

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

Escuela de Biología

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL
PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA

Helicobacter pylori.

Estudiante: Sirley Mariel Arias Cordero

Tutora: MSc. Montserrat Jarquín Cordero

Setiembre, 2014-Marzo, 2015.

Tabla de contenido

Autora.....	3
Sirley Mariel Arias Cordero.....	3
Resumen.....	4
Introducción	5
Marco Teórico.....	6
<i>Helicobacter pylori</i>	6
Taxonomía.....	6
Detección de <i>H. pylori</i> mediante PCR en tiempo Real	11
Parámetros de diseño de un ensayo de PCR en tiempo real.....	12
Análisis de la técnica de PCR en tiempo real.....	12
Metodología	16
Preparación del ADN genómico de <i>H. pylori</i> para la elaboración de las curvas estándar.	16
Optimización de la temperatura de alineamiento para los <i>primers</i>	17
Optimización de la concentración de <i>primers</i>	19
Optimización de la concentración de sonda.....	20
Resultados y discusión	21
Optimización de la temperatura de alineamiento para los <i>primers</i>	21
Optimización de la concentración de <i>primers</i>	26
Optimización de la concentración de sonda.....	30
Conclusiones	34
Recomendaciones.....	34
Referencias Bibliográficas	34
Anexos.....	38

Autora

Sirley Mariel Arias Cordero

Estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, ITCR.

Carné: 200944159

Cédula: 3-451-072

Correo electrónico: mariel.ar.co@gmail.com

Teléfono: 89237837

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL
PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA
Helicobacter pylori.

Sirley Mariel Arias Cordero

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria que se estima está presente en la mitad de la población mundial y desde 1980 se ha ligado con diferentes patologías gástricas, incluido el cáncer gástrico. Dada su importancia, tanto a nivel clínico como ambiental, la IARC ha considerado que existe suficiente evidencia para clasificarla como un patógeno primario completo capaz de inducir procesos carcinogénicos en humanos. Por lo tanto estudios que permitan realizar su detección son de suma importancia. Debido a ello, en el presente trabajo se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real para la detección del gen *glmM* de la bacteria, ajustando la temperatura de alineamiento y se optimizaron las concentraciones de *primers* y de sonda de hidrólisis, empleando el equipo LightCycler 480 II, utilizando el método de análisis de cuantificación absoluta por segunda derivada máxima. Se obtuvo que 52°C fue la mejor temperatura de alineamiento con una eficiencia de 1,963; asimismo se determinó que la concentración de óptima cada *primer* fue de 1µM, con una eficiencia de 1,962 y finalmente, para la sonda de hidrólisis, se obtuvo una eficiencia de 1,963, con una concentración de 1 µM en la reacción.

Palabras clave:Cáncer gástrico, gen *glmM*, LightCycler 480II.

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria que se estima se encuentra presente en la mitad de la población mundial (IARC, 2014), siendo aquellos países en vías de desarrollo los que presentan mayor incidencia de infección. A partir de los descubrimientos de Marshall y Warren en 1980, en los cuales se demostró la relación existente entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de diferentes patologías gástricas, estudios sobre dicha bacteria ha cobrado relevancia (Olaya, 2008).

Según Azevedo *et al* (2007), las enfermedades con las cuales se le vincula *H. pylori* datan desde gastritis crónica y úlceras pépticas, hasta ser considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, debido a que desde el año de 1994 (con reconfirmación en el 2009), la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó a esta bacteria dentro el Grupo I de patógenos que inducen cáncer (IARC, 2014).

Su capacidad para colonizar el epitelio gástrico humano y ser un potencial factor de riesgo para el desarrollo de cáncer, se debe a la producción de la enzima ureasa, con la cual neutraliza el ácido clorhídrico del estómago, por la conversión de la urea gástrica en amonio (Alarcón, Barquero, Domingo, López y Royo, 2004; Hernández, 1990).

En Costa Rica se ha relacionado con gastritis, úlcera duodenal, gastritis atrófica con probabilidades de transformarse en cáncer gástrico, especialmente en adenocarcinoma de tipo intestinal (Sierra, 2002). Según datos de Ministerio de Salud (2014), la incidencia anual de cáncer gástrico es aproximadamente sesenta casos por cien mil habitantes, con una relación hombre:mujer de 2:1; aunque si bien la incidencia ha disminuido en las últimas dos décadas, continúa siendo un problema de salud pública.

Actualmente en el país se realizan investigaciones con *H. pylori* en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica (UCR) y en Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), específicamente en el Centro de Investigación en Biotecnología. Para el año 2011 en el ITCR, Montero logró aislar e identificar cepas de *H. pylori* a partir de muestras de agua para consumo humano, provenientes de zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico. Además se trabajó con la detección molecular de cepas a partir de biopsias gástricas provenientes de pacientes dispépticos (González, 2011).

De acuerdo a las estadísticas de Costa Rica. relacionadas con estas patologías, es necesario innovar las técnicas existentes para su diagnóstico mediante investigaciones que permitan no sólo la detección, sino además la cuantificación de esta bacteria en distintos tipos de muestras, para con ello tomar las acciones pertinentes y poder generar mejoras a la salud pública.

Es por esto que en el presente informe se reporta una metodología para la identificación del gen *glmM* de *H. pylori*, misma que permite realizar un estimado de la concentración de bacterias en una muestra, utilizando la técnica de PCR cuantitativa o PCR en Tiempo Real, empleando el equipo LightCycler® 480 II de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania).

Marco Teórico

Helicobacter pylori

Taxonomía

Según Olaya (2008), inicialmente *H. pylori* se denominó *Campylobacter pyloridis*, luego su nombre fue corregido a *Campylobacter pylori* y finalmente en 1989, tras la secuenciación de su genoma, se concluyó que no presentaba homología con la secuencia del género *Campylobacter*, sino con el genoma de *Helicobacter*, dando como resultado la clasificación taxonómica que se muestra a continuación:

- **Reino:** Bacteria
- **Filo:** Proteobacteria
- **Clase:** Epsilonproteobacteria
- **Orden:** Campylobacterales
- **Familia:** Helicobacteriaceae
- **Género:** *Helicobacter*
- **Especie:** *H. pylori*

Dentro del género *Helicobacter* existen 35 especies capaces de colonizar animales como los gatos (*H. bizzozeronii*, *H. felis*), conejos y perros (*H. salomonis*), cerdos y monos (*H. suis*), entre otros. Estas especies, de manera similar a *H. pylori* son capaces de promover el desarrollo de enfermedades como linfoma, dispepsia y cáncer gástrico en su hospedero. No obstante, *H. pylori* es la única especie con evidencia de infectar seres humanos (Boyanova, L.; Mitov, I.; Vladimirov, B., 2011).

Características microbiológicas

Morfología

H. pylori es una bacteria Gram negativa, con morfología espiralada y dimensiones que van desde los 2 a los 4 μm de largo y de 0,5 a 1 μm de ancho. Presenta de dos a seis flagelos unipolares (Cervantes, 2006) que le dan gran capacidad de movilidad. Bajo condiciones de estrés, es capaz de transformar su morfología bacilar a cocoide, siendo ésta última reportada como una morfología viable, pero no cultivable en el laboratorio (VBNC, por sus siglas en inglés).

Las cepas de *H. pylori* se transforman en VBNC bajo ciertas condiciones de estrés como una incubación prolongada, subcultivos, variaciones en la temperatura, contacto con oxígeno y los tratamientos con antibióticos. En la figura 1 se muestran los diferentes tipos de morfología que puede presentar *H. pylori*.

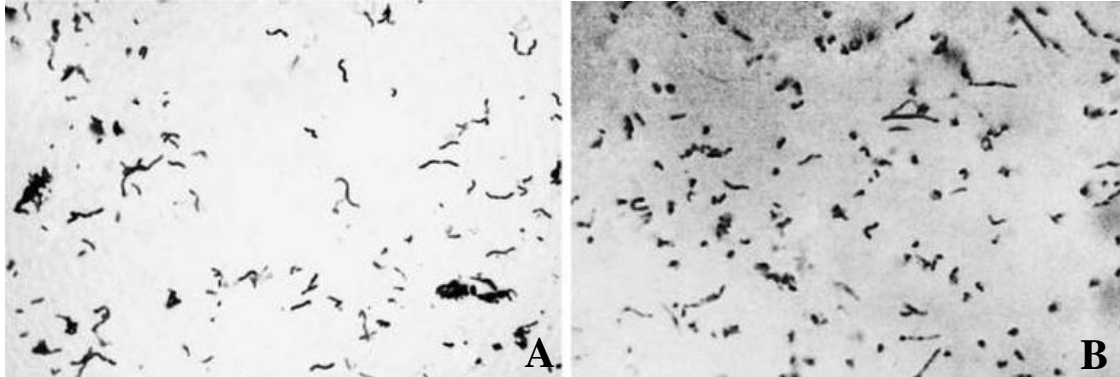


Fig. 1. Morfologías pertenecientes a *H. pylori*. **A:** cultivo puro observado con microscopio óptico, se puede observar la morfología de bacilo espiralado (100X). **B:** cultivo puro observado con microscopio óptico, se puede observar la morfología cocoide las cepas VBNC (100X). **Fuente:** Boyanova, L.; Mitov, I.; Vladimirov, B. 2011.

Macroscópicamente, sus colonias presentan un diámetro menor a 1mm y son redondeadas e incoloras. En el laboratorio, su crecimiento óptimo se da a una temperatura de 37°C con un periodo de incubación de tres a seis días (Alarcón, Barquero, Domingo, López y Royo, 2004).

Estructura del genoma

Actualmente se ha secuenciado el genoma de tres cepas de *H. pylori*: la cepa 26695, aislada de un paciente con gastritis; la cepa J99, aislada de un paciente con úlcera gastroduodenal y la cepa HPAG1, aislada a partir de un paciente con gastritis atrófica crónica (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006). Estas cepas poseen un cromosoma circular de 1667867 pb, 1643831 pb y 1596366 pb, respectivamente. La cepa HPAG1 contiene un plásmido con un tamaño de 9369 pb denominado pHPAG1.

El porcentaje de las secuencias codificantes de la cepa 26695, J99 y HPAG1 es cerca del 92%. De estas, 1379 marcos abiertos de lectura (ORFs por sus siglas en inglés) son comunes entre las tres especies y únicamente el 10% de los genes son específicos para cada cepa, 117 y 89 genes presentes en las cepas 26695 y J99 están ausentes en la cepa HPAG1; por el contrario, 43 de los genes pertenecientes a la cepa HPAG1 no se encontraron en las otras dos cepas (Oh *et al.*, 2006).

El número de genes de acuerdo a su funcionalidad han sido clasificados con base en lo que se indica en el cuadro 1. El análisis de estos resultados revela que las cepas de *H. pylori* poseen un potencial metabólico similar entre ellas.

Cuadro 1. Clasificación del número de genes de dos de las cepas de *H. pylori* secuenciadas. **Fuente:** IARC (s.f).

Categoría de los genes	Número de genes en la cepa:	
	<i>H. pylori</i> J99	<i>H. pylori</i> 26695
Clasificados funcionalmente	877	898
Biosíntesis de aminoácidos	44	44
Biosíntesis de cofactores	60	59
Envoltura celular	160	164
Procesos celulares	96	113
Replicación del ADN	23	23
Restricción y modificación al ADN	66	68
Metabolismo energético	104	104
Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos	28	29
Biosíntesis de purinas y pirimidinas	34	34
Funciones regulatorias	32	32
Transcripción	13	13
Transporte y proteínas de unión	88	87
Conservados sin función conocida	275	290
Específicos para <i>H. pylori</i>	343	364
Total	1495	1552

Dentro de los genes de *H. pylori* se puede mencionar el gen *glmM*, (anteriormente se llamado *ureC*), uno de los más estudiados, es un gen constitutivo que codifica para una fosfoglucosamin mutasa bacteriana (PNGM) que pertenece a la superfamilia alfa-D-fosfohexomutasa (UNIPROT CONSORTIUM, 2011).

Esta enzima es requerida para la interconversión de la glucosamina-6-fosfato a glucosamina-1-fosfato y participa directamente en la síntesis de la pared celular. Este gen, junto con el gen que codifica para el ADN_r16S, han sido utilizados para la detección molecular de la bacteria en distintos tipos de muestras (UNIPROT CONSORTIUM, 2011).

Patogenicidad

H. pylori presenta un conjunto de factores que permiten su desarrollo metabólico en el estómago de su huésped, logrando así asegurar su sobrevivencia en el mismo e induciendo una interacción parásita con las células gástricas. Estos factores se pueden clasificar en factores de colonización y factores de virulencia (Olaya, 2008).

Factores de colonización

La colonización por *H. pylori* involucra una interacción entre las proteínas de membrana externa y las células del epitelio gástrico del huésped. Asimismo, los lipopolisacáridos (LPS) tienen un rol de suma importancia en la interacción entre las bacterias Gram negativas y el huésped ya que son estimuladores del sistema inmune; sin embargo, los LPS de *H. pylori* poseen baja actividad estimuladora y su síntesis involucra solamente 20 genes dispersos a través del genoma, contrario a otras bacterias en las cuales se agrupan en un solo *cluster* (IARC, s.f.).

Además, la expresión de la fucosiltransferasa (una enzima esencial en la ruta metabólica para la biosíntesis del LPS) permite a *H. pylori* simular los antígenos de Lewis, lo cual le permite evadir la respuesta inmune del huésped y lograr así una colonización exitosa. Aunado a ello, dentro de las características más importantes que destaca en relación a otras bacterias, es la producción de la enzima ureasa, esta enzima le permite neutralizar el ácido clorhídrico del estómago mediante la conversión de urea gástrica en amonio, generando con ello un ambiente propicio para su crecimiento (Alarcón, Barquero, Domingo, López y Royo, 2004).

Factores de patogenicidad

Isla de Patogenicidad cag (cagPAI)

El factor de virulencia cagPAI es una región de 40 kb ubicada en el gen de la glutamato racemasa. Se estima que está presente en el 50% de las cepas de *H. pylori* de países occidentales y en más del 98% de las cepas provenientes del este asiático. Esta isla de patogenicidad contiene de 28 a 31 genes, siendo el último el gen *cagA*, mismo que ha sido ampliamente utilizado como marcador para la caracterización patógena de las cepas (Olaya, 2008).

Los genes presentes en la isla de patogenicidad, codifican un sistema de secreción tipo IV (SST4), conformado por las proteínas virB4, virB7, virB10, virB11, virD4. Este sistema de secreción permite que el producto del gen *cagA* (la proteína CagA) sea traslocado al interior de la célula epitelial, donde la proteína CagA es fosforilada a nivel de las tirosinas, lo que se asocia con desfosforilación de proteínas y cambios a nivel morfológico en las células epiteliales del huésped. Las cepas *cagA* positivas se asocian con gastritis atrófica severa y se estima que son de suma importancia en el desarrollo del cáncer gástrico (Azevedo *et al.*; 2007).

Citotoxina vacuolizante (VacA)

La citotoxina vacuolizante es una proteína codificada por el gen *vacA*. Esta proteína induce la formación de vacuolas en células eucarióticas y estimula a su vez, la apoptosis en células epiteliales. Hasta la fecha todos los aislamientos de *H. pylori* presentan en su genoma el gen *vacA*; sin embargo, la secreción de la proteína se liga con variaciones en la secuencia

señal de secreción (alelos *s1* y *s2*) cerca del extremo 5' del gen *vacA* y en la región media del gen (alelos *m1* y *m2*) (Olaya, 2008).

Las cepas que presentan en su secuencia el alelo *s1* producen citotoxinas funcionales, no así para el alelo *s2*. Las cepas con alelos *s1m1* son más citotóxicas que las cepas con la configuración alélica *s1m2* que se asocian con gastritis severas, atrofia, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.

Proteína Inductora del Factor de Necrosis Tumoral (Tip- α)

La proteína tip-alpha (Tip- α), es un factor carcinogénico de *H. pylori* que induce la alta expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de las quimiocinas pro-inflamatorias (IL-1 β y IL-8), aumenta la expresión del gen Bcl-2 que codifica una proteína que se sitúa en la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplasmático liso y la membrana nuclear, la cual está relacionada con la supresión de la apoptosis celular (Cheng, *et al.*, 2008).

Tip-alpha es una proteína única en la bacteria, que completa proyecciones inmunoproteómicas de *H. pylori*; es altamente inmunogénica por lo que está involucrada en la estimulación de macrófagos así como en la colonización de la mucosa gástrica en ratones (Godlewska *et al.* 2008).

Este factor carcinogénico de *H. pylori* al ser secretado al medio extracelular es capaz de entrar al núcleo de las células gástricas colonizadas mediante una molécula específica de unión. El homodímero de Tip- α tiene un peso de 38 kDa y sus subunidades se unen mediante puentes disulfuro; región importante ya que *in vitro* muestra la capacidad de unirse a ADN de simple y doble banda (Suganuma *et al.*, 2005).

Epidemiología de la infección

La prevalencia mundial de la infección por *H. pylori* es aproximadamente del 50%, con variaciones sustanciales entre países. La misma difiere entre países debido a razones de edad, raza y condiciones socioeconómicas. El porcentaje de prevalencia es mayor en países en vías de desarrollo que en países desarrollados; sin embargo, en el este de Europa los índices de infección por la bacteria son elevados (IARC, s.f.).

A nivel mundial se estima que cerca de 650 000 casos de cáncer gástrico se deben a la infección con *H. pylori*. Sin embargo, en Costa Rica según datos del Manual de Normas para el Tratamiento de Cáncer en Costa Rica (2014), la incidencia anual de cáncer gástrico es aproximadamente sesenta casos por cien mil habitantes, con una relación hombre:mujer de 2:1, a pesar de que la incidencia ha disminuido en las últimas dos décadas, continúa siendo un problema importante de salud pública.

Transmisión de H. pylori

Según la IARC (s.f.) se han establecido cuatro posibles rutas para la transmisión de la bacteria, siendo éstas:

- **Persona-persona:** los seres humanos son los principales reservorios de *H. pylori*, es por esto que el contacto entre personas ha sido considerado como la primera ruta de transmisión.
- **Oral-oral:** contacto con saliva de personas infectadas.
- **Fecal-oral:** mediante malos hábitos de higiene.
- **Agua de consumo:** se ha demostrado la presencia de *H. pylori* en agua para consumo humano, situación que podría favorecer la colonización por parte de la bacteria en el cuerpo humano.

Detección de H. pylori mediante PCR en tiempo Real

La técnica de PCR en tiempo real es una variante de la técnica convencional que combina la amplificación y detección de los productos de PCR en un mismo paso, porque correlaciona el producto de la reacción en cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia que es captada y cuantificada por un equipo de termociclado especial (Brechtbuehl, Whalley, Dusheiko, Saunders; 2001).

Esta técnica difiere de la convencional en varios aspectos; sin embargo, el más importante es que se debe de contar con un fluoróforo dentro de la reacción, el cual permita detectar en cada ciclo el aumento de la fluorescencia. Estos fluoróforos se pueden clasificar en moléculas intercalantes de unión no específica al ADN y moléculas fluorescentes específicas para secuencias también dentro de las que se citan las sondas de hidrólisis (Green, Sambrook; 2012).

Las sondas de hidrólisis o sondas 5' nucleasas se basan en la actividad 5' exonucleasa de la enzima ADN polimerasa. Son oligonucleótidos específicos para una secuencia de un determinado gen, marcados con un reportero en el extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3'. El tamaño de la sonda en pares de bases es la distancia que se encuentra entre los dos fluoróforos (Green, Sambrook; 2012).

Una vez que se han alineado los *primers* a la secuencia, la sonda se hibrida y, en el ciclo de extensión, la polimerasa hidroliza la sonda, provocando la separación del reportero y el *quencher* generando así un incremento en la fluorescencia que es proporcional al incremento del producto de PCR. Este tipo de sonda son comúnmente conocidas como sondas Taqman® (Roche Diagnostics) y las sondas ZEN™ doubled-quencher de la empresa Integrated DNA Technologies, que al poseer dos *quenchers*, reduce la distancia entre éstos y la molécula reportera, generando una disminución en el *background* en las curvas de amplificación. (IDT, 2012).

Parámetros de diseño de un ensayo de PCR en tiempo real

Para llevar a cabo esta técnica se debe de cumplir con los siguientes parámetros de diseño según Green & Sambrook (2012):

- ✓ El tamaño del producto de PCR debe de estar en un rango de 50-150 pb debido a que, amplicones de menor tamaño, generan mayor eficiencia en la reacción.
- ✓ Analizar la pareja de oligonucleótidos y la sonda diseñados mediante el BLASTn del *National Center for Biotechnology Information* para verificar la homología e identidad del gen que se desea amplificar.
- ✓ El contenido de guanina y citosina (GC) de cada *primer* debe de estar entre 40-60%.
- ✓ Evitar la formación de estructuras secundarias entre oligonucleótidos.
- ✓ Cada primer debe de tener no más de tres nucleótidos de guanina o citosina en las últimas 5 bases del extremo 3' ya que puede generar la formación de productos inespecíficos y su tamaño debe de estar en un rango de 18-30 pb.
- ✓ En lo casos donde se utilicen sondas de hidrólisis, la temperatura de alineamiento de la sonda debe de ser mayor a la de los *primers* (idealmente 10°C mayor) y en éstas, el extremo 5' de la sonda debe de estar lo más cercano posible al extremo 3', además se debe purificar mediante HPLC. El tamaño óptimo de la sonda debe de ser de 20 pb, sin embargo se aceptan sondas cuyo tamaño sea menor a 30 pb.

Análisis de la técnica de PCR en tiempo real

Contrario a la PCR convencional donde el análisis se realiza al final de la reacción, la qPCR capta la fluorescencia en cada ciclo, generando curvas de amplificación mediante un software que posee el termociclador. Estas curvas de amplificación están compuestas por cuatro regiones: la de fluorescencia base (*baseline* o *background*), la región exponencial o logarítmica, la fase linear y la de finalización o plateau (figura 2) (Fonseca, Arbeláez, Contreras, 2010).

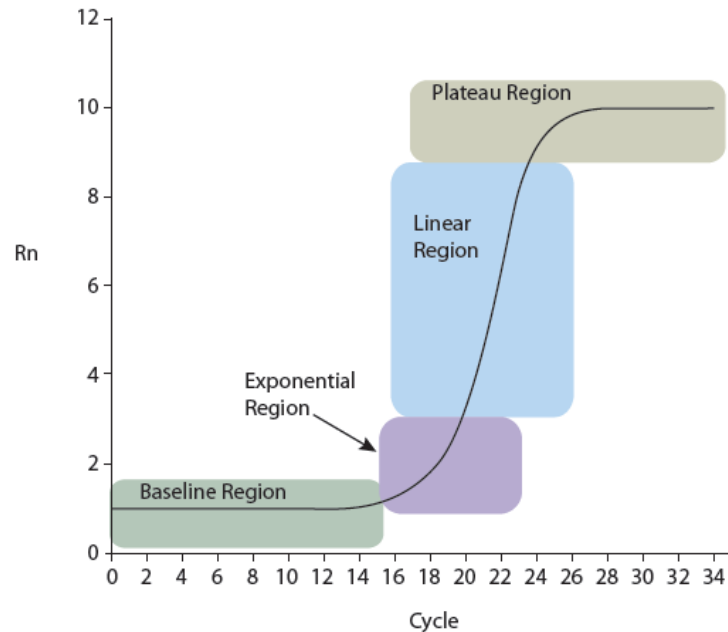


Fig. 2. Gráfico de amplificación de una reacción de PCR en tiempo real (Integrated DNA Technologies, 2012).

Durante el *background*, la fluorescencia generada corresponde a la fluorescencia base de la molécula reportera. Seguidamente, la región exponencial de la curva los reactivos presentes en la reacción se encuentran en abundancia, por lo tanto espera que la amplificación presente una eficiencia cercana al 100%. En esta fase el comportamiento es de 2^n , lo cual significa que a partir de cada molécula del ADN presente, se van a generar dos productos de PCR y así sucesivamente en cada ciclo. En la fase lineal, los reactivos se vuelven limitantes y finalmente, en la fase plateau se detiene la amplificación (Bio-Rad Laboratories, s.f.).

Al inicio de la fase logarítmica, se ubica un ciclo en el cual la fluorescencia deja de ser fluorescencia basal y se convierte en una fluorescencia mayor, este ciclo es conocido como *Cycle threshold* (Ct) o *Crossing point* (Cp), éste último en el caso de los equipos LightCycler® de Roche Diagnostics GmbH. Este valor es directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN de interés presente en una muestra. Por lo tanto, en muestras que poseen concentraciones elevadas del gen de interés se presentarán los Ct o Cp menores, al contrario con aquellas que posean bajas concentraciones, en las cuales se requiere un mayor número de ciclos para alcanzar una fluorescencia detectable (Roche Diagnostics GmbH, 2008; Green, Sambrook; 2012).

Según Aguilera, Ruiz, Rocha, Pineda y Chánez (2014) el valor de Ct o Cp está directamente relacionado con el equipo que se está utilizando ya que variables como los filtros del equipo y el tiempo de vida de la lámpara que posee, pueden afectar los resultados

de este valor, por lo que no es posible realizar comparaciones de Ct o Cp entre experimentos y equipos.

Elaboración de la curva estándar

En ensayos de PCR en tiempo real, la elaboración de una curva estándar es un paso crítico para la optimización de la reacción, ya que de ella se extraen los datos de eficiencia de la reacción, reproducibilidad o el error y la pendiente o cinética de la reacción. Para elaborar una curva estándar se deben de realizar como mínimo de seis a cinco diluciones 1:10 del ácido nucleico (AN) de partida (ADN genómico, ADNc, plásmidos linearizados, entre otros), se deben analizar en una misma corrida las diluciones por réplicas (se recomienda un mínimo de tres) y al menos una reducción de 5 logaritmos en la concentración del AN. Esto es requerido para lograr una cuantificación más exacta y con el fin de determinar la eficiencia de la reacción (Green, Sambrook; 2012).

La curva estándar se construye graficando el logaritmo de la concentración inicial de AN de partida contra los valores de Ct o Cp obtenidos durante cada ciclo de amplificación. La mayoría de software de los equipos existentes genera una regresión lineal con un valor de R^2 el cual es utilizado para evaluar la optimización de la reacción de PCR (Bio-Rad Laboratories, s.f.).

Eficiencia y pendiente (slope) de la reacción

La eficiencia es un valor que indica qué tan capaz es la reacción de doblar la cantidad de producto de PCR en cada ciclo. Este dato está influenciado por el diseño de los *primers*, la calidad del ADN de partida, las condiciones de reacción, entre otras variables y se relaciona directamente con la pendiente obtenida al momento de realizar una curva estándar (Green, Sambrook; 2012).

Roche Diagnostics GmbH (2008), en el manual del equipo LightCycler® 480 II, indica que matemática y teóricamente, la amplificación ideal tiene una eficiencia (E)=2 y puede ser definida en la fase logarítmica-lineal de la amplificación mediante la siguiente ecuación:

$$T_n = T_0 \times 2^n \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde “ T_n ” es la cantidad de moléculas de interés en “n” ciclos, “ T_0 ” es la cantidad inicial de moléculas diana y “n” es el número de ciclos de amplificación. De esta forma, el software de los equipos calcula el valor de la eficiencia que es tomado como referencia para optimizar las reacciones de PCR en tiempo real.

Sin embargo, en la práctica, los ensayos se ven influenciados por diferentes factores que alejan la eficiencia de su valor ideal; por lo tanto, cuando el software realiza los cálculos para determinar la eficiencia real, utiliza la ecuación 2.

$$T_n = T_0 \times E^n \quad (\text{Ecuación 2})$$

En este caso “E” es la eficiencia de la amplificación. Según las especificaciones técnicas de la casa comercial Bio-Rad Laboratories, el rango de aceptación para la eficiencia en una reacción de PCR en tiempo real va de 90% al 105%, lo cual es equivalente a 1,90 y 2,05 (utilizando la ecuación 4), pero se recomienda utilizar aquellos parámetros cuya combinación genere una eficiencia lo más cercana al 100%. Valores por debajo del 90% pueden ser generados por un mal diseño de los *primers* y/o sondas, además de inadecuadas condiciones de reacción y valores mayores al 100% reflejan errores en el pipeteo y/o presencia de inhibidores de reacción (Bio-Rad Laboratories, s.f.; Roche Diagnostics GmbH, 2008).

Por otro lado, el valor de la pendiente es el que describe la cinética de la amplificación en la reacción. En otras palabras, indica qué tan rápido (en número de ciclos) se espera que incremente la cantidad de ADN diana en cada ciclo de amplificación. La ecuación que se utiliza para determinar la pendiente de la curva estándar se muestra en la ecuación 3 (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

$$E = 10^{\frac{-1}{slope}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Si la eficiencia fuera 2, la cantidad de producto de PCR doblaría su cantidad con cada ciclo y por lo tanto, teóricamente el valor de la pendiente sería de -3,32. No obstante, al estar relacionado con la eficiencia, cambios en los valores de alguna de las dos variables, afecta los resultados.

Otra ecuación útil es la que se utiliza para convertir el valor de E a porcentaje (ecuación 4) porque la manera en que los equipos expresan la eficiencia varía. Es importante mencionar que para efectos del presente documento, la eficiencia se expresará en el rango de 1-2 no en porcentaje, debido a que el LC480II genera los resultados empleando dicha escala.

$$\%E = (E - 1) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Valor de R²

El valor del R² es otro parámetro de suma importancia para evaluar una reacción, es una medida de qué tanto los datos experimentales se ajustan a la línea de regresión. Si no existe dispersión entre los datos, el valor de R² será igual a 1, pero en la práctica un R² mayor a 0,98 es aceptable para efectos de PCR en tiempo real (Green, Sambrook; 2012).

En lo que respecta a la técnica de PCR tiempo real empleada en muestras ambientales, Pérez *et al.*, (2010) analizaron la presencia y la concentración de *H. pylori* en aislamientos de suelo en Barcelona, España; para esto realizaron la extracción del ADN genómico presente en el suelo y lo amplificaron utilizando el kit Quantitect probe PCR (Qiagen, Hilden, Germany); para la cuantificación realizaron suspensiones celulares de *H. pylori* con una absorbancia de 0,2 a 600nm, extrajeron el ADN de dicha suspensión y efectuaron cinco diluciones seriadas del ADN para la elaboración de la curva estándar utilizando el equipo

LightCycler 1,5 (Roche, Mannheim, Alemania). Obtuvieron una eficiencia de 2,008 y un límite de cuantificación de 100células/gramo de suelo.

Por otra parte Yañez, Barberá, Soria y Catalán (2009), cuantificaron *H. pylori* en muestras de agua residual, ríos y agua de consumo humano utilizando como referencia el gen *cagE* perteneciente a la isla de patogenicidad *cagPAI*. Este gen, se ubica cerca de la región promotora del gen *cagA* y ambos han sido considerados como importantes marcadores de virulencia en las cepas. Para lograr la cuantificación utilizaron una sonda de hidrólisis marcada con FAM y TAMRA, y obtuvieron como resultado una eficiencia de 2,07; un R^2 de 0,9598.

En cuanto a muestras clínicas, en pacientes dispépticos, Ramírez-Lázaro *et al.*, (2011) utilizaron como referencia el gen *ureA* empleando sonda tipo Taqman® marcada con FAM y TAMRA. En este caso, muestras que por otros métodos de detección se reportaron como negativas para *H. pylori*, empleando la técnica de PCR en tiempo real, mostraron un resultado positivo en 2/3 de las muestras que los autores procesaron.

Metodología

Para la adecuada optimización de la técnica se estandarizó la temperatura de alineamiento, la concentración de *primers* y la concentración de sonda mediante el análisis de diferentes curvas estándar para determinar con ello, las mejores condiciones de reacción que permitan detectar y cuantificar el gen *glmM* de *H. pylori* utilizando el equipo LightCycler® 480 II (LC480II) de la casa comercial Roche Diagnostics GmbH, empleando la versión del software # LCS480 1.5.0.39. Además, para el cálculo del R^2 se empleó el programa Microsoft Excel 2010, graficando el logaritmo de la concentración vs el C_p obtenido por cada una de las muestras (los resultados generados por Excel se muestran en los anexos 6-14).

Preparación del ADN genómico de *H. pylori* para la elaboración de las curvas estándar.

Se utilizó ADN genómico de la cepa *H. pylori* ATCC 51932 en una concentración inicial de 215,1 ng/ μ L y con una relación de absorbancia de A_{260}/A_{280} de 1,9 cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, USA). La extracción del ADN se realizó previamente con el kit QIAmp® DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las especificaciones de la casa fabricante.

Una vez cuantificado, se procedió a realizar los cálculos para determinar la cantidad de copias de genoma de *H. pylori* equivalentes a 215,1 ng/ μ L. Para esto, se utilizó la relación de que una bacteria corresponde a 1,815 fg de ADN, que el tamaño del genoma de *H. pylori* es de 1655849 pb y que además existe una única copia del gen *glmM* por bacteria (Lascols *et al.*, 2003; Olaya, 2008; He, Wang, Osato y Lachman, 2002). La cantidad de copias de

genoma calculadas por reacción se muestran en el cuadro 1. Una vez obtenido el cálculo teórico, se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10 hasta 10^{-8} . De estas diluciones, se escogieron las últimas seis para la elaboración de las curvas estándar respectivas.

Cuadro 2. Concentración teórica de *H. pylori* en cada una de las diluciones realizadas para la elaboración de las curvas estándar.

Dilución	Cantidad de copias/2,5µL
10^{-1}	$3,00 \times 10^7$
10^{-2}	$3,00 \times 10^6$
10^{-3}	$3,00 \times 10^5$
10^{-4}	$3,00 \times 10^4$
10^{-5}	$3,00 \times 10^3$
10^{-6}	$3,00 \times 10^2$
10^{-7}	$3,00 \times 10^1$
10^{-8}	$3,00 \times 10^0$

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB.

Optimización de la temperatura de alineamiento para los *primers*.

Para establecer la mejor temperatura de alineamiento de los *primers* se evaluaron las temperaturas de 52°C, 54°C y 56°C.

Para cada una de las reacciones se emplearon 7,5 µL de una master mix que contenía 5 µL de LightCycler® 480 Probes Master (2X) (Roche Diagnostics GmbH,); 1,5 µL de agua para PCR LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH,); 1 µM de *primers* glmMFw y glmMRv (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) (cuadro 2). Para la emisión de fluorescencia se utilizó 1 µM de una sonda de hidrólisis tipo ZEN™ doubled-quencher (Integrated DNA Technologies,), purificada mediante HPLC y marcada con fluoresceína (FAM) y dos *quenchers*: Iowa BlackFQ y ZEN (cuadro 3).

A cada una de las reacciones se le agregaron 2,5 µL de la dilución de ADN correspondiente, para un volumen final de reacción de 10 µL. Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas de 96 pozos blancas específicas para el equipo. Adicionalmente, en cada curva estándar se montó por duplicado un control negativo con 2,5 µL de ADN de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27856.

Cuadro 3. Propiedades de la sonda y los primers utilizados para la optimización de las condiciones de reacción para la detección del gen *glmM* de *H. pylori*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Tm teórica (°C)	%GC	Producto PCR (pb)
glmM Forward (glmMFw)	CAACCAATTAAGCCAGGAAGTG	22	54,3	45,5	112
glmM Reverse (glmMRv)	CCCATGCACGATATCCCTA	21	54,5	47,6	
glmM Probe (glmMPb)	56- FAM/CCGCGCAGA/ZEN/TTTAGGCTTTGCTTT/3IABkFQ	24	60,7	50	

Fuente: *PrimerQuest*, IDT, 2014.

Una vez preparada la placa, se procedió a llevar a cabo la PCR previamente programada en el equipo bajo las condiciones de reacción recomendadas por la casa fabricante para la LightCycler® 480 Probes Master (cuadro 4).

Cuadro 4. Perfil térmico utilizado para la estandarización de la temperatura de alineamiento de los primers para la detección del gen *glmM* de *H. pylori*.

Programación			
Formato de detección	Tipo de bloque	Volumen de reacción	
Sonda de hidrólisis Mono-Color (FAM 465-510)	96	10 µL	
Programas			
Nombre del programa	Ciclos	Modo de análisis	
Preincubación	1	Ninguno	
Amplificación	60	Cuantificación	
Enfriamiento	1	Ninguno	
Temperaturas			
Temperatura (°C)	Modo de adquisición	Tiempo (hh:mm:ss)	Velocidad de enfriamiento (°C/s)
Preincubación			
95	Ninguno	00:05:00	4,40
Amplificación			
95	Ninguno	00:00:10	4,40
52/54/56	Ninguno	00:00:20	2,20
72	Simple	00:00:01	4,40
Enfriamiento			
40	Ninguno	00:00:10	2,20

Fuente: Roche Diagnostics, GmbH.

Una vez concluido el programa, para el análisis de los resultados, se utilizó el método de Cuantificación Absoluta por Segunda Derivada Máxima.

Para verificar la formación de los productos de PCR, los amplicones de las tres temperaturas se corrieron en un gel de agarosa al 4%(m/v) durante 1:30 h a 80 V, el gel se tiñó con GelRed (PHENIX Research Products, USA) y se visualizó en transiluminador EM 0079 (Major Science, Saratoga, USA).

Optimización de la concentración de primers

Para la optimización de la concentración de *primers*, se evaluaron las concentraciones de 1 µM, 0,25 µM y 500 nM por reacción con una concentración estándar de sonda de hidrólisis de 0,25 µM, en los tres casos. Para las reacciones se emplearon 7,5 µL de una master mix que contenía 5 µL de LightCycler® 480 Probes Master (2X) (Roche Diagnostics GmbH), *primer glmMFw* y *primer glmMRv* en la concentración evaluada, 250 nM de la sonda de

hidrólisis glmMPb y 1,5 μL de agua para PCR LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH).

Se le agregaron 2,5 μL de la dilución de ADN correspondiente, para un volumen final de reacción de 10 μL . Cada reacción se realizó por duplicado bajo el programa de termociclado recomendado por Roche Diagnostics GmbH para LightCycler® 480 Probes Master (cuadro 3), se utilizó como temperatura de alineamiento 52°C para todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos, como control negativo se empleó 2,5 μL de ADN de *P. aeruginosa* ATCC 27856.

Tras concluida la reacción, los resultados se analizaron mediante la Cuantificación Absoluta por Segunda Derivada Máxima.

Optimización de la concentración de sonda

Debido a que previamente se había evaluado la reacción con una concentración de sonda glmMPb de 1 μM y de 0,25 μM a una temperatura de 52°C, se procedió a realizar una única curva estándar con una concentración de 0,1 μM de sonda para evaluar la eficiencia de la reacción utilizando concentraciones más bajas de sonda. De esta forma, se preparó una master mix con 5 μL de LightCycler® 480 Probes Master (2X) (Roche Diagnostics GmbH), 1 μM de primer glmMFw y 1 μM de primer glmMRv, 0,1 μM de la sonda de hidrólisis glmMPb y 1,5 μL de agua para PCR LightCycler® 480 Probes (Roche Diagnostics GmbH).

Se agregaron por pozo 2,5 μL de cada una de las diluciones de ADN de *H. pylori* ATCC 51932 correspondientes, para un volumen final de reacción de 10 μL ; asimismo se corrió un control negativo con ADN de *P. aeruginosa* ATCC 27856. Cada reacción se realizó por duplicado bajo el programa de termociclado recomendado por la casa fabricante para LightCycler® 480 Probes Master (cuadro 3) y utilizando como temperatura de alineamiento 52°C en todos los casos. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pozos.

Las curvas de amplificación obtenidas se analizaron por el método de Cuantificación por Segunda Derivada Máxima.

Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la estandarización de la temperatura de alineamiento de los primers glmMRv y glmMFw para la detección y cuantificación de *H. pylori*.

Optimización de la temperatura de alineamiento para los primers.

Se observaron las curvas de amplificación correspondientes al gen *glmM* de *H. pylori* en cada una de las diluciones de las tres temperaturas evaluadas, no así para el control negativo cuya fluorescencia se mantuvo constante durante los 60 ciclos del PCR (figuras 3, 4 y 5). En cada uno de las figuras se destaca el valor de fluorescencia máximo (ΔRnm) obtenido por cada temperatura.

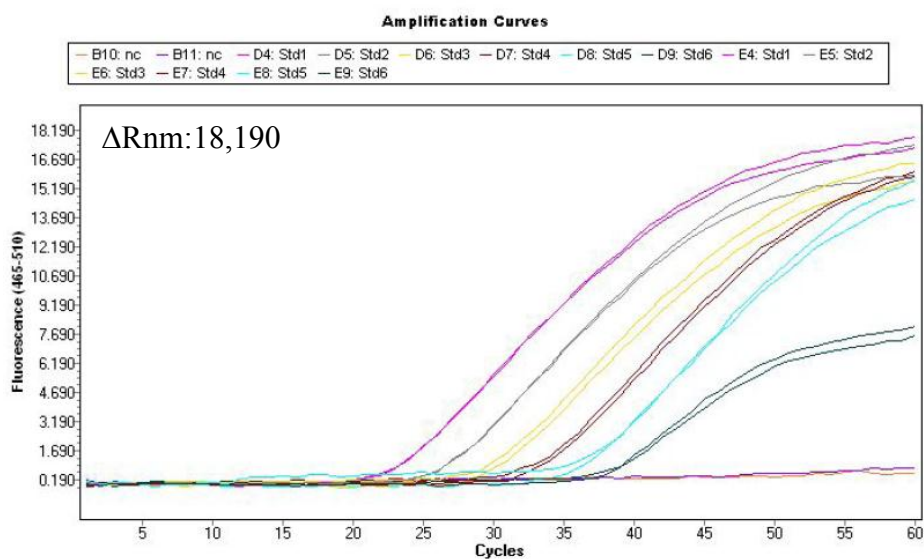


Fig. 3. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la temperatura de 52°C para el alineamiento de los primers glmMFw y glmMRv. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color rosado: Estándar 1. . Curva color gris: Estándar 2. Curva color amarillo: Estándar 3. Curva color vino: Estándar 4. Curva color turquesa: Estándar 5. Curva color verde: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Por otra parte, en la figura 4 se pueden observar las curvas de amplificación correspondientes a la temperatura de alineamiento de 54°C, en la misma se presenta el valor del ΔRnm máximo obtenido.

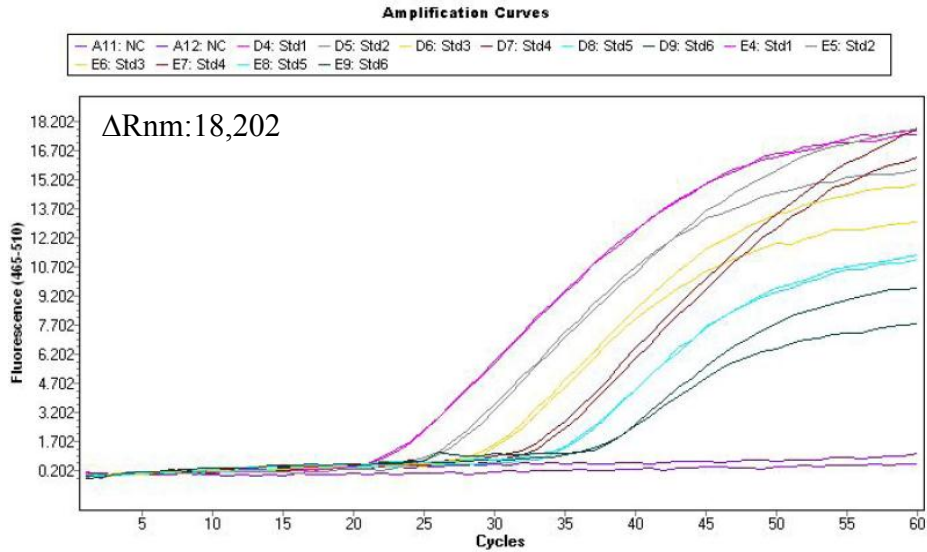


Fig. 4. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la temperatura de 54°C para el alineamiento de los primers glmMFw y glmMRv. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color rosado: Estándar 1. Curva color gris: Estándar 2. Curva color amarillo: Estándar 3. Curva color vino: Estándar 4. Curva color turquesa: Estándar 5. Curva color verde: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

De la misma manera que los gráficos anteriores, en la figura 5 se presentan los resultados obtenidos tras la amplificación del gen *glmM* con una temperatura de 56°C.

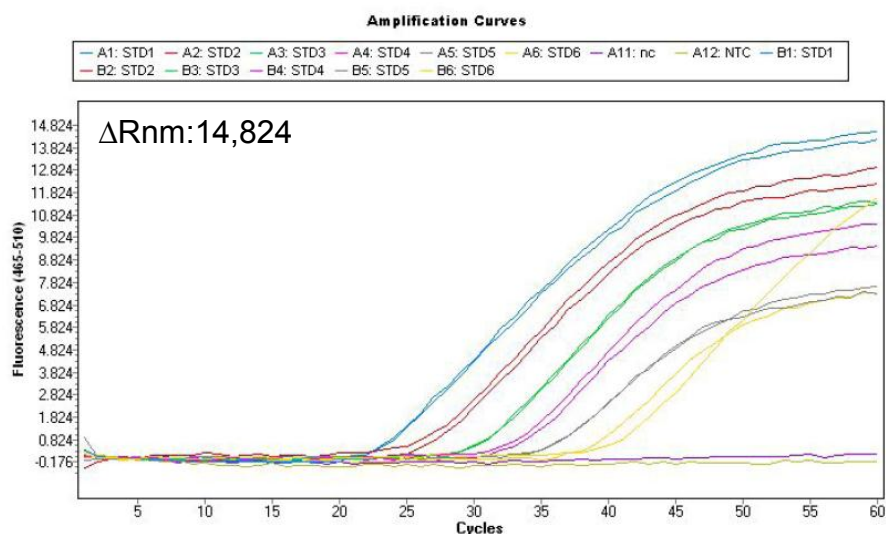


Fig. 5. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la temperatura de 56°C para el alineamiento de los primers *glmMFW* y *glmMRv*. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color celeste: Estándar 1. Curva color rojo: Estándar 2. Curva color verde: Estándar 3. Curva color morado: Estándar 4. Curva color gris: Estándar 5. Curva color amarillo: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Luego de realizar el análisis de Cuantificación Absoluta por Segunda Derivada Máxima para obtener la curva estándar de cada una de las temperaturas evaluadas, se obtuvieron los valores de error, R^2 , eficiencia, pendiente, intersección con el eje Y que se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Datos obtenidos de la curva estándar para la optimización de la temperatura de alineamiento de los primers *glmMRv* y *glmMFW*.

Variable ¹	Temperatura (°C)		
	52	54	56
Error	0,00944	0,00650	0,135
Eficiencia	1,963	1,949	1,841
Pendiente	-3,415	-3,450	-3,772
R^2	0,9914	0,9931	0,9875
Intersección con el eje Y	43,66	44,22	44,37

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

¹El gráfico obtenido para cada una de las curvas estándar se muestra en el anexo 1.

Por otra parte, los valores de Cp y el número de copias del gen *glmM* en cada una de las diluciones se calculó utilizando la curva estándar correspondiente a cada temperatura, los valores calculados por el equipo se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de Cp y concentración calculados por el software el LightCycler® 480 II para cada una de las temperaturas evaluadas.

Nombre	Valores								
	Concentración teórica			Concentración calculada			Cp		
	52°C	54°C	56°C	52°C	54°C	56°C	52°C	54°C	56°C
Estándar 1	3,00x10 ⁵			2,96x10 ⁵	2,72x10 ⁵	2,79x10 ⁵	22,84	22,68	22,85
Estándar 1	3,00x10 ⁵			2,72x10 ⁵	3,44x10 ⁵	3,23x10 ⁵	22,96	22,33	22,62
Estándar 2	3,00x10 ⁴			3,16x10 ⁴	3,19x10 ⁴	3,19x10 ⁴	26,15	25,89	26,41
Estándar 2	3,00x10 ⁴			2,85x10 ⁴	2,61x10 ⁴	2,82x10 ⁴	26,31	26,20	26,61
Estándar 3	3,00x10 ³			3,41x10 ³	3,33x10 ³	2,85x10 ³	29,46	29,29	30,17
Estándar 3	3,00x10 ³			3,20x10 ³	2,81x10 ³	2,64x10 ³	29,55	29,54	30,28
Estándar 4	3,00x10 ²			2,76x10 ²	2,27x10 ²	2,45x10 ²	33,19	32,87	33,64
Estándar 4	3,00x10 ²			3,42x10 ²	1,98x10 ²	4,15x10 ²	32,87	33,04	32,92
Estándar 5	3,00x10 ¹			3,93x10 ¹	4,26x10 ¹	5,68x10 ¹	36,08	34,76	35,58
Estándar 5	3,00x10 ¹			1,80x10 ¹	3,65x10 ¹	5,20x10 ¹	37,07	34,92	35,70
Estándar 6	3,00x10 ⁰			1,92x10 ⁰	2,21x10 ⁰	6,13x10 ⁰	38,36	37,69	38,38
Estándar 6	3,00x10 ⁰			4,51x10 ⁰	3,62x10 ⁰	7,88x10 ⁰	37,97	37,23	40,82
Control negativo	N/A			N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Control negativo	N/A			N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Además, los productos de PCR de cada uno de los seis estándares de las temperaturas evaluadas se verificaron en un gel de agarosa, se obtuvo el producto de PCR esperado de 112 pb aproximadamente en cada una de las temperaturas; sin embargo, en la temperatura de 54°C y 56°C se observó la formación de productos inespecíficos de mayor y menor peso molecular al esperado (figura 6).

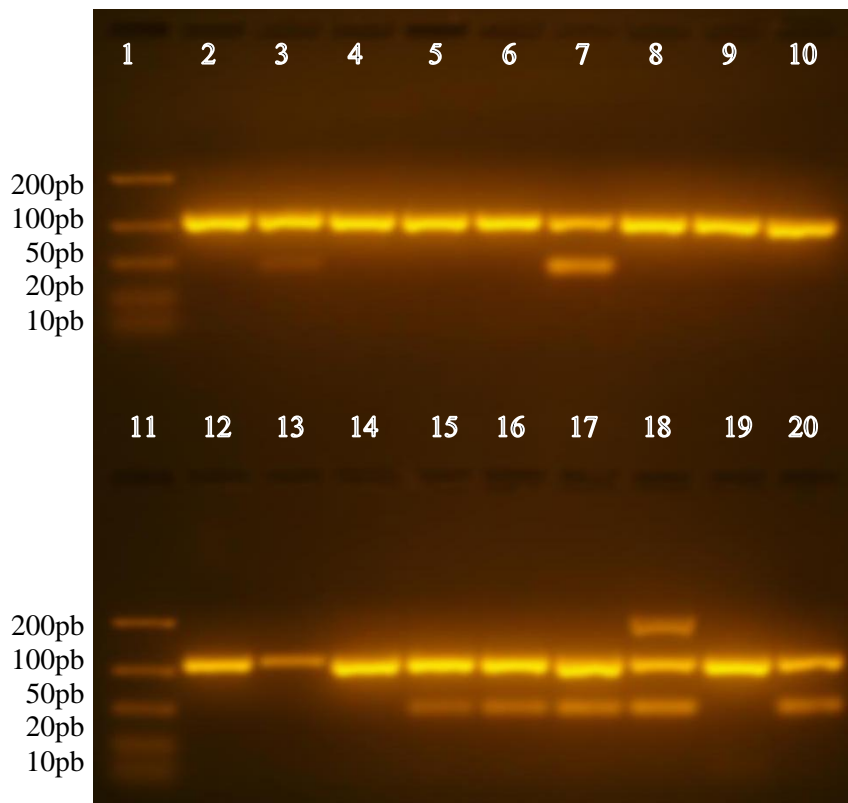


Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR correspondientes a los estándares de las tres temperaturas evaluadas. Pozos 1 y 11: marcador de peso molecular FastRuler Ultra Low Range (Fermentas). Pozos del 2 al 7: 54°C, pozo 2: Estándar 1, pozo 3: Estándar 2. Pozo 4: Estándar 3. Pozo 5: Estándar 4. Pozo 6: Estándar 5. Pozo 7: Estándar 6. Pozos del 8 al 14: 52°C, pozo 8: Estándar 1, pozo 9: Estándar 2. Pozo 10: Estándar 3. Pozo 12: Estándar 4. Pozo 13: Estándar 5. Pozo 14: Estándar 6. Pozos del 15 al 20: 56°C, pozo 15: Estándar 1, pozo 16: Estándar 2. Pozo 17: Estándar 3. Pozo 18: Estándar 4. Pozo 19: Estándar 5. Pozo 20: Estándar 6. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Al analizar los datos de ΔR_{nm} de las curvas de amplificación cada una de las temperaturas evaluadas, se puede observar una disminución en la fluorescencia máxima de las curvas correspondientes a 56°C en comparación con 52°C y 54°C, esto debido a que como ampliamente se menciona en la literatura, las sondas de hidrólisis deben de tener una T_m mayor en 8-10°C a la T_m de los *primers* para que la reacción sea más eficiente (Green, Sambrook; 2012).

Además, como se puede observar en la figura 5, con una temperatura de 56°C se promueve la formación de productos inespecíficos en la reacción, en este caso, los *primers* pueden formar dímeros entre sí, limitando los reactivos en la reacción lo cual podría estar relacionado con la disminución de la fluorescencia detectada por el equipo, ya que si hay menos *primers* disponibles para unirse al ADN, la sonda se hidroliza en menor cantidad (Green, Sambrook; 2012).

Por otra parte, analizando los valores de las curvas estándar obtenidos para la temperatura de alineamiento (cuadro 5) y según los parámetros de aceptación del LC480II los valores del error de las tres temperaturas evaluadas son menores al límite máximo reportado para el equipo que es de 0,2, lo cual significa que en cada una de las curvas estándar, los datos se ajustan de manera precisa a la línea de regresión; de igual forma, el valor de R^2 calculado es mayor a 0,98 por lo tanto las tres temperaturas evaluadas caen en el rango de aceptación de la técnica para esta variable (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

Aunado a lo anterior, si se observan los datos de eficiencia, la temperatura de alineamiento que presentó una mejor eficiencia fue 52°C, seguido de 54°C y por último 56°C. Brankatschk, Bodenhausen, Zeyer & Burgman (2012) reportan resultados similares analizando comunidades bacterianas, en las cuales obtuvieron valores de eficiencia de 1,72; 1,77; 1,85 y 1,95 para los diferentes microorganismos en estudio.

Es importante mencionar que los valores de eficiencia obtenidos para la temperatura de alineamiento de los *primers* glmMRv y glmMFw para 52°C y de 54°C se encuentran dentro del rango de aceptación según los parámetros establecidos para la técnica, los cuales indican que una reacción de PCR es aceptable si su eficiencia se encuentra entre el 1,90 y el 2,05 (Bio-Rad Laboratories, s.f.). Sin embargo, la mejor eficiencia y la más cercana al 2 es la temperatura de 52°C.

Sumado a lo anterior, Loddenkotter, Becker, Hohoff y Brinkmann, (2005) utilizaron el gen *glmM* como referencia para un ensayo de PCR en tiempo real y obtuvieron una eficiencia de 1,98 con una pendiente de -3.37, utilizando el fluoróforo de unión no específica SYBR Green I. Si bien se diferencia de los resultados expuestos en este trabajo, ejemplifica que, aunque se trabaje con la detección de un mismo gen, cambios en el diseño del ensayo como por ejemplo los *primers*, el ADN molde, y el tipo de sonda, pueden afectar la eficiencia de una reacción de PCR.

En cuanto a la capacidad de detección del ADN por parte de cada una de las temperaturas en estudio, en el cuadro 6 se puede observar que efectivamente se cuantificó el ADN en el rango esperado en las temperaturas evaluadas y que además, no hubo diferencias notables en los valores de C_p de cada una de las muestras.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para determinar la concentración óptima de *primers* para la detección de *H. pylori*.

Optimización de la concentración de *primers*

Se observaron curvas de amplificación del gen *glmM* de *H. pylori* en cada una de las diluciones utilizadas para la concentración de 1µM tal y como se observa en la figura 7.

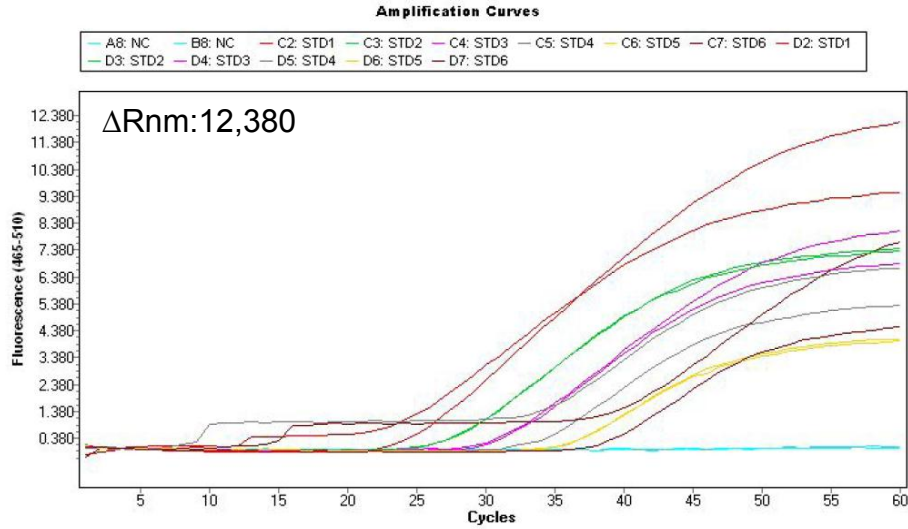


Fig. 7. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la concentración de $1\mu\text{M}$ de primers glmMFW y glmMRv en la reacción. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color rojo: Estándar 1. Curva color verde: Estándar 2. Curva color morado: Estándar 3. Curva color gris: Estándar 4. Curva color amarillo: Estándar 5. Curva color vino: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Del mismo modo, en la figura 8 se muestran las curvas de amplificación obtenidas para la estandarización de la concentración de $0,5\mu\text{M}$ de primers glmMFW y glmMRv en la reacción

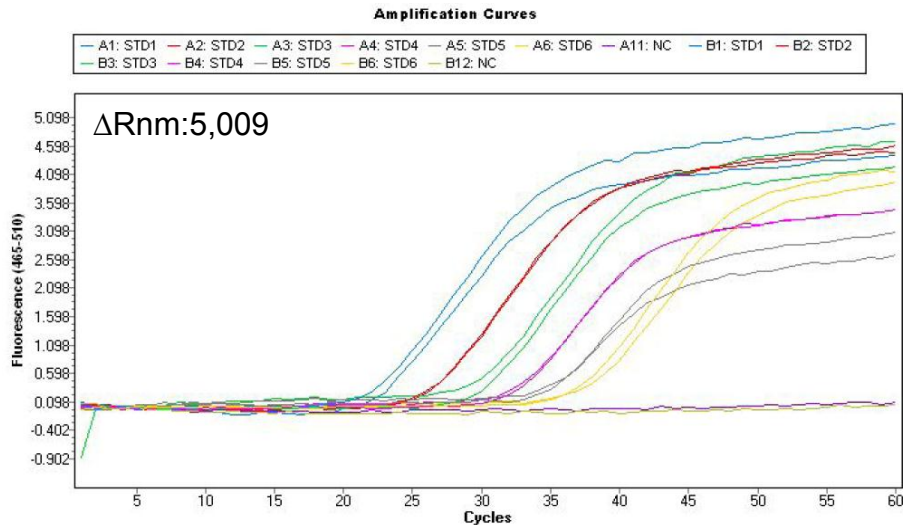


Fig. 8. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la concentración de $0,5\mu\text{M}$ de primers glmMFW y glmMRv en la reacción. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color celeste: Estándar 1. Curva color rojo: Estándar 2. Curva color verde: Estándar 3. Curva color morado:

Estándar 4. Curva color gris: Estándar 5. Curva color amarillo: Estándar 6. Línea sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Para la concentración de *primers* de 0,25 μM , se obtuvieron las curvas de amplificación que se muestran en la figura 9.

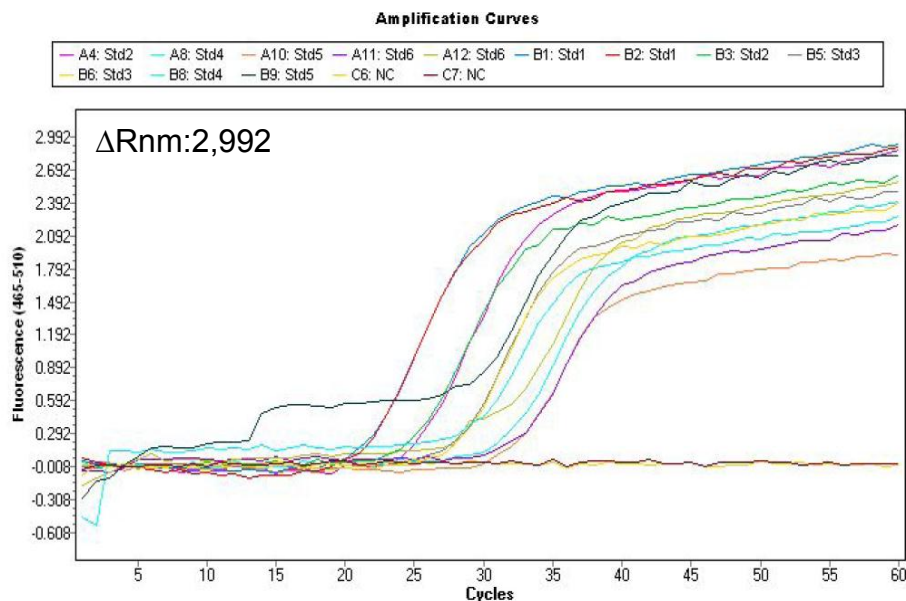


Fig. 9. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la concentración de 0,25 μM de primers glmMFw y glmMRv en la reacción. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color rojo y azul: Estándar 1. Curva color verde y rosado: Estándar 2. Curva color amarillo y gris: Estándar 3. Curva color turquesa: Estándar 4. Curva color naranja: Estándar 5. Curva color verde y morado: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Luego realizar el análisis de Cuantificación Absoluta por Segunda Derivada Máxima para obtener la curva estándar de cada una de las concentraciones, se obtuvieron los valores de error, eficiencia, R^2 , pendiente e intersección con el eje Y que se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Datos obtenidos de la curva estándar para la optimización de la concentración de los primers glmMRv y glmMFw.

Variable ²	Concentración		
	1 μM	0,5 μM	0,25 μM
Error	0,0374	0,0349	0,105
Eficiencia	1,962	1,736	2,028
Pendiente	-3,416	-4,175	-3,256
R^2	0,9944	0,979	0,9176
Intersección con el eje Y	43,75	42,67	36,62
Link	2 4000	30 100	8 354

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

²El gráfico obtenido para cada una de las curvas estándar se muestra en el anexo 2.

Por otra parte, el número de copias del gen *glmM* en cada una de las diluciones se calculó utilizando la curva estándar correspondiente a cada concentración, los valores calculados por el equipo se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Valores de Cp y concentración calculados por el software del LightCycler® 480 II para cada una de las concentraciones de *primers* evaluadas.

Nombre	Valores								
	Concentración teórica			Concentración calculada			Cp		
	1µM	0,5µM	0,25µM	1µM	0,5µM	0,25µM	1µM	0,5µM	0,25µM
Estándar 1		3,00x10 ⁵		3,71x10 ⁵	3,07x10 ⁵	3,06x10 ⁵	23,50	22,21	21,62
Estándar 1		3,00x10 ⁵		2,54x10 ⁵	2,93x10 ⁵	3,08x10 ⁵	24,06	22,29	21,61
Estándar 2		3,00x10 ⁴		2,76x10 ⁴	2,98x10 ⁴	2,74x10 ⁴	27,36	26,44	25,03
Estándar 2		3,00x10 ⁴		2,96x10 ⁴	3,02x10 ⁴	2,98x10 ⁴	27,25	26,41	24,92
Estándar 3		3,00x10 ³		3,41x10 ³	2,67x10 ³	2,92x10 ³	30,46	30,17	28,20
Estándar 3		3,00x10 ³		2,77x10 ³	3,01x10 ³	3,24x10 ³	30,76	30,00	28,06
Estándar 4		3,00x10 ²		2,40x10 ²	3,52x10 ²	2,09x10 ²	34,03	32,68	31,65
Estándar 4		3,00x10 ²		2,11x10 ²	3,68x10 ²	8,35x10 ²	34,19	32,63	29,46
Estándar 5		3,00x10 ¹		4,70x10 ¹	4,00x10 ¹	1,10x10 ¹	35,94	35,02	31,94
Estándar 5		3,00x10 ¹		4,34x10 ¹	4,64x10 ¹	6,52x10 ¹	36,06	34,87	29,66
Estándar 6		3,00x10 ⁰		1,61x10 ⁰	1,50x10 ⁰	2,34x10 ⁰	39,42	37,69	32,59
Estándar 6		3,00x10 ⁰		4,36x10 ⁰	3,57x10 ⁰	2,14x10 ⁰	38,45	37,33	32,63
Control negativo		N/A		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Control negativo		N/A		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Según los resultados obtenidos para la optimización de la concentración de *primers*, el valor de 1µM de *glmMRv* y *glmMFw* en la reacción fue la concentración que presentó mejor eficiencia, no así para 500nM y 250nM cuyas eficiencias no son aceptables por los límites establecidos para este valor (1,90-2,05). Este resultado se puede corroborar con la eficiencia obtenida en la optimización de la temperatura de alineamiento de 52°C, la cual se llevó a cabo con 1µM de cada primer en la reacción y se obtuvo una eficiencia de 1,963.

De igual forma que para la estandarización de la temperatura de alineamiento, el error desplegado por el software del equipo para las tres concentraciones evaluadas es menor a 0,2. Es decir, se encuentran dentro de los límites de aceptación de la técnica, no así para el valor de R², ya que únicamente con una concentración de 1 µM se obtuvo el valor mayor a 0,98 (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

En la literatura se reporta el uso de concentraciones menores de *primers*, tanto para la detección de *H. pylori* mediante qPCR, como de otros microorganismos. En el caso de *H. pylori* se utilizó una concentración de 0,4 μM en la reacción para la detección de genes como el ARr16S, el ureA y el ARNr23S (Ramírez-Lázaro *et al.*, 2011). Sin embargo, para la detección del gen *glmM* Sen, Schable & Lye, (2007) reportan el uso de una concentración de 1 μM de primer en la reacción presentando valores de R^2 de 0,99.

Sumado a esto, la emisión de fluorescencia, como se puede observar en la figura 4, disminuye notablemente entre cada una de las concentraciones de *glmMRv* y *glmMFw* evaluadas, esto podría deberse a que se genera una limitación en los reactivos y para que se dé la hidrólisis de la sonda, debe de haber amplificación y si los *primers* se acaban rápidamente en la reacción, la polimerasa no hidrolizará la sonda (Green, Sambrook, 2012).

Con base en el cuadro 8, se puede observar que bajo las tres concentraciones de *primers* evaluadas, hubo detección y cuantificación del gen *glmM*; sin embargo, si se analizan los valores de C_p calculados para cada concentración, éstos varían más entre un mismo estándar entre cada variable analizada. Esta situación también se refleja en el valor de la pendiente, donde indica que una concentración de 0,5 μM posee una cinética de reacción mayor; es decir, se necesitan más números de ciclos para que los estándares comiencen a generar fluorescencia.

Sumado a los resultados anteriores, para estandarizar la concentración de sonda de hidrólisis para la detección del gen *glmM*, se obtuvieron los resultados que se muestran en las figuras 10, 11 y 12; así como en los cuadros 9 y 10.

Optimización de la concentración de sonda

En la figura 10 se muestran las curvas de amplificación del gen *glmM* de *H. pylori* correspondientes a cada una de las concentraciones de sonda evaluadas. En cada una se especifica el valor de ΔR_{nm} .

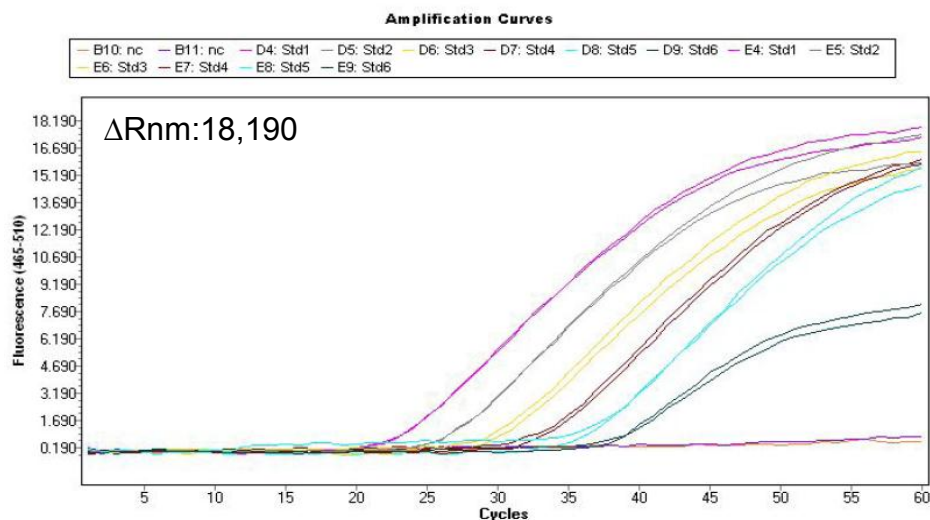


Fig. 10. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la concentración de 1 μM de la sonda glmMPb en la reacción. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color morado: Estándar 1. Curva color gris: Estándar 2. Curva color amarillo: Estándar 3. Curva color vino: Estándar 4. Curva color turquesa: Estándar 5. Curva color azul: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de 0,25 μM evaluada para la sonda glmMPb.

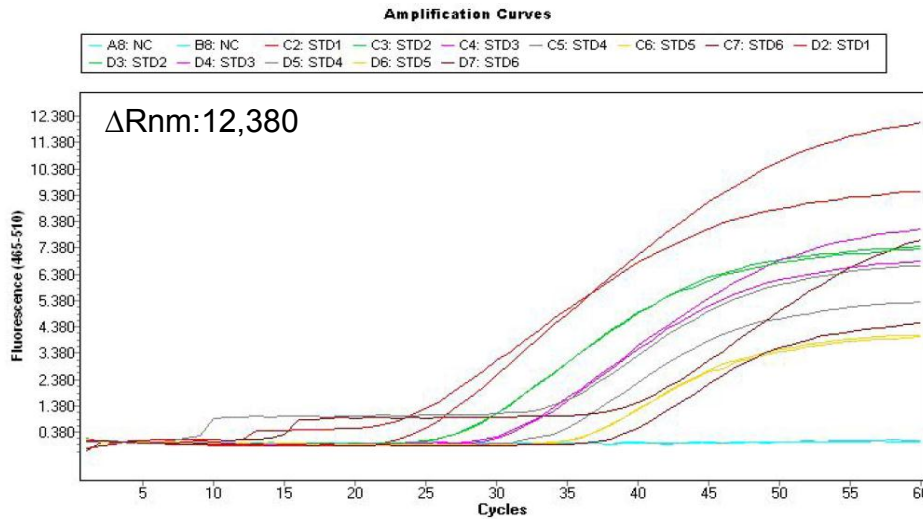


Fig. 11. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la concentración de 0,25 μM de la sonda glmMPb en la reacción. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color rojo: Estándar 1. Curva color verde: Estándar 2. Curva color morado: Estándar 3. Curva color gris: Estándar 4. Curva color amarillo: Estándar 5. Curva color vino: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

En la figura 12 se presentan las curvas de amplificación correspondientes a la concentración de 0,1 μM evaluada para estandarizar la concentración de sonda glmMPb.

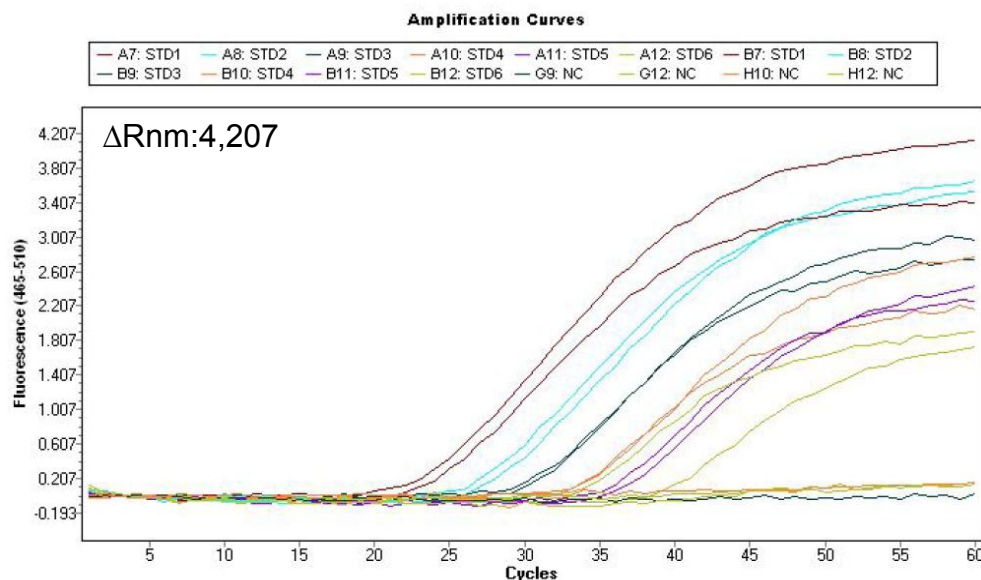


Fig. 12. Curvas de amplificación para la elaboración de la curva estándar correspondiente a la concentración de $0,1 \mu\text{M}$ de la sonda glmMPb en la reacción. En el gráfico se representa la fluorescencia emitida en el eje Y contra el número de ciclos en el eje X. Curva color vino: Estándar 1. Curva color turquesa: Estándar 2. Curva color verde: Estándar 3. Curva color naranja: Estándar 4. Curva color morado: Estándar 5. Curva color verde: Estándar 6. Líneas sobre el eje X: control negativo. **Fuente:** Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Una vez concluidos los ciclos de PCR, el análisis de Cuantificación Absoluta por Segunda Derivada Máxima para cada una de las concentraciones de glmMPb evaluadas generó los resultados que se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Datos obtenidos de las curva estándar para la optimización de la concentración de la sonda glmMPb.

Variable ³	Concentración		
	$1\mu\text{M}$	$0,25 \mu\text{M}$	$0,1 \mu\text{M}$
Error	0,00944	0,0374	0,106
Eficiencia	1,963	1,962	2,122
Pendiente	-3,415	-3,416	-3,060
R^2	0,9914	0,9944	0,9062
Intersección con el eje Y	43,66	43,75	41,57

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

³Los gráficos de cada una de las curvas estándar se muestran en el anexo 3.

Sumado a lo anterior, el número de copias del gen *glmM* en cada una de las diluciones se calculó utilizando la curva estándar correspondiente a cada concentración de sonda glmMPb, los valores calculados por el equipo se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Valores calculados por el software del LightCycler® 480 II de Roche Diagnostics GmbH para el Cp y la concentración de las diluciones de ADN de *H. pylori* ATCC 51932 para la estandarización de la concentración de sonda.

Nombre	Valores								
	Concentración teórica			Concentración calculada			Cp		
	1µM	0,250µM	0,1µM	1µM	0,250µM	0,1µM	1µM	0,250µM	0,1µM
Estándar 1		3,00x10 ⁵		2,96x10 ⁵	3,71x10 ⁵	3,61x10 ⁵	22,84	23,50	23,29
Estándar 1		3,00x10 ⁵		2,72x10 ⁵	2,54x10 ⁵	2,76x10 ⁵	22,96	24,06	23,65
Estándar 2		3,00x10 ⁴		3,16x10 ⁴	2,76x10 ⁴	2,71x10 ⁴	26,15	27,36	26,73
Estándar 2		3,00x10 ⁴		2,85x10 ⁴	2,96x10 ⁴	1,75x10 ⁴	26,31	27,25	27,31
Estándar 3		3,00x10 ³		3,41x10 ³	3,41x10 ³	1,32x10 ³	29,46	30,46	30,75
Estándar 3		3,00x10 ³		3,20x10 ³	2,77x10 ³	1,81x10 ³	29,55	30,76	30,32
Estándar 4		3,00x10 ²		2,76x10 ²	2,40x10 ²	2,03x10 ²	33,19	34,03	33,23
Estándar 4		3,00x10 ²		3,42x10 ²	2,11x10 ²	1,27x10 ²	32,87	34,19	33,85
Estándar 5		3,00x10 ¹		3,93x10 ¹	4,70x10 ¹	2,85x10 ¹	36,08	35,94	35,84
Estándar 5		3,00x10 ¹		1,80x10 ¹	4,34x10 ¹	1,81x10 ¹	37,07	36,06	36,44
Estándar 6		3,00x10 ⁰		1,92x10 ⁰	1,61x10 ⁰	1,11x10 ⁰	38,36	39,42	34,04
Estándar 6		3,00x10 ⁰		4,51x10 ⁰	4,36x10 ⁰	2,68x10 ⁰	37,97	38,45	38,98
Control negativo		N/A		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Control negativo		N/A		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CIB, ITCR.

Los resultados obtenidos para la optimización de la concentración de sonda mostraron que, tanto una concentración de 1 µM como de 0,25 µM, presentan eficiencias aceptables para poder aplicar la técnica porque las eficiencias son de 1,963 y 1,962, respectivamente y sus pendientes difieren en 0,001. No así para la concentración de 0,1 µM cuya eficiencia es de 2,122 representando, según Roche Diagnostics GmbH (2008) y Aguilera, Ruiz, Rocha, Pineda & Chánez (2014) posibles inhibiciones en la reacción.

Otra manera de optimizar la concentración de sonda es con base en la forma que poseen las curvas; en otras palabras, una concentración óptima de sonda genera (teóricamente) curvas “rectas” o “lisas” (Integrated DNA Technologies, 2012) (Anexo 4) y la concentración de 0,1 µM generó curvas con relieves que implican una errónea concentración en la reacción. En cuanto al error, al igual que con la temperatura de alineamiento y la concentración de los *primers*, es menor al límite establecido por la casa fabricante del equipo.

Para determinar la concentración de sonda de hidrólisis, se deben de correr las reacciones y hay que analizar además de la forma de la curva y la eficiencia, la fluorescencia máxima de la muestra y los valores de Cp. En la literatura se reporta el uso de sondas de hidrólisis en concentraciones más bajas que los *primers*, por ejemplo Ou *et al.*, (2013) utilizaron una

sonda de hidrólisis para la detección del gen *ureA* en concentración de 0,12 μM ; por otra parte Ramírez-Lázaro *et al.*, (2011) utilizaron 0,4 μM para la detección del gen ARr16S y de 0,2 μM para el gen *ureA*.

No obstante, hay otras variables que analizar para elegir la concentración de sonda adecuada entre 1 μM y 0,25 μM . La primera de ellas es la emisión de fluorescencia, en la figura 5 se observa que hay una mayor emisión de fluorescencia con una concentración de 1 μM , no así con 0,25 μM ; además con los resultados que se muestran en el cuadro 9, se puede observar que con 1 μM se obtienen valores de C_p menores en la mayoría de los estándares. Con estos datos, la concentración de 1 μM podría ser la óptima para poder llevar a cabo la reacción.

Conclusiones

Se estableció la temperatura de 52°C como la temperatura de alineamiento óptima para los primers glmMRv y glmMFw, con una eficiencia de 1,963.

Se determinó una concentración de los *primers* glmMRv y glmMFw óptima de 1 μM en la reacción con una eficiencia de 1,962.

Se seleccionó la concentración de 1 μM de la sonda glmMPb como la concentración óptima para la reacción con una eficiencia de 1,963.

Recomendaciones

Optimizar los tiempos de los ciclos en cada uno de los programas de termociclado.

Evaluar otros sets de *primers* para determinar si es posible alcanzar mayores eficiencias en las reacciones.

Referencias Bibliográficas

Aguilera, P.; Ruiz, M.; Rocha, M.; Pineda, B.; Chánez, M. (2014). *PCR en tiempo tiempo real*. Herramientas moleculares aplicadas a la ecología. México. Primera edición.

Alarcón T., Barquero M., Domingo D., López M., Royo G. 2004. *Diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori*. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap17.htm>. Consultado el 19 de febrero de 2015.

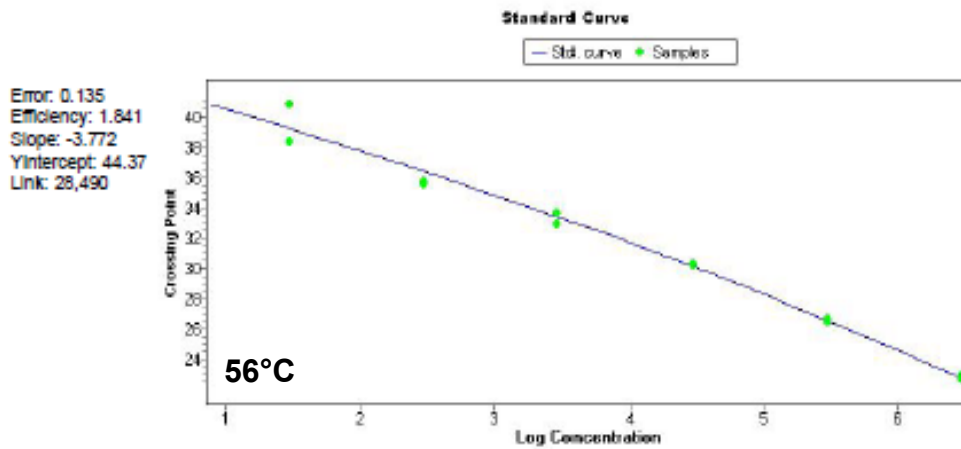
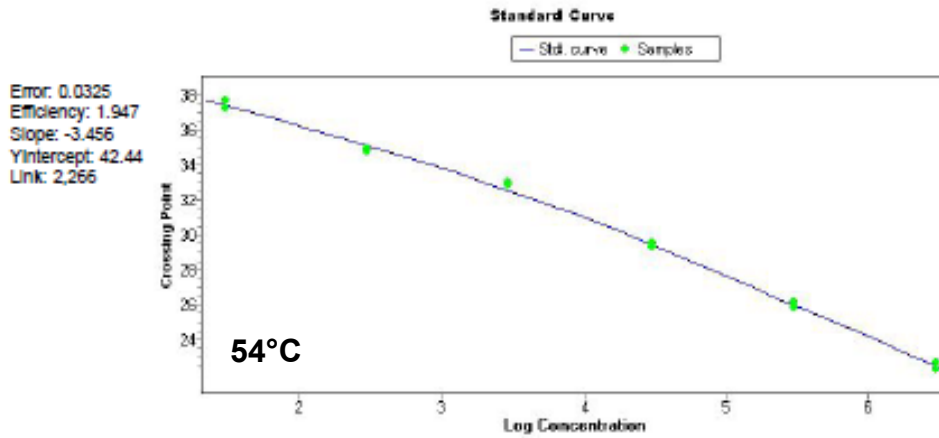
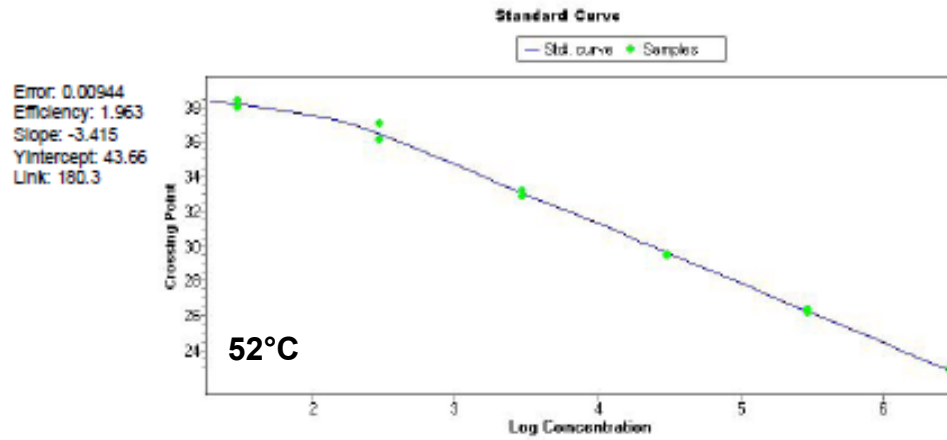
- Alm, R.; Ling, L.; Moir, D. *et al.*, (1999). *Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori*. *Nature*, 397: 176–180. doi:10.1038/16495 PMID:9923682
- Azevedo, N, Guimares N, Figueredo C, Kevil C; et al., (2007) *A New Model for the Transmission of Helicobacter pylori: Role of Environmental Reservoirs as Gene Pools to Increase Strain Diversity*. *Critical Reviews in Microbiology*. 33:157-169.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (s.f.). *Real-Time PCR Application Guide*. En línea. Obtenido de http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. Consultado el 5 de febrero de 2015.
- Boyanova, L.; Mitov, I.; Vladimirov, B. (2011). *Helicobacter pylori*. Horizon Scientific Press. 289pp.
- Brankatschk, R.; Bodenhausen, N.; Zeyer, J.; Burgman H. (2012) *Simple Absolute Quantification Method Correcting for Quantitative PCR Efficiency Variations for Microbial Community Samples*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(12):4481-4489.
- Brechtbuehl, K.; Whalley, S.; Dusheiko, G.; Saunders, N. (2001). *A rapid real time quantitative polymerase chain reaction for the hepatitis B virus*. *Journal of Virological Methods*. 93:105-113.
- Cervantes, E. 2006. *Helicobacter pylori e infecciones asociadas*. (en línea). *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 49(4): 163-168. Consultado 19 oct. 2011. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2006/un064i.pdf>
- Cheng, P.; Shi, R.; Zhang, H.; Yu, I.; Zhang, G.; Hao, B. 2008. *Effects of tumor necrosis factor-alpha inducing protein-alpha secreted by Helicobacter pylori on human gastric epithelial cells*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 88(22):1528-1532.
- Fonseca, D.; Arbeláez, H.; Contreras, N. (2010). *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. Universidad del Rosario. 69pp.
- Godlewska, R.; Pawlowski, M.; Dzwonek, A.; Mikula, M.; Ostrowski, J.; Drela, N.; Jugusztyn, E. (2008). *Tip-a (hp0596 Gene Product) Is a Highly Immunogenic Helicobacter pylori Protein Involved in Colonization of Mouse Gastric Mucosa*. *Current Microbiology*. 56: 279-286.
- González, M. (2011). *Detección molecular de cepas de la bacteria Helicobacter pylori provenientes de biopsias de estómago de pacientes de zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica*. Trabajo Final de Graduación. Escuela de Biología. ITCR.

- Green, M.; Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Vol. II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cuarta edición.
- He, Q.; Wang, J.; Osato, M.; Lachman, L. (2002) *Real-Time Quantitative PCR Detection of Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology. 40(10): 3720-3728.
- Hernández, F. (1990). “Caracterización de *Campylobacter*, *Helicobacter* y bacterias curvadas asociadas con gastritis y úlceras pépticas”. Rev. Cost. Cienc. Méd. 11(3,4) <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v11n3-4/art7.pdf>. Consultado el 20 de marzo de 2015.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2014). *Helicobacter pylori Eradication as a Strategy for preventing gastric cancer*. IARC Working Group Report. Vol. 8
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (s.f.). *Helicobacter pylori*. IARC Monographs-100B.
- Integrated DNA Technologies (IDT). (2012). *qPCR Application Guide: Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting*. Bélgica. Tercera Edición.
- Loddenkotter, B.; Becker, K.; Hohoff, C.; Brinkmann, T. (2005). *Real-time quantitative PCR assay for the detection of Helicobacter pylori: no association with sudden infant death syndrome*. Int J Legal Med. 119:202-206.
- Manual de normas para el tratamiento de cáncer en Costa Rica. (2014). 1ª ed. – San José: Imprenta Nacional, 2014. 1 recurso en línea (408 p.): pdf. ; 1750 Kb.
- Montero, V.; Masís, F.; López, G.; Hernández, A.; Barboza, K.; Orozco, J.; Camacho, J.; García, F. (2011). *Hallazgo de la bacteria Helicobacter pylori en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica*. Tecnología en Marcha. 24(3):3-14.
- Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M *et al.*, (2006). *The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis Helicobacter pylori strain: evolution during disease progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 9999–10004. doi:10.1073/pnas.0603784103 PMID:16788065
- Olaya, S. (2008). *Comparación entre una técnica estandarizada de PCR en tiempo real y PCR convencional para la detección del gen cagA de Helicobacter pylori*. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Ou, Z.; Xiong, L.; Li, D.; Geng, L.; Li, L.; Chen, P.; Yang, M.; Zeng, Z.; Xia, H.; Gong, S. (2013). *Evaluation of a new fluorescence quantitative PCR test for diagnosing Helicobacter pylori infection in children*. BMC Gastroenterology 13:7.

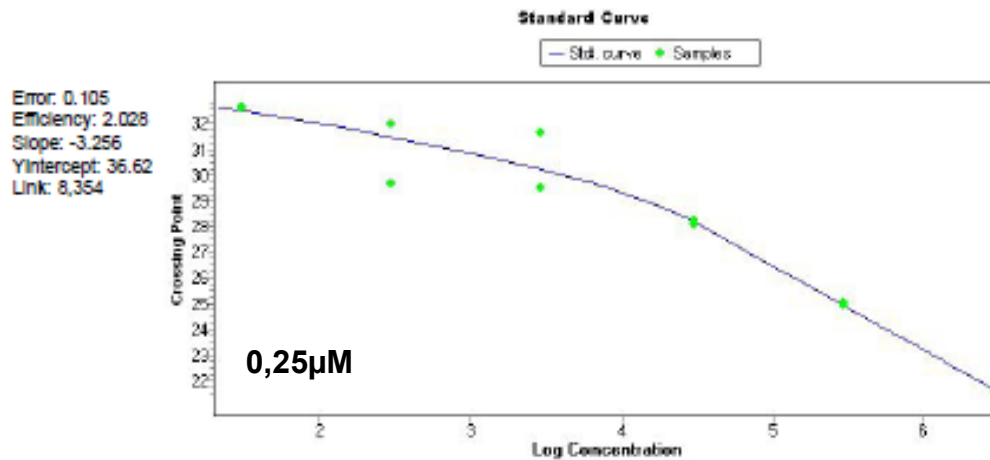
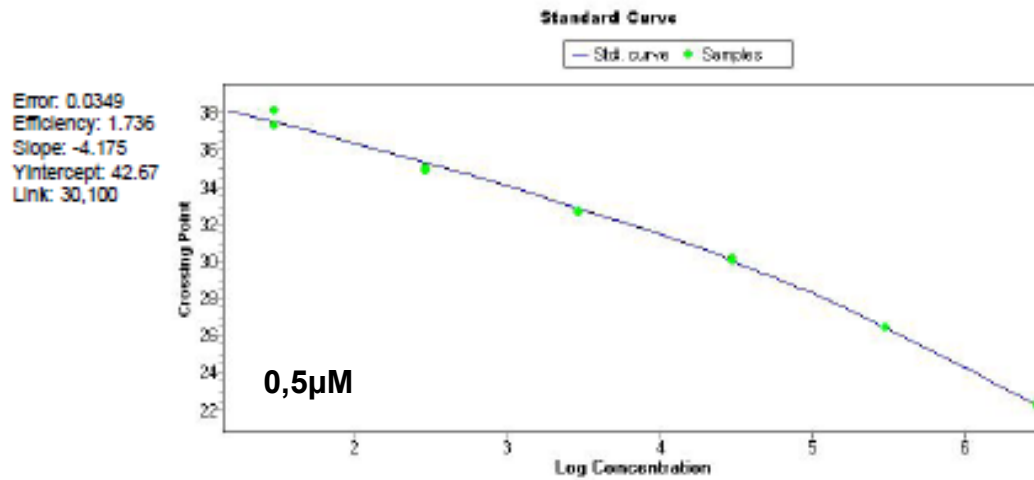
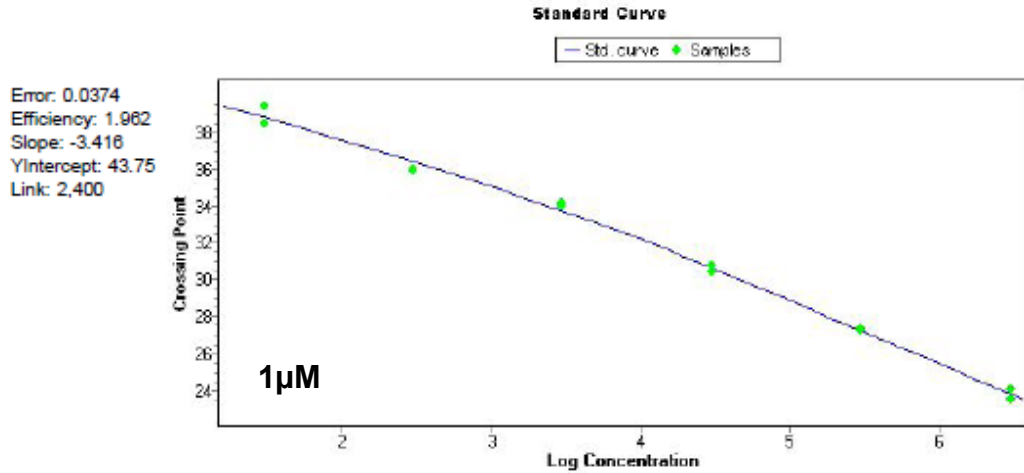
- Pérez, L.; Codony, F.; López, D.; Fittipaldi, M.; Adrados, B.; Morató, J. (2010). *Quantification of Helicobacter pylori level in soil samples from public playgrounds in Spain*. Journal of Zhejiang University. 11(1): 27-29.
- Ramírez-Lázaro, M.; Lario, S.; Casalots, A.; Sanfeliu, E.; Boix, L.; García-Iglesias, P.; Sánchez-Delgado, J.; Montserrat, A.; Bella-Cueto, M.; Gallach, M.; Sanfeliu, I.; Segura, F.; Calvet, X. (2011) *Real-time improves Helicobacter pylori detection in patients with peptic ulcer bleeding*. PLoS ONE 6(5): e20009. doi:10.1371/journal.pone.0020009.
- Roche Diagnostics GmbH. (2008). *LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual*.
- Sen, K.; Schable, N.; Lye, D. (2007). *Development of an internal control for evaluation and standardization of a quantitative PCR assay for detection of Helicobacter pylori in drinking water*. Applied and Environmental Microbiology. 73(22):7380-738
- Sierra, R. (2002). *Cáncer gástrico, epidemiología y prevención*. Acta Médica Costarricense. 44 (2): 55-61.
- Suganuma, M.; Yamaguchi, K.; Ono, Y.; Matsumoto, H.; Hayashi, T.; Ogawa, T.; Imai, K.; Huzuhara, T.; Nishizono, A.; Fujiki, H. 2008. TNF- α -inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. International Journal of Cancer. 123(1): 117-122.
- Tomb, J.; White, O.; Kerlavage, A.; Clayton, R.; Sutton, G.; Fleischmann, R.; Ketchum, K.; Klenk, H.; Gill, S.; Dougherty, B.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fitzgerald, L.; Lee, N.; Adams, M.; Hickey, E.; Berg, D.; Gocayne, J.; Utterback, T.; Peterson, J.; Kelley, J.; Cotton, M.; Weidman, J.; Fujii, C.; Bowman, C.; Watthey, L.; Wallin, E.; Hayes, W.; Borodovsky, M.; Karp, P. Smith, H.; Fraser, C.; Venter, J. (1997). *The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori*. Nature, 388: 539–547. doi:10.1038/41483 PMID:9252185.
- UNIPROT CONSORTIUM. 2011. P55980 (CAGA_HELPY) Version 60. (en línea). Consultado 11 marzo de 2011. Disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P55980>
- Yañez, M.; Barberá, V.; Soria, E.; Catalán, V. (2009). *Quantitative detection of Helicobacter pylori in water samples by real time PCR amplification of the cag pathogenicity island gene, cagE*. Journal of Applied Microbiology. 107: 416-424.

Anexos

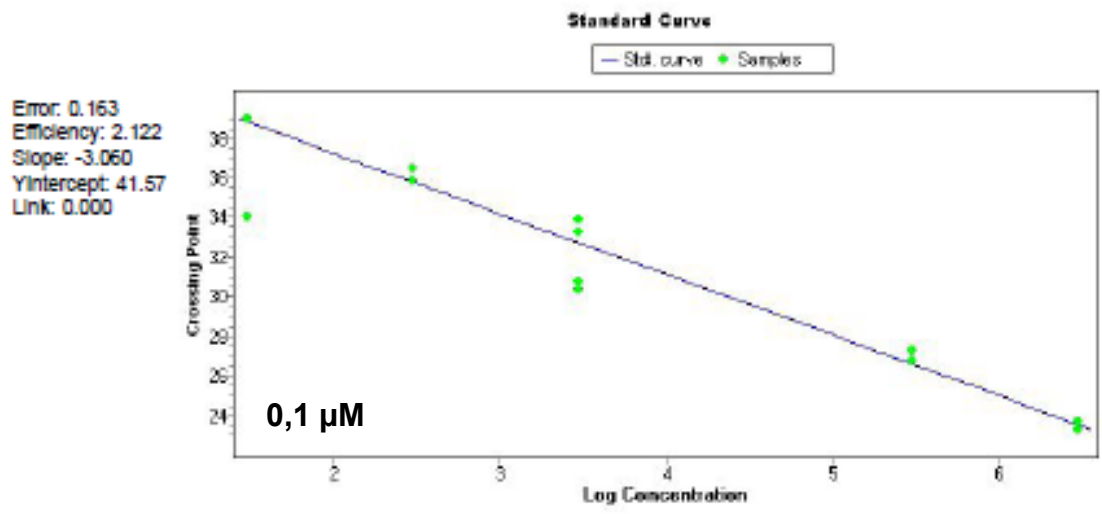
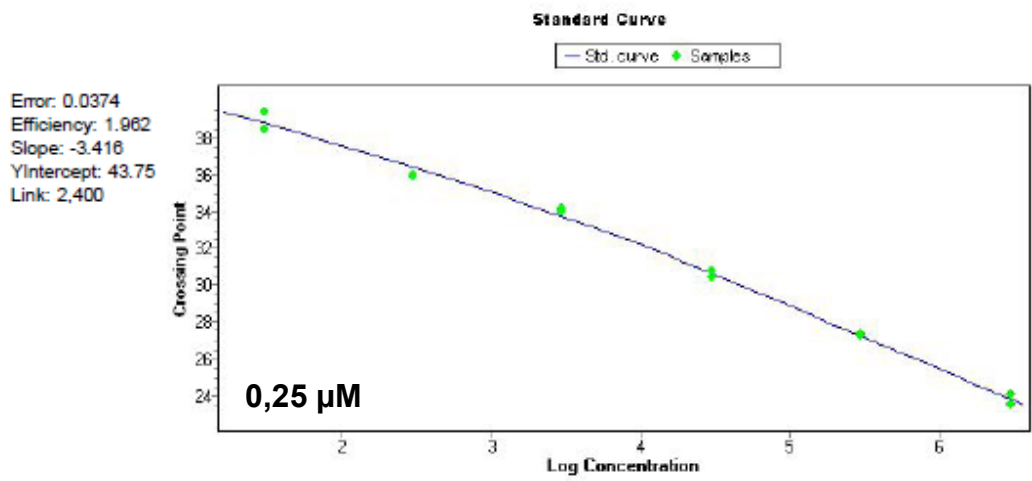
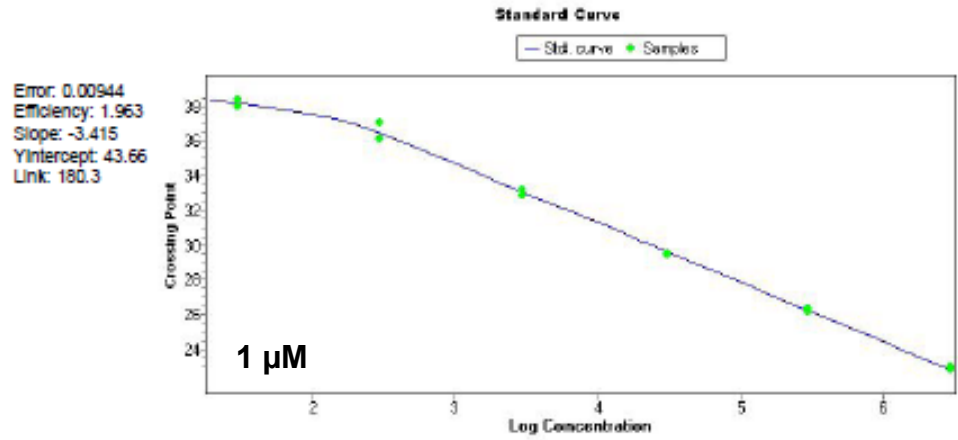
Anexo 1. Curvas estándar generadas por el LC480II para la optimización de la temperatura de alineamiento.



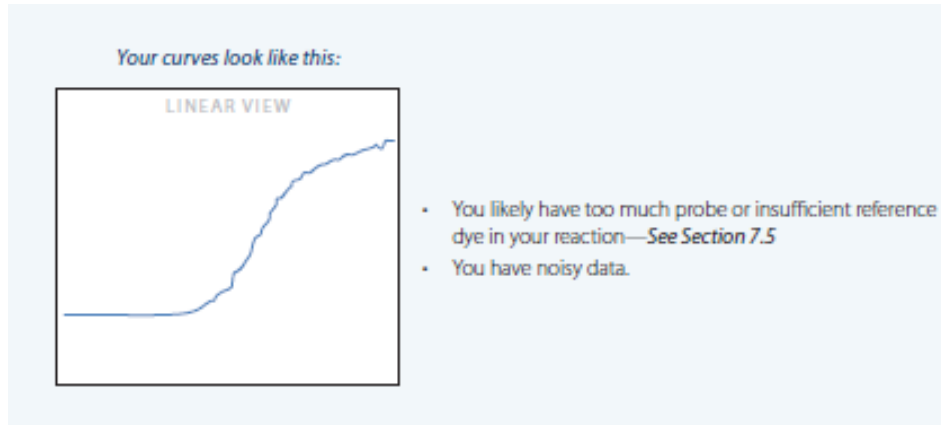
Anexo 2. Curvas estándar generadas por el LC480II para la optimización de la concentración de *primers*.



Anexo 3. Curvas estándar generadas por el LC480II para la optimización de la concentración de sonda.



Anexo 4. Imágenes de curva de amplificación con concentraciones no óptimas de sondas.



Anexo 5. Glosario de abreviaciones utilizadas en el texto.

H. pylori: *Helicobacter pylori.*

IARC: International Agency for Research on Cancer.

LC480II: LightCycler 480 II.

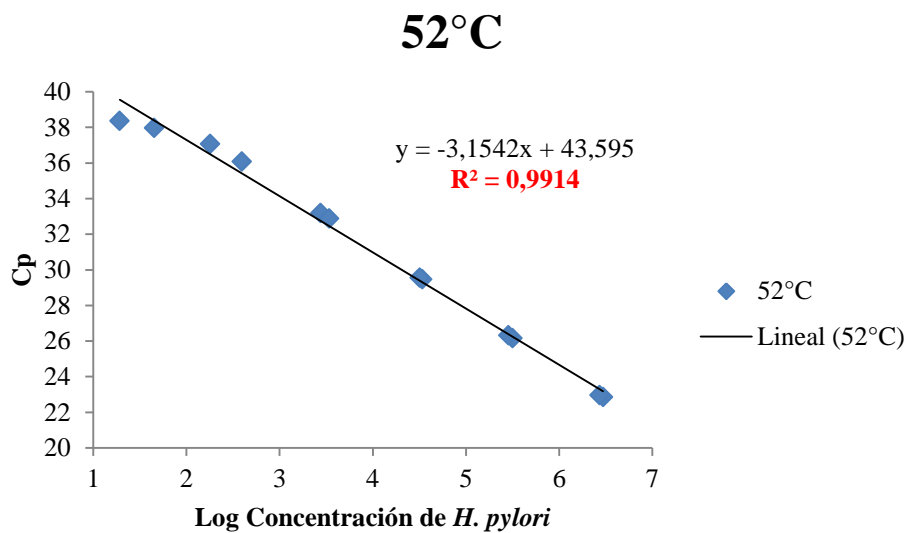
T_m: Temperatura de *melting*.

ΔR_{nm}: Delta R_n Máximo.

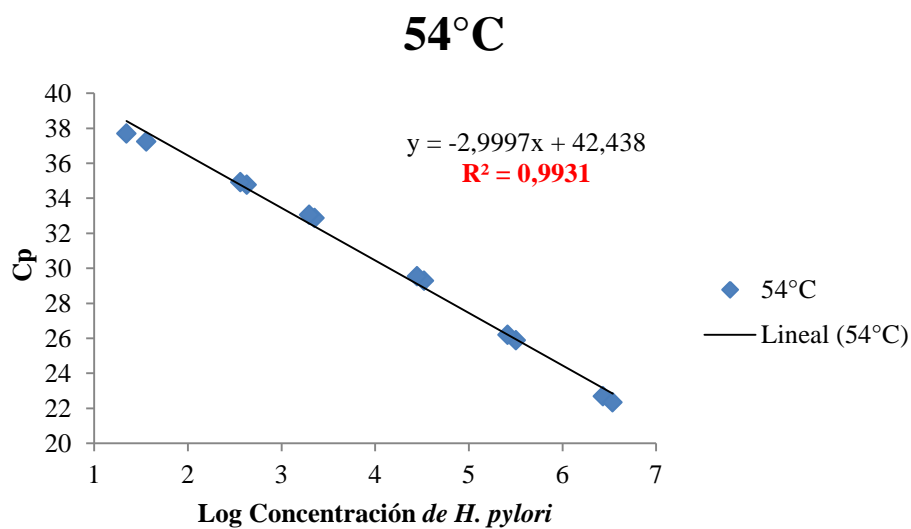
C_p: *Crossing Point.*

qPCR: PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.

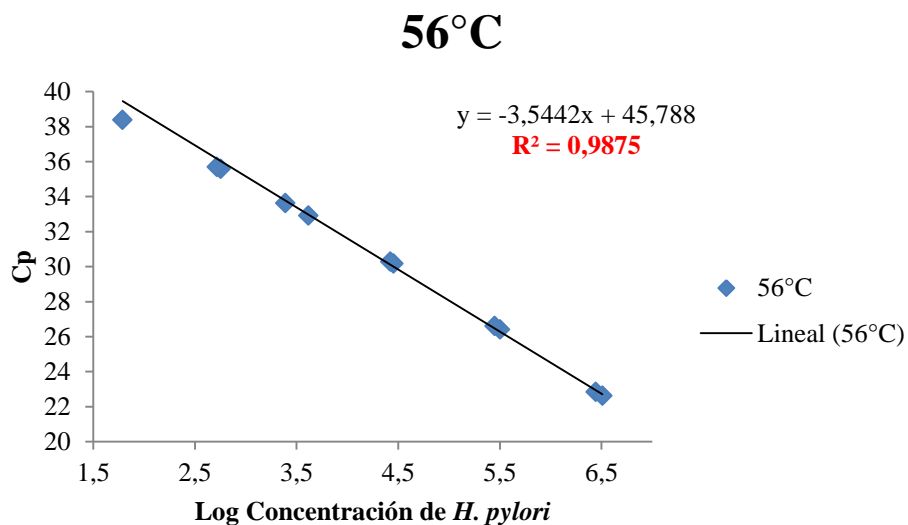
Anexo 6. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 de la temperatura de alineamiento de 52°C.



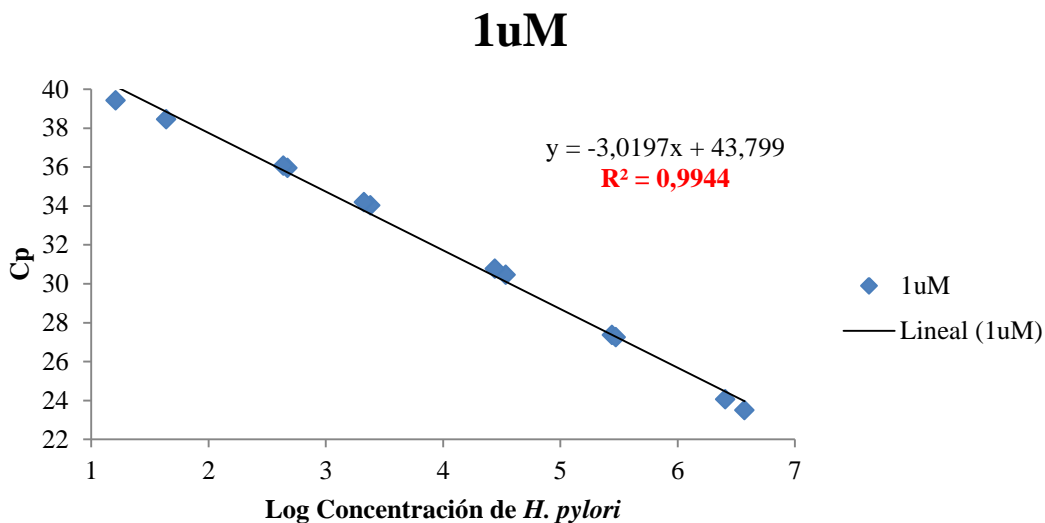
Anexo 7. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 de la temperatura de alineamiento de 54°C.



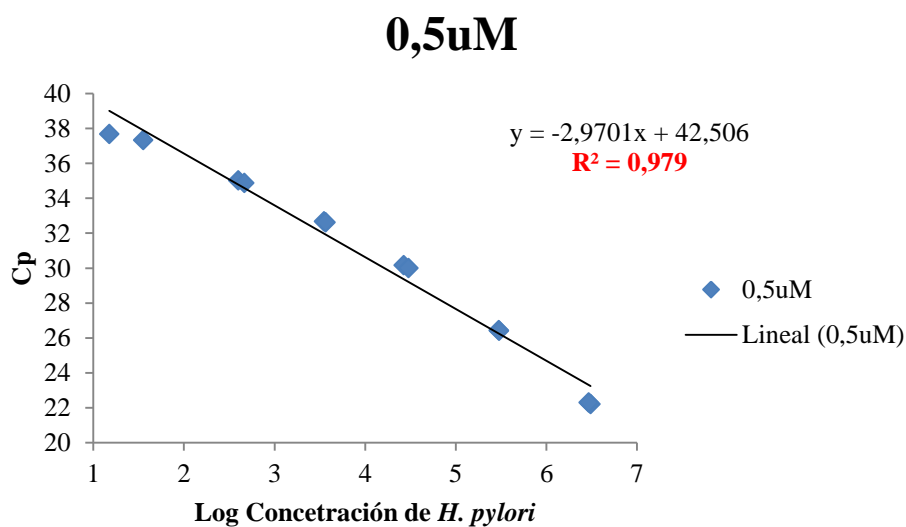
Anexo 8. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 de la temperatura de alineamiento de 56°C.



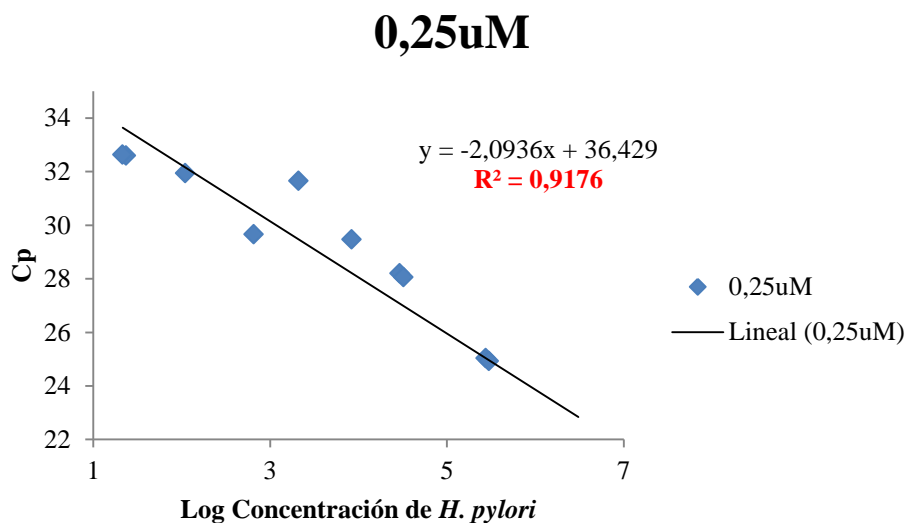
Anexo 9. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 para la optimización de la concentración de 1µM de los *primers* glmMRv y glmMFw.



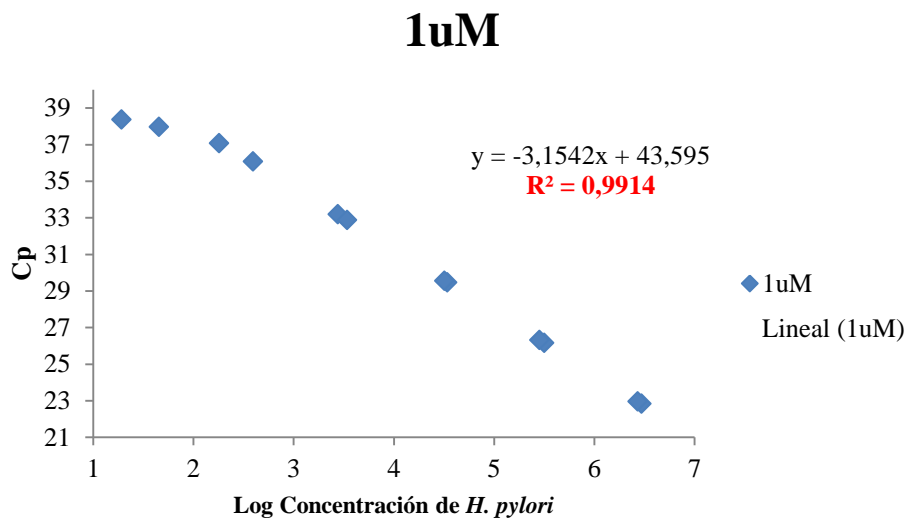
Anexo 10. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 para la optimización de la concentración de $0,5\mu\text{M}$ de los *primers* glmMRv y glmMFw.



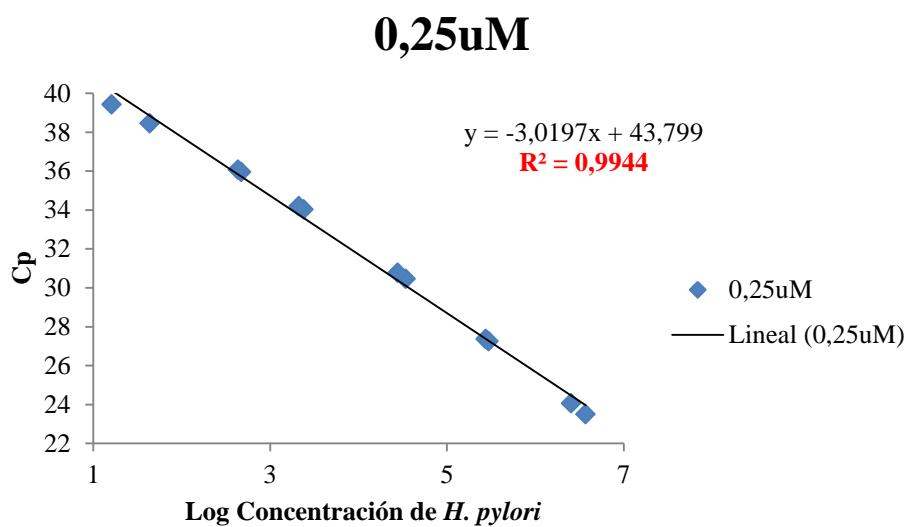
Anexo 11. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 para la optimización de la concentración de $0,25\mu\text{M}$ de los *primers* glmMRv y glmMFw.



Anexo 12. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 para la optimización de la concentración de $1\mu\text{M}$ de la sonda glmMPb.



Anexo 13. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 para la optimización de la concentración de $0,25\mu\text{M}$ de la sonda glmMPb.



Anexo 14. Gráfico generada por Microsoft Excel para el cálculo del R^2 para la optimización de la concentración de $0,1\mu\text{M}$ de la sonda glmMPb.

