

# ¿Se ve afectada la capacidad de detección de una RT-PCR multiplex por la coexistencia de dos patógenos gastrointestinales?

Brusca-Vidao. L<sup>1</sup>, Ballester-Téllez. M<sup>1</sup>, Arjona. P<sup>1</sup>, Rajadell. M<sup>1</sup>, Jiménez-Morgades E<sup>1</sup>, Garreta M<sup>1</sup>, Boronat. A<sup>1</sup>, Pérez.P<sup>1</sup>.  
1- Centre Analítiques Terrassa, Catlab. Departamento de Microbiología Clínica. Viladecavalls. Barcelona, España

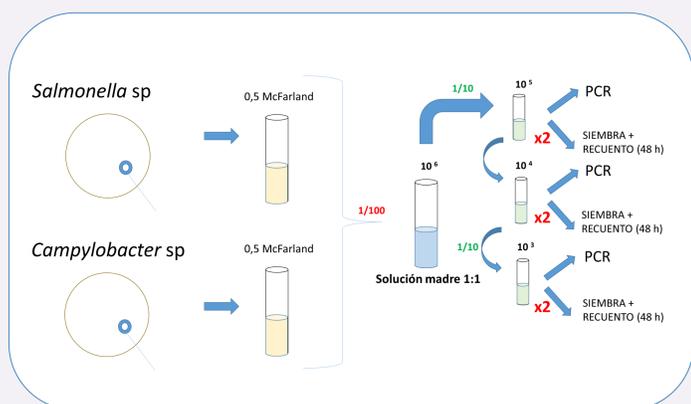


## INTRODUCCIÓN

*Salmonella* sp y *Campylobacter* sp, se encuentran entre los patógenos causantes de gastroenteritis aguda bacteriana más ampliamente descritos. Cada vez es más común el uso de técnicas moleculares para la detección de estos microorganismos en muestra directa. La mayoría de estas técnicas son real-time multiplex PCR (RT-PCR) capaces de detectar simultáneamente varias dianas.

El **objetivo** de este estudio es evaluar la detección mediante multiplex RT-PCR de dos patógenos (*Salmonella* sp y *Campylobacter* sp) cuando estos coexisten a igual concentración en una muestra así como relacionar el número de UFC/mL de la muestra con los valores de Ct de la RT-PCR.

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 1.** Diseño de la técnica de validación de RT-PCR para la codetección de dos patógenos gastrointestinales.

- Se sembraron en agar MacConkey (BioMérieux) y agar Campylosel (BioMérieux) las cepas ATCC14028 *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y ATCC33281 *Campylobacter jejuni* respectivamente.
- Se realizaron diluciones seriadas logarítmicas partiendo de un inóculo inicial de 0,5 McFarland para ambos patógenos hasta llegar a concentraciones de 1000 UFC/mL.
- Cada una de las diluciones se analizó mediante multiplex RT-PCR (GI-EB Screening, Seegene).
- Esas mismas diluciones se sembraron en placas de MacConkey y Campylosel para proceder al recuento de microorganismos por mL real de cada muestra.
- Los datos de la RT-PCR fueron analizados mediante Seegene Viewer para extraer el valor de Ct.
- La media de UFC/mL de cada dilución se obtuvo tras el recuento por duplicado de las placas tras 24h de incubación el MacConkey y 48h el Campylosel.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dilución	Dilución con un solo microorganismo		Dilución con dos microorganismos	
	Ct <i>Salmonella</i> sp	Concentración (UFC/mL)	Ct <i>Salmonella</i> sp	Concentración (UFC/mL)
10 <sup>5</sup>	29.15	198400	29.05	208000
10 <sup>4</sup>	33.5	13050	32.59	31200
10 <sup>3</sup>	36.96	120	35.45	239

**Tabla 1.** Resultados la detección de *Salmonella* sp mediante una PCR multiplex y de los recuentos obtenidos tras la siembra de las diferentes diluciones analizadas.

- Un valor de Ct de 29.15 para *Salmonella* sp en nuestras condiciones experimentales, corresponde a un recuento de  $1.9 \times 10^5$  UFC/mL.
- Si en estas mismas concisiones se añade un segundo microorganismo (*Campylobacter* sp) a la muestra en la misma concentración, se le añade una concentración el valor de Ct para *Salmonella* sp es 29.05.
- A concentraciones de  $1.3 \times 10^4$  UFC/mL y de  $1.2 \times 10^2$  UFC/mL de *Salmonella* sp se obtienen unos valores de Ct de 33.5 y 36.96, respectivamente.
- Al añadir *Campylobacter* sp a la mezcla en igual proporción, los valores de Ct fueron de 32.59 y 35.45 respectivamente
- Al generar la ecuación de la recta y calcular el valor de Ct estimado al cual la concentración teórica en UFC/mL es igual a 0, se obtienen valores de Ct de 35.90 si sólo se detecta *Salmonella* y de 35.89 en la codetección.

## CONCLUSIONES

- La presencia de dos de los microorganismos más comúnmente causantes de diarrea aguda (*Salmonella* sp y *Campylobacter* sp) en la misma proporción en la muestra, no modifica la sensibilidad de la PCR ni los valores de Ct obtenidos para dichas dianas.
- Con estos resultados podemos predecir aproximadamente el número de colonias esperadas en cultivo, y se plantea la posibilidad de NO sembrar muestras con Ct > 36.
- Son necesarios estudios adicionales en los que se evalúen el comportamiento de la RT-PCR con codetecciones de patógenos a diferentes concentraciones.