melting, analysis of immunodiffusion and serology.

Concludes that the PCR-TR technique is a great utility in the determination of the *Histoplasma capsulatum* and a useful tool that strengthens the diagnosis.

Keywords

***Histoplasma capsulatum*, PCR-TR, reproducibility, specificity, sensitivity**

INDICE

1. INTRODUCCIÓN 5

2. OBJETIVOS 7

2.1 Generales y específicos 7

3. DESARROLLO 8

3.1 Caso Práctico 8

3.2 Pregunta a Resolver. 8

3.3 Marco teórico 8

3.3.1 Histoplasma Capsulatum 8

3.3.1.1 Taxonomía 9

3.3.1.2 Caracterización molecular 10

3.3.1.3 Vectores del Histoplasma capsulatum 10

3.3.1.4 Clasificación y Ciclo de contagio 11

3.3.1.5 Etiología 11

3.3.1.6 Sintomatología 13

3.3.1.7 Factores de riesgos 13

3.3.1.8 Procedimientos necesarios para determinar *Histoplasma Capsulatum* 13

3.3.2 Métodos Moleculares de laboratorio 14

3.3.2.1 PCR 14

3.3.2.1.1 Protocolo para el desarrollo de la técnica. 16

3.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR): PCR cuantitativa 17

3.3.3 Equipos 19

3.3.3.1 Termociclador 19

3.3.3.2 Espectrofluorometro 19

3.3.3.3 Centrifugadora 19

3.3.3.4 Agitador Vórtex 20

3.3.4 Reactivos 21
3.3.4.1 Gel de agarosa. 21
3.3.4.2 Medio GYEP 21
3.3.5 Programas analíticos 21
4. MATERIALES Y MÉTODOS 22
5. METODOLOGÍA 22
6. RESULTADOS 24
7. CONCLUSIÓN 26
8. BIBLIOGRAFÍA 27

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figure 1. observación de histoplasma capsulatum var. capsulatum en diferentes observaciones 1. levadura en fase de gemación en foco 1000X. 2. levaduras en hematoxilina Eosina1000X. 3. Bastoconidios reflejando un halo claro citoplasmático enseñando una capsula. 4. Macroconidios denticulados formados en cultivo agar cerebro corazón con extracto de levadura a 37C*(Cruz et al. 2006)* 9
Figure 2 8 Clados del Histoplasma capsulatum(Rodrigues et al. 2020) 10
Figure 3Columba livia, vector del Histoplasma capsulatum(Anon n.d.). 11
Figure 4 procedimiento de la PCR(Trujillo-colon et al. 2019) 17
Figure 5. PCR-TR(UCM 2019) 18
Figure 6 termociclador(Block n.d.) 19
Figure 7centrifuga de laboratorio clinico(Para, Blackberry, and Software n.d.) 20
Figure 8Agitador Vórtex(Selecta n.d.) 20
Figure 9 gel de agarosa(Rojas 2017) 21

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Cuadro de taxonomia(Melo 2016)…… 9

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la proliferación del reino fúngico se ha incrementado, convirtiéndose en un gran riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades, entre las que se conoce a la histoplasmosis importada, es una enfermedad endémica de América Central, América del Sur, África y Asia, principalmente; las migraciones o visitas turísticas han sido las responsables de esparcir esta enfermedad a otras zonas del mundo como Estados Unidos (desde Ohio hasta Mississippi), esta área húmeda y acida constituye un ambiente idóneo para la proliferación del moho. En Europa se han evidenciado agentes positivos principalmente de migrantes residentes en la zona[1]

En el Ecuador esta enfermedad se encuentra en estudio y no refleja datos fijos, aunque es endémica de la zona[1], pero en el año 2016 el Ministerio de Salud Pública (MSP) arrojó unos datos que abarcaba a la población de entre 15 a 29 años, este grupo representaba un número de 335 pacientes con esta patología, de los cuales 180 eran del sexo masculino y 155 del femenino, seguidos por casos de personas con VIH/SIDA que representaban un grupo de 3.421, los cuales se encontraban en edades de 30 a 49 años, este grupo era solo respecto al año 2016[2].

Aunque esto no establece un número real que refleje la cantidad de pacientes con Histoplasmosis en Ecuador se puede apreciar que un 11,1% de los pacientes que padecen de VIH presentan la enfermedad esto permite conocer que es una prevalencia cada vez más elevada y esto basado en los estudios realizados anteriormente en la ciudad de Quito los cuales determinan que se puede localizar este fúngico en región pulmonar y casi de forma benigna[2].

El agente fúngico *Histoplasma capsulatum* es el causante de la histoplasmosis importada el cual presenta dos variedades conocidas como *H. capsulatum Var capsulatum* y el *H. capsulatum var duboisii,* además existe una tercera que se da en equinos, una de las características es su ubicación geográfica que puede variar, siendo para el *H. capsulatum Var capsulatum* América Latina y para *H. capsulatum var Duboisii,* África. Otro de los datos a tener en cuenta es que se puede encontrar en lugares contaminados con excrementos de aves o murciélagos que, además, se

complementan con humedad y temperatura templada, presentando estas características, el desarrollo del fúngico se produce con facilidad, siendo la fase micelial la adecuada para el contagio por vía inhalatoria principalmente[3].

En los seres humanos la sintomatología que provoca este hongo puede no manifestarse en cierta población, así como de otra forma podría darse un conjunto de dolencias generalizadas, por lo que el cuadro clínico puede ser fatal en algunos casos o crónico por la afectación a múltiples órganos[4], es por ello que se vuelve importante conocer técnicas que aporten dirección en la identificación de un agente patógeno entre ellos se pueden apreciar ciertos estudios como los radiológicos e incluso epidemiológicos y otras pruebas como cultivos o frotis teñidos realizado a tejidos seccionados, con la finalidad de identificar al fúngico en el organismo humano e incluso evidenciar la presencia de antígenos o anticuerpos. Existen estudios como el cultivo que permita el aislamiento del H. capsulatum con sus conidias en perfecto estado o cuando ocurre el cambio del hongo a levadura, lo cual se da a una temperatura de 37°C[3].

La relevancia de la investigación está encaminada, principalmente, a la interpretación de las características sobre la técnica molecular PCR-TR para su uso en el diagnóstico clínico de la enfermedad Histoplasmosis mediante el reconocimiento del ADN ribosomal de *Histoplasma capsulatum*, el cual se encuentra presente en las heces de aves domésticas (palomas) y murciélagos siendo capaz de esparcirse cuando se encuentra en fase micelial, accediendo al organismo por vía inhalatoria y ya que el contacto con uno de estos vectores es muy frecuente se ve la necesidad de conocer su sintomatología y las técnicas de laboratorio útiles para el correcto diagnóstico.

Debido a los estudios científicos existentes se puede recopilar datos que permita abarcar la orientación y actualización de los procesos que conlleva la técnica PCR-TR para el correcto uso en laboratorio clínico y ser de gran utilidad amenorando costos y tiempo al personal de salud además mejorar el conocimiento sobre el diagnóstico clínico de esta enfermedad y el uso de técnicas específicas y de alta

sensibilidad con la finalidad de ofrecer mejores servicios clínicos a la población en general que lo requiera.

2. OBJETIVOS

2.1 Generales y específicos

GENERAL

- Interpretar la técnica PCR-TR para la determinación de la reproducibilidad, especificidad y sensibilidad a *Histoplasma capsulatum* mediante análisis bibliográfico.

ESPECÍFICOS

- Identificar las características particulares de la técnica PCR-TR mediante análisis de revisión bibliográfica para el diagnóstico de *Histoplasma capsulatum.*
- Investigar bibliográficamente la especificidad y la sensibilidad que tiene la técnica PCR-TR mediante la amplificación del ADN ribosomal del fúngico

3. DESARROLLO

3.1 Caso Práctico

Se presenta un caso clínico en el que se lleva a cabo la evaluación clínica de una técnica PCR cuantitativa mediante análisis de muestras biológicas positivas y otras con sospecha de Histoplasmosis importada, la finalidad era validar la especificidad, reproducibilidad y la sensibilidad de esta técnica para aplicarla en estudios diagnósticos futuros[5]

3.2 Pregunta a Resolver.

¿En qué consiste la PCR, que tan específica es y por qué se usó PCR-TR?

3.3 Marco teórico

3.3.1 Histoplasma Capsulatum

Es un hongo que presenta una gama amplia con referencia a los demás hongos dimórficos, además, existen tres variedades esparcidas a nivel global y que no comparten la morfología ni los síntomas que provocan, de los cuales, dos afectan principalmente a la población humana, *Histoplasma capsulatum var. Capsulatum* y el *H. capsulatum var. Duboisii,* de manera general está comprobado que el H. capsulatum tiene múltiples conjuntos genéticos que aún no han sido denominados como especie y cada uno de ellos puede provocar una virulencia diferente[6].

Se lo puede encontrar en lugares que presenten baja iluminación, con suelos que contengan nitrógeno y fosforo, por lo general estos elementos se encuentran presentes en los fertilizantes que en combinación con las heces de aves y murciélagos propiciarían el desarrollo de este hongo[7]

Las investigaciones realizadas han permitido determinar que este fúngico se haya en las heces de la paloma doméstica, pertenecientes a la familia de las *Columbinae,* especie livia, lo que la lleva a ser denominada como plaga, ya que son muchos los daños que causa y las enfermedades que puede transmitir entre estas se encuentra la histoplasmosis, una enfermedad que presenta varias denominaciones como patología de Darling, enfermedad de las cuevas, calentura de las minas y las cavernas, calentura de María Tingo, citomicosis, histoplasmosis americana o

patología del valle de Ohio, provocada por el desarrollo del fúngico *Histoplasma capsulatum*[8].

La histoplasmosis tiene como zona endémica América del Sur, América Central y del Norte, sobre todo para una de las especies conocida como *Histoplasma Capsulatum var. Capsulatum.*

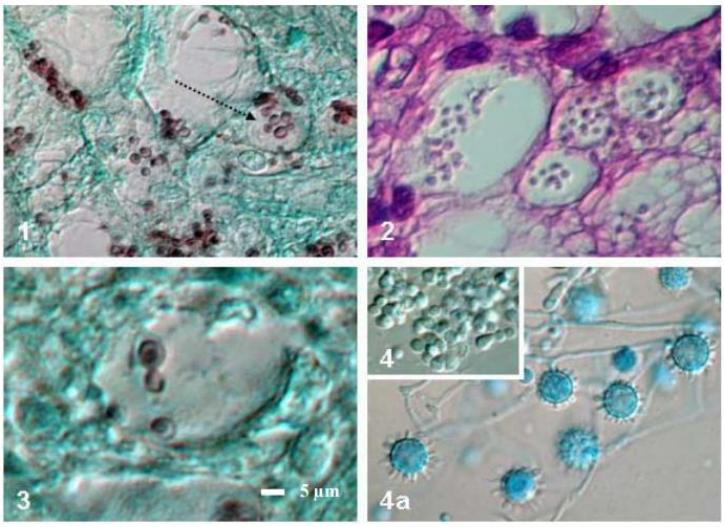

Figure 1. observación de histoplasma capsulatum var. capsulatum en diferentes observaciones 1. levadura en fase de gemación en foco 1000X. 2. levaduras en hematoxilina Eosina1000X. 3. Bastoconidios reflejando un halo claro citoplasmático enseñando una capsula. 4. Macroconidios denticulados formados en cultivo agar cerebro corazón con extracto de levadura a 37C[9]

3.3.1.1 Taxonomía

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Onygenales
Familia	Ajellomycetaceae
Género	*Histoplasma*
Especie	*Histoplasma capsulatum*

Tabla 1. Cuadro de taxonomia[10]

3.3.1.2 Caracterización molecular

La caracterización molecular del hongo se realiza mediante un análisis filogenético del ADN, específicamente una secuencia que se encarga de codificar proteínas Factor de ribosilacion de ADP(Arf), precursor del antígeno H(anti-H), ácido graso desaturasa delta -9 (Ole) y el alfa tubulina (Tub), mediante este análisis se detalla ocho clados separados de los cuales siete entran en la especia filogenética y la última entra en el clado A de Latinoamérica.

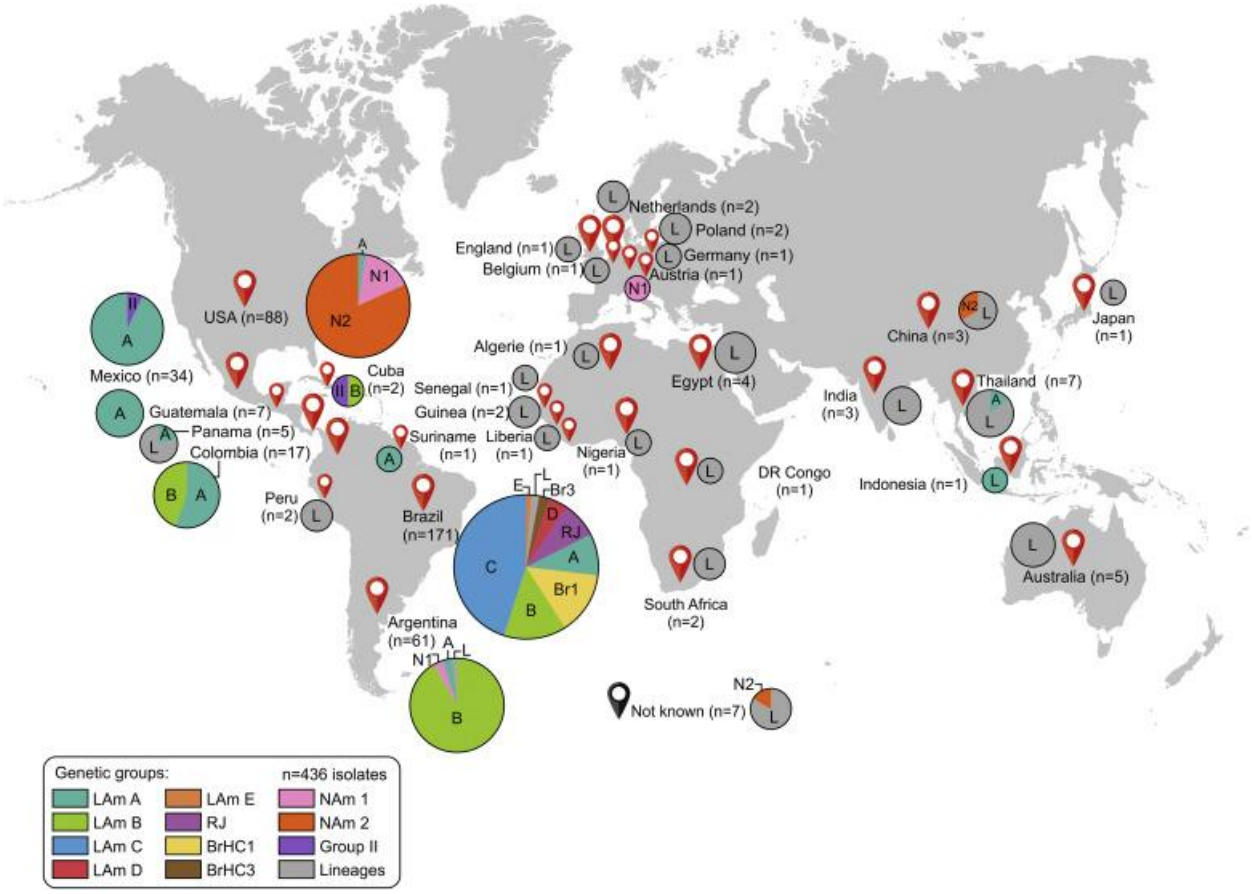

Figure 2 *8 Clados del Histoplasma capsulatum*[7]

3.3.1.3 Vectores del Histoplasma capsulatum

Los vectores responsables de la proliferación del hongo son las aves *Columbia livia* pertenecientes a la familia *Columbidae*, estas son más conocidas como palomas domésticas y tiene un promedio de vida cerca de los 6 años, son originarias de África, Asia y Europa, se introdujeron en América Latina por los colonos, estas aves se acumulan en lugares de las ciudades donde se les hace fácil elaborar sus nidos, estos espacios se encuentran lleno de heces, de igual manera ocurre en la zona

rural, es ahí donde se desarrolla el hongo *Histoplasma capsulatum* debido a las características acidas y presencia tanto de fosforo como de nitrógeno que favorecen el crecimiento del microrganismo citado, convirtiendo así a esta ave en una plaga[11].

Figure 3Columba livia, vector del Histoplasma capsulatum[11].

3.3.1.4 Clasificación y Ciclo de contagio

La *Emmonsiella capsulata* es un estado de tipo teleomorfo que se distingue de los demás géneros de ascomicetos debido a la apariencia de sus hifas espirales que afloran del ascogonio y la existencia de otras ramificaciones ondulas con ciertas hifas peridiales que brotan de los espirales, otra de sus características es que presenta tipos sexuales tanto positivo como negativo ya que es una heterotelica.

El desarrollo del hongo empieza cuando entra en contacto con el suelo rico en materia orgánica, específicamente de aves y heces de murciélago, posteriormente se presenta la fase micelial con hifas hialinas, de aspecto tabicado, con conidios tuberculados que surgen de los conidióforos, estos presentan un diámetro de 8 a 15 µm en las paredes más gruesas y las finas se forman por microconidios sésiles[7]

3.3.1.5 Etiología

El desarrollo de la enfermedad Histoplasmosis provocada por este hongo, se lleva a cabo en dos fases; la primaria que se presenta con una reacción que abarca pulmones y la piel, la fase progresiva, que es el avance del hongo por todo el organismo, es en la forma micelial en la que se presenta microconidias y macroconidias, los microconidios son realmente pequeños, tienen un tamaño de 2-4μm lo que les permite acceder a la zona bronquial[12], después de la infestación los micelios pasan a la forma de levadura en el interior de los macrófagos tisulares, posteriormente se multiplican provocando el alisado del macrófago avanzando hacia la zona alveolar. Se produce una respuesta inflamatoria en la denominada fase invasiva con ciertas características de gemación, en algunos casos,

esparciéndose por todo el organismo por vía hemática o por el sistema reticuloendotelial que lleva a los ganglios regionales[13].

El proceso de incubación se desarrolla entre una a tres semanas la cual es mediada por los Linfocitos T, aunque puede darse de uno a tres días, que son generados por la elaboración de citoquinas Th1 que se encargan de la activación en los macrófagos para la expresión de receptores complemento CR3 y CR4, los cuales están relacionados con la liberación de IL2 e IL12, estas citoquinas van a provocar el reclutamiento de los conocidos macrófagos tisulares e incluso los monocitos, que van a formar unos granulomas compactados del epitelio asignados para el control de la infección[13].

Además, el hongo presenta en su pared 1,3glucano, β-1,3 glucano y quinina, siendo esta ultima la más abundante, pero los dos compuestos primeros van a diferenciarse según la fase en la que se encuentre el fúngico, por ejemplo, si está en la fase levaduriforme habrá mayor α-1,3 glucano y en la fase micelial β-1,3 glucano, también se ha considerado la presencia de galactomanano en la membrana plasmática, pero en mucha menos cantidad[14].

Concretamente se conoce que el hongo se va a presentar en diferentes formas clínica dependiendo de la edad del infectado, la intensidad a la cual se dio la exposición y el estado en el que se encuentra el sistema de defensa. Existe una primoinfeccion en la cual no se presentarán síntomas además de necesitar pruebas de tipo serológicas o intradermorreactivas con *histoplasmina* o cualquier otro antígeno procedente del *Histoplasma* presente en el sistema orgánico[15]

3.3.1.6 Sintomatología

La sintomatología clínicas características de esta patología es asociada a la carga fúngica que haya inhalado el paciente, así como también la condición en la que se encuentre el sistema inmunológico y la virulencia de la cepa que contrajo[16].

Después de 3 a 17 días de la exposición se presentan ciertos síntomas como la fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, tos seca, dolores musculares, fatiga, molestia en el pecho, además en algunos pacientes puede llegar a provocar dolor articular e incluso erupciones, tenesmo con presencia de moco y sangre, si el paciente presenta otras patologías pulmonares, se llega a desarrollar de manera crónica la histoplasmosis incluyendo pérdida de peso y presencia de sangre en la tos[13].

3.3.1.7 Factores de riesgos

La población con mayor riesgo de contraer esta enfermedad son los que se encuentran con VIH o SIDA, en tratamientos contra el cáncer, aquellos que estén bajo medicación con corticoides, o medicamentos administrados para inhibir los posibles rechazos a trasplantes.

3.3.1.8 Procedimientos necesarios para determinar *Histoplasma Capsulatum*.

Para el diagnóstico de la patología histoplasmosis importada se emplean métodos y técnicas de laboratorio que engloban el cultivo microbiológico, biopsias y la detección tanto de los antígenos como los anticuerpos que provocan, los cultivos se realizan con el aislamiento del microorganismo, además se puede realizar exámenes que permitan la visualización del mismo sin la necesidad de fijarlos ni teñirlos como lo ofrecen los exámenes en fresco, esto es debido a la movilidad característica del hongo en medios acuosos, pero se debe tener cuidado ya que el exceso de líquido podría dificultar su apreciación en la muestra[13].

Otros métodos que se pueden emplear para el aislamiento del hongo son las coloraciones especiales llevadas a cabo con muestras cutáneas, biopsias y extendidos de medula ósea, además están los cultivos útiles para la observación del microorganismo vivo sin tener que colorearlos, pero las técnicas inmunológicas basadas en la fijación sobre gel agar, ELISA directa o indirecta son las que permiten reconocer al anticuerpo o al antígeno del hongo[13].

3.3.2 Métodos Moleculares de laboratorio

Existen distintos tipos de métodos moleculares que permiten el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas, dentro de este grupo se encuentran la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), NGS (secuenciación de nueva generación), RAPD (polimorfismo amplificado aleatorio ADN) y RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción), estas técnicas son las que presentan mayor especificidad, sensibilidad y aporta rapidez a los procesos de diagnóstico, además presentan una alta confiabilidad en los resultados[17].

La reacción en cadena de la polimerasa es una de las técnicas más empleadas debido a su facilidad para multiplicar el ADN de una determinada muestra biológica, pudiéndose obtener un gran número de copias exactas y presenta especificidad ya que se puede obtener una secuencia determinada de ADN[17]

3.3.2.1 PCR

La aplicación de esta técnica en área de la salud e investigaciones científicas es gracias a Karry B. Mullis quien ideo por primera vez dicho proceso, pero el cual carecía de perfeccionamiento por ello otros investigadores que pertenecían a Cetus Corporation, al igual que Mullis, tomaron la técnica y la modificaron para poder posteriormente aplicarla al diagnóstico clínico[18].

Debido a que el proceso era reciente se debía llevar a cabo de forma manual para esto utilizaron un fragmento de Klenow perteneciente a la ADN polimerasa de una bacteria en particular como lo es la *E.coli* y además los cambios de temperatura necesarios para este proceso se realizaban mediante diversos baños de agua caliente en los distintos grados de temperatura, es decir, que para poder darse la desnaturalización del ADN molde se debía aplicar drásticamente agua en ebullición a niveles altos de temperatura esto conllevaba a que se altere demás sustancias presentes en la muestra como enzimas provocando su inactivación por ello se debía agregar nuevas enzimas acompañada de glicerol pero esto provocaba la inhibición de la misma resultando en una limitación de la eficacia catalítica que presentaba la ADN polimerasa I[19].

Pero poco tiempo después estos desajustes costosos y nada eficientes se vieron resueltos con la aparición del ADN polimerasa termoestable Taq proveniente de la bacteria Thermus aquaticus, la cual predomina en lugares acuáticos con altos grados de temperatura, 90ºC, específicamente y es parecida al ADN polimerasa de la *E.coli* por contener en su cadena polipeptídica tres centros activos separados entre ellos[20]

Los tres centros están asociados a puntos importantes, uno de ellos presenta actividad de 5´a 3´con la ADN polimerasa, un segundo con actividad correctora de prueba es decir, exonucleasa 3´ a 5´ la cual también elimina bases no complementarias durante la polimerización , el tercer centro encargado de la actividad exonucleasa 5´a 3´ agregada a la actividad 3´a 5´de la exonucleasa, aunque son muy distintas provocada por la ruptura del enlace fosfodiester final o en un extremo 5´presente en una área de la doble hélice. Es así como se da el cambio en el perfeccionamiento de la técnica PCR[19].

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite la amplificación de una pequeña parte de ADN, ya que es un proceso completamente enzimático realizado in vitro y presenta una gran especificidad y sensibilidad, debido a que es capaz de detectar estas biomoléculas a pesar de que exista una mínima cantidad de muestra a analizar[18].

En el desarrollo de las reacciones se puede decir que actúan dos oligonucleótidos los cuales reconocen una pequeña parte de la secuencia del ADN complementario y que se encuentran mediados por acción del ADN polimerasa. Conforme se da el proceso ocurren algunos ciclos en los cuales implican que se desarrollen procesos como la desnaturalización del ADN, los oligonucleótidos se aparean y la síntesis del fragmento de ADN que se ha formado, la cual es llevada a cabo por el ADN polimerasa y esto se va a repetir por 20 a 30 ciclos para obtener un crecimiento de las copias llegando hasta millones del fragmento, la ADN polimerasa debe ser termoestable para soportar los cambios elevados de temperatura que conlleva el proceso, por ello, la participación de la bacteria termófila *Thermophilus aquaticus* es muy relevante ya que es a quien se le extrae esta enzima, esta bacteria habita en

lugares de agua caliente y su descubridor fue Thomas Brock el cual en un análisis al Parque Nacional de Yellowstone encontró dicha bacteria clasificándola como una Gram-negativa, heterótrofa y aerobia[18].

Este proceso de amplificación genética se da en un tiempo muy corto y solo es necesaria una pequeña parte de la muestra, además se ha podido apreciar que la especificidad reactiva es la misma en las copias de ADN como en el fragmento original, comprendiendo así que para los análisis de laboratorio se puede tomar una muy limitada porción del material genético[19].

3.3.2.1.1 Protocolo para el desarrollo de la técnica.

El protocolo va a depender de la compañía que elabore los estuches, por lo tanto, serán diferentes dependiendo del fabricante, pero de forma general todos deben contar con los tres puntos específicos que conforman la técnica los cuales son los siguientes:

- Desnaturalización de la cadena. - este proceso consiste en la separación correcta de la doble hélice por medio de una alta temperatura llega a estar en 90 a 96º C en un periodo de tiempo que abarca de 25 a 90 segundos[21]
- Alineamiento. - para que este paso se lleve a cabo de debe bajar la temperatura cerca de los 50 a 60ºC, es idónea para que se produzca el apareamiento entre los fragmentos de oligonucleótidos iniciadores y la cadena de ADN previamente desnaturalizada, todo este proceso conllevará un tiempo de 30 o 60 segundos[21].
- Extensión. - denominada así por la función extensiva que realiza el ADN polimerasa sobre los fragmentos iniciadores u oligonucleótidos que presentan enlazados al ADN blanco para obtener nuevas cadenas que complementen cada cadena sencilla procedente de la muestra original, como detalle importante es recordar el cambio de temperatura a 70ºC[21].

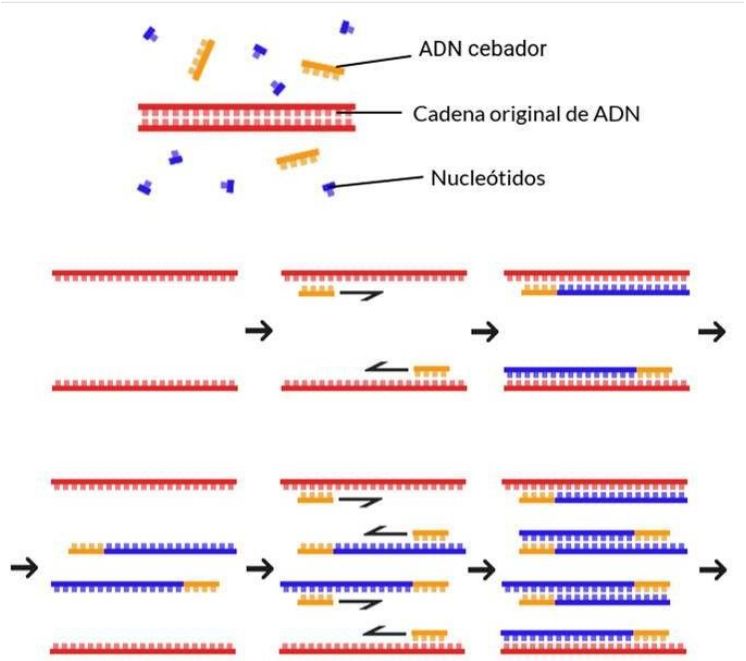

Figure 4 procedimiento de la PCR[13]

Para este proceso se emplean equipos denominados termocicladores, que permiten desarrollar los ciclos completos con ayuda del efecto Peltier, encargado de los cambios de temperatura en el bloque mediante una inversión de la corriente eléctrica, para garantizar mejorar el transporte de temperatura, los tubos presentan características cónicas de 0,2 – 0,5 ml, con pared fina, el equipo cuida que no se produzca la condensación mediante el calentamiento de las tapas que poseen los tubos[19].

Es así como se va obteniendo millones de cadenas únicas de una muestra, pudiendo ser de una bacteria, virus, hongos e incluso antígenos y anticuerpos convirtiéndose en una técnica de alta especificidad y sensibilidad para el desempeño de distintos diagnósticos[22].

3.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR): PCR cuantitativa

la técnica PCR –TR es un avance de la PCR convencional, ya que presenta todas las cualidades de esta, pero incluye la cuantificación de los fragmentos de ADN amplificados. Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de ciertas moléculas específicas para la fluorescencia denominados fluorocromos[23]

Estos fluorocromos se sienten estimulados por energías de luz que dan lugar a una señal que es detectada por el fotodetector para ser leído en un computador, este proceso se lleva a cabo cada vez que se repita el ciclo en el que se produce la amplificación y así se puede conocer la cantidad de ADN nuevo, estos fluorocromos se ubican en dirección 5´de la sonda y permanece inactivo hasta que la polimerasa llegue a su encuentro y por la exonucleasa provoque la liberación de este fluorocromos alejándolo del quencher situado en lugar 3´ provocando que permanezca sin reaccionar, una vez dado el distanciamiento se emite la señal fluorescente indicio del final de un ciclo.

La técnica PCR-TR se muestra accesible para la implementación de un oligonucleótido que aportara información para el reconocimiento de falsos positivos mediante la hibridación de este con los iniciadores gracias a su secuencia la cual es complementaria con los mismos y la sonda, pero presentara un cambio el cual solo le permitirá la unión con los iniciadores, esto dará como resultado la ausencia de un registro fluorescente como la resultante de una amplificación de ADN.

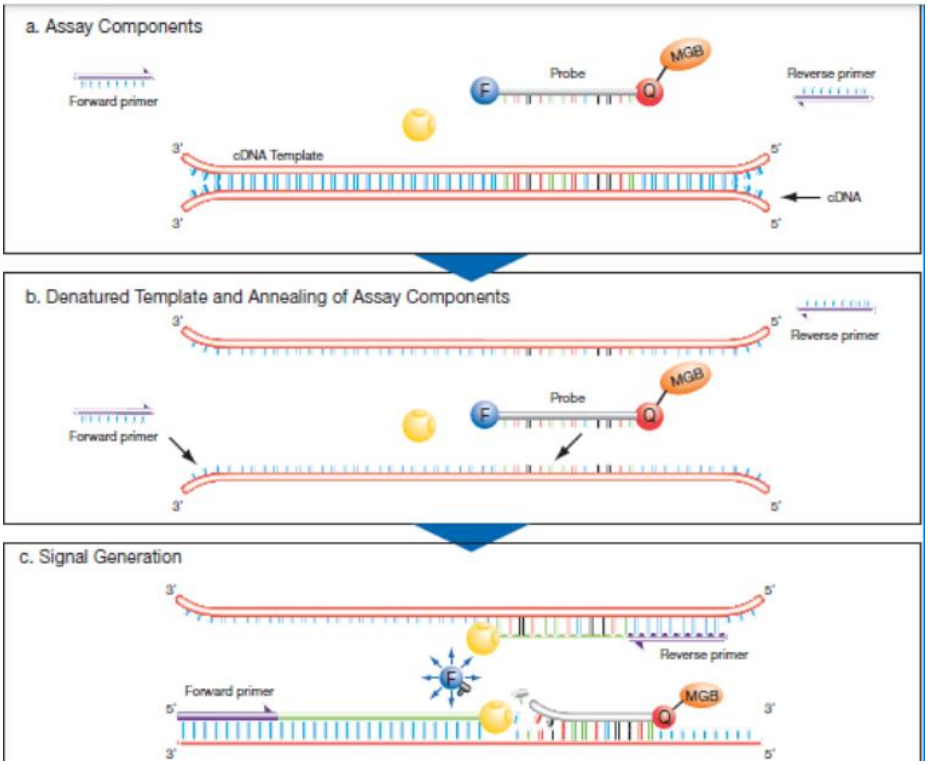

Figure 5. PCR-TR[24]

3.3.3 Equipos

3.3.3.1 Termociclador

Es un equipo encargado de la amplificación por PCR, consta de ciclos programados por intervalos, entre cada ciclo de da la Activación Enzimática, Desnaturalización, Alineamiento o Extensión, Desactivación Enzimática, Estabilidad de la muestra y la Retención (esta última es opcional), esto mediado por cambios de temperatura, numero de ciclos y el tiempo

Figure 6 *termociclador*[25]

3.3.3.2 Espectrofluorometro

La electroforesis se emplea para la separación del ADN y la observación de fragmentos en el gel de agarosa con ayuda de bromuro de etidio el cual lo tiñe y hace visible la muestra gracias a una carga eléctrica que se aplica en el gel lo que provoca la migración del ADN con polo negativo hacia el ánodo positivo eso emite una luz ultravioleta apreciable por el equipo [26]

3.3.3.3 Centrifugadora

Se emplea en el diagnostico *in vitro*, es un equipo de sobremesa para laboratorios, de uso sencillo, seguro y con diversas utilidades como análisis clínicos, trabajo de investigación bioquímicos y otros, permite la separación de los componentes presentes en las muestras debido a la diferencia de densidades de las cuales se extrae el material con

el que se pretende trabajar para la obtención de resultados, pueden ser sanguínea, orina, y demás muestras biológicas.

Figure 7centrifuga de laboratorio clínico[27]

3.3.3.4 Agitador Vórtex

Agitador con velocidad 0-2500 r.p.m. que pueden ser continuas o a presión, tiene una órbita de 4mm, e incluye una base para tubos y bultos de goma antideslizante en la plataforma de apoyo[27].

Figure 8Agitador Vórtex[27]

3.3.4 Reactivos

3.3.4.1 Gel de agarosa.

Se obtiene mediante la disolución de la agarosa en un medio de Tris, acetato y EDTA presente en un *buffer*, está compuesto por un polímero lineal de galactosa más 3,6-anhidrogalactosa

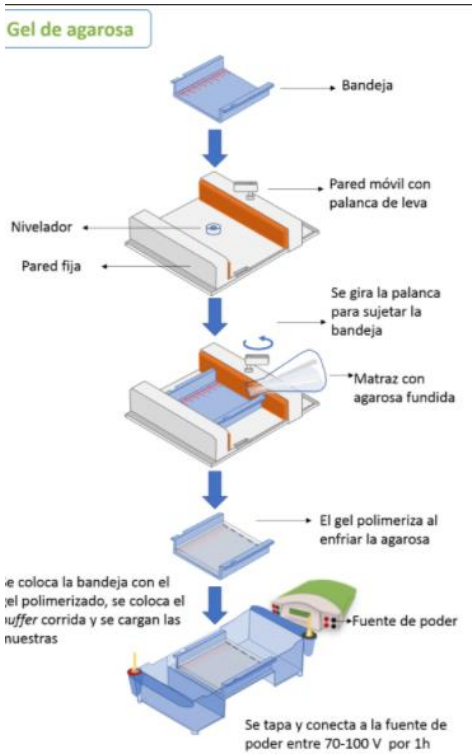

Figure 9 *gel de agarosa*[26]

3.3.4.2 Medio GYEP

Medio de cultivo enriquecido con 2% de glucosa, 0,3% extracto de levadura,1% de peptona para el cultivo de cepas.

3.3.5 Programas analíticos

Programa Lishtcycler Probe Design Sofware 1.0.-se emplea para la creación de iniciadores empleados en los ensayos cualitativos y cuantitativos

Fluoresce Resonance Energy Transfer. - utilizado para diseñar las sondas empleadas en la técnica PCR.

Sistema ABI Prism 377DNA sequencer. - permite emplear la química de los cebadores y los terminadores que están marcados por

cuatro fluoróforos distintos, hace posible que un mismo tubo se lleve a cabo las cuatro reacciones.

Programa BLAST. - se encarga de encontrar secuencias similares en la base de datos de ADN.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Para el análisis de este artículo científico se emplearon métodos de Revisión bibliográfica primarias y secundarias, fotografías presentes en investigaciones realizadas y los instructivos de los equipos que figuran en el artículo científico.
- Como materiales de estudio se presentó la técnica molecular PCR-TR y el *Histoplasma capsulatum.*

5. METODOLOGÍA

De acuerdo al análisis del caso clínico estudiado el desarrollo del trabajo se llevó a cabo en diferentes etapas las cuales se detallarán a continuación:

- Obtención de las muestras. - emplearon 22 cepas de *H. capsulatum* que se encontraban dentro del área de Micología en el Centro Nacional de Microbiología, 12 muestras de otro tipo de fúngicos, ADN genómico de ser humano y de ratón.
- Extracción de ADN.- este procedimiento se llevó a cabo con la previa incubación de las cepas en medio GYEP(1%peptona, 0,3 de levadura, 2% glucosa), por siete días, posteriormente se llevó a congelación por dos ciclos con 6 bolitas de vidrio en un tubo Falcon con el micelio previamente extraído y secado, después de la congelación se realizó la agitación con el equipo vórtex a 2.000 r.p.m. en 3 segundos, se pulveriza la muestra y se extrae el ADN con ayuda del método comercial Dneasy Plant Mini Kit.
- Elaboración de los iniciadores y las sondas. - en este procedimiento se utilizó el programa Lightcycler Probe Design Software 1.0 para las sondas, pero previamente se tuvo que analizar regiones ITS del ADN que permitieron reconocer fragmentos idóneos presentes en la zona ITS-1, esto más los datos que tiene el GenBank y el banco de Micología.

Así se obtuvo iniciadores directos con 5´-CCACCCTTGTCTACC-3´ y el iniciador inverso 5´-GGAACCAAGAGATCCGT-3´, las sondas presentaban las secuencias HC1-Fluos 5´GTCGGTGAACGATTGGAGT3'-LCFluorescein, Hc1-Red5´LCRED630-GAGCATGAGAGCGATAATAATCCAGT3´ (Tibmolbiol).

- Descripción de la técnica PCR-TR.- Se preparó primero la técnica con el ADN previamente obtenido, la mezcla contenía 3 Mm de Cl_2Mg, 0,3 micromoles de iniciador y 0,2 de sonda FRET, se agregó 2 microlitros de ADN, esto se llevó al termociclador con la finalidad de obtener valores para resultados positivos y negativos , este proceso ayudo a obtener un amplicon y sus dimensiones mediante electroforesis, se comparó los fragmentos obtenidos con los registrados en la base de datos de laboratorio, para conocer la reproducibilidad y la cuantificación del ADN copiado utilizaron rectas de regresión entre la concentración de ADN y los ciclos de amplificación que se realizaban detectados por fluorescencia.
- Diseño de un control interno de la técnica de PCR.- es útil para evitar los posibles falsos negativos, debido a que en la muestra existen diferentes sustancias que podrían alteran la amplificación, se empleó un oligonucleótido monocatenario que presentaba una secuencia similar a los iniciadores lo que ayudaba en su unión pero tenían diferencias para no relacionarse con la sonda así no se involucraban en las respuestas fluorescentes, además se puede detectar por la curva de temperatura de los productos amplificados ya que este oligonucleótido emplea un rango diferente al de la sonda. Es necesario implementar un cierto número de copias control para evitar el enfrentamiento con el ADN diana, garantizando así la sensibilidad de este proceso.
- Realización de la técnica de PCR en muestras clínicas. - una vez listo todo lo necesario para el procedimiento se llevó a cabo el análisis de 14 muestras confirmadas con *Histoplasma capsulatum* por medios de otros estudios, más 10 muestras con otros tipos de fúngicos, 10 pacientes con neutropenia febril y 10 voluntarios sanos, se empleó 2 microlitros de muestra ADN extraído, 4

microlitros de suero, la técnica se desarrolló por dos veces y los resultados se compararon con los datos registrados, además a las muestras de suero se les realizó un análisis de inmunodifusión que arrojo la presencia de anticuerpos para *Histoplasma capsulatum.*

6. RESULTADOS

El límite de muestra para ser detectado por la técnica fue de 1fg/µl y se realizó una recta de regresión entre esta concentración y los puntos detectados por fluorescencia o también conocidos como crossing point (CP) se representó un 0,99 de coeficiente para la determinación. Con esto se logró apreciar una reproducibilidad muy elevada en los 6 primeros puntos, pero se encontró una variación del 3% con las 8 repeticiones siguientes, y que va aumentando en concentraciones bajas, por ello establecieron una media de 1,8 para la amplificación y reproducibilidad eficaz por la tenía PCR-TR.

En relación a la especificidad para ADN Histoplasma capsulatum se obtuvieron resultados muy factibles ya que solo logró detectar a este fúngico y no se evidencio la amplificación de los otros fúngicos presentes ni mucho menos con el ADN genómico Humano o del roedor.

Para determinar que los controles internos funcionaban se realizó una curva de melting que dio como resultado tres gráficos uno con la muestra positiva, una negativa que no tenía control interno, pero arrojo amplificación, lo cual sería por alguna otra sustancia presente en la muestra, y una positiva más control interno.

Como las muestras no eran todas del mismo tipo ni número, se procedió a detallarlas por grupo, es decir que en 10 muestras de suero fueron 7 positivas, los 3 lavados broncoalveolares, las 2 secreciones bronquiales, el esputo y los 3 aspirados medulares fueron positivos y como solo había una muestra de sangre y una de plasma no se puedo obtener un análisis estadístico pero se los agrupo como muestras hematológicas reflejando 7 sueros positivos más el plasma y con ello se determinó la cantidad de ADN amplificado el cual fue de 23,1 fg/µl siendo el menor en comparación con las muestras respiratorias que dieron un $4,9x10^3$fg/µl y los aspirados medulares con $4,8x10^3$ fg/µl.

Además, cabe destacar que 6 de las 10 muestras de suero eran positivas para VIH, pero el análisis de inmunodifusión solo resulto positiva en 6 de los 10 casos de los cuales 4 eran negativos para VIH y dos positivos para VIH.

Con respecto a la especificidad se obtuvo un 100% ya que no hubo positivos en las otras muestras de enfermos con micosis, ni en pacientes con neutropenia febril mucho menos en pacientes voluntarios.

6.1 DISCUSIÓN

Según la investigación realizada por la doctora Ana Karina Ibarrola Vannucci, menciona que la técnica PCR-TR permite una gran visualización de las amplificaciones realizadas al ADN del organismo que se desee estudiar con gran exactitud disminuyendo el tiempo de trabajo y sin afectar a la sensibilidad, eficiencia ni a la reproducibilidad[28], por otro lado el doctor Juan C. Pereira Palacios y su grupo de investigación, denomina como mejoras de rendimiento y especificidad a las cualidades propias de esta técnica ya que permite el monitoreo según se va desarrollando la reacción con la finalidad de detectar y cuantificar las copias de ácidos nucleicos[23].

Según O. Bassy Álvarez, G. Larigauderie y sus colaboradores resaltan la cualidad de respuesta que tiene la técnica mediante gel de agarosa permitiendo que la luz sea detectada por el fluorometro señalando un punto en la recta de melting conociendo así el tamaño del fragmento que se ha amplificado[29], además investigadores de la Universidad Complutense de Madrid reporta que esta técnica realiza la señal de respuesta mediante pequeños oligonucleótidos que se complementan a la secuencia entre los dos ampliaciones llevando consigo dos moléculas situadas en cada extremo uno en 5´que ejerce la función de fluoróforo (emite la señal) y en 3´siendo un apagador (Quencher), si estas dos moléculas se encuentran muy cerca podría apagarse el fluoróforo y no emitir respuesta[24]

Es por todo esto que se puede resaltar a esta técnica como la más adecuada para la investigación de amplificación sobre el ADN del organismo que se desea investigar ya que posee una gran especificidad y sensibilidad para el análisis.

7. CONCLUSIÓN

Mediante la revisión bibliográfica de artículos científicos sobre de la técnica PCR se pudo deducir que es una herramienta molecular de gran potencial debido a su facilidad para el desarrollo de amplificación genómica en diversos ciclos y presenta gran especificidad con el organismo de análisis aunque se debe tener en cuenta el periodo de desarrollo del patógeno, además, esta técnica ha sido importante para la implementación de nuevas tecnologías de laboratorio como la técnica PCR-TR que aporta conocimiento de las características particulares que presenta y permite la interpretación de la técnica con ciertas añadiduras como la lectura de señales en la copia del ADN y evitar falsos negativos, logrando así, describir la especificidad y sensibilidad que tiene para la amplificación de ADN ribosomal del Histoplasma capsulatum, convirtiéndose en una técnica útil que permitirá el análisis de casos, aparentemente, con Histoplasmosis y ahorrando, tanto en tiempo como en recursos, lo cual es beneficioso para el sector de salud.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Valencia Sancho D, Loza Santillan J, Santana Vargas P, Zambrano-Achig P, Pérez Tasigchana F. Histoplasmosis Diseminada en paciente Inmunocompetentes. *Práctica Fam Rural*. 2020;5(2):2020. doi:10.23936/pfr.v5i2.163

2. Titulación TDE, Como P, Para R, Por O, Lissett A, Condo S. TÍTULO Y SUBTÍTULO : Published online 2018.

3. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL ESCUELA DE MEDICINA TITULO : DETECCIÓN DE HISTOPLASMA CAPSULATUM EN PACIENTES CON SUBTÍTULO HOSPITAL INFECTOLOGIA / PERIODO 1 DE ENERO DEL 2015 HASTA EL 31 DE DICIEMBRE DEL 2015 KATHY LIZETTE TORO VILLAFUERTE TUTOR : DRA : MARIA F. Published online 2017.

4. Liliana1 G-G, * N-CD, Perozo-Mena Armindo3 B-GJ y, Milagros2 M. Universidad del Zulia Facultad de Medicina Escuela de Medicina Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales Maracaibo , Venezuela Indizada en la Base de Datos LILACS / CD-ROM Staphylococcus aureus con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR. Published online 2016.

5. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(1):16-22. doi:10.1157/13096748

6. Sepúlveda VE, Márquez R, Turissini DA, Goldman WE, Matute DR. Las secuencias del genoma revelan una especiación críptica en el patógeno humano Histoplasma capsulatum. Published online 2020:1-39.

7. Rodrigues AM, Beale MA, Hagen F, et al. The global epidemiology of emerging Histoplasma species in recent years. *Stud Mycol*. 2020;100095:1-21. doi:10.1016/j.simyco.2020.02.001

8. Arias Guerrero Y, Morales Cauti S, Villacaqui Ayllon E. Presencia de Histoplasma capsulatum en Heces de Palomas Mensajeras y de Castilla en la Ciudad de Lima, Perú. *Rev Investig Vet del Perú*. 2017;28(3):636. doi:10.15381/rivep.v28i3.13348

9. Cruz R, Opazo H, Barthel E, Campos S, Piontelli E. Reporte Clinico: Histoplasmosis Diseminada Aloctona En Un Paciente Con Sindrome De Inmunodeficiencia Adquirida. *Boletín Micológico*. 2006;21(December 2006). doi:10.22370/bolmicol.2006.21.0.261

10. Melo S. Estudio preliminar para determinar la presencia de Histoplasma capsulatum y potencial zoonótico fúngico, en paloma común (columba livia) mediante análisis de heces en laboratorio y molecular confirmatorio, en zonas de alta población del área urbana del di. Published online 2016:95. http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/5613/1/UDLA-EC-TMVZ-2016-29.pdf

11. Vista de la evaluación de la abundancia relativa y percepción de la presencia de palomas bravías Columba Livia (Columbiformes_ Columbidae) en la Universidad Nacional de Costa Rica.pdf.

12. Azar MM, Hage CA. Laboratory diagnostics for histoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1612-1620. doi:10.1128/JCM.02430-16

13. Trujillo-colon S, Briceño-largo YM, Castro-montoya N, Fuenmayor-valderrama M, Bonilla-aldana DK. Carta al Editor La Histoplasmosis Aviar – Aún un Problema de Salud Pública. Published online 2019:4-6.

14. Medicina CDE, Zootecnia VY, Sur DEL. Del sur ,. <}- . Published online 2016:1-61.

15. Arzuaga A, Lesly R. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL ESCUELA DE MEDICINA TEMA : HISTOPLASMOSIS EN PACIENTES VIH CON DIAGNOSTICO CONFIRMADO POR PUNCION ASPIRATIVA DE MEDULA OSEA Tutor : DRA . MARIA CHAVEZ VELIZ GUAYAQUIL MAYO 2018. Published online 2018.

16. Posadas NPA. Revista chilena de infectología Histoplasmosis diseminada . Una infección Experiencia en el Hospital Nacional Prof . A . in HIV positive patients Experience in the Hospital. Published online 2020:1-10.

17. Angarita M, Torres MI, Díaz A. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev Habanera Ciencias Medicas*.

2017;16(5):796-807.

18. Molina E (Centro N de IO. Sebbm divulgación la ciencia al alcance de la mano. *Sebbm*. 2019;(3):0-1.

19. Article O. Revista Científica Salud Uninorte , Vol Validación técnica de una PCR : Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Chlamydia trachomatis. 2020;32(3):1-10.

20. Lazzarini MV. PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA Bognanni , Carolina Gisela – LU 126849 Licenciatura en Biotecnología. Published online 2015.

21. Vazquez-lobo A. *Microsatélites*.; 2015.

22. Valero C, De La Cruz-Villar L, Zaragoza Ó, Buitrago MJ. New Panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):2910-2918. doi:10.1128/JCM.01580-16

23. Pereira-Palacio JC, Gaviria-Mejía LJ, Zea-Castrillón S, Jaramillo Arbelaez PE, Bedoya A. Descripción de pruebas moleculares en el diagnóstico del virus Zika en el periodo 2008-Febrero 2018. Revisión sistemática. *Nova*. 2018;16(30):81-93. doi:10.22490/24629448.2838

24. UCM. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS EN LA TÉCNICA DE LA qRT-PCR (quantitive Real Time-Polymerasa Chain Reaction). Published online 2019:15. https://www.genome.gov/glossarys/index.cfm?id=140

25. Block T. Beyond the Border of PCR Technolo g y. 1.

26. Rojas AC. Método: Gel de electroforesis Agarosa. *Conogasi*. Published online 2017:1.

27. Selecta JP. Marcas representadas por animales. http://brandsandtrends.blogspot.com.co/2011/04/marcas-representadas-por-animales.html

28. Ibarrola Vannucci A-K. *Caracterización Molecular y Funcional de Las Prohibitnas 1 y 2 de Trypanosoma Cruzi*.; 2019.

29. Bassy Álvarez O, Larigauderie G, Ortega García M, Granja Albarellos C, Cabria Ramos JC. Optimización y Validación de una PCR en Tiempo Real para la Rápida Identificación de Bacillus thuringiensis, Simulador de Bacillus anthracis TT - Optimization and validation of a real-time PCR for rapid identification of Bacillus thuringiensis, surrogate. *Sanid Mil*. 2018;74(2):84-89. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712018000200084&lang=pt%0Ahttp://scielo.isciii.es/pdf/sm/v74n2/1887-8571-sm-74-02-00084.pdf