

Detección y caracterización molecular de microorganismos



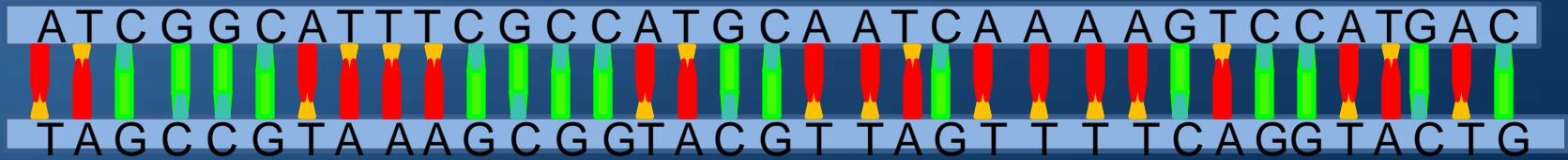
Aplicaciones de las técnicas moleculares

Detección e identificación (cuantitativa) del microorganismo (especialmente útil en aquellos de crecimiento “fastidioso” o que se encuentren en pequeñas cantidades en la muestra).

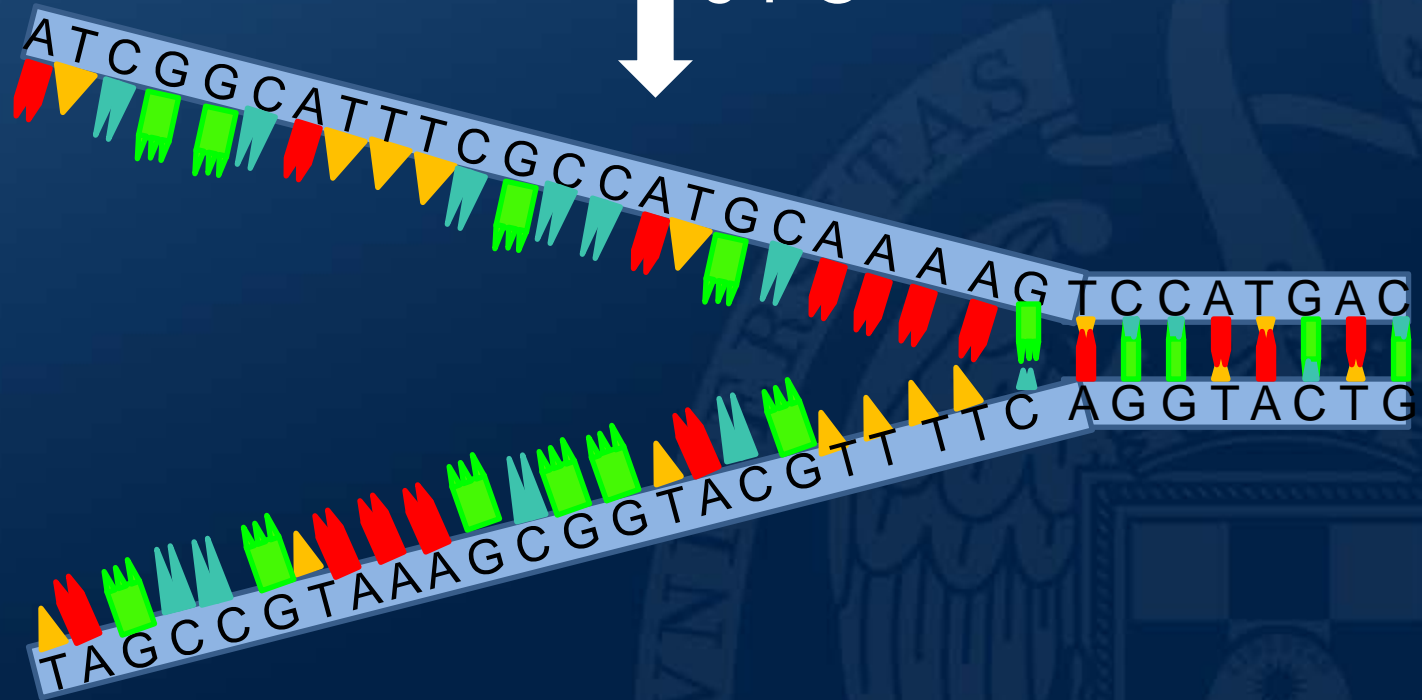
- Gran estabilidad del ADN
- Posibilidad de determinar la presencia/ ausencia de gran número de microorganismos (simultáneamente).
- Muy rápido. Muy eficaz. Alta sensibilidad. Alta especificidad.



PCR CUANTITATIVA



94°C



ATCGGCATTTTCGCCCATGCAATCAAAAGTCCATGAC

TAGCCGTA AAGCGGTACGT TAGT T T TCAGGTACTG

56°C

ATCGGCATTTTCGCCCATGCAATCAAAAGTCCATGAC

AGCCG

Q

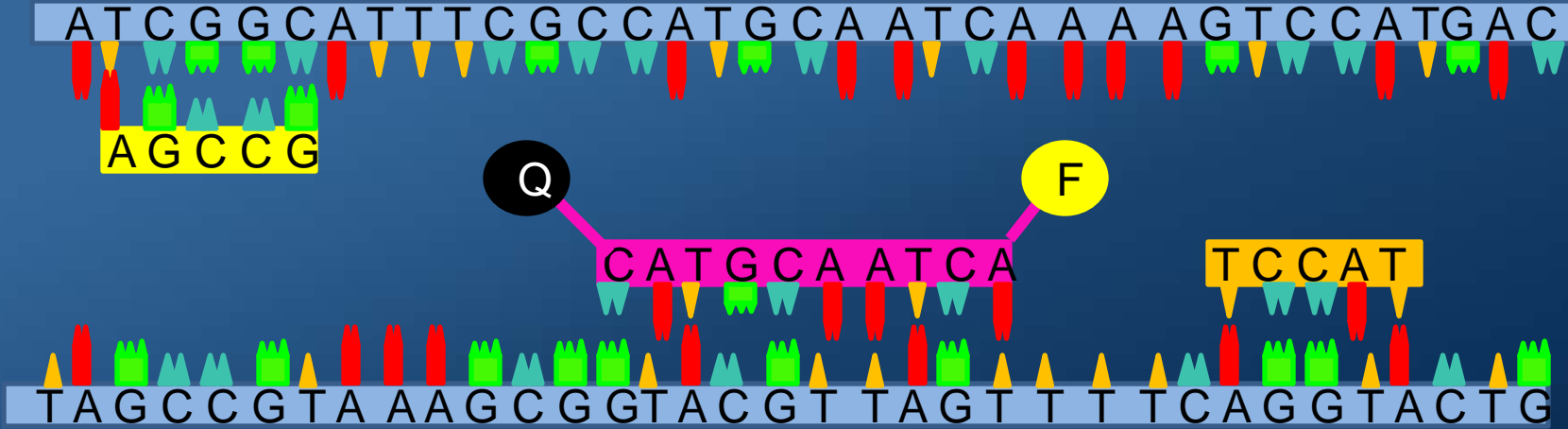
F

CATGCAATCA

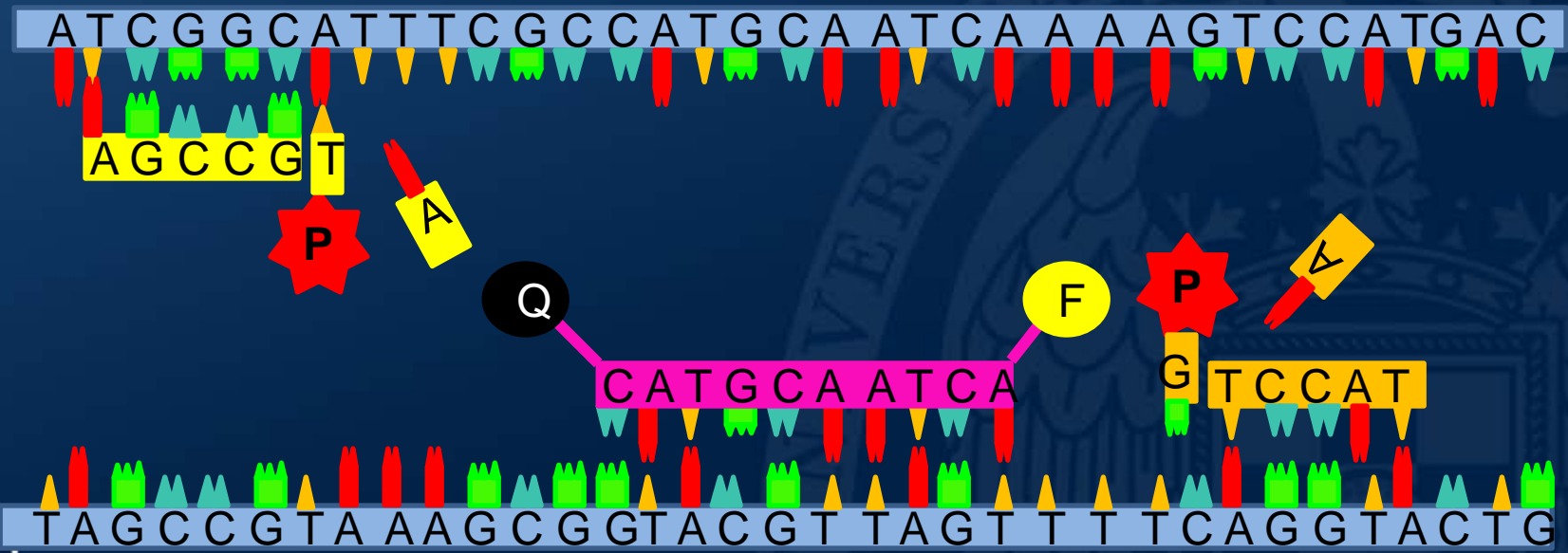
TCCAT

TAGCCGTA AAGCGGTACGT TAGT T T TCAGGTACTG





72°C



ATCGGCATTTCGCCATGCAATCAAAGTCCATGAC



AGCCGTA AAGCGGTAC



TAGCCGTA AAGCGGTACGT TAGTTTTCAGGTACTG



ATCGGCATTTTCGCCATGCAATCAAAGTCCATGAC

AGCCGTA AAGCGGTACGT TAGTTTTCAGGTA

P

F

Q

CATGCAATCA

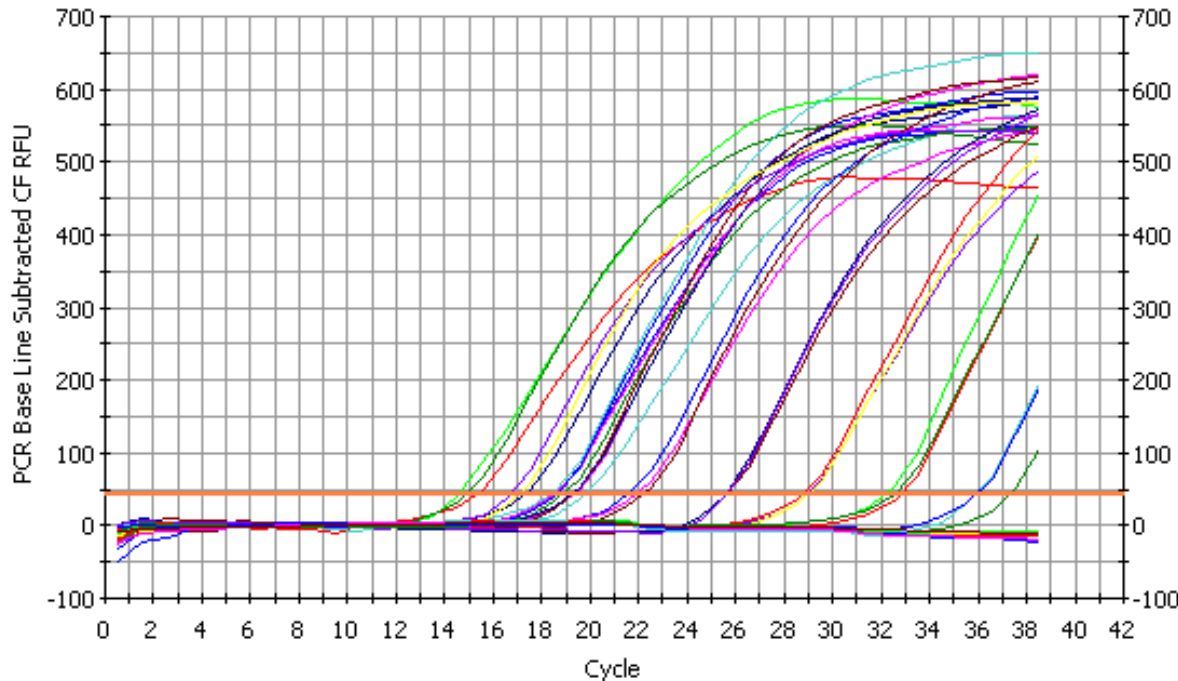
TCGGCATTTTCGCCATGCAATCAAAGTCCAT

TAGCCGTA AAGCGGTACGT TAGTTTTCAGGTA CTG

P

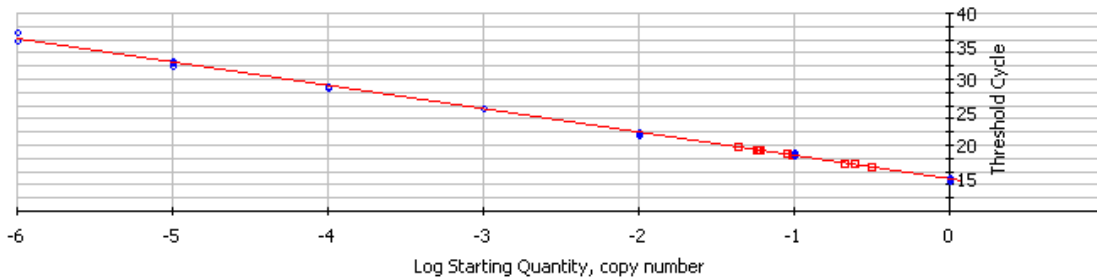


CURVAS PATRÓN Y REAL TIME C. COLI (FAM)



Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,543 Intercept: 14,904 $Y = -3,543 X + 14,904$
 PCR Efficiency: 91,5 %

□ Unknowns
 ○ Standards



PCR Quantification Spreadsheet Data for FAM-490

Well Identifier	Ct
A01	23,4
A02	22,9
A03	22,8
A04	24,4
A05	24,6
A06	24,1
B01	26,6
B02	26,5
B03	26,9
B04	19,2
B05	19,2
B06	19,4
C01	30
C02	30,7
C03	30,4
C04	31,6
C05	31,6
C06	31,3
D01	34
D02	33,6
D03	33,3
D04	N/A
D05	N/A
D06	N/A
E01	37,3
E02	37
E03	37,2
F01	N/A
F02	N/A
F03	N/A
G01	N/A
G02	N/A
G03	N/A
H01	N/A
H02	N/A
H03	N/A

1
 muestra 1 +

10⁻¹

muestra 2+

10⁻²

muestra 3+

10⁻³

muestra NEGATIVA

10⁻⁴

10⁻⁵

10⁻⁶

blanco



	1	2	3	4	5	6
A	Standard 1	Standard 1	Standard 1	Blank	Blank	Blank
Concentration	5.65e+06	5.65e+06	5.65e+06	N/A	N/A	N/A
Identifier						
B	Standard 2	Standard 2	Standard 2	Unknown 1	Unknown 1	Unknown 1
Concentration	5.65e+05	5.65e+05	5.65e+05	2.33e+06	2.11e+06	2.50e+06
Identifier						
C	Standard 3	Standard 3	Standard 3	Unknown 2	Unknown 2	Unknown 2
Concentration	5.65e+04	5.65e+04	5.65e+04	1.97e+07	2.01e+07	2.13e+07
Identifier						
D	Standard 4	Standard 4	Standard 4	Unknown 3	Unknown 3	Unknown 3
Concentration	5.65e+03	5.65e+03	5.65e+03	1.10e+04	1.13e+04	1.19e+04
Identifier						
E	Standard 5	Standard 5	Standard 5	Unknown 4	Unknown 4	Unknown 4
Concentration	5.65e+02	5.65e+02	5.65e+02	0.00e+00	0.00e+00	0.00e+00
Identifier						
F	Standard 6	Standard 6	Standard 6			
Concentration	5.65e+01	5.65e+01	5.65e+01			
Identifier						
G	Standard 7	Standard 7	Standard 7			
Concentration	5.65e+00	5.65e+00	5.65e+00			
Identifier						
H	Standard 8	Standard 8	Standard 8			
Concentration	5.65e-01	5.65e-01	5.65e-01			
Identifier						

Blanco

muestra 1 +

muestra 2 +

muestra 3 +

muestra NEGATIVA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Permite la identificación del microorganismo.

Permite diferenciar cepas. Aplicación en estudios de distribución, epidemiología, etc.

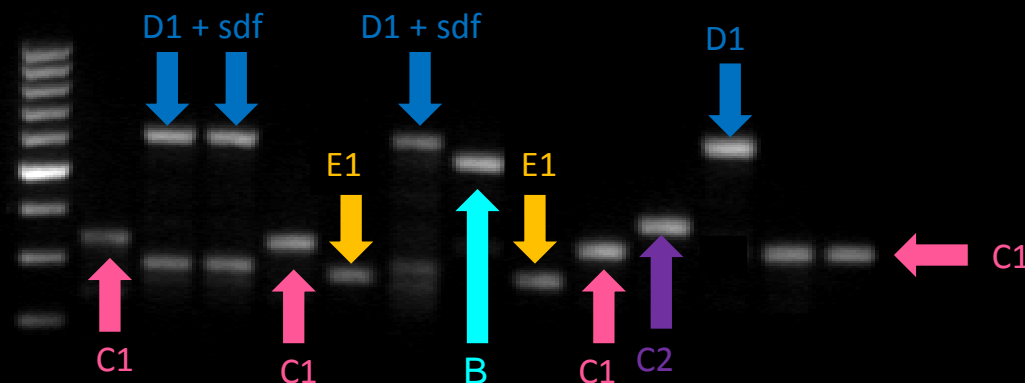
Permite conocer las características del microorganismo (virulencia, resistencia a antibióticos, etc).

- Serotipificación por PCR
- MLST (*multi locus sequence typing*)
- VNTRs (*variable number tandem repeats*)
- microarrays



SEROTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *SALMONELLA* (antígeno O)

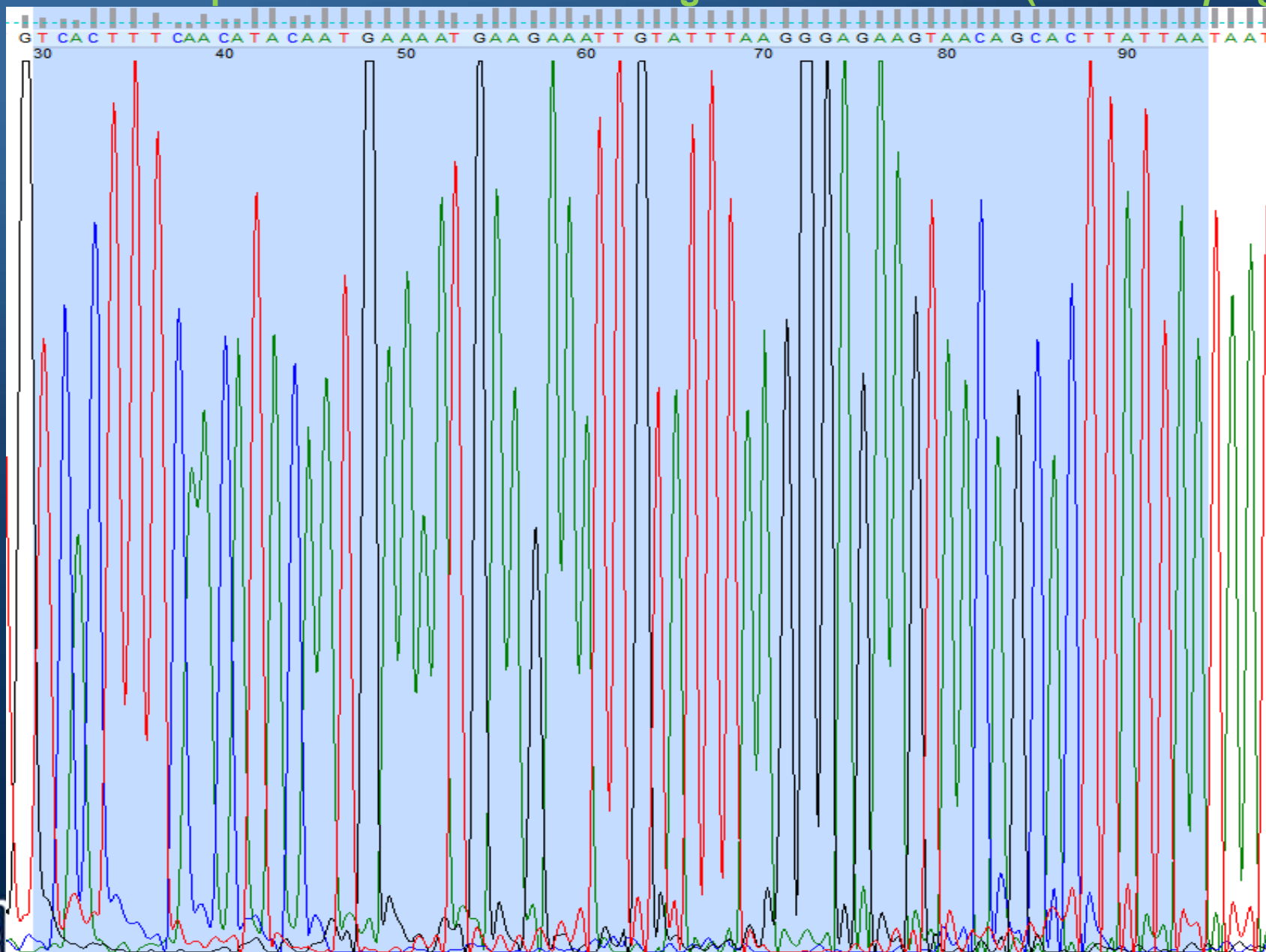
ANTIGENO O *SALMONELLA* MULTIPLEX PCR



C1 341 pb
D1/A 624 pb
sdf 293 pb
E1/4 283 pb
B 561 pb
C2 397 pb

1. marcador
2. C1
3. D1 + sdf
4. D1 + sdf
5. C1
6. E1/4
7. D1 + sdf enteriti
8. B typhimurium
9. E1/4 meleagridis
10. C1 Mbandaka
11. C2 Hadar
12. D1 panama
13. C1 virchow
14. C1 infantis

MLST: comparación de secuencias de genes conservados (*housekeeping*)



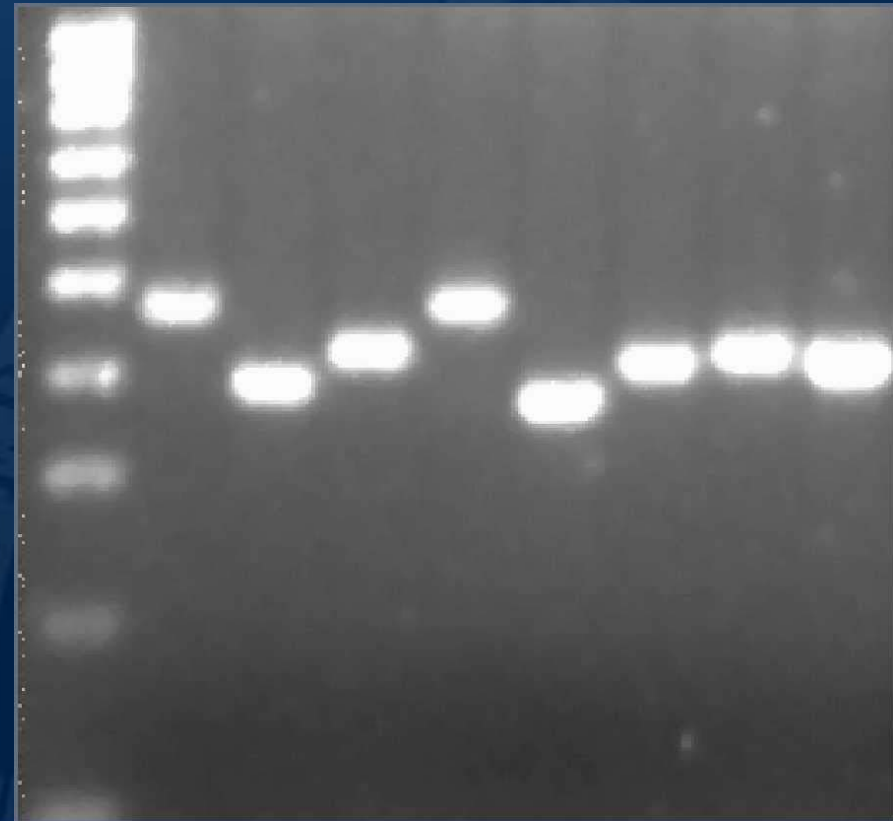
VNTRs (*variable number tandem repeats*)

CEPA 1

TTCTGTTACGCGTAATGGTCATGGTCATGGTCATGGTCATGGTCGATCCATTGCATT

CEPA 2

TTCTGTTACGCGTAATGGTCATGGTCATGGTCGATCCATTGCATT



MICROARRAYS



ADN bacteria crecida en medio estresante



ADN bacteria crecida en medio no estresante



GEN VIR1



GEN VIR2



GEN VIR3



GEN VIR4



GEN VIR5



GEN VIR6

