

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

***Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para
el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016***

**Estudiante de Maestría
Manuel Alfredo Ruiz Benítez. MD, Esp. Epid.**

**Coinvestigadores
Alejo Monsalve Querubín. Bact.**

**Tutora
Miryan Margot Sánchez Jiménez. Bact, MsC, DrSci.**

**Facultad de Medicina.
División de Salud pública
Área académica: Medicina Tropical**

**Maestría en Medicina Tropical
Universidad CES - Instituto Colombiano de Medicina Tropical**

Medellín 2017.

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

Agradecimientos:

Cuando la voluntad humana ya no puede dar ni un paso adelante, Jesús sigue allí para sostenerte. Por eso te damos gracias Padre Celestial porque fuiste mi roca fuerte para salir con bien en esta tesis y en cada uno de los proyectos de mi vida.

Agradezco a la **universidad CES, ICMT, COLCIENCIAS**, por la colaboración en todos los procesos de emprendimiento y conocimiento que me enseñaron

De una manera muy especial, doy gracias a todos los docentes de la **MSc. Medicina Tropical** ya que sin ellos no hubiera sido posible lograr mi objetivo.

A mi asesor de tesis la **Dra. Miryan Margot Sánchez Jiménez. Bact, MsC, DrSci.** por estar siempre en la disposición de ofrecerme su ayuda para llevar a cabo tan importante tema de investigación.

A mis familiares, porque siempre estuvieron ahí para brindarme su apoyo y darme ese empujoncito cuando me desanimaba, sin ustedes unidos no fuese posible alcanzar las metas trazadas.

Gracias a todo aquel que de una manera u otra intervino para que nuestra tesis hoy fuera una realidad.

Gracias del alma,

Manuel Alfredo Ruiz Benitez.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Tabla de contenido

1) Resumen.....	6
2) Planteamiento del problema.	7
3) JUSTIFICACIÓN.....	9
4) Pregunta de investigación.....	10
5) Marco teórico.....	11
5.1 Leptospira sp.	11
5.2 Salmonella sp.....	13
5.3 Brucella sp.	15
6) Objetivo general.....	18
6.1 Objetivos específicos.	18
7) Metodología.....	19
7.1 Enfoque metodológico de la investigación.	19
7.2 Tipo de estudio.	19
7.3 Área de estudio.	20
7.4 Población.....	20
7.5 Criterios de inclusión.	20
7.6 Criterios de exclusión.....	21
7.7 Diseño de la muestra.....	21
7.8 Tamaño de la muestra.	21
7.9 Selección de la muestra.....	22
7.10 Captación de la población de estudio y toma de muestras.....	22
8) Descripción de las Variables.	23
8.1 Grafico 1. Diagrama de variables.	23
8.2 Tabla 2. Variables.	24
9) Técnicas de Recolección de Información.	26
9.1 Fuentes de Información.....	26
9.2 Instrumento de Recolección de Información.....	26
9.3 Control de errores y sesgos.	26
9.4 Pruebas de laboratorio.....	26
9.5 Pruebas convencionales.	26

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.

Antioquia /Chocó2015-2016

9.6	PCR múltiple.	27
	Tabla 3. Cebadores utilizados en la prueba PCR múltiple.	28
	Tabla 4. Cebadores utilizados en la prueba de PCR individual.	28
10)	Técnicas de procesamiento y análisis de los datos.....	31
11)	Plan de divulgación de los resultados.....	33
12)	Consideraciones Éticas.	34
13)	Resultados.....	3635
13.1	Grafica # 2. Distribución de muestras por municipio.	3736
13.2	Grafica # 3. Distribución por sexo y departamento.	3938
13.3	Identificación de <i>Leptospira sp</i> , <i>Salmonella Typhi</i> y <i>Brucella sp</i> por pruebas diagnósticas convencionales.	3938
13.4	Resultados obtenidos por los métodos convencionales de acuerdo a las características sociodemográfica de la población.	4039
	Grafica # 5. Casos de <i>Leptospira sp</i> . Determinados por Immunoblot y lugar de procedencia.	4140
13.5	PCR individual para cada agente.....	4140
13.6	Tabla # 5. Frecuencia de <i>Leptospira sp</i> , <i>Salmonella Typhi</i> y <i>Brucella sp</i> por PCR individual.	4241
13.7	Casos positivos PCR-m y lugar de procedencia.	4241
13.8	Grafica # 6. Detección de casos positivos por tipo de prueba diagnóstica.	4342
13.9	Capacidad predictiva de la PCR-m por agente causal	4342
13.10	Tabla # 9. Capacidad predictiva de la PCR-m por agente causal.	4544
	Cuando se realizaron los mismos análisis, pero comparando PCR múltiple frente a PCR individual se encontraron los siguientes valores.	4645
13.11	Co-infecciones determinadas por los métodos aplicados,.....	4645
13.12	. Tabla # 10. Utilidad clínica de la PCR-m a través de la razón de verosimilitud positiva y negativa y la probabilidad a posteriori de infección por <i>Leptospira Sp</i> . <i>Salmonella Sp</i> . y <i>Brucella Sp</i>	4645
14)	Discusión	4847
15)	Conclusiones.	5352
16)	Bibliografía.	5453
16.1	Anexo 1	6362
16.2	Anexo 2.....	6463
16.3	Anexo 3.....	6766
16.4	Anexo 4. Rosa de bengala.	6766

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.**

Antioquia /Chocó2015-2016

16.5	Anexo 5. Agar macckonkey.	68 67
16.6	Anexo 6. PCR-m para Salmonella sp. Leptospira sp. Brucella sp.	68 67
16.7	PCR individual Salmonella sp.	69 68
16.8	Anexo 7. PCR individual Leptospira Sp.	69 68
16.9	Anexo 8.PCR individual Brucella SP.	70 69
16.10	ANEXO #8. Electroforesis de la PCR-m Salmonella sp, Leptospira sp y Brucella sp.	70 69

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

1) Resumen.

Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella sp*, *Leptospira sp*, y *Brucella sp*. 2016.

Debido a la dificultad que existe para el diagnóstico de las enfermedades producidas por algunos agentes bacterianos utilizando métodos convencionales, se genera la necesidad de desarrollar y probar la utilidad de métodos moleculares que, por su alta sensibilidad, especificidad, poder de discriminación, reproducibilidad y fácil interpretación, se puedan convertir en una alternativa para el manejo oportuno de pacientes con síndrome febril con infecciones bacterianas de difícil diagnóstico. Por lo anterior se propone en este trabajo la evaluación de la utilidad de una prueba de PCR múltiple para el diagnóstico de agentes bacterianos causantes de síndrome febril. **Objetivo:** Evaluar la utilidad de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-m) para diagnóstico de síndromes febriles causados por *Leptospira sp*, *Salmonella sp* y *Brucella sp*. **Materiales y métodos:** Se tomaron muestras de sangre total y suero a pacientes febriles de Apartadó, Sabaneta (Antioquia) y Quibdó (Chocó). A cada muestra se le realizaron las pruebas de diagnóstico convencional: hemocultivo en medio Ruiz Castañeda, Microaglutinación, Rosa de Bengala y Prueba de reacción en cadena de la polimerasa individual para cada agente. Se les realizó también el proceso de Prueba de reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la búsqueda de los tres agentes bacterianos en forma simultánea. Se determinaron los valores estadísticos: sensibilidad, especificidad, valores predictivos negativo y positivo de la prueba y se determinó su utilidad clínica. **Resultados:** de acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba de PCR múltiple se determinó para *Salmonella Typhi* una S: 12,5%, E: 86.2%, VPP: 1,6% y VPN: 98,2%. Para *Leptospira sp* se encontró una S: 2,2%, E 98,3%, VPP 12,5% y VPN 90%. Para *Brucella abortus* se encontró S: 0%, E: 98,9, VPP 0% y VPN 98.7%.

Por los resultados encontrados se concluyó que la PCR múltiple tiene utilidad clínica para ser empleada en corto plazo en el diagnóstico de los agentes infecciosos mencionados, aunque es necesario mejorar la prueba con múltiples estudios que demuestren su efectividad.

Palabras claves: *Salmonella sp*, *Leptospira sp*, y *Brucella sp*, PCR, Cultivo, Inmunoblot, Rosa De Bengala.

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.

Antioquia /Chocó2015-2016

2) Planteamiento del problema.

Para algunos agentes patógenos, es fácil colonizar nuestro organismo de acuerdo al medio en que se encuentren y por su capacidad de virulencia y patogenicidad, por estas razones se puede facilitar la presentación de enfermedades producidas por diferentes agentes infecciosos algunos de ellos bacterianos tales como *Leptospira* sp, *Salmonella* sp y *Brucella* sp, cuya importancia radica en su elevada morbilidad y severidad clínica y su fácil mecanismo de transmisión, sin embargo la confirmación del diagnóstico etiológico por laboratorio presenta aún muchas dificultades lo cual dificulta la elección del tratamiento.

La leptospirosis es una zoonosis causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira* sp. Se estima que ocurren aproximadamente 873.000 casos por año en todo el mundo y afecta principalmente a mamíferos domésticos y salvajes (1,2). El hombre se considera un hospedero susceptible para *Leptospira* sp, la cual puede adquirirse por contacto directo con la orina y otros fluidos corporales de animales infectados, causando un espectro clínico que puede variar de formas leves a severas con elevada mortalidad como en el síndrome de Weill (366).

La prueba de diagnóstico aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la microaglutinación en campo oscuro (MAT). Esta prueba, aunque tiene una sensibilidad elevada (95,7%), solo está disponible en laboratorios especializados, porque se necesitan mantener cultivos de diferentes serovares, además se requieren sueros pareados de los pacientes para la detección de la seroconversión y también puede presentar reacciones cruzadas entre serogrupos. Otra alternativa de diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction) que tiene la capacidad de distinguir entre especies patógenas utilizando curvas de fusión, proporcionando así una alternativa rápida para la identificación de *Leptospira* sp, además de tener una elevada sensibilidad del 97-100% (7610).

La salmonelosis es una enfermedad producida por *Salmonella* sp. bacilo Gram negativo anaerobio que se encuentra en el tracto gastrointestinal de los animales domésticos, reptiles y pájaros. Se reportan más de 21 millones de casos a nivel mundial, con más de 700.000 muertes por año. En los EEUU causa 1.4 millones de casos, con 17 hospitalizaciones y cerca de 600 muertes cada año(11). En Colombia los datos de prevalencia de la infección

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

no se conocen con exactitud porque no está disponible en todos los laboratorios el aislamiento bacteriano por lo cual el diagnóstico es la mayoría de las veces clínico (12,13).

El método diagnóstico usado como prueba de referencia es el hemocultivo o mielo cultivo, sin embargo, su uso es limitado ya que solo se realiza en laboratorios especializados y su utilidad puede verse afectada por tratamientos previos, cadena de frío de las muestras, entre otros (14). Los métodos moleculares (PCR) han mostrado una sensibilidad del 100%, además tienen una ventaja y es que con poca cantidad de DNA de la bacteria se puede diagnosticar la infección, tampoco se necesita de la existencia de bacterias vivas o viables en la muestra (15,21).

La brucelosis es una infección, transmitida por la bacteria Gram negativa *Brucella* sp, causa aborto e infertilidad en animales y en humanos y es una enfermedad de larga duración (22). En los EEUU se presentan aproximadamente 100 casos por año (23), aunque el sub-registro se considera alto se estima que se pueden presentar 500.000 nuevas infecciones al año en el mundo (24). En Colombia los casos de brucelosis humana tales como canis, melitensis y suis no son de notificación obligatoria, además hay desconocimiento del personal de salud sobre la enfermedad y pocos métodos diagnósticos disponibles. Se consideran como pruebas de oro el hemo y mielocultivo, pero solo se realizan en laboratorios de referencia. Como prueba tamiz se utiliza la prueba de aglutinación Rosa de Bengala que es específica pero presenta problemas de sensibilidad(25).

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

3) JUSTIFICACIÓN.

Desde el desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se están buscando nuevas alternativas diagnósticas empleando esta técnica para la detección de agentes causales de enfermedades infecciosas, lo que plantea un cambio en la forma como se han realizado hasta el momento los diagnósticos en forma convencional a nivel de laboratorio (9).

El uso de las técnicas de diagnóstico microbiológico convencional, requieren tiempo, infraestructura especializada y personal capacitado para obtener un resultado confiable (11). En algunos casos a pesar de la presencia de síntomas clínicos compatibles con la infección sospechada por el médico tratante, los resultados pueden ser negativos, debido a una mezcla de factores como una baja sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos relacionados con la capacidad de detección solo, como en el caso de los cultivos, de bacterias vivas y no material genómico como en el caso de las pruebas moleculares. (26635),(14,16,20) (36).

La posibilidad de detectar ácidos nucleicos directamente de la muestra clínica, aumenta la rapidez del diagnóstico, además se necesitan pocas copias de este material para obtener un resultado positivo y la bacteria no necesariamente debe estar viable para que estas pruebas sean positivas (37,38) .

Estas pruebas aumentan la oportunidad de diagnóstico y por ser un método de diagnóstico directo, aumentan también la confiabilidad en los resultados. Además disminuyen el tiempo de reporte y ayuda a la pronta recuperación del paciente por el tratamiento oportuno (39) (40).

En cuanto a la PCR múltiple, esta es una prueba que permite detectar el material genético de varios agentes infecciosos de manera simultánea a partir de una misma muestra clínica, lo cual es de gran utilidad cuando los síntomas clínicos son iguales pero el tratamiento es diferente dependiendo del agente causal. La PCR múltiple permite disminuir aún más el tiempo del resultado, identificar el agente causal o co-infecciones, disminuir costos hospitalarios y uso de pruebas que conllevan más tiempo en su realización. (41644).

co-infecciones

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

4) Pregunta de investigación.

¿Cuál es la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-m) para diagnóstico de síndromes febriles bacterianos causados por *Leptospira* sp, *Salmonella* sp y *Brucella* sp, comparada con los métodos convencionales: ¿Rosa de Bengala, Inmunoblot y cultivo?

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

5) Marco teórico.

5.1 *Leptospira sp.*

La leptospirosis es una zoonosis causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. Móvil de 6-20 m de longitud y de 0.1 m de diámetro, son aerobios obligados, cuyo genoma es relativamente grande, con dos cromosomas de aproximadamente 4.3 mega bases y 350 kilo bases, tiene buena capacidad para adaptarse a ambientes extremos y al hospedador (45,46).

Es una antropozoonosis, es decir, una enfermedad que se transmite naturalmente desde los animales vertebrados al ser humano, el reservorio natural son los roedores; el modo de transmisión más frecuente es el contacto cutáneo mucoso con el agua contaminada por la orina de animales infectados, no hay transmisión interhumano (45)

5.1.1 Epidemiología

Hay pocos datos confiables disponibles. Se trata de la primera antropozoonosis del mundo, con estimaciones de más de 1 millón de casos graves al año y asociada a una tasa de mortalidad del 5-20% (47). La mayoría de los casos se diagnostican por serología mediante MAT (prueba de aglutinación microscópica), un predominio del serogrupo Icterohaemorrhagiae (31%), seguido del serogrupo Grippotyphosa (18%), Canicola (7%) y Australis (6%) (48). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay 873.000 casos en todo el mundo cada año con 48.600 muertes.

En Colombia el reporte de casos para *Leptospira* para el año 2015 fue de 696 casos de los cuales Antioquia presentó 201 casos. Entre enero y abril de 2017 el departamento con mayor reporte de casos fue Antioquia con 205 casos (49).

5.1.2 Microbiología.

El género *Leptospira* contiene 21 especies; 9 son consideradas patógenas: *Leptospira interrogans*, *L.kirschneri*, *L.noguchii*, *L.alexanderi*, *L.weilii*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, y *L. kmetyi*. 5 son de patogenicidad intermedia o incierta: *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. licerasiae* y *L. wolffii* y las otras 7 son las

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

especies patógenas de vida libre saprófitos que no infectan huéspedes animales: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*, y *L. idonii* (50).

Leptospira tiene forma de espiral, son espiroquetas aerobias altamente móviles. Se visualizan en el laboratorio mediante microscopio de campo oscuro, tinción de plata o microscopia fluorescente. Se pueden distinguir morfológicamente de otras espiroquetas por su único gancho en forma de "signo de interrogación" al final de la bacteria (40).

5.1..3 Manifestaciones clínicas.

Algunos cursan como casos leves y auto-limitados o subclínicos, mientras que otros son graves y potencialmente mortales. La enfermedad se presenta con la aparición repentina de fiebre, escalofríos, mialgias y dolor de cabeza en el 75 a 100 por ciento de los pacientes, tras un periodo de incubación de 2 a 26 días (promedio de 10 días). La leptospirosis se puede complicar por el daño hepático e insuficiencia renal ("enfermedad de Weil"), hemorragia pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), miocarditis, rabdomiolisis y uveítis (9,47,51).

5.1..4 Diagnóstico.

5.1..5 Serología.

Las pruebas serológicas son las más empleada para el diagnóstico de leptospirosis, por lo general se realiza una prueba de detección serológica como ELISA o Inmuno Fluorescencia Indirecta (IFI), y en caso de resultar positiva, se confirma con la técnica de referencia que es la aglutinación microscopica (MAT). Los anticuerpos de clase IgM son detectables a partir de la sexta semana desde el inicio de la enfermedad y se mantienen hasta 2-6 meses. Los anticuerpos de clase IgG aparecen más tarde y son circulantes durante años. Sin embargo, la interpretación de la serología es difícil, ya que el primer resultado es negativo en cerca del 50% de las veces y puede seguir siendo negativo en caso de tratamiento precoz con antibióticos. La serología negativa no excluye el diagnóstico y debe repetirse de 15 días a 3 semanas más tarde (9,47).

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

5.1..6 MAT.

La técnica de referencia es la prueba de aglutinación microscópica (MAT, por sus siglas en inglés). Consiste en incubar el suero del paciente con diferentes cepas de *Leptospira* y observar aglutinación con diferentes diluciones en el microscopio de campo oscuro (8,9,47). Se puede utilizar a partir del octavo día del inicio de los síntomas. Detecta anticuerpos tipo IgM e IgG. Entre las ventajas que presenta esta técnica están: especificidad cercana al 100%, es cuantitativa pues determina el título de anticuerpos y permite identificar el serovar contra el cual se produjeron los anticuerpos.(7,47,51).

5.1..7 ELISA.

Esta técnica es mucho más sencilla de realizar que el MAT y, en la práctica, se suele emplear como prueba de detección inicial. Las técnicas detectan todos los anticuerpos IgM anti leptospira, el título umbral de positividad está fijado en 400. Según los estudios publicados, la sensibilidad de esta técnica es mayor si se realiza después de 7 días del inicio de la enfermedad y varía del 75 al 100%, y la especificidad varía del 78 al 97,57%.(47).

5.1..8 Reacción en cadena de la polimerasa.

La sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de DNA de *Leptospira* en sangre es del 96,4 %-100%; la especificidad de la técnica es del 96 % -100% (47,52,53).

5.2 *Salmonella* sp.

Las salmonelosis producidas por bacterias del género *Salmonella*, pueden producir fiebre tifoidea y paratifoidea o infecciones no tifoideas, producidas por diversos serotipos de *Salmonella* y que tienen una epidemiología y un cuadro clínico distintos (45,54,55).

5.2..1 Epidemiología.

Se reportan 17 millones de casos anuales y 600.000 fallecimientos según los datos mundiales más recientes (incidencia: 730 casos/100.000, frente a 0,2 casos/100.000 en los países de clima templado (56,57)En las regiones más afectadas, la máxima incidencia se

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

produce en niños y adolescentes de 4-19 años de edad. En los países industrializados, la presentación de casos es infrecuentes y esporádicos siendo la mayoría casos importados después de un viaje a una zona endémica.

En Colombia el reporte de casos para *S. Typhi* para el año 2015 fue de 291 casos confirmados, en Antioquia se reportaron 91 casos.(49,54).

5.2..2 Microbiología.

Salmonella es un bacilo Gram negativo, móvil debido a la presencia de flagelos, anaerobios, con una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C y que cuentan con capacidad para fermentar la glucosa pero no la lactosa (58).

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacterias intracelulares facultativas provistas de flagelos (antígeno H) y una pared con una endotoxina (antígeno O).

Salmonella Typhi y Paratyphi pueden tener un antígeno capsular (antígeno Vi) útil para la vacunación. El género *Salmonella* incluye dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La especie *Salmonella enterica* comprende seis subespecies, que a su vez se subdividen en numerosos serotipos (más de 2.500 conocidos hasta el momento) (54)

5.2..3 Manifestaciones clínicas.

Produce varios cuadros clínicos, dependiendo del serotipo. Cursa con un periodo de incubación de 7 a 28 días, asociado a dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal y diarrea, erupción maculo-papulosa en pecho y espalda. Los enfermos presentan un período de convalecencia entre 1 y 8 semanas y las personas curadas pueden eliminar *Salmonella* por materia fecal y se convierten en reservorios de la infección.(45,59661).

5.2..4 Diagnóstico.

Anteriormente se utilizaban pruebas serológicas como la prueba de Widal que detectaba anticuerpos aglutinantes contra los antígenos O y H de *S. Typhi*. La prueba de Widal fue desarrollada hace más de un siglo, pero presenta importantes limitaciones en su sensibilidad y especificidad, así como en su fiabilidad por lo cual está en desuso y no se recomienda como prueba diagnóstica pues tiene una especificidad baja (50-70%) y no tiene la

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

capacidad de diferenciar entre una infección activa o la vacunación previa (62). Se han desarrollado otras pruebas serológicas de diagnóstico rápido para la fiebre entérica. Las principales pruebas comercializadas son la prueba IDL Tubex y la prueba Typhidot (14). diversos estudios sugieren que la sensibilidad de la IDL Tubex es aproximadamente del 70% al80%, con una especificidad del 80% al90% cuando se evalúan controles compuestos por pacientes con hemocultivos positivos para fiebre tifoidea frente a otras causas conocidas de bacteriemia (55,60)

Aunque son menos sensibles que los hemocultivos, los cultivos de heces son positivos en más del 50% de los niños y el 30% de los adultos con fiebre entérica, y aumentan el rendimiento diagnóstico sobre los hemocultivos por sí solos en aproximadamente un 5%. El cultivo de médula ósea tiene la mayor sensibilidad (80-95%) de todos los métodos bacteriológicos, de forma que en el adulto el cultivo de un aspirado de 1 ml de médula ósea tiene la misma sensibilidad que el cultivo de 15 ml de sangre periférica(63).

Las pruebas de diagnóstico molecular basadas en la detección de ácidos nucleicos han tenido un éxito desigual y limitado, probablemente debido a la baja bacteremia que dificulta la obtención de cultivos, así como a la acción de inhibidores presentes en la sangre humana; estas pruebas no están comercializadas en la actualidad (55,64,65).

5.3 *Brucella sp.*

La infección por las bacterias del género *Brucella* se transmite a los humanos a partir de animales como consecuencia de exposición ocupacional o ingestión de productos de origen animal contaminados. A pesar de intentar instaurar unas medidas de control eficaces, la brucelosis sigue siendo una carga significativa, tanto en términos de salud como de economía en muchos países.(66ó68).

5.3.1 Epidemiología.

Cada año se reportan más de 500.000 casos de brucelosis a la Organización Mundial de la Salud a partir de 100 países. *Brucella melitensis* la de mayor número de casos con mayor predominancia en el mediterráneo, Iberoamérica entre otros, (23,66,68ó77).

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

5.3..2 Microbiología.

Brucella es un cocobacilo Gram negativo de crecimiento intra y extracelular, que mide 0,6-1,5 μm de longitud. Esta bacteria, que infecta a los macrófagos, carece de cápsula, de flagelo y de plásmido nativo. Su principal factor de virulencia es un lipopolisacárido de membrana. Las cepas con lipopolisacárido liso (S-LPS) son más virulentas y resistentes a la destrucción intracelular por los polimorfo nucleares que el fenotipo rugoso (R-LPS) presente en la membrana de *B. canis* y *B. ovis* (78).

Tradicionalmente, el género *Brucella* constaba de seis especies reconocidas, agrupadas de acuerdo con sus preferencias de huésped primario, es decir, *B. abortus*, ganado; *B. melitensis*, ovejas y cabras; *B. suis*, cerdos; *B. ovis*, ovejas; *B. canis*, los perros; y *B. neotomae*, ratas del desierto madera. Aislamientos recientes de humano (*B. inopinata*), mamíferos acuáticos (*B. pinnipedialis* y *B. Ceti*), y un ratón de campo común (*B. microti*) son reconocidos como nuevas especies, por lo que 10 es el número actual de especies reconocidas en el género.(23,66,69-73).

5.3..3 Manifestaciones clínicas.

Clínicamente, la brucelosis humana puede dividirse, en enfermedad subclínica, enfermedad aguda o subaguda, enfermedad circunscrita y complicaciones, infección recidivante y enfermedad crónica(77,79-83). El inicio de las manifestaciones clínicas de la forma aguda se caracteriza por cefalea, fiebre, artralgias, mialgias y diaforesis (sudoración profusa) de predominio nocturno. Aproximadamente el 50% de los pacientes tiene un cuadro clínico con comienzo abrupto durante días, mientras que el resto tiene un comienzo insidioso durante semanas. Los síntomas de la brucelosis son inespecíficos. Más del 90% de los pacientes experimenta malestar, escalofríos, sudoración, fatiga y debilidad. Más del 50% de los pacientes presenta mialgia, anorexia y pérdida de peso. Un menor número de pacientes manifiesta artralgias, tos, dolor testicular, disuria, dolor ocular o vista borrosa. Igualmente, son escasos los signos físicos manifiestos. La fiebre, con una temperatura con frecuencia mayor de 39,4 °C, se da en el 95% de los pacientes. (24,67,84-90).

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

5.3..4 Diagnóstico.

Esta infección se diagnostica generalmente mediante la detección de anticuerpos específicos contra *Brucella* en sangre por seroaglutinación. También por aislamiento del patógeno mediante hemocultivo (91). Otros métodos incluyen variedad de métodos serológicos que permiten la detección de anticuerpos contra los componentes de la pared celular o algunas proteínas citoplásmicas, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Prueba de Coombs, inmunocaptura de aglutinación (Brucellacapt) y para cepas rugosas como *Brucella canis*, la aglutinación rápida en placa con 2-mercaptoetano (2ME-PARP) (92) (93) (94696).

Coinfecciones.

Ya que los estudios de coinfecciones en la población sobre los tres agentes no hay poca evidencia el cual se encuentran algunos entre *Salmonella* con *Brucella* y *Leptospira* y *Brucella*

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

6) Objetivo general.

Evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-m) para diagnóstico de síndromes febriles bacterianos causados por *Leptospira* sp, *Salmonella* sp y *Brucella* sp, comparada con los métodos convencionales: PCR, Inmunoblot, cultivo y Rosa de Bengala, Antioquia 2015-2016.

6.1 Objetivos específicos.

1. Determinar la frecuencia de *Leptospira* sp., *Salmonella* sp. y *Brucella* sp. En la población de estudio según características sociodemográficas, presencia o no de fiebre y tiempo de evolución de la enfermedad.
2. Determinar la presencia de co-infecciones por estos agentes infecciosos según características sociodemográficas, presencia o no de fiebre y tiempo de evolución de la enfermedad.
3. Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la PCR-m frente a pruebas convencionales.
4. Identificar la utilidad clínica de la PCR-m a través de la razón de verosimilitud positiva y negativa y la probabilidad a posteriori de infección por *Leptospira* sp., *Salmonella* sp. y/o *Brucella* sp.

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.

Antioquia /Chocó2015-2016

7) Metodología.

7.1 Enfoque metodológico de la investigación.

Se realizó una investigación cuantitativa porque implicó la ejecución de una metodología sistemática con definición previa de objetivos, sujetos de estudio, variables y análisis de información para la obtención de resultados que se pudieron inferir a una población de la cual se obtuvo la muestra, lo cual permitió determinar la sensibilidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, razón de verosimilitud positiva y razón de verosimilitud negativa de la PCR-m frente a pruebas convencionales mediante un estudio prospectivo en población residente en zona endémica.

7.2 Tipo de estudio.

Se realizó un estudio descriptivo transversal con el fin de evaluar la utilidad de una prueba múltiple bajo la metodología de prueba de una prueba, mediante la recolección de información de forma prospectiva.

7.2..1 Descriptivo:

Este estudio fue descriptivo porque relata las características de los sujetos de estudios y el comportamiento de pruebas diagnósticas sin comprobación de hipótesis de causalidad.

7.2..2 Transversal:

Este estudio fue transversal por que la medición de las variables en los sujetos de estudio se hará una sola vez en el tiempo (97).

7.2..3 Prueba de una prueba:

Este estudio fue una prueba de una prueba porque se realizó un proceso a través del cual un individuo o un grupo de individuos fueron clasificados como poseedor o careciente de un determinado atributo (usualmente una enfermedad).

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

7.3 Área de estudio.

El estudio se realizó en el municipio de Apartadó (Antioquia), localizado en la subregión de Urabá en el departamento de Antioquia y en la ciudad de Quibdó (Chocó).

Apartadó es el municipio más importante de la subregión del Urabá, ya que en él se encuentran las sedes de las principales empresas bananeras y comerciales. Limita por el norte y oeste con la ciudad de Turbo, por el este con el departamento de Antioquia y por el sur con el municipio de Carepa. Es el municipio más poblado de la Subregión con 178.257 habitantes, de los cuales 83,4% pertenecen al área urbana (98). Apartadó se divide en 49 barrios urbanos y 4 corregimientos y 57 veredas en la zona rural.

Quibdó es un municipio colombiano, capital del departamento del Chocó y una población total de 115.907 habitantes en la zona urbana y 108.142 habitantes en la zona rural (99).

La parte de procesamiento de muestras y pruebas diagnósticas se llevó a cabo en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT), el cual es un centro de investigación y de referencia de diagnóstico y atención clínica de enfermedades tropicales para el país. Cuenta con dos sedes, la principal ubicada en el municipio de Sabaneta (Antioquia) y otra sede en el municipio de Apartado (Antioquia).

7.4 Población.

La población de estudio hizo parte del proyecto primario -FEBRILPLEX- que se ejecutó en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (Sánchez MM y cols, el cual fue financiado por COLCIENCIAS proyecto 363-2015). En dicho estudio se captaron sujetos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión.

7.5 Criterios de inclusión.

Se incluyeron en el estudio individuos mayores de 2 años de edad, con antecedente de fiebre (medida por termómetro - $>37.5^{\circ}\text{C}$ - o por apreciación subjetiva), en los últimos 6 meses y acompañantes no febriles, que aceptaran participar de manera voluntaria en el estudio.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

7.6 Criterios de exclusión.

Se excluyeron pacientes gravemente enfermos.

7.7 Diseño de la muestra.

7.8 Tamaño de la muestra.

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó en el programa EPIDAT versión 4.0 (Xunta de Galicia, Organización Panamericana de la Salud), para cada agente etiológico (*Leptospira sp*, *Salmonella sp* y *Brucella sp*). Los parámetros estadísticos utilizados fueron los siguientes: se consideró la prevalencia del evento a estudiar y los datos de sensibilidad y especificidad, así como la frecuencia de la infección disponible en la literatura para cada agente infeccioso, en el caso de no disponer de datos se utilizó una prevalencia de la infección del 50% para obtener el máximo del tamaño de muestra Ver Tabla 1.

Tabla 1. Tamaño de la muestra según sensibilidad, especificidad y frecuencia de la infección por agente infeccioso.

Agente infeccioso/ parámetro	<i>Leptospira</i>				<i>Salmonella</i>				<i>Brucella</i>			
	PCR	n	MAT	n	PCR	n	Cultivo	n	PCR	n	Rosa de Bengala	n
Sensibilidad	97%	320	97,50%	443	98%	253	68%	659	97%	90	95,30%	146
Especificidad	99%		55%		99%		95%		99%		95,10%	
Prevalencia de la enfermedad	14%		14%		50%		50%		50%		50%	

Debido a que se tomó una sola muestra para el diagnóstico de estos tres agentes infecciosos se optó por la muestra de 443 sujetos y no la de mayor tamaño de 659 debido a la imposibilidad logística, ya que la prevalencia de los otros agentes infecciosos es baja, y que

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

hay limitación en la notificación y subregistros de los datos de diagnóstico. Tampoco se tiene información sobre el registro de co-infección con estos tres agentes.

7.9 Selección de la muestra.

La selección de la muestra fue por conveniencia. Los participantes ingresaron al estudio en forma consecutiva hasta completar el tamaño muestral.

7.10 Captación de la población de estudio y toma de muestras.

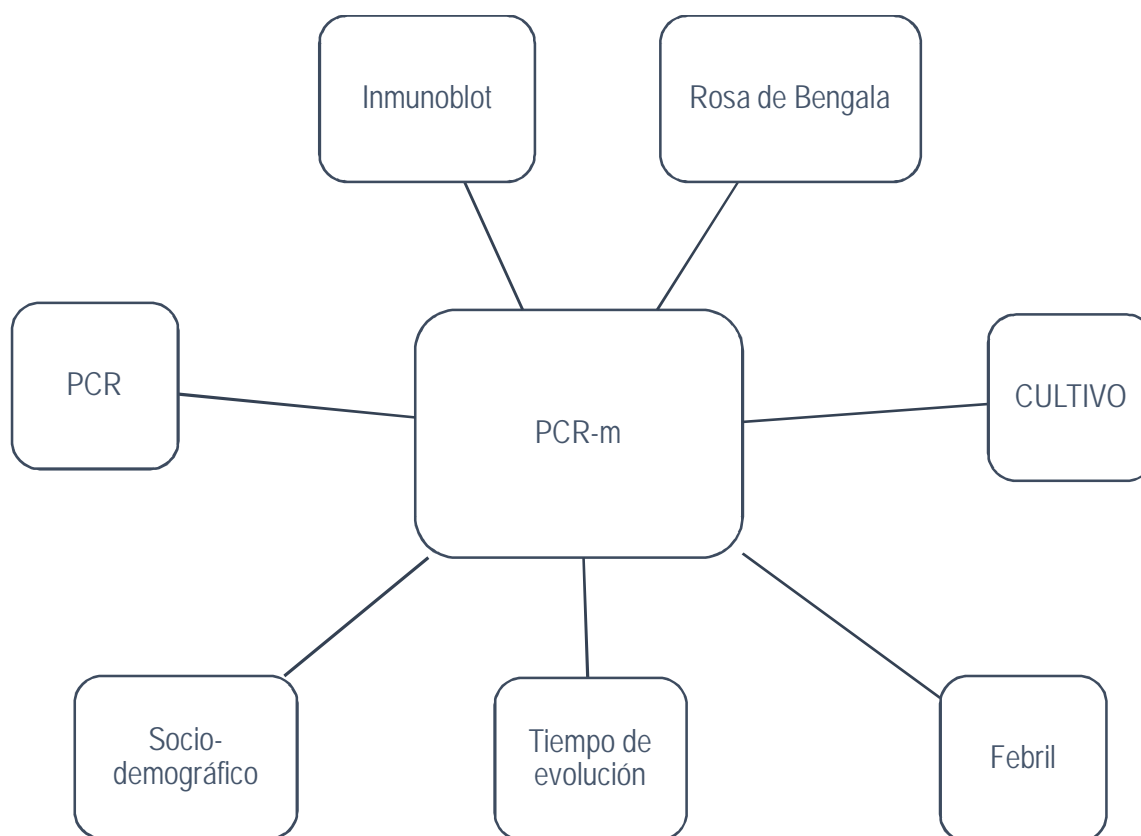
La captación de la población del proyecto -FEBRILPLEXØ se hizo mediante la búsqueda activa en las Instituciones Prestadoras de servicios de Salud (IPS) del municipio de Apartadó, Quibdó y en las sedes del ICMT, de pacientes con síndrome febril en los últimos 6 meses y sus acompañantes, que cumplieron con los criterios de inclusión. También se captaron participantes en los sitios de la zona urbana o rural donde se tuvo conocimiento de presencia de pacientes con síndrome febril.

A las personas que se captaron se les solicitó la firma de un consentimiento informado para su participación en el estudio. A cada participante se le tomaron tres muestras de sangre periférica: una en tubo con citrato, otra en tubo con EDTA de al menos 5 ml cada uno, y otra muestra de 7 ml en tubo seco. Las muestras se enviaron al ICMT conservadas a temperatura de 4°C. Una vez llegaron al ICMT se realizaron los siguientes procedimientos: la muestra con citrato se sembró en medio bifásico Ruiz-Castañeda para hemocultivos, con revisiones durante un mes a 37°C. A la muestra con EDTA se le realizó extracción de DNA, el cual se conservó a -20°C hasta la realización de la PCR. El remanente de la muestra se guardó a 4°C. Las muestras en tubo seco se centrifugaron a 14.000 RPM y las alícuotas de suero resultantes se conservaron a ó 80°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron tomadas por auxiliares de investigación, quienes eran también responsables de diligenciar la encuesta y solicitar la lectura y firma del consentimiento.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

8) Descripción de las Variables.

8.1 Grafico 1. Diagrama de variables.



**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella* abortus.
Antioquia /Chocó2015-2016**

8.2 Tabla 2. Variables.

Nombre	Definición	Dimensión	Naturaleza	Nivel de medición
Fiebre	Aumento de la temperatura corporal por encima de 37.5 °C.	1 Si 2 No	Cualitativa	Nominal
Evolución de la fiebre	Tiempo transcurrido entre la fecha de inicio de síntomas y la fecha de la toma de la muestra	Días	Cuantitativa	Razón
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo a la fecha	Años cumplidos	Cuantitativa	Razón
Sexo	Características genéticas que conllevan a diferencias biológicas que diferencian los individuos en hombre y mujer.	1.Hombre 2. Mujer	Cualitativa	Nominal
Municipio	Municipio de residencia del participante.	Nombre	Cualitativa	Nominal
Barrio	Barrio de residencia del participante.	Nombre	Cualitativa	Nominal
Caso confirmado de <i>Leptospira</i> sp	Caso confirmado por PCR y/o Inmunoblot.	1 Si 2 No	Cualitativa	Nominal
Caso confirmado de <i>Salmonella</i> sp	Caso confirmado por PCR y/o cultivo.	1 Si 2 No	Cualitativa	Nominal
Caso confirmado de <i>Brucella</i> sp	Caso confirmado por PCR y/o Rosa de bengala	1 Si 2 No	Cualitativa	Nominal
Resultado de la PCR -m	Presencia de DNA de <i>Leptospira</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Brucella</i>	1 Si 2 No	Cualitativa	Nominal

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

9) Técnicas de Recolección de Información.

9.1 Fuentes de Información.

A cada participante se le recolectaron datos sociodemográficos, datos clínicos y de diagnóstico etiológico; esta información se obtuvo de fuente primaria, mediante interrogatorio a los participantes y los resultados del diagnóstico etiológico se obtuvieron del procesamiento de las muestras.

9.2 Instrumento de Recolección de Información.

Se elaboró un formulario con variables sociodemográficas (edad, sexo, departamento, municipio y barrio de procedencia), datos clínicos (antecedentes de fiebre, días de evolución de la fiebre y diagnóstico etiológico según técnica de laboratorio utilizada), fecha de toma de muestra y fecha del diligenciamiento del formulario. (Anexo1).

9.3 Control de errores y sesgos.

El estudio puede tener sesgo en la selección de los participantes porque es un muestreo por conveniencia en el que los participantes actuaron de manera voluntaria (sesgo de voluntariado). Los sesgos de información fueron controlados con un adecuado diseño del formulario con personal capacitado para su diligenciamiento. Las técnicas de laboratorio fueron realizadas por personal idóneo previamente capacitado. Las bases de datos se digitaron por los investigadores con doble entrada de los datos.

9.4 Pruebas de laboratorio.

9.5 Pruebas convencionales.

Se realizaron hemocultivos en medio bifásico Ruiz Castañeda a 37°C con seguimientos hasta por 2 meses para identificar la presencia de *Brucella* sp o *Salmonella* sp; También se realizó Rosa de bengala para detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*, se realizó gota gruesa para descartar malaria como causante del cuadro febril o para determinar si había co-infección; adicionalmente se realizaron pruebas de Inmunoblot para confirmar la

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

infección por *Leptospira* sp e Inmunoblot para detectar la presencia de anticuerpos IgG o IgM para los tres agentes.

9.6 PCR múltiple.

9.6.1. Extracción: el proceso de extracción de DNA se realizó con el estuche comercial Quick-DNA ó Universal Kit de Zymo Research (Irving, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 200 microlitros (µl) de sangre total con 200 µl de buffer de lisis de fluidos biológicos más 20 µl de proteinasa K, se incubó la mezcla a 55°C por 10 minutos, luego adicionaron 25 u µl de buffer de unión genómica y posteriormente se transfirió la muestra a las columnas con tubos y se centrifugaron a 12.000 revoluciones por minuto (RPM) por 1 minuto; luego se adicionaron 400 µl de DNA buffer de pre-lavado en una columna nueva y se centrifugó por 1 minuto, posteriormente se adicionaron 700 µl de buffer de lavado de DNA . Finalmente se centrifugó por 1 minuto en un tubo nuevo y se obtuvo el DNA, al cual Se le determinó la pureza y concentración mediante lectura de la densidad óptica en una relación de absorbancia 260/280 en el equipo Nanodrop.

9.6.2. PCR: el proceso de amplificación se realizó tomando como volumen final de la reacción 30 µl, para esto se mezclaron: 23 µl de supermix Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), 4 µl de DNA, 0.5 µl de cada uno de los 6 cebadores (concentración de 10 µM cada uno), para un total de 3 µl de la mezcla de cebadores.

En la Tabla 3 se observan los cebadores que se utilizaron en esta prueba múltiple, los cuales fueron desarrollados por investigadoras del ICMT en trabajos previos. Se usaron como controles positivos DNA extraído de cepas de *Salmonella*, *Leptospira* y *Brucella*, y se usó como control negativo agua estéril ultra purificada.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca C1000 Thermal cycler (BIO RAD, Hercules, CA, USA), siguiendo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, posteriormente 35 ciclos con 3 pasos: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, anillamiento de los cebadores a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

minuto; posteriormente un ciclo de adicional de extensión a 72°C por 5 minutos y un ciclo extra a 4°C en forma indefinida.

9.6.3. Electroforesis: la visualización de los amplificadores se realizó por medio de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio 10 mg/ml, se dejó correr en cámara de electroforesis a 100 voltios por 90 minutos, posteriormente se adquirieron las imágenes utilizando un EpiChemi Darkroom (UV, Upland, USA).

Tabla 3. Cebadores utilizados en la prueba PCR múltiple.

Agente	CEBADORES		Amplicones	Referencia
<i>Brucella abortus</i>	F	TGCAGCTCACGGATAATTTG	783 pb ORF BruAb2_0168	Sánchez-Jiménez MM, Cardona-Castro N. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (2): 73-82.
	R	ACACCTTGTCACGCTCAC		
<i>Salmonella</i> Typhi	F	GCGTTGGGAGTGTGGTCTAT	181 pb Grupo D	Muñoz N et al. Journal of Molecular Diagnostic. 2010; 12 (2): 220-25.
	R	AATGGGCAGTATTGCTACCG		
<i>Leptospira</i> sp.	F	CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT	401 pb LipL32/270F-R 260	Moreno N, Agudelo -Flórez P. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(4): 548-56
	R	CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT		

Adicionalmente se realizaron pruebas de PCR individual para cada uno de los agentes infecciosos para comparar cómo se comportaba la PCR múltiple frente a la PCR individual. En la PCR individual se utilizó el mismo DNA extraído para la PCR múltiple, la variación se presentó en el protocolo de PCR pues se realizaron PCR's individuales en las cuales se usaron:

Tabla 4. Cebadores utilizados en la prueba de PCR individual.

Agente	CEBADORES		Amplicones	Referencia
<i>Brucella abortus</i>	F	TGCAGCTCACGGATAATTTG	461 pb UgpA	Sánchez-Jiménez MM, Cardona-Castro N. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (2): 73-82.
	R	ACACCTTGTCACGCTCAC		
<i>Salmonella</i> Typhi	F	GCGTTGGGAGTGTGGTCTAT	450 pb InvA	Muñoz N et al. Journal of Molecular Diagnostic. 2010; 12 (2): 220-25.
	R	AATGGGCAGTATTGCTACCG		
<i>Leptospira</i> sp.	F	CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT	401 pb LipL32/270F-R 260	Moreno N, Agudelo -Flórez P. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(4): 548-56
	R	CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT		

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

También se utilizó el mismo protocolo de amplificación con variación en la temperatura de anillamiento: 57°C, 67°C y 58°C para *Leptospira*, *Salmonella* y *Brucella* respectivamente. Posteriormente, se realizó un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y se determinó la presencia de amplificación en un transiluminador. Se obtuvo la imagen del gel con un analizador de imágenes.

9.7 Hemocultivos

Cinco mililitros de las muestras de sangre inoculadas con *B. abortus*, se sembraron en el medio bifásico Ruiz- Castañeda (tripticase soya agar y tripticase soya caldo). Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% y se revisaron periódicamente para detectar crecimiento por turbidez o hemólisis, momentos en los que se repicaron en agar sangre. Si los cultivos después de una semana permanecían negativos, se realizaban repiques ciegos a los 10, 20 y 30 días.

9.8 Inmunoblot

Se realizó Inmunoblot® a todas las muestras para la detección de anticuerpos tipo IgG e IgM, utilizando tiras de nitrocelulosa que contenían como antígenos proteínas recombinantes de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp y *Brucella* sp. Estas pruebas fueron realizadas por la bacterióloga Lizet Uribe en el marco del proyecto Inmunotropic®,

El resultado fue reportado como positivo o negativo por la presencia de bandas inmunorreactivas detectadas visualmente. Se buscaron anticuerpos para una proteína de 54 kDa en el caso de *Brucella* sp, 43 kDa para *Salmonella* Typhi, y para *Leptospira* sp de 29 kDa. Se consideraron positivos anticuerpos ig G o IgM para *Leptospira* sp. y solo IgM para *Salmonella* Typhi y *Brucella* sp.

9.9 Rosa de Bengala

Se realizó Rosa de Bengala (aglutinación) como prueba tamiz para detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*. (Realizado por laboratorio clínico ICMT-CES)

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

9.10 Gota Gruesa

A cada una de las muestras se les realizó gota gruesa para descartar la presencia de malaria. (Realizado por laboratorio clínico ICMT-CES)

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella* abortus.
Antioquia /Chocó2015-2016**

10) Técnicas de procesamiento y análisis de los datos.

Para hacer el análisis de los resultados los pacientes se dividieron en varios grupos dependiendo de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas diagnósticas: Pacientes que fueron positivos para *Salmonella* sp, *Leptospira* sp y *Brucella* sp. Pacientes con gota gruesa positiva y sin co-infección bacteriana, que se incluyeron en el grupo de pacientes negativos, pacientes que viven en la zona del estudio y no están enfermos que se consideraron como verdaderos negativos. Los resultados de los participantes para cada una de las pruebas se consignaron en una base de datos que se elaboró en Microsoft Excel versión 2016. El procesamiento de la información se realizó en el programa Statistical Package for the Social Science SPSS (SPSS versión 21, Inc.01., Chicago, ILL) y en EPIDAT versión 4 y se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo y sus respectivos intervalos de confianza del 95% de la PCR-m frente a las pruebas convencionales.

Se determinó también la frecuencia de *Leptospira* sp, *Salmonella* sp y *Brucella* sp en la población de estudio según características socio-demográficas, presencia o no de fiebre y tiempo de evolución de la enfermedad.

Se realizó un análisis univariado para describir las características generales, clínicas y de diagnóstico de los participantes utilizando medidas de frecuencia absoluta y relativa para variables cualitativas y tendencia central (promedio), medidas de posición (mediana) y rango para variables cuantitativas. También se realizó un análisis univariado que permitió comparar las características sociodemográficas y clínicas de los participantes según la presencia o no de los agentes infecciosos estudiados. Las diferencias entre grupos (con presencia o no del agente etiológico) para variables cualitativas se calculó mediante la prueba chi cuadrado con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Se determinó también la presencia de co-infecciones por estos agentes infecciosos según características las socio-demográficas, presencia o no de fiebre y tiempo de evolución de la enfermedad. Se realizó un análisis univariado que permitió describir las presencia de co-infecciones de estos tres agentes infecciosos utilizando medidas de frecuencia absoluta y relativa para variables cualitativas y tendencia central (promedio), medidas de dispersión (desviación estándar) medidas de posición (mediana) y rango para variables cuantitativas.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Se comprobó la utilidad clínica de la PCR-m a través del cálculo de la razón de verosimilitud y la probabilidad a posteriori de infección por *Leptospira* sp, *Salmonella* sp y/o *Brucella* sp. Se calcularon las razones de verosimilitud positiva y negativa y sus respectivos intervalos de confianza del 95%.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

11) Plan de divulgación de los resultados.

Los resultados de este estudio fueron socializados al personal de salud y a las directivas de salud del municipio de Apartadó. Se elaborará un artículo para una revista nacional.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

12) Consideraciones Éticas.

El proyecto FEBRIL PLEX, del cual este estudio hizo parte, fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical, según consta en comunicado del 12 de marzo de 2015 en la que se describe que el proyecto cumple con los requisitos establecidos en la RESOLUCION No. 008430 DE 1993 (4 DE OCTUBRE DE 1993) del Ministerio de Salud, en la cual se estipula en el artículo 11 que la presente investigación es considerada de riesgo mínimo porque implicaba solo la toma de muestras de sangre a los participantes y ningún otro procedimiento adicional. También cumplió con los principios establecidos en la declaración de Helsinki de la 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008. A cada participante o a un tutor, cuando fueron menores de edad, se le solicitó consentimiento informado y escrito, previa información clara sobre el estudio. Los participantes tuvieron la libertad de retirarse del estudio en cualquier momento sin tener objeción por parte de los investigadores, los exámenes de laboratorio fueron gratuitos y los resultados se le entregaron al participante para que acudiera a su institución prestadora de salud correspondiente para el tratamiento específico de cada enfermedad en caso de ser necesario. Se garantizó la confidencialidad de la información a los participantes, las bases de datos y los formularios solo fueron manejados por los investigadores. En ningún momento se divulgaron los nombres de los participantes. No hubo remuneración económica por la participación en este estudio. Los procedimientos de este estudio fueron realizados por personal idóneo.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

13) Resultados.

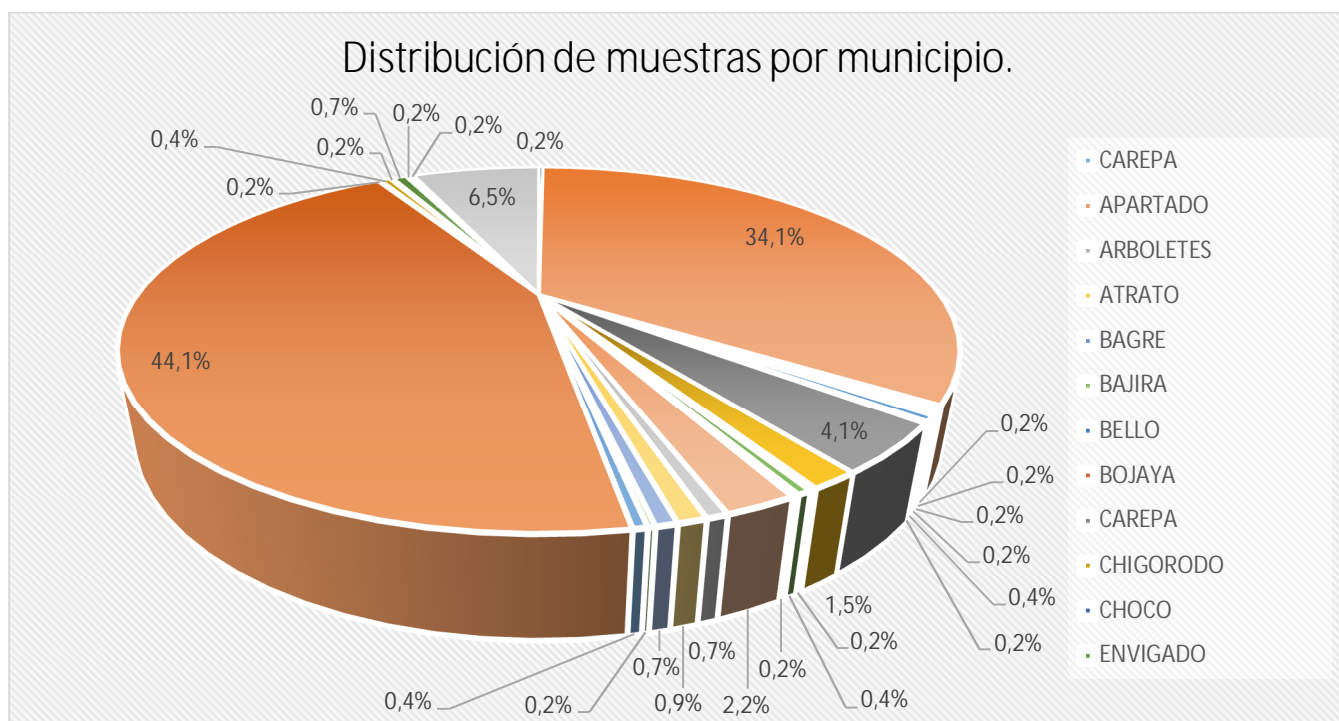
Las enfermedades tropicales son una de las principales causas de síndromes febriles en nuestro país y la mayoría de las veces no se establece un diagnóstico etiológico certero de la infección porque no se cuentan con los métodos para detección de los agentes causales de fiebre tifoidea, dengue, brucelosis, leptospirosis y malaria; la mayoría de los casos de síndrome febriles se quedan sin identificación del agente casual con las implicaciones adicionales de no brindar un adecuado tratamiento a las personas que presentan el síndrome.

El síndrome febril agudo es definido como el estado mórbido con inicio repentino de fiebre, de menos de siete días de evolución, en el cual no se hayan identificado signos o síntomas relacionados con un foco infeccioso. En zonas endémicas para malaria, esta infección es la principal sospecha clínica en los pacientes con cuadros febriles agudos.

Para determinar la frecuencia de *Leptospira sp.*, *Salmonella sp.* y *Brucella sp.* en este estudio se analizaron en total 461 muestras, distribuidas así: 270 muestras de pacientes procedentes del departamento de Antioquia y 191 muestras de pacientes del departamento del Chocó. La distribución por municipios de procedencias se representa en la **Gráfica 2**.

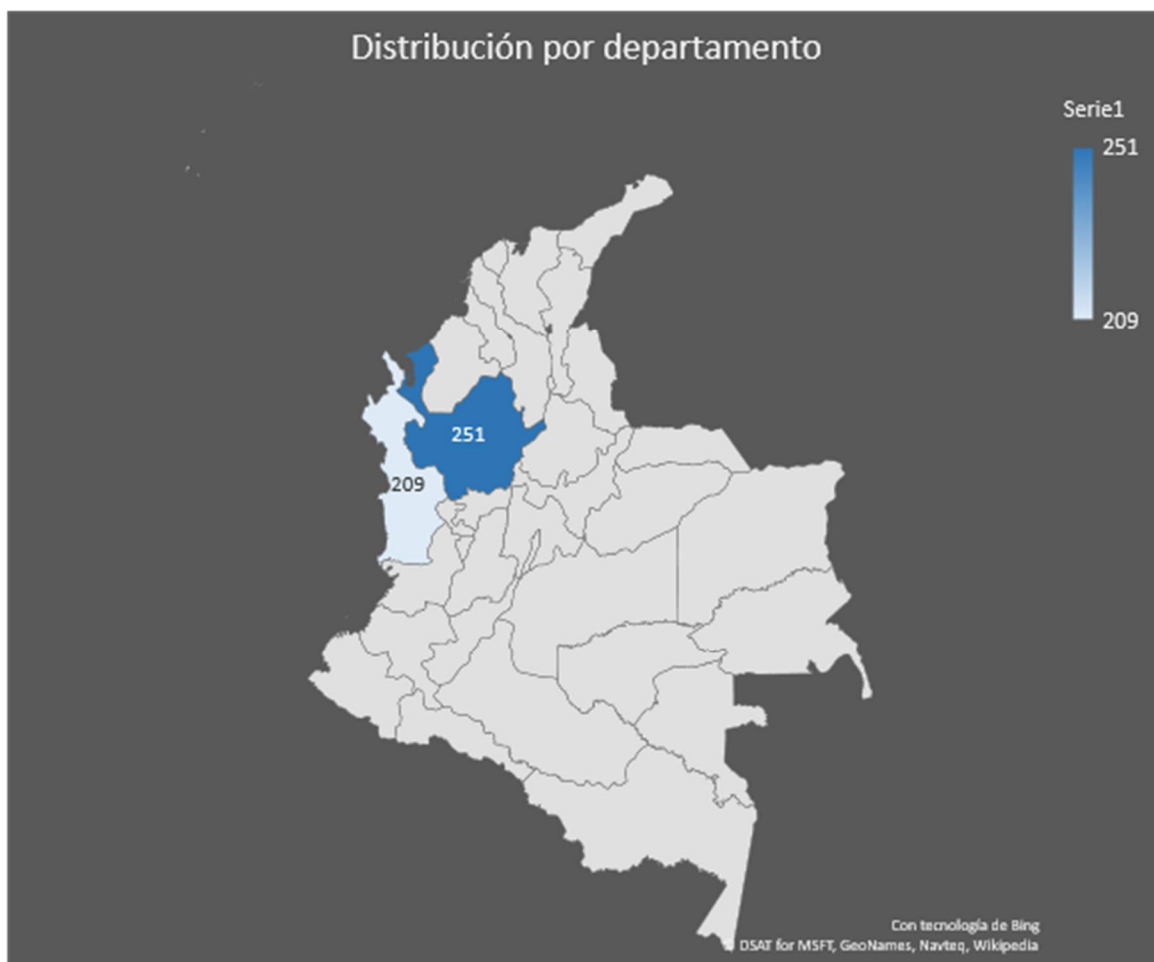
**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

13.1 Grafica # 2. Distribución de muestras por municipio.



Al observar la distribución de muestras por municipios en los cuales se realizó el estudio, se encontró que del número total de 460 pacientes, Apartadó con 157 (39%) casos y Quibdó con 202 (44%) casos, fueron los municipios con mayor número de casos ya que son los sitios donde están los hospitales donde consultan la mayoría de personas de estas regiones.

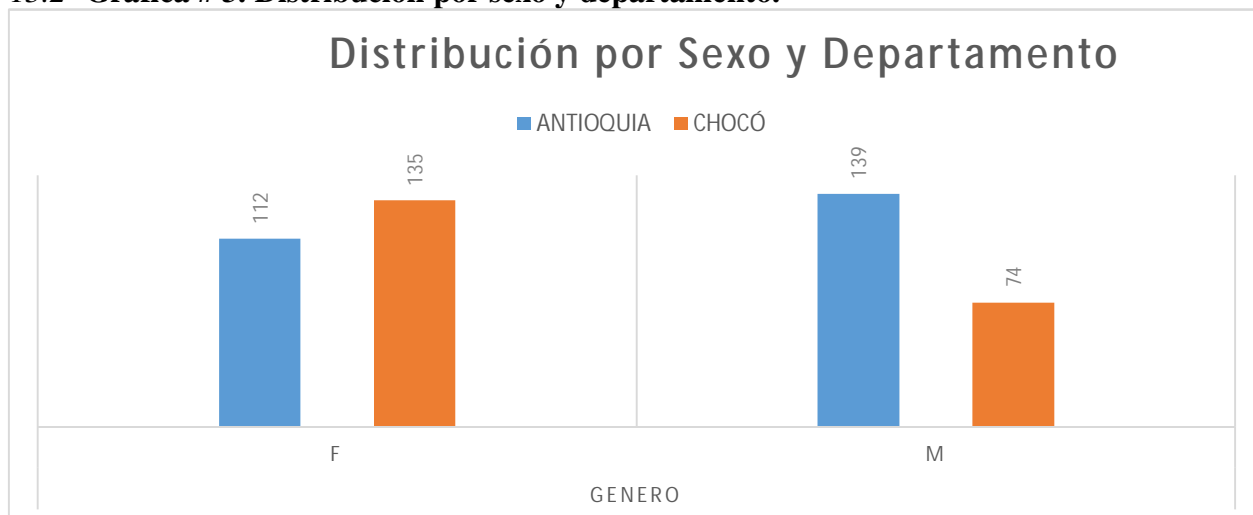
**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**



De acuerdo a las variables sociodemográficas que se evaluaron en este estudio de las 460 muestras clínicas estudiadas, 251 muestras fueron tomadas en Antioquia y 209 en el departamento del chocó.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

13.2 Grafica # 3. Distribución por sexo y departamento.



De las 460 muestras estudiadas el departamento con mayor número de mujeres que participaron en el estudio fue Chocó con 139 (27.5%) casos. En Antioquia fueron más frecuentes los pacientes de sexo masculino con 135 (32.7%) casos.

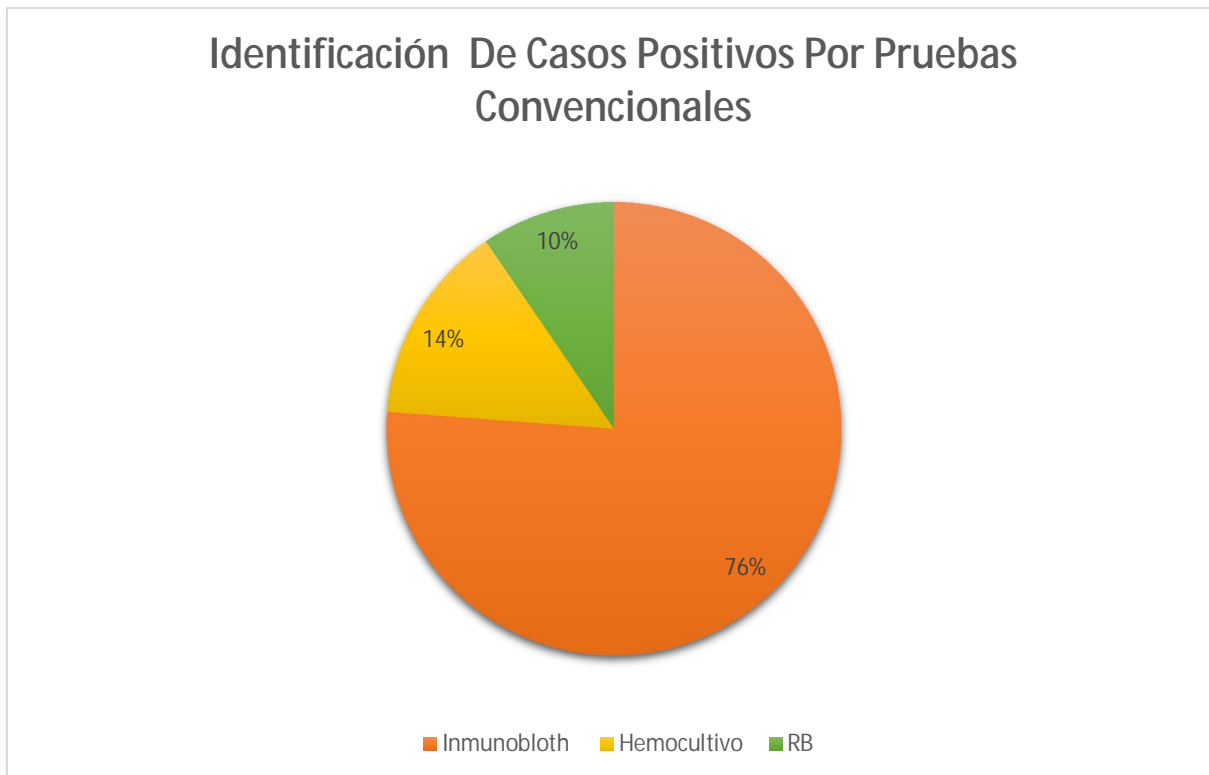
13.3 Identificación de *Leptospira sp*, *Salmonella Typhi* y *Brucella sp* por pruebas diagnósticas convencionales.

Por métodos de diagnóstico convencionales se encontraron los siguientes resultados para los tres agentes en estudio: hemocultivo positivo para *Salmonella Typhi* 9 (2%) muestras y 451 (98%) negativos. Por Inmunoblot, 48 (10%) pacientes fueron positivos y 413 (90%) negativos para anticuerpos tipo IgG contra *Leptospira sp*. Para Rosa de Bengala para *Brucella abortus*, 6 (1%) pacientes fueron positivos y 455 (99%) casos negativos

Grafico # 4.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Grafico # 4. Identificación De Casos Positivos Por Pruebas Convencionales



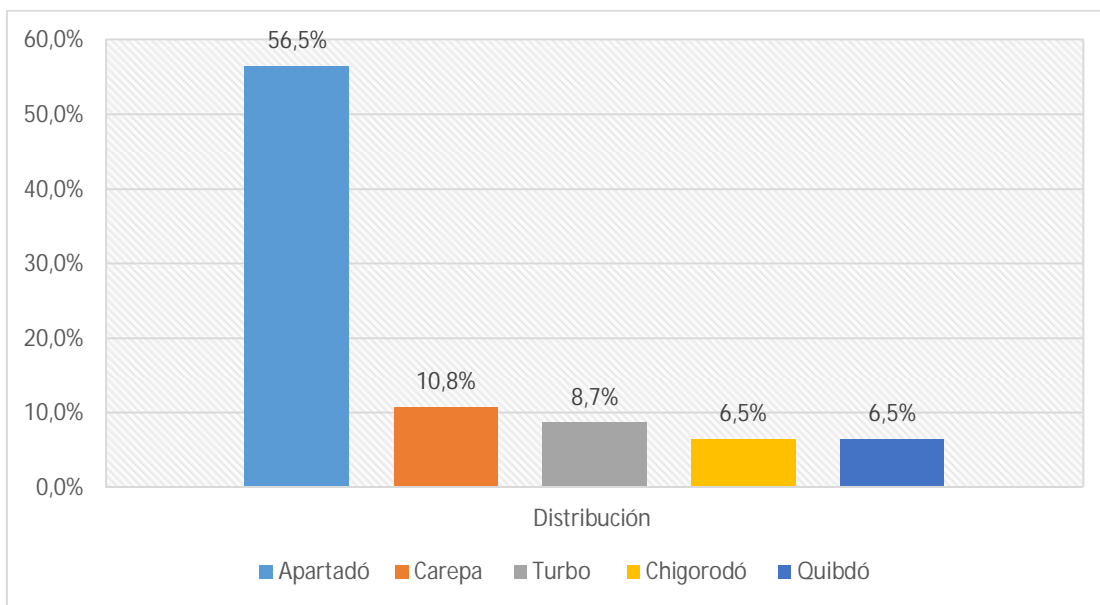
13.4 Resultados obtenidos por los métodos convencionales de acuerdo a las características sociodemográfica de la población.

Para la detección de *Salmonella* sp en los pacientes febriles se empleó el hemocultivo, del total de pacientes analizados se encontraron 9 (2%) hemocultivos positivos. De estos el 25% eran de sexo masculino y el 75% de sexo femenino. La media de edad de estos pacientes fue de 51 años. El promedio de días con fiebre fue de 6 días. La totalidad de los casos fueron registrados en el departamento de Antioquia y el municipio con mayor cantidad fue Medellín con 3 casos lo que corresponde al 37.5%.los pacientes.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Al aplicar el método Inmunoblot para *Leptospira* sp se encontraron 48 (10%) muestras positivas, de las cuales 18 (39%) pacientes fueron de sexo masculino y 28 (61%) fueron de sexo femenino.

Grafica # 5. Casos de *Leptospira* sp. Determinados por Inmunobloth y lugar de procedencia.



Para la identificación de *Brucella* sp en las muestras analizadas se empleó el método Rosa de bengala. De las 461 muestras analizadas se encontraron 6 (1%) muestras positivas. De estas el 50% correspondió a pacientes de sexo masculino y 50% a pacientes de sexo femenino. La media de edad de estos pacientes fue 25.2 años. El promedio de días con fiebre fue de 7 días. El municipio con mayor cantidad de casos fue Apartadó con 3 casos.

13.5 PCR individual para cada agente.

A cada una de las 461 muestras captadas en los departamentos de Antioquia y Chocó se les realizó PCR individual, siendo positivas para *Salmonella* 67 (15%) muestras, para

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella* abortus.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Leptospira 4 (0.87%) casos positivos y para *Brucella* todas las muestras fueron negativas por la PCR individual.

Del total de 71 (100%) pacientes positivos por PCR individual, el porcentaje fue *Salmonella* Typhi 67 (94%) casos y *Leptospira* sp 4 (6%) casos.

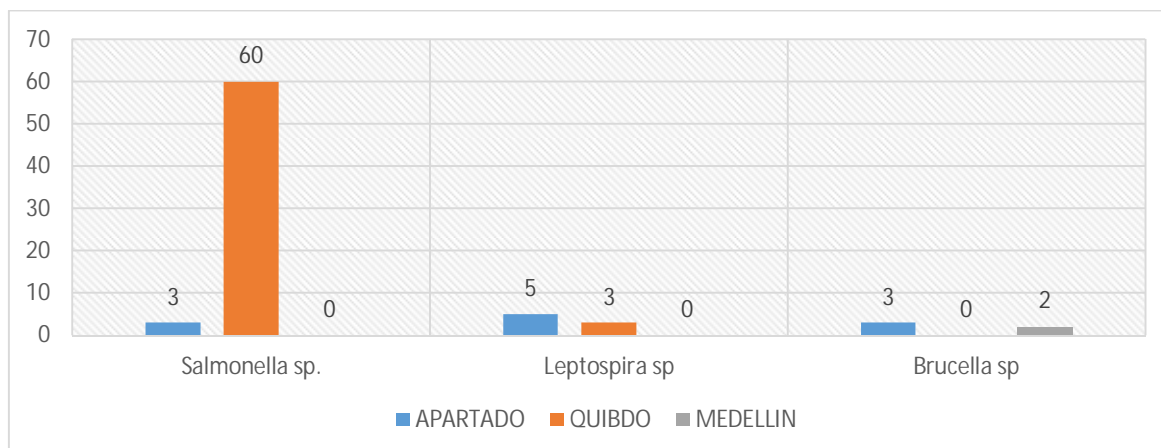
13.6 Tabla # 5. Frecuencia de *Leptospira* sp, *Salmonella* Typhi y *Brucella* sp por PCR individual.

PCR- individual	positivos	%positivos
PCR <i>Salmonella</i>	67	94 %
PCR- <i>Leptospira</i>	4	6%
PCR- <i>Brucella</i>	0	0,00%
Total		100,00%

13.7 Casos positivos PCR-m y lugar de procedencia.

Se aplicó la PCR-m para la identificación de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp y *Brucella* sp en las 461 muestras incluidas en el estudio. En esta, se identificaron 60 (94%) casos positivos para *Salmonella* Typhi, 8 (4%) casos positivos para *Leptospira* sp y 5 (2%) casos positivos para *Brucella* sp distribuidos de la siguiente forma según su lugar de procedencia. **Gráfica 5.**

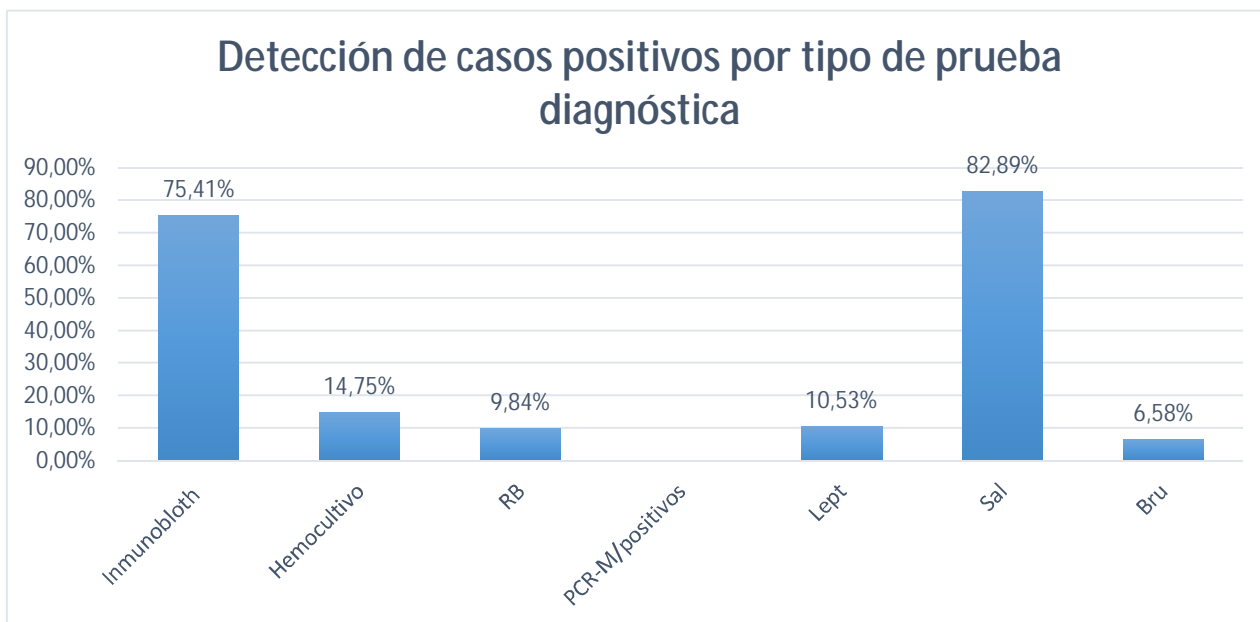
Grafica # 5. Casos positivos PCR-m y lugar de procedencia.



**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella* abortus.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Se compararon los resultados obtenidos en la PCR-m contra los métodos convencionales empleados para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp y *Brucella* sp. En el caso de *Salmonella* sp , se encontró que la PCR-m detectó mayor cantidad de casos positivos en comparación con el hemocultivo, método convencional utilizado para el diagnóstico de esta infección. En cuanto ala identificación de *Leptospira* sp por los dos métodos, se encontró que el método convencional Inmunoblot logro detectar mayor número de casos que la PCR-m. Y para *Brucella* sp solo se encontró variación en un caso detectado de más mediante el método convencional rosa de bengala con respecto a la PCR-m. Estos resultados se representan en la siguiente **Gráfica 6**.

13.8 Grafica # 6. Detección de casos positivos por tipo de prueba diagnóstica.



13.9 Capacidad predictiva de la PCR-m por agente causal

Para determinar la capacidad predictiva de la PCR-m se realizaron tablas de 2x2, para compararla con los métodos convencionales.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Tabla # 6. PCR-m *Salmonella* vs Hemocultivo

Tabla 2x2 Para <i>Salmonella</i> sp	HEMOCULTIVO					
		Positivo	%Positivo	Negativo	%Negativo	Total
PCR m <i>Salmonella</i> .	Positivo	1	2%	62	98%	100%
	Negativo	7	2%	390	98%	100%
	Total	8	2%	452	98%	100%

Se evidencia en la tabla PCR- m *Salmonella* VS Hemocultivo se presentaron 63 pruebas positivas para la PCR ó m de los cuales 1 prueba positiva para PCR- m *Salmonella* VS Hemocultivo (2%), que coincide con los caso positivo del hemocultivos (13%).

Tabla # 7 PCR m *Leptospira* vs Inmunoblot.

Tabla 2x2 Para <i>leptospira</i> sp	INMUNOBLOT					
		Positivo	%Positivo	Negativo	%Negativo	Total
PCR m <i>Leptospira</i>	Positivo	1	12,50%	7	87,50%	100%
	Negativo	45	10,00%	407	90,00%	100%
	Total	46	10,00%	414	90,00%	100%

En la PCR- m *Leptospira* frente al Inmunoblot de los 8 muestras que fueron positivas para PCR ó m se encontró que solo 1 fue positiva para ambas pruebas lo que representa un 87.5% 12.5% eran positivas en las 2 pruebas diagnósticas.

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

Tabla # 8 PCR m *Brucella* VS ROSA DE BENGALA

Tabla 2x2 Para <i>Brucella sp</i>		ROSA DE BENGALA.				
		Positivo	%Positivo	Negativo	%Negativo	Total
<i>PCR m Brucella</i>	Positivo	0	0,00%	5	100%	100%
	Negativo	6	1,30%	449	99%	100%
	Total	6	10,00%	454		100%

En el caso de *Brucella*, 6 muestras fueron positivas por Rosa de Bengala, pero negativas por PCR - m con 5 muestras positivas por PCR- m pero que se encontraban negativas por Rosa de Bengala.

13.10 Tabla # 9. Capacidad predictiva de la PCR-m por agente causal.

Agente	Sensibilidad (IC95%) ³	Especificidad (IC95%) ³	VPP ¹	VPN ²	Prevalencia
<i>Salmonella sp</i>	13% (1 - 53).	87% (83 - 89).	2%	98%	2%
<i>Leptospira sp</i>	2% (0,11 ó 13 %)	98% (96 ó 99 %)	13%	90,0%	10%
<i>Brucella sp</i>	0% (1,6 ó 48)	99% (97 ó 100)	0%	99%	1%

1. **VPP**: valor predictivo positivo. 2. **VPN**: valor predictivo negativo. 3. **IC 95%:** intervalo de confianza del 95%.

Se halló la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y la prevalencia de la enfermedad de acuerdo al método molecular. Los cuales muestran que la prueba tiene una sensibilidad muy baja frente a los métodos convencionales. Los valores obtenidos se representan en la **tabla 9**.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Cuando se realizaron los mismos análisis, pero comparando PCR múltiple frente a PCR individual se encontraron los siguientes valores.

13.11 Co-infecciones determinadas por los métodos aplicados,

Se determinó la presencia de co-infecciones tanto por los métodos convencionales como con la PCR múltiple implementada en el estudio. De las 460 muestras analizadas cuando se aplicó la PCR múltiple se encontró 1 caso de co-infección para *Leptospira* sp y *Salmonella* sp y un caso para *Leptospira* sp y *Brucella* sp equivale (0.2%). Cuando se determinaron las infecciones mediante las pruebas convencionales solo se encontraron 3 (1%) casos de co-infección para *Leptospira* sp y *Brucella* sp equivale al (1%). Todos los casos hallados correspondían a pacientes sintomáticos febriles. En síntesis, la PCR logró detectar un caso de co-infección de *Leptospira* sp y *Salmonella* sp que los métodos convencionales no lograron determinar. Por tanto, son 4 casos de co-infección de los cuales el 66% corresponde a pacientes de sexo masculinos y 33% a pacientes de sexo femenino. En cuanto a la procedencia de los casos, tres pacientes son residentes de departamento de Antioquia y 1 caso es proveniente del departamento del Chocó.

13.12. Tabla # 10. Utilidad clínica de la PCR-m a través de la razón de verosimilitud positiva y negativa y la probabilidad a posteriori de infección por *Leptospira* Sp. *Salmonella* Sp. y *Brucella* Sp.

	Razón de verosimilitud positiva. (IC95%)	Razón de verosimilitud negativa. (IC95%)	Probabilidad de diagnóstico a priori. (IC 95%)	Probabilidad a posteriori negativa (IC 95%)
<i>Salmonella</i> sp.	0,9. (0,14 - 5,1)	1,0 (0,77 - 1,3).	1,6% (0,3 - 8,4%)	1,7% (0,8 ó 3,5)
<i>Leptospira</i> sp.	1,26 (0,16 - 10,2)	1,0 (0,95 - 1,04).	16,4% (2,9 - 56,1%)	1,5% (0,7 - 3,1)
<i>Brucella</i> sp.	0,75 (0,0 - 484,3)	1,0 (0,89 - 1,0)	1,0 (0,0 - 44,3)	1,3 (0,6 ó 2,8)

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

observando los resultados obtenidos en este estudio y ver las razones de probabilidades se evidencia que es una prueba aplicable que tiene validez aunque permitiendo descartar la patología ya que es altamente específica para algunos agentes. que se refleja en la Tabla 10.

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

14) Discusión

Para la identificación de los agentes infecciosos se han desarrollado múltiples pruebas, que son de gran importancia en el ámbito clínico, teniendo en cuenta que algunas necesitan más tiempo para su procesamiento, con muy buenos protocolos de estandarización y un profesional capacitado.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la dificultad de diagnosticar adecuadamente y en forma sensible y específica las infecciones causadas por estos tres agentes, debido a que la disponibilidad de cultivos es limitada en los casos de *Brucella abortus* y *Salmonella Typhi*.

La positividad de los métodos moleculares varía dependiendo de factores como el tiempo de evolución de la enfermedad, estado inmune del paciente y experticia del laboratorio en el procesamiento de este tipo de muestras.

Otra causa posible para la discrepancia de los resultados de la PCR múltiple frente a las pruebas convencionales, podría ser la fase clínica de la enfermedad del paciente.

En casos agudos las pruebas de detección directa del agente funcionan mejor en casos de brucelosis o fiebre tifoidea; pero en casos focalizados de brucelosis, funciona mejor la detección de anticuerpos por Rosa de Bengala que las pruebas directas como PCR y hemocultivo, debido a la intermitencia en la circulación del agente en sangre. En el caso de leptospirosis se conoce que las pruebas serológicas tienen mejores resultados para el diagnóstico de la infección.

Los casos de PCR positiva para *Leptospira* en este trabajo se observaron en pacientes que tenían formas clínicas severas, cuando la bacteria está haciendo bacteremia. Cuando se analizó la frecuencia de estos agentes patógenos en los municipios de estudio, se encontró una alta frecuencia de *Salmonella Typhi* diagnosticada por PCR- m en el departamento del Chocó con 60 casos, con respecto a Antioquia donde solo se encontraron 3 casos.

La alta frecuencia de estos patógenos en el Chocó puede estar asociada a los factores ambientales y socio culturales de la región sin embargo existen muy pocos estudios en el departamento del Chocó que demuestren la frecuencia de *Salmonella sp*

La técnica de PCR-m es una opción que podría tener utilidad en el diagnóstico de estos microorganismos ya que, por la detección de ADN de los agentes de interés, se podrían

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.

Antioquia /Chocó2015-2016

encontrar casos positivos con mayor frecuencia que con los cultivos u otras técnicas convencionales pues las pruebas moleculares no requerirían que el agente este viable como si sucede para la realización de cultivos. (Richtzenhain y col., 2002).

Además, la utilización de cebadores probados con anterioridad en otros estudios, como es el caso de los usados en el presente trabajo, también podría garantizar que la realización de estas pruebas moleculares podría ser exitosa en detectar casos en los cuales el ADN de las bacterias está circulando en la muestra del paciente. Esto también refleja la dificultad de diagnosticar adecuadamente y en forma sensible y específica las infecciones causadas por estos tres agentes, debido a que la disponibilidad de cultivos es limitada en los casos de *Brucella* sp y *Salmonella* sp y la positividad de este método varía dependiendo de factores como el tiempo de evolución de la enfermedad, estado inmune del paciente y experticia del laboratorio en el procesamiento de este tipo de muestras.

En el caso de *Leptospira* sp. se evidenció que las pruebas serológicas como el MAT y la IFI hubieran sido la mejor prueba de comparación, pero en el momento de realización de este trabajo estas pruebas no estuvieron disponibles, por eso se usó el Inmunoblot que presenta una sensibilidad del 96% y una especificada del 88% comparado con IFI para *Leptospira* sp.

Adicionalmente también se evidenció con los resultados de este trabajo que la prueba de PCR individual es la más útil para *Salmonella* Typhi más que el hemocultivo y la PCR múltiple, por lo anotado anteriormente sobre que la prueba molecular detecta ADN y no necesariamente bacterias viables como lo hace el hemocultivo. (Romero y col., 1995; Lavaroni y col., 2004). La especificidad del método ha sido demostrada con los resultados que se encuentran en la **tabla 9**.

Existe el inconveniente relacionado con el almacenamiento o preservación de las muestras, que debe garantizar la viabilidad en el tiempo, se debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza de la muestra permanezca inalterable. El traslado de muestras congeladas es el método preferido para transportar y almacenar grandes colecciones de especies microbianas. Estas condiciones aumentan la complejidad y el riesgo de perder viabilidad de las células para realizar cuantificación mediante la técnica. Por otra parte, la PCR-m es una técnica cualitativa que solo permite indicar presencia o

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella* abortus.
Antioquia /Chocó2015-2016**

ausencia de un determinado fragmento de DNA y por ende asociar la presencia o ausencia de un determinado microorganismo. Que indica que aunque a (Pedraza JG, 2014; Sánchez-Jiménez MM, Cardona-Castro N. 2004) la prueba les dio con alta sensibilidad los mecanismos externos pueden ser los encargados en hacer que la prueba no funcione de manera adecuada dando los resultados esperados. La PCR es poco empleada como herramienta diagnóstica a nivel de campo, a pesar de su reconocida ventaja sobre las pruebas convencionales, hemocultivo, Inmunoblot y la Rosa de Bengala, y a sabiendo la utilidad en fase inicial de la enfermedad donde las pruebas serológicas son poco confiables (Cevallos, y col., 2008).

Por lo que es discutido por múltiples fuentes actualmente, ya que el uso de estas técnicas moleculares pueden tener componentes que no generen unos buenos resultados desde no conseguir material de DNA del agente a estudio, o que los factores que permiten una buena reacción en el proceso de procesamiento se alteren y sean negativos para la realización de este proceso y más cuando se realiza en campo como en nuestro estudio tomando sangre total.

Los resultados de la validación de la prueba mostraron una incongruencia entre el método molecular y el método tradicional de demostrados en las tablas (6-7-8) (n=460). Estos resultados indican altos valores de sensibilidad y especificidad de la nueva prueba molecular desarrollada. (Lelia Lavalett 2009) En nuestro estudio encontramos pacientes positivos tanto por el método convencional como para la PCR-m, se obtuvo un caso positivo tanto por PCR -m como Inmunoblot y uno positivo por PCR -m versus hemocultivo sin embargo para *Brucella* se presentaron casos positivos por métodos convencionales, pero negativos por PCR -m versus rosa de bengala, posiblemente debido a lo descrito por otros autores que la cantidad de sangre fue insuficiente, donde lo dicho por otros investigadores resulta ser positivo ya que han observado que *Brucella* sp, debe estar viable y en una concentración suficiente y requiere de un período de incubación prolongado, porque su crecimiento es lento (De la Rúa, 2006; Kantor y Ritacco, 2006; Mancilla y col., 2006).

El éxito de las pruebas y la pulcritud de los resultados dependerán del cuidado que se tenga en evitar la contaminación. Es obligado el uso de controles positivos y negativos en cada

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

tanda de reacciones (Guevara, 2004). Por esto cuando se analizó la frecuencia de estos agentes patógenos en los municipios de estudio, se encontró una alta frecuencia de *Salmonella* sp. Diagnosticada por PCR- m en el departamento del Chocó con 60 casos, con respecto a Antioquia donde solo se encontraron 3casos. La alta frecuencia de estos patógenos en el Chocó puede estar asociada a los factores ambientales y socio culturales de la región sin embargo existen muy pocos estudios en el departamento del Chocó que demuestren la frecuencia de *Salmonella* sp. (Parra-henao 2010);.

Se han diseñado variaciones de los métodos moleculares, para el diagnóstico de los agentes infecciosos, con alta sensibilidad y especificidad. Dentro de estos se han desarrollado PCR múltiple para diferentes serovares de un solo género entre ellos *Salmonella* sp, *Leptospira* sp y *Brucella* sp. (Ahmed 2012; Kositanont 2007; Selim 2014;Vital-brazil 2010).

Aunque se demostró que la utilidad de la PCR para la detección de múltiples patógenos de manera simultánea, puede verse afectada en su sensibilidad y especificidad por varios factores externos tales como sales biliares, bilirrubina, hemoglobina o derivados, proteasas, polisacáridos complejos y grasa, que intervienen en el funcionamiento de la enzima, o interacción con el cloruro de magnesio o desnaturalizan el DNA. Otros autores sugieren que en el momento de la extracción del de DNA en la muestra, puede que no se obtenga material genético bacteriano. Esto limita esta prueba, y actúa de manera negativa para obtener buena sensibilidad (Lara EB. 2015); (100,101). Algunos autores describen que el límite inferior detección por PCR convencional para *Leptospira* sp, es de 1:10 a 1:1 000000 diluciones, a partir de 120 ng de DNA extraído (99). Para *Salmonella* sp. El límite de detección de DNA extraído a partir de 1: 10 hasta 1: 10⁻⁸ UFC/mL (102). Para *Brucella* sp. El límite inferior detección de DNA extraído es a partir de 3,0x10⁻⁵ UFC/mL (Una 2004).

Por los resultados en esta prueba posiblemente la causa en la limitación diagnóstica pudo haber estado con los mecanismos de transporte ambientales o que el master mix utilizado no sea tan específico para esta PCR-m, ya que las temperaturas utilizadas en el protocolo de estandarización fueron apropiadas al realizar la PCR en el termociclador. Observando e la diferencia como prueba múltiple puede funcionar de manera adecuada para el diagnóstico, hay que tener en cuenta el límite mínimo de detección del patógeno en la

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016

PCR-m, para saber su utilidad como prueba diagnóstica. se ha demostrado por otros autores que la sensibilidad PCR-m es alta siempre se ha utilizado serovares del mismo patógeno o con inóculos controlados en laboratorio y no se ha realizado en muestras clínicas (Moreno N. 2010). Por lo que se ha demostrado que el aumentar el número de primers en una reacción reduce la efectividad de la prueba secuestrando componentes esenciales (Bolívar 2014), es importante saber que las amplificaciones preferenciales son otro reto en el proceso de la PCR múltiple ya que son otro factor que es inevitable cuando se realiza este tipo de prueba (Bolívar 2014).

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

15) Conclusiones.

La prueba de PCR individual es útil para el diagnóstico de los géneros *Salmonella*, *Leptospira* y *Brucella* ya que permite la identificación de los patógenos a nivel de género.

Hay que realizar procesos de optimización de la prueba de PCR múltiple que detecta *Salmonella Typhi*, *Brucella abortus* y *Leptospira sp* para lograr una alta sensibilidad y especificidad.. Donde requieren estudios adicionales para aumentar la sensibilidad de las pruebas y su aplicación en la clínica. Teniendo como referencia que a futuro se planea desarrollar estudios para aplicar estas pruebas con mayor número de muestras distribuidas en la población, mejorando procedimientos como la extracción y purificación de DNA.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

16) Bibliografía.

1. DÍA I, PUESTA L, ZUNINO E, ROLANDO M. Leptospirosis. Puesta al día. 2007;24(3):2206-6.
2. Leptospirosis [Internet]. [cited 2016 Feb 23]. Available from: <http://cmr.asm.org/content/14/2/296>
3. Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelso F, Walteros D, Rodríguez F, et al. [Epidemiological surveillance of human leptospirosis in Colombia, 2007-2011]. Biomédica Rev Del Inst Nac Salud [Internet]. 2013;33 Suppl 1:153660. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652259>
4. Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelso F, Walteros D, Rodríguez F, et al. Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011 [Internet]. Vol. 33, Biomédica. 2013. p. 153660. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1608/2279>
5. Bandara M, Ananda M, Wickramage K, Berger E, Agampodi S. Globalization of leptospirosis through travel and migration. Global Health [Internet]. 2014;10(1):61. Available from: <http://www.globalizationandhealth.com/content/10/1/61>
6. Guerra MA. Leptospirosis: Public health perspectives. Biologicals. 2013;41(5):29567.
7. Schreier S, Doungchawee G, Chadsuthi S, Triampo D, Triampo W. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. Expert Rev Clin Immunol [Internet]. 2013;9(3):263680. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445200>
8. WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO Libr. 2003;45(5):16109.
9. PRO Leptospirosis.
10. Cha MK, Kang C, Kim SH, Cho SY, Ha YE, Wi YM, et al. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2015;38:9611.
11. La UDE. Informe sobre la Salud en el Mundo. 2003;
12. Thong KL, Cheong YM, Puthuchearry S, Koh CL, Pang T. Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.

Antioquia /Chocó2015-2016

electrophoresis. J Clin Microbiol. 1994;32(5):1135-41.

13. Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Le Hello S, Weill F-X, Baggesen DL, Jun S-R, et al. Global Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2016;82(8):2516-26. Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03821-15>
14. Sánchez MM, Cardona-castro NM. Desarrollo y evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la secuencia del gen hila para diagnóstico de fiebre entérica por *Salmonella* spp . Biomédica [Internet]. 2004 [cited 2015 May 24];24(2):194-69. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v24n2/v24n2a10>
15. Diana JE, Pui CF, Son R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella typhi* and *salmonella typhimurium* in fruit juices. Int Food Res J. 2012;19(1):51-66.
16. Saeki EK, Alves J, Bonfante RC, Hirooka EY, De Oliveira TCRM. Multiplex PCR (mPCR) for the Detection of *Salmonella* spp. and the Differentiation of the Typhimurium and Enteritidis Serovars in Chicken Meat. J Food Saf. 2013;33(1):25-39.
17. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Nillian E, Ghazali FM, Cheah YK, et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* in sliced fruits using multiplex PCR. Food Control. 2011;22(2):337-42.
18. Paião FG, Arisitides LGA, Murate LS, Vilas-Bôas GT, Vilas-Boas LA, Shimokomaki M. Detection of *Salmonella* spp, *Salmonella Enteritidis* and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. Brazilian J Microbiol. 2013;44(1):37-41.
19. Silva DSP, Canato T, Magnani M, Alves J, Hirooka EY, de Oliveira TCRM. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella Enteritidis* in food. Int J Food Sci Technol [Internet]. 2011;46(7):1502-67. Available from: <Go to ISI>://000292521300022
20. Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, Lee HS, Jeon WJ, Choi KS, et al. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. J Vet Sci. 2009;10(1):43-51.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

21. Yin Ngan GJ, Ng LM, Lin RTP, Teo JWP. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *Res Microbiol.* 2010;161(4):24368.
22. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel J-P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol Rev.* 2011;240(1):211634.
23. Sauret JM, Vilissova N. Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* [Internet]. 2002;15(5):40166. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12350062>
24. De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *Am J Pathol* [Internet]. 2015;185(6):1505617. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
25. Ulu-Kilic A, Metan G, Alp E. Clinical presentations and diagnosis of brucellosis. *Recent Pat AntiinfectDrug Discov.* 2013;8(15746891X (Print)):34641.
26. Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J Microbiol Methods.* 2006;66(3):538647.
27. Gonzalez Pedraza JB, Sanandres NP, Varela ZS, Aguirre EH, Camacho JV. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Vol. 30, *Salud Uninorte.* 2014. p. 73694.
28. Hoorfar J, Ahrens P, Radstrom P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3429635.
29. Perelle S, Dilasser F, Malorny B, Grout J, Hoorfar J, Fach P. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Mol Cell Probes.* 2004;18(6):409620.
30. Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, Gormley E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol.* 2002;89(1):53660.
31. Moore MM, Feist MD. Real-time PCR method for *Salmonella* spp. targeting the *stn* gene. *J Appl Microbiol.* 2007;102(2):516630.
32. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella*

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

- enteritidis and *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol.* 1999;28(2):11367.
33. Ferretti R, Mannazzu I, Cocolin L, Comi G, Clementi F. Twelve-Hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp . in Food Twelve-Hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp . in Food. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(2):97769.
 34. Zhang G, Brown EW, González-Escalona N. Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):64956501.
 35. Tennant SM, Diallo S, Levy H, Livio S, Sow SO, Tapia M, et al. Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(3).
 36. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):129063.
 37. Medina ML, Medina MG, Merino LA. Myriam Lucrecia Medina 1 , Marcelo Gabriel Medina 2 , Luis Antonio Merino 3 . 1. 2012;21:116622.
 38. Elisa E, Elisa E. diagnóstico molecular : 2007;1668.
 39. Méndez-Alvarez S, Pérez-Roth E. [Multiplex PCR in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]*. 2004 Mar;22(3):1836191; quiz 192. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987539>
 40. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS [Internet]*. 2004 Dec [cited 2016 Apr 12];112(11612):7856807. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1206.x/abstract>
 41. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986694.
 42. Bergkessel M, Guthrie C. Colony PCR. *Methods Enzymol.* 2013;529:2996309.
 43. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome*

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

- Res [Internet]. 1996;6(10):986694. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8908518>
44. Some P, Barrier L, Gualberto J. PCR Protocols. Plant Sci. 2004;167(1):183.
 45. Pegues DA. 225 - Género Salmonella [Internet]. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Elsevier España#241;a, S.L.U.; 2016. 2698-2708 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-84-9022-917-0/00225-0>
 46. Information B. Salmonellosis. 2017;112062.
 47. Abgueguen P. Leptospirosis. EMC - Tratado Med [Internet]. 2014;18(4):1610. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S163654101469228X>
 48. Medrano C, César G, Díaz A, Ernesto R, Dalmau A. Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá *. 2011;(10).
 49. Sanitarias PDE. Contenido La Asamblea de la Salud acuerda un nuevo Programa de Emergencias Sanitarias Notificación. 2016;2016.
 50. Marcos Restrepo-Izasa M, David Botero-Ramos, NoraCardona -Castro. ENFERMEDADES TROPICALES. 1a.edicion. Medellin- Colombia: Editorial CES; 2009. 421 p.
 51. Manifestations C. CHAPTER 323 Leptospirosis. 2016;
 52. Guerra MA. Leptospirosis. J Am Vet Med Assoc [Internet]. 2009;234:430,472-478. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed{&}cmd=Retrieve{&}dopt=AbstractPlus{&}list{&}uids=19222355>
 53. Levett PN. Leptospirosis. Vol. 14, Clinical Microbiology Reviews. 2001. p. 2966 326.
 54. Terrier B, Martinez V. Salmonellosis. EMC - Tratado Med [Internet]. 2006;10(4):16 6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1636541006704020>
 55. Arvanitakis C. Salmonella Infections [Internet]. Twenty Thi. Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi. 2008. 125-138 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00026-1>

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

56. Voetsch AC, Gilder TJ Van, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, et al. FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal Salmonella Infections in the United States. 2004;30333(Suppl 3):127634.
57. Guidelines I. SUBMISSION OF ENTERIC PATHOGENS FROM POSITIVE CIDT SPECIMENS Submission of Enteric Pathogens from Positive Culture-Independent Diagnostic Test Specimens to Public Health Interim Guidelines. 2016;(February):164.
58. Mantenidos T, Cautiverio EN, La EN, Biología EDE. TRABAJO DE GRADO.pdf. 2009;
59. Crump JA. 308 ó Salmonella Infections (Including Enteric Fever) [Internet]. Twenty Fif. Goldman-Cecil Medicine. Elsevier Inc.; 2016. 1971-1975.e2 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455750177003081>
60. Harris JB. 102 - Fiebre entérica y otras causas de fiebre y síntomas abdominales [Internet]. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Elsevier España#241;a, S.L.U.; 2016. 1325-1338 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-84-9022-917-0/00102-5>
61. Bhutta ZA. Chapter 198 ó Salmonella [Internet]. Twentieth. Vol. 2002, Nelson Textbook of Pediatrics. Elsevier Inc.; 2016. 1382-1393.e1 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455775668001988>
62. Zúñiga AEK, Universidad C, Magdalena D. Reacción de Widal - interpretación clínica Widal test - clinical interpretation. 2006;8(2):4064.
63. Eulalia K, Llory J, Julio C, Alvarado J. Hemocultivo , Coprocultivo y Reacción de Widal en la detección de Salmonella Entérica en pacientes con Salmonelosis The use of blood culture , stool culture and Widal test in the detection of Enteric Salmonella in patients with Salmonellosis. (Área 27):215620.
64. Haines CF, Sears CL. Chapter 110 ó Infectious Enteritis and Proctocolitis [Internet]. Tenth Edit. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Elsevier Inc.; 2016. 1896-1929.e8 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455746927001101>
65. Ferri FF. Sarcoidosis. Ferri's Clin Advis 2016 [Internet]. 2016;109761098.e2.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323280471006818>

66. Olsen S, Tatum F. Bovine brucellosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract [Internet]. 2010;26(1):15627, table of contents. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072009001042>
67. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med [Internet]. 2005;352(22):2325636. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930423>
68. Corbel MJ. Brucellosis: An Overview. Emerg Infect Dis. 1997;3(2):213621.
69. Ulug M, Ayaz C, Celen MK. Laboratory-acquired brucellosis. Kuwait Med J. 2013;45(3):23769.
70. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. Vol. 90, Veterinary Microbiology. 2002. p. 71680.
71. Guihot A, Bricaire F, Bossi P. Brucellosis. EMC - Tratado Med [Internet]. 2007;11(1):166. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1636541007706542>
72. Corbel M. Brucellosis in humans and animals. WHO-FAO-OIE [Internet]. 2006;16102. Available from: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>
73. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2007;7(12):775686.
74. Godfroid J. Brucellosis in wildlife. Rev Sci Tech. 2002;21(2):277686.
75. Marcela S, Veterinario M. Brucelosis : Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica) - Brucellosis : Immunity and vaccination (a review). O M P s. 2006;VII:1625.
76. Deqiu S, Donglou X, Jiming Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. Vol. 90, Veterinary Microbiology. 2002. p. 165682.
77. Boon TH, Williams E. DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS. Vol. 296, The Lancet. 1970. p. 51.
78. Lipopolisacárido E, Romero S, Carlos H, Iregui A. El Lipopolisacárido 1. 2010;37645.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

79. Cherry JD, Harrison GJ, Kaplan SL, Hotez PJ, Steinbach WJ, editors. Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. Seventh ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2014. 2 p.
80. Cardona-castro N. Diagnóstico diferencial de las micosis superficiales con enfermedades dermatológicas. Rev CES í [Internet]. 2010;24(1):37652. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3621036.pdf>
81. Brucella B De. 228 - Brucelosis (especies de Brucella) [Internet]. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Elsevier España; 2016. 2724-2729 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-84-9022-917-0/00228-6>
82. Bose KS, Sarma RH. Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 1975 Oct;66(4):117369. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2>
83. Anderson TR, Slotkin TA. Maturation of the adrenal medulla--IV. Effects of morphine. Biochem Pharmacol [Internet]. 1975 Aug;24(16):1469674. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7>
84. Eskandari-Nasab E, Moghadampour M, Sepanj-Nia A. TNF- α -238, -308, -863 polymorphisms, and brucellosis infection. Hum Immunol [Internet]. 2016;77(1):12165. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885915005637>
85. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to Brucella infection: review and future perspective. J Infect Dev Ctries [Internet]. 2015;9(7):6976701. Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/26230118>
86. Cardenal XA. Capítulo © 2012. 2016;204567.
87. Young E. Chapter 128 ó Brucellosis. Feigin Cherry's Textb Pediatr Infect Dis [Internet]. 2014;161161615.e3. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978145571177200128X>
88. Shen MW. Diagnostic and therapeutic challenges of childhood brucellosis in a nonendemic country. Pediatrics [Internet]. 2008;121(5):e1178-83. Available from:

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450861>

89. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. Vol. 352, New England Journal of Medicine. 2005. p. 2325636.
90. Torioni de Echaide S. Respuesta Inmune de Organismo Intracelulares. 2006;(1):265. Available from:
<http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/inmunologia/material/anexos/pdf/respuestainmune.pdf>
91. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas y Bennett, enfermedades infecciosas: principios y práctica. Barcelona: Elsevier España; 2015.
92. Medline ® Abstracts for References 3,15,54 of Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of brucellosis [Internet]. [cited 2016 Feb 23]. Available from:
<http://www.uptodate.com.bdigital.ces.edu.co:2048/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-treatment-of-brucellosis/abstract/3,15,54?utdPopup=true>
93. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia - Design and evaluation of a PCR test for detection of *Brucella* spp. and *Brucella abortus* [Internet]. 2015 [cited 2015 May 25]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072013000200007
94. Medline ® Abstract for Reference 4 of Microbiology, epidemiology, and pathogenesis of *Brucella* [Internet]. [cited 2016 Feb 23]. Available from:
<http://www.uptodate.com.bdigital.ces.edu.co:2048/contents/microbiology-epidemiology-and-pathogenesis-of-brucella/abstract/4>
95. Brucellosis - ClinicalKey [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar 14]. Available from:
<https://www-clinicalkey-es.bdigital.ces.edu.co:2443/#!/content/book/3-s2.0-B978145575017700310X>
96. Salmonellosis - ClinicalKey [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 27]. Available from:
<https://www-clinicalkey-es.bdigital.ces.edu.co:2443/#!/content/emc/51-s2.0-S1636541006704020?scrollTo=%23hl0000087>
97. 6tipos_estudios.pdf.
98. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) [Internet]. [cited 2015 Oct 29]. Available from: <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y->

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.

Antioquia /Chocó2015-2016

demografia/proyecciones-de-poblacion

99. Moreno N. APLICACIÓN DE LAS PRUEBAS DE PCR CONVENCIONAL SIMPLE Y MÚLTIPLE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE APPLICATION OF CONVENTIONAL AND MULTIPLEX PCR ASSAYS FOR IDENTIFICATION OF ISOLATES OF *Leptospira spp* . IN COLOMBIA. 2010;27(4):548657.
100. Lara EB. Comparación de las pruebas : reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad , para la detección de *Brucella spp* en muestras humanas. 2015;
101. Pedraza JG, Sanandres NP. Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp* . y herramientas moleculares para su detección Microbiological Isolation of *Salmonella spp* . And Molecular tools for detection. 2014;30(1):73694.
102. Sánchez-Jiménez MM, Cardona-Castro N. Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the *hlyA* gene in clinical samples from Colombian patients. J Med Microbiol. 2004;53(9):87568.

16.1 Anexo 1



UTILIDAD DE DOS PRUEBAS EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA MÚLTIPLE PCR-M PARA EL DIAGNÓSTICO DE AGENTES CAUSANTES DE SÍNDROME FEBRIL

Nombres y Apellidos: _____

ID. Caso: _____

Institución donde le atienten: _____

Municipio de residencia _____

departamento _____

Barrio: _____

Dirección: _____

Teléfono cel.: _____

Edad: _____

Sexo: H: ____ M: ____

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.**

Antioquia /Chocó2015-2016

Febril: _____

Fecha de inicio de fiebre: _____

No febril: _____

Fecha de toma de muestra (día/mes/año): _____

Infecciones previas el último semestre: Si____ No____ Cuales: Malaria____
*Salmonella*____ *Brucella*____ *Leptospira*____ *Rickettsia*____ Dengue____ No se
sabe_____

Observaciones:

Elaboró: _____

16.2 Anexo 2.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

Consentimiento informado

Utilidad de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple PCRM, para el diagnóstico de agentes causantes de síndrome febril.

Investigador principal del proyecto: Miryan Margot Sánchez Jiménez. Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Antioquia.

Co-Investigadores: Bertha Nelly Restrepo Jaramillo, Nora María Cardona Castro, Margarita Arboleda Naranjo, Luz Astrid Velasquez, Irma Marcela Romero Montoya, Leidy Diana Piedrahita, Catalina Alfonso.

Este documento describe el propósito del estudio, sus posibles riesgos y beneficios y los derechos que usted tiene como participante en él. Por favor, tómese el tiempo necesario para tomar su decisión. La decisión de participar o no en este estudio es solamente suya. Por favor no firme, a menos, que se sienta satisfecho con las respuestas a sus preguntas. Si usted decide participar, por favor asegúrese de firmar y poner la fecha al final de la última página de este formulario.

¿POR QUE HACEMOS ESTE ESTUDIO?

Por esta razón se plantea realizar este estudio cuyo objetivo es Determinar la utilidad diagnóstica de dos pruebas de PCR múltiple para la detección de agentes causantes de síndrome febril, en muestras de sangre total y sueros de pacientes atendidos en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical sedes Sabaneta y Apartadó, durante el segundo semestre del año 2015. Estos resultados permitirán determinar cómo se comportan un grupo de nuevas pruebas diagnósticas denominadas Febrilplex, que permiten detectar brucelosis, leptospirosis, fiebre tifoidea, dengue, chikunguya y west nile.

¿QUE PASARÁ DURANTE EL ESTUDIO?

A los participantes se le tomarán dos muestras de 7 ml de sangre cada una, en los adultos y de 5 ml cada una en los niños menores de 5 años.

Adicionalmente nos autorizará a tomar datos clínicos, de laboratorio y a realizar análisis especializados a partir de la muestra que fue recolectada.

¿CUALES SON LOS RIESGOS EN EL ESTUDIO?

La toma de la muestra de sangre puede causar:

- ☒ Pequeña molestia al momento de introducir la aguja.
- ☒ Hematoma en el sitio de la punción que desaparece en pocos días.
- ☒ En raras ocasiones mareo o infección en el lugar de la punción.
- ☒ La cantidad extraída de sangre no causa anemia.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS AL FORMAR PARTE DEL ESTUDIO?

Los beneficios para los participantes en el estudio son: Obtener diagnóstico en menos de 24 horas de infecciones causantes de síndrome febril, obtener resultados rápidos y confiables para que el médico tome decisiones de tratamiento oportunas y obtener diagnóstico diferencial de la enfermedad causante del síndrome febril.

¿QUIÉN PUEDE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Puede participar cualquier persona, de cualquier edad, con excepción las personas que tengan alguna enfermedad muy grave.

La información suministrada a los integrantes del estudio será confidencial. A cada paciente se le asignará un código que permitirá su identificación durante el análisis de los datos. Las muestras tomadas serán almacenadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

La participación en el estudio será voluntaria y no tendrá ningún costo, Usted tampoco recibirá compensación económica. Usted podrá retirarse del estudio en el momento en que lo considere necesario, sin que esto traiga consecuencias.

**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

CONSENTIMIENTO DEL PARTICIPANTE, DEL PADRE/MADRE/TUTOR SI ES MENOR DE EDAD.

Se contestaron todas mis preguntas con satisfacción. Me han explicado que la participación en este estudio es voluntaria y que se puede dejar de participar en cualquier momento, si así se desea.

Autorizo la toma de la muestra de sangre y de materia fecal y para ser usada en la investigación y para que los investigadores puedan usar la información recolectada.

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRAS ADICIONALES

Fecha: Día ____ Mes ____ Año ____

Número de Identificación del Paciente: _____

Paciente: _____

Primer Apellido Segundo Apellido Primer Nombre Segundo Nombre

T.I o C.C # _____

Padre o Acudiente _____

Nombres Apellidos

C.C #: _____

**Utilidad de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple PCRm, para el diagnóstico de agentes
causantes de síndrome febril**

Muestras adicionales

Autorizo que las muestras de sangre tomadas a mí en este estudio puedan ser utilizadas en otros estudios realizados por el ICMT-CES.

Las muestras serán guardadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES. Sin embargo otras enfermedades también importantes podrían ser estudiadas en esas muestras. Por lo tanto como parte de este estudio, los investigadores planean guardar muestras adicionales de sangre con el fin de estudiar otras enfermedades. Las muestras serán identificadas solo por códigos, de modo tal que su nombre no será identificado.

Si Usted desea que los investigadores guarden muestras adicionales, por favor firme abajo para indicar su deseo de dar permiso a los investigadores de guardar muestras adicionales para futuros estudios.

Cualquier estudio adicional usando sus muestras serán revisadas por los Comités de Ética institucionales de los investigadores, un comité que chequea estudios médicos para proteger los derechos de los voluntarios.

Usted puede cambiar de parecer en cualquier momento acerca de permitir que muestras suyas sean usadas en estudios futuros. Si es así contacte a los investigadores y hágales saber de su decisión.

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor contacte a Miryan Margot Sánchez Jiménez, teléfono: 3053500 ext: 2316. Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES

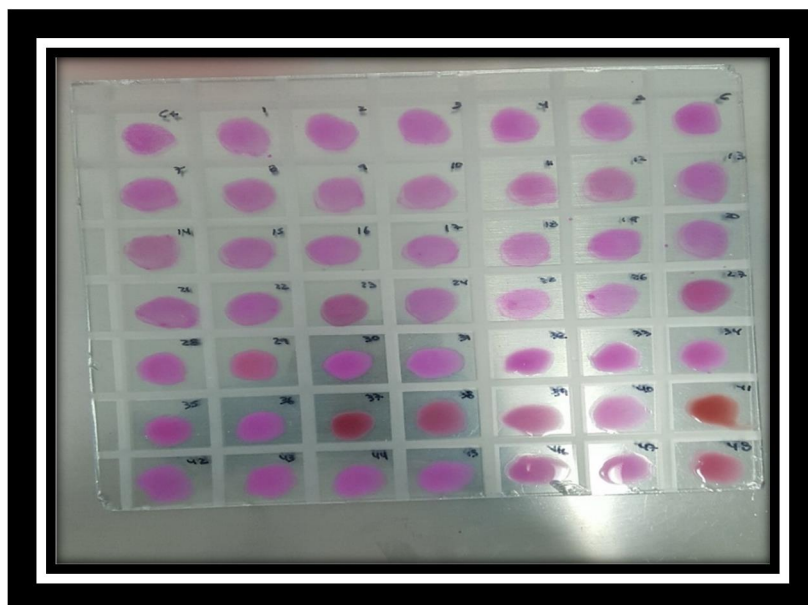
**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

16.3 Anexo 3.

Medio de cultivo bifásico Ruiz Castañeda para diagnóstico de *Salmonella* sp.



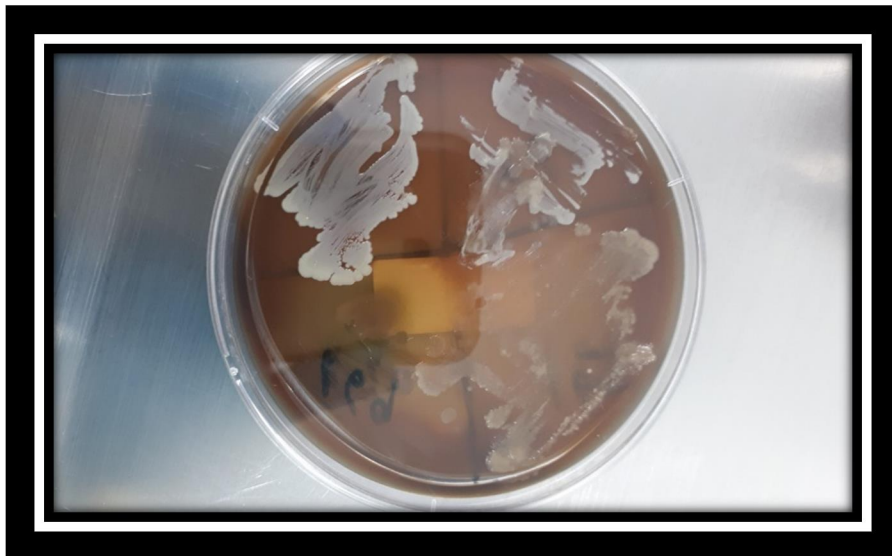
16.4 Anexo 4. Rosa de bengala.



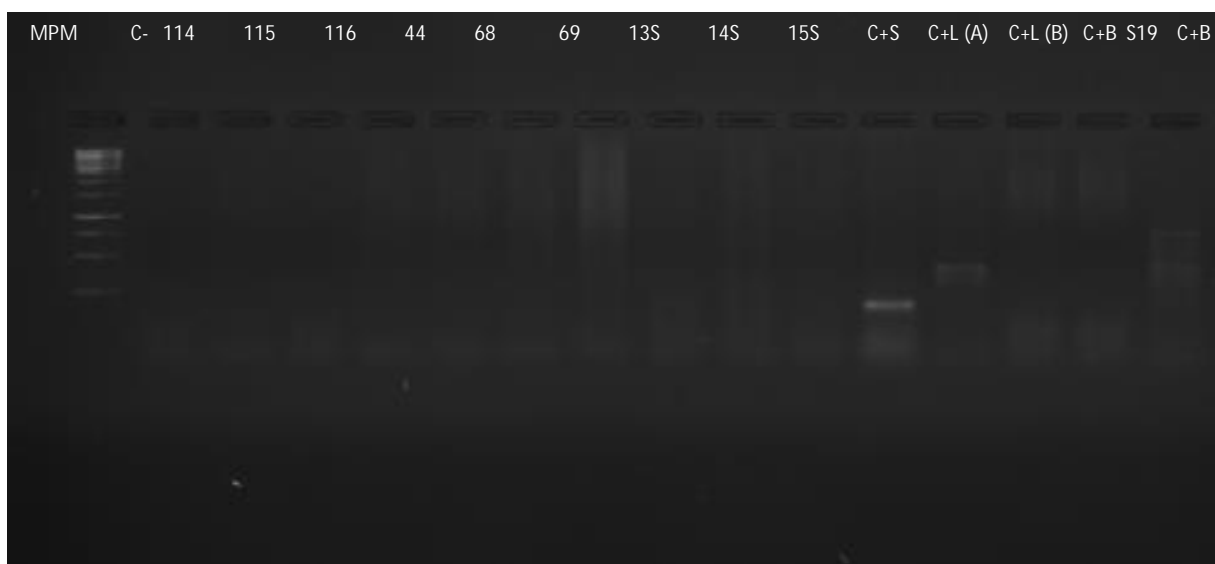
**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para el diagnóstico de *Salmonella Typhi*, *Leptospira sp.* y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

16.5 Anexo 5. Agar macckonkey.

Medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias diseñado para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos



16.6 Anexo 6. PCR-m para *Salmonella sp.* *Leptospira sp.* *Brucella sp.*

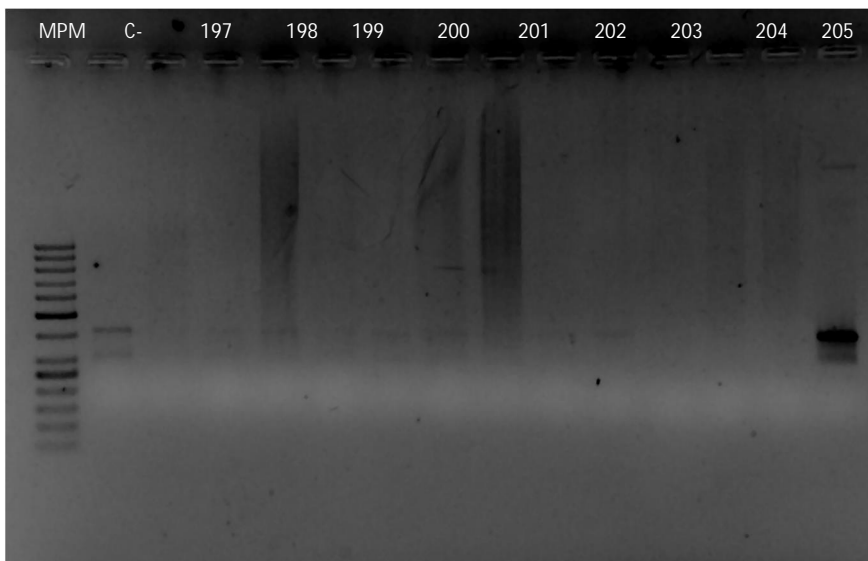


**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

16.7 PCR individual *Salmonella* sp.

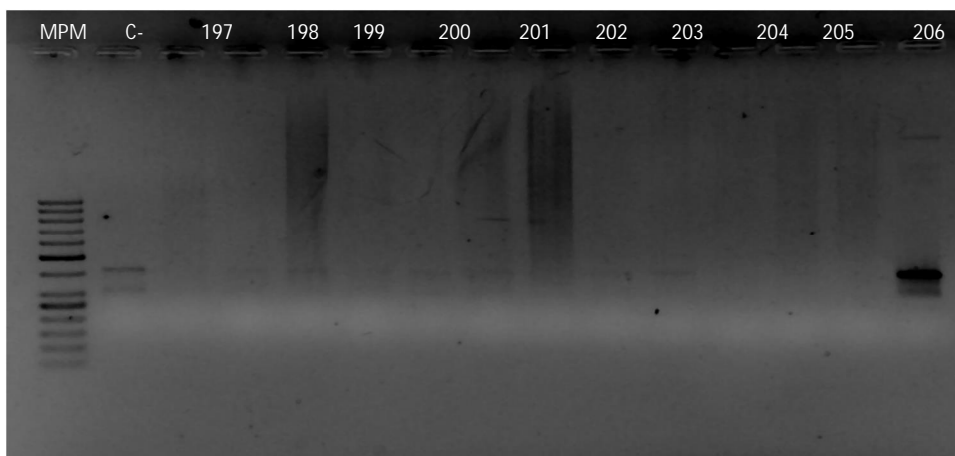


16.8 Anexo 7. PCR individual *Leptospira* Sp.



**Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple
para el diagnóstico de *Salmonella* Typhi, *Leptospira* sp. y *Brucella abortus*.
Antioquia /Chocó2015-2016**

16.9 Anexo 8.PCR individual *Brucella* SP.



16.10 ANEXO #8. Electroforesis de la PCR-m *Salmonella* sp, *Leptospira* sp y *Brucella* sp.

