



Salud Uninorte

ISSN: 0120-5552

carvica@gmail.com

Universidad del Norte

Colombia

Hernández, Marta; Cardona-Muñoz, Laura; Celis Zapata, Liliana; Iglesias-Acosta, Jesús; Meléndez-Labrador, Sandra; Ospina Guzmán, Magda; Otero Chate, Vicente; Posso Menco, Laura; Pozo García, Kell; Roa Narváez, Alana; Rodríguez Ortiz, Rosa; Romero-Moreno, Martha; Vargas-Rosero, Elizabeth; Viveros Celín, Carmen; Hernández Olmos, Joanne

Validación técnica de una PCR: Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Chlamydia trachomatis*

Salud Uninorte, vol. 32, núm. 3, september-december, 2016, pp. 398-410

Universidad del Norte

Barranquilla, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81750089014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Validación técnica de una PCR: Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Chlamydia trachomatis*

Technical validation of a polymerase chain reaction for *Chlamydia trachomatis* detection

Diana Jurado-Orejuela¹, Claudia Paredes-Amaya²,
Gerardo Libreros-Zúñiga³

Resumen

Objetivo: Estandarizar una técnica de PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis*.

Materiales y método: Estudio experimental en el que se optimizaron las condiciones de PCR para la detección *in vitro* de *C. trachomatis*. Se utilizó ADN de *C. trachomatis* VR885D y los cebadores CtP1 5'-TAGTAAGTCCACTTCATCA-3' y CtP2 5'-TTCCCCTGTGAATTCGTTGC-3', que amplificaron un segmento de 201 pb del plásmido clamidial. Se realizaron diluciones logarítmicas de ADN clamidial y fueron empleados para determinar la sensibilidad analítica expresada como copias de plásmidos y/o de cuerpos elementales. La especificidad analítica de la prueba se evaluó usando los cebadores CtP1 y CtP2 y ADN de microorganismos colonizadores y/o patógenos urogenitales. La variabilidad intraensayo fue evaluada sobre muestras por triplicado, mientras que la variabilidad interensayo se determinó mediante comparación de los resultados obtenidos por tres técnicos en diferentes días.

Resultados: Las condiciones de PCR para la amplificación del gen de interés fueron establecidas (94°C/4 min; 40 ciclos de 94°C/1 min, 56°C/1 min. y 72°C/1.5 min; 72°C/4 min); 1.5 mM MgCl₂ y 1 U/μL Taq polimerasa. La sensibilidad analítica de la PCR fue de 10⁻¹⁷ g de ADN, equivalentes a una copia del plásmido o menos de un cuerpo elemental de *C. trachomatis*. Los cebadores CtP1 y CtP2 amplificaron específicamente el ADN de *C. trachomatis* bajo las condiciones experimentales evaluadas. La repetitibilidad y reproducibilidad de la PCR se determinó con experimentos de variabilidad intra e interensayo respectivamente.

Conclusiones: La estandarización de esta PCR es el primer paso para su utilización en el diagnóstico de infecciones por *C. trachomatis*. Se requieren estudios adicionales de validación clínica de ésta prueba.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, diagnóstico molecular, PCR.

Fecha de recepción: 15 abril de 2016
Fecha de aceptación: 26 de mayo de 2016

¹ Profesora Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad del Valle, Cali (Colombia). dijurado@yahoo.com

² Bacterióloga Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. ccparedes09@gmail.com

³ Profesor Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. gerardo.libreros@correounivalle.edu.co

Correspondencia: Gerardo Andrés Libreros Zúñiga. Av. 1N n° 3N-35, oficina 2301, Centenario, Cali (Valle del Cauca, Colombia). Teléfono 57-2-6670326, Fax 57-2-6670329. gerardo.libreros@correounivalle.edu.co

Abstract

Objective: To standardize a PCR for Chlamydia trachomatis detection.

Materials and methods: An experimental study was designed to standardize a C. trachomatis PCR test. Genomic DNA from C. trachomatis serovar D ATCC VR885D was used for the PCR standardization. An amplicon of 201 bp from clamidial plasmid was obtained using primers CtP1 5'-TAGTAAGTCCACTTCATCA-3' and CtP2 5'-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3'. Serial dilutions of clamidial DNA were used to determine the analytical sensitivity. Analytical specificity was tested using DNA from several urogenital microorganisms. Intra assay variability was assessed on triplicate DNA samples, while inter assay variability was assessed comparing the results by three technicians on different days.

Results: Established (94°C/4 min; 40 cycles at 94°C/1 min, 56°C/1 min and 72°C/1.5 min; 72°C/4 min; 1.5 mM of MgCl₂ and 1U/μL of Taq polymerase. The analytical sensitivity was 10⁻¹⁷ g of DNA equivalent to one plasmid or less than one elementary body from C. trachomatis. Primers CtP1 and CtP2 amplified specifically C. trachomatis in the experimental conditions evaluated. Intra and inter assay variability demonstrated the repeatability and reproducibility of the PCR respectively.

Conclusions: We standardized the experimental conditions for a C. trachomatis PCR that can be used for diagnostic purposes. Other studies are required for further clinical evaluation of this test.

Keywords: Chlamydia trachomatis, molecular diagnosis, PCR.

INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis es la bacteria que causa el mayor número de infecciones de transmisión sexual en el mundo, con un estimado de 100 millones de casos por año, constituyéndose en un problema de salud para la población sexualmente activa (1, 2). *C. trachomatis* infecta principalmente células del epitelio mucoso y, simultáneamente, se a

a

q

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

El

[illegible]

DISCUSIÓN

Chlamydia trachomatis 16S rRNA gene (7).

a a l a y f

għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae*, p ≤ 0.001 għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 u għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
y ≤ 0.001 u għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
f ≤ 0.001 u għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
lloga għall-*Chlamydia trachomatis* p ≤ 0.001 u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
f ≤ 0.001 u għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
tqiegħid għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
x ≤ 0.001 u għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
ta tliet, għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
u għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .
h għall-*Chlamydia trachomatis* u għall-*Neisseria gonorrhoeae* p ≤ 0.001 .

[illegible]

□□ C□□□ b□□ , □□□□ p □□□ a q□□□ la a p □□□□ □□□□

[illegible]

$\frac{1}{2} p$ $\frac{1}{2} b$ $\frac{1}{2} a$ $\frac{1}{2} j$ $\frac{1}{2} l a$ $\frac{1}{2} p$ $\frac{1}{2} a$ $\frac{1}{2} M g$

A p q t r l a q a j f a l x
x é t f p a z a p a x t x (13).

La gattinella battrà le ali trachomatis,

1. Mg^{2+} 2. Mg^{2+} 3. Mg^{2+} 4. Mg^{2+} 5. Mg^{2+} 6. Mg^{2+} 7. Mg^{2+} 8. Mg^{2+} 9. Mg^{2+} 10. Mg^{2+} 11. Mg^{2+} 12. Mg^{2+} 13. Mg^{2+} 14. Mg^{2+} 15. Mg^{2+} 16. Mg^{2+} 17. Mg^{2+} 18. Mg^{2+} 19. Mg^{2+} 20. Mg^{2+} 21. Mg^{2+} 22. Mg^{2+} 23. Mg^{2+} 24. Mg^{2+} 25. Mg^{2+} 26. Mg^{2+} 27. Mg^{2+} 28. Mg^{2+} 29. Mg^{2+} 30. Mg^{2+} 31. Mg^{2+} 32. Mg^{2+} 33. Mg^{2+} 34. Mg^{2+} 35. Mg^{2+} 36. Mg^{2+} 37. Mg^{2+} 38. Mg^{2+} 39. Mg^{2+} 40. Mg^{2+} 41. Mg^{2+} 42. Mg^{2+} 43. Mg^{2+} 44. Mg^{2+} 45. Mg^{2+} 46. Mg^{2+} 47. Mg^{2+} 48. Mg^{2+} 49. Mg^{2+} 50. Mg^{2+} 51. Mg^{2+} 52. Mg^{2+} 53. Mg^{2+} 54. Mg^{2+} 55. Mg^{2+} 56. Mg^{2+} 57. Mg^{2+} 58. Mg^{2+} 59. Mg^{2+} 60. Mg^{2+} 61. Mg^{2+} 62. Mg^{2+} 63. Mg^{2+} 64. Mg^{2+} 65. Mg^{2+} 66. Mg^{2+} 67. Mg^{2+} 68. Mg^{2+} 69. Mg^{2+} 70. Mg^{2+} 71. Mg^{2+} 72. Mg^{2+} 73. Mg^{2+} 74. Mg^{2+} 75. Mg^{2+} 76. Mg^{2+} 77. Mg^{2+} 78. Mg^{2+} 79. Mg^{2+} 80. Mg^{2+} 81. Mg^{2+} 82. Mg^{2+} 83. Mg^{2+} 84. Mg^{2+} 85. Mg^{2+} 86. Mg^{2+} 87. Mg^{2+} 88. Mg^{2+} 89. Mg^{2+} 90. Mg^{2+} 91. Mg^{2+} 92. Mg^{2+} 93. Mg^{2+} 94. Mg^{2+} 95. Mg^{2+} 96. Mg^{2+} 97. Mg^{2+} 98. Mg^{2+} 99. Mg^{2+} 100. Mg^{2+}

CE x ta p , á t la lza a á t la f
ya q l p .*trachomatis* g
ta á t la ga ta x l p , f ta
CE q l á t , p g ya la v z fa la fla a y
q ta PCR la p l ta la v b (23, 24).

a b g p a a a a a a a a a a a a a a a

[illegible]

a p v ha ta fla a

Pa  a la   ta   a   a           ta p            p   C. trachomatis p a  a   f   ta      ADN  Chlamydia trachomatis    v a  D      la   la         ta  a       la         a    (a     a  a      f             ta       v       ta    (24,25)).

v a ☐, p a ☐ a ☐ p ☐ i a ☐ a ☐ g ☐ ☐ p lá ☐ ☐

p t g a b a g é t a y a p l p l t a p b a g t a ,
t b t g é Chlamydia (16, t l l a P C R t a a z a a x t t t
19,22); p t t t t r p t a x p l a t t t t t b t t t t t t g t t t y
p a t t t t a t t a t t t v a t t g t t l t t a t t t t t p a t t t t l a t t f t t t t p t
t v a t v a t t t E-K, a t t t t l t b t v a Chlamydia t t t t t t á t t t y
t a t t a y t f g a t t t a v t t é t t . a t t t t á t t t t (26).

Agradecimientos

[illegible]

CONCLUSIONES

A p[ro]p[os]it[o] la t[er]m[in]a p[ar]a [un]a b[e]n[e]ficia[r]ia Financiaci[on]: Un[iv]ersidad de Va[lencia]. C[on]voca[t]o r[eg]lame[n]to de f[u]ndaci[on]es p[ar]a el t[er]cero q[ue]nta[n]do de la f[u]ndaci[on] de 1908. Madrid, 1911. CI 1671.

Conflicto de intereses: Ninguno.

REFERENCIAS

ECDC. ECfDPaC. Söxally ttaaxxxtttx-
 ftaaxxxtttx Etxxpx 2013 Sttxxxtx 2015.
 Amxxtxlttx / (txxxttxxttx)

Financiación: Unión Europea a través de la II. CEEV y la t
a 2011. CI 1671.

Conflicto de intereses: No existe.

REFERENCIAS

1st ECDC, ECfDPaC. Specially tailored to the
 needs of the EEP 2013 Stockholm 2015.
 Available from: <http://ecdc.europa.eu/>

- [illegible]

20. Makhadmeh N, Al-Hadad M, Al-Hadad M, Al-Hadad M, Al-Hadad M, Al-Hadad M. The prevalence of Chlamydia trachomatis in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol* 1993;31(11):3081.
21. Makhadmeh CE, Saeed C, Al-Hadad CA, Whittam JA, Magbaza JP, Nakhala EC et al. Chlamydia trachomatis infection in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1395-402.
22. Thun A, NS, Loh M, Stucky CC, Clark IN. Plaque assay for Chlamydia. *Microbiology* 1997;143 (Pt 6):1847-54.
23. Mahalingam MT, Bhat P, Ojha A. In vitro pathogenicity of Chlamydia trachomatis in ISRN *Obstet Gynecol*. 2011;2011:436936.
24. Malla M, Malla CJ, Wadapa E, Aala A, Palla H, Fakhri S et al. The prevalence of Chlamydia trachomatis in Saudi Arabia. *J Infect Dis* 2005;191(6):907-16.
25. Palam MC, Gz YM, Tamm AM, Fakhri M, Tava MB. Prevalence of Chlamydia trachomatis in Saudi Arabia. *Biomedica* 2015;35(3):314-24.
26. Falk L, Jalla M, Ull M. Malla la g... Chlamydia trachomatis in Saudi Arabia. *APMIS* 2004;112(11-12):771-84.

Tabla 1. Microorganismos usados en la estandarización de la PCR de *C. trachomatis* y su relación con el tracto genitourinario (TGU)

Grupo	Microorganismo	Relación con TGU	Origen
Bacterias	<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar D	Patógeno	ATCC VR885D
	<i>Treponema pallidum</i>	Patógeno	Cepa Nichols
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Patógeno	Aislado clínico
	<i>Mycoplasma hominis</i>	Patógeno	Aislado clínico
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Comensal o patógeno	ATCC 12386
	<i>Escherichia coli</i>	Comensal o patógeno	ATCC 25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Comensal o patógeno	ATCC 25923
	<i>Micrococcus (Kocuria) kristinae</i>	Comensal	Aislado clínico
Hongos	<i>Candida albicans</i>	Comensal o patógeno	Aislado clínico
Virus	Herpes tipo 1	Patógeno	Aislado clínico
	VIH-1	Patógeno	Aislado clínico

Tabla 2. Mezcla de reacción de la PCR de *C. trachomatis*

Reactivos	Concentración final (50 µL)	Vol. / reacción (µL)
Agua DEPC	-	34,6
Green GoTaq® Flexi Buffer pH 8.5 (Promega)	1X	10
MgCl ₂	1,5 mM	3
dNTP mix	800 µM	1
Primer CtP1	0,5 µM	0,15
Primer CtP2	0,5 µM	0,15
T GoTaq® polimerasa (Promega)	1 U	0,1
ADN	> 10-17 g	1

Tabla 3. Especificidad analítica de la PCR para *C. trachomatis*

Microorganismo	PCR
<i>C. trachomatis</i>	+
<i>U. urealyticum</i>	-
<i>M. hominis</i>	-
<i>C. trachomatis</i> + <i>U. urealyticum</i>	+
<i>C. trachomatis</i> + <i>M. hominis</i>	+
<i>U. urealyticum</i> + <i>M. hominis</i>	-
<i>T. pallidum</i>	-
<i>S. agalactiae</i>	-
<i>E. coli</i>	-
<i>S. aureus</i>	-
<i>M. kristinae</i>	-
<i>C. albicans</i>	-
Herpes tipo 1	-
VIH-1	-

Tabla 4. Variabilidad intraensayo repetitibilidad de la PCR de *C. trachomatis*

Técnico	Muestra	Resultado PCR 1	Resultado PCR 2	Resultado PCR 3	Resultado final
1	1	+	+	+	Positivo
	2	-	-	-	Negativo
	3	-	-	-	Negativo
	Control	+	+	+	Positivo
2	4	-	-	-	Negativo
	5	-	-	-	Negativo
	6	+	+	+	Positivo
	Control	+	+	+	Positivo
3	7	+	+	+	Positivo
	8	+	+	+	Positivo
	9	-	-	-	Negativo
	Control	+	+	+	Positivo

Tabla 5. Variabilidad inter ensayo (reproductibilidad) de la PCR de *C. trachomatis*

Operador	Jornada	Muestra	Resultado PCR 1	Resultado PCR 2	Resultado PCR 3	Resultado final
1	Día 1, mañana	10	-	-	-	Negativo
		11	+	+	+	Positivo
		12	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo
	Día 2, tarde	10	-	-	-	Negativo
		11	+	+	+	Positivo
		12	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo
2	Día 1, mañana	13	+	+	+	Positivo
		14	-	-	-	Negativo
		15	+	+	+	Positivo
		Control	+	+	+	Positivo
	Día 2, tarde	13	+	+	+	Positivo
		14	-	-	-	Negativo
		15	+	+	+	Positivo
		Control	+	+	+	Positivo

3	Día 1, tarde	16	-	-	-	Negativo
		17	-	-	-	Negativo
		18	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo
	Día 2, mañana	16	-	-	-	Negativo
		17	-	-	-	Negativo
		18	-	-	-	Negativo
		Control	+	+	+	Positivo

3541 aaaattagta aatttttggg tattaaaaaa gtatggtaaa ttatagtaa tggaaattta
3601 taaaagt tttttttt gaaaaaga agtttgaag aagaattgtt aatttatta
3661 agatatttt taaattgggt taaaaaggga tggtagaagt tataggttt gattttttt
3721 tatttatta ttatgatta gtagttat aaagatta tgaaggaaag aattaagg
3781 ggaaataaa

Figura 1. Regiones de reconocimiento de los cebadores CtP1 y CtP2 en el plásmido de *C. trachomatis* (GenBank: CP007132.1). En gris se muestran las secuencias flaqueadas por los cebadores CtP1: Timina 3584-Adenina 3604 (T3584-A3604) y CtP2: Guanina 3765-Adenina 3784 (G3765-A3784).

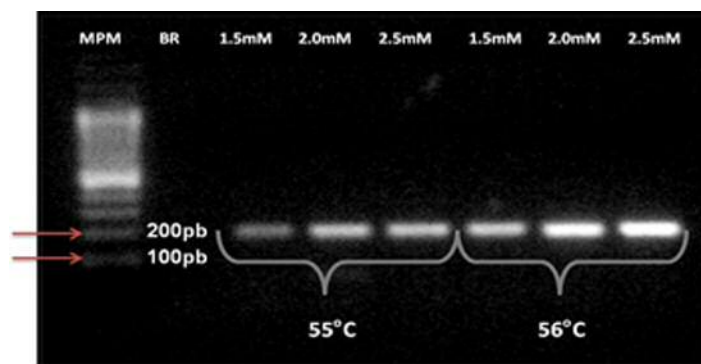


Figura 2. Estandarización de la temperatura de alineamiento de los cebadores CtP1 y CtP2 y de la concentración de MgCl₂. Volúmenes iguales (10 µL/ pozo) de los productos de amplificación se colocaron en cada pozo y se realizó la electroforesis en gel de agarosa a 7 V/cm durante 1 hora. Se observó la amplificación del gen de interés a 55 y 56 °C y a las concentraciones de 1.5 a 2.5 mM de MgCl₂. MPM: Marcador de peso molecular 100 pb, 1.5 mM, 2.0 mM, 2,5 mM: Con flechas rojas se muestran las bandas de 100 y 200 pares de bases, esta última, cercana al tamaño del amplicón esperado (201 pb). En la parte superior se muestra el gradiente de concentraciones de MgCl₂ evaluado. MPM: Marcador de peso molecular, BR: Blanco de reactivo.



Figura 3. Límite de detección de la PCR de *Chlamydia trachomatis*. Diluciones logarítmicas del ADN ATCC VR885D fueron usadas para PCR. Los números en la parte superior corresponden al logaritmo negativo de la concentración del ADN. En la parte inferior se correlaciona la concentración de ADN con el número de plásmidos y de cuerpos elementales (C.E). El límite de detección de la prueba correspondió a 10⁻¹⁷ g de ADN, equivalentes a un plásmido y menos de un C.E de *C. trachomatis*, está indicado sobre la foto del gel con un círculo rojo.

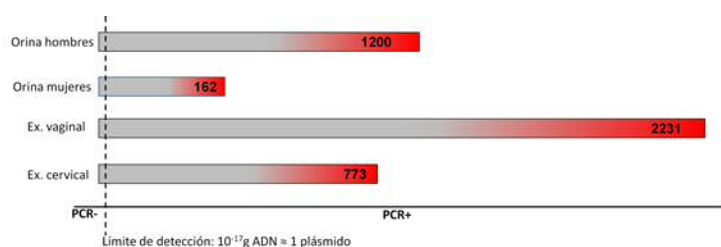


Figura 4. Potencial diagnóstico de la PCR en el diagnóstico de infecciones sintomáticas y asintomáticas por *Chlamydia trachomatis*. La carga bacteriana, definida como el número de cuerpos elementales (C.E./100 μL), fue determinada por Michel *et al.* en diferentes muestras de hombres y mujeres sintomáticos (21). Las cuatro barras horizontales representan la magnitud relativa de la carga bacteriana para cada muestra clínica. A la derecha de cada barra (en rojo), se encuentra la carga promedio determinada en (21). La zona central e izquierda de las barras (en gris), representarían la región de umbral en donde posiblemente se encuentran los individuos con infección asintomática. El límite de detección determinado para la PCR de nuestro estudio (10⁻¹⁷ g ADN ≈ 1 plásmido ≈ ≤ 1 C.E) está representado por la línea punteada vertical que corta el eje x, y definiría la PCR como positiva o negativa.