



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL
PARA EL DIAGNÓSTICO DE *COXIELLA BURNETII* COMO AGENTE
CAUSAL DE FIEBRE Q**

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en Biotecnología*

AUTORA:

ALEIDA JUSTINE VILLARROEL MUÑOZ

TUTORES:

PhD. BRENDA LÓPEZ ULLOA

Ing. NAOMI DANIELA MORA JARAMILLO

GUAYAQUIL - ECUADOR

2025

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO

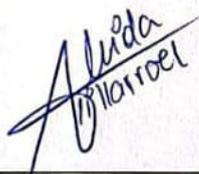
TITULACIÓN

Yo, **Aleida Justine Villarroel Muñoz** con documento de identificación N° 1208948164;
manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total
o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



Aleida Justine Villarroel Muñoz

CI: 1208948164

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, **Aleida Justine Villarroel Muñoz** con documento de identificación N° 1208948164, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo experimental: **VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE COXIELLA BURNETII COMO AGENTE CAUSAL DE FIEBRE Q**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



Aleida Justine Villarroel Muñoz

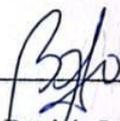
CI: 1208948164

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Brenda Patricia López Ulloa** con documento de identificación N° 0960450922, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE *COXIELLA BURNETHI* COMO AGENTE CAUSAL DE FIEBRE Q**, realizado por **Aleida Justine Villarroel Muñoz** con documento de identificación N° 1208948164, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



PhD. Brenda Patricia López Ulloa

CI: 0960450922

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Naomi Daniela Mora Jaramillo** con documento de identificación N° 0927529990, analista de laboratorio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI) , declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE *COXIELLA BURNETII* COMO AGENTE CAUSAL DE FIEBRE Q**, realizado por **Aleída Justine Villarroel Muñoz** con documento de identificación N° 1208948164, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



Ing. Naomi Daniela Mora Jaramillo

CI: 0927529990

Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicada a mis queridos padres, quienes han sido el pilar fundamental de mi vida, desde que comencé este camino, me han acompañado con su amor incondicional, su sabiduría y su fortaleza, han sido mi fuente constante de inspiración, y gracias a su apoyo, nunca me sentí sola en los momentos de duda o desafío.

Ustedes me enseñaron el valor del esfuerzo, la importancia de la perseverancia y, sobre todo, el significado del sacrificio. A lo largo de los años, me han mostrado con su ejemplo que nada es imposible cuando se tiene pasión y determinación, sin su aliento, sin sus palabras de ánimo en los días más difíciles, este logro no habría sido posible.

A mi abuelita, quien siempre ha estado a mi lado con su amor y su sabiduría, aunque no siempre fue fácil, su apoyo y sus enseñanzas me han dado fuerzas para seguir adelante. Gracias por creer en mí, por ser mi guía y mi ejemplo de valentía, y por darme la seguridad de que siempre puedo lograr lo que me proponga.

A mi hermano, por su amor y apoyo incondicional, dedico también unas palabras a aquellos que ya no están físicamente conmigo, gracias por sus enseñanzas, por el amor que me brindaron pero que siempre estarán presentes en mi corazón.

A mis compañeros de la universidad, con quienes he compartido risas, desafíos y aprendizaje a lo largo de este proceso. Gracias por su apoyo, su colaboración y por hacer de este camino un trayecto más enriquecedor. Cada uno de ustedes ha sido una fuente de motivación, y este trabajo también es el reflejo de la fuerza que encontramos juntos como grupo.

Este trabajo es solo una pequeña muestra de mi gratitud por todo lo que me han dado, cada paso que he dado ha sido impulsado por su amor, confianza y apoyo.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI) por brindarme el espacio adecuado y los recursos necesarios para desarrollar esta investigación. La colaboración entre la universidad y esta institución ha sido esencial en mi formación, y estoy profundamente agradecida por la oportunidad de haber sido parte de este entorno tan enriquecedor.

Agradezco al Mgtr. Alberto Orlando Narváez, investigador auxiliar del INSPI, por su apoyo en la definición del tema de tesis y por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, su confianza fue fundamental para el éxito de mi investigación. Gracias a la Ing. Naomi Mora Jaramillo, por compartir sus conocimientos y orientación técnica, esenciales para mi desarrollo. Mi reconocimiento a la Dra. Mirella Rivera por su constante guía y confianza en mi trabajo.

Agradezco al Ing. José Luis Ballesteros, director de carrera, por su apoyo continuo y liderazgo, siempre dispuesto a orientarme, ha sido un privilegio contar con su respaldo. Mi reconocimiento al Ing. Jaime Naranjo por sus consejos valiosos desde el inicio de mi carrera, los cuales fueron cruciales para mi motivación. A los profesores de la carrera de Biotecnología, mi más sincero agradecimiento por compartir sus conocimientos y por fomentar mi pensamiento crítico, lo que ha sido esencial para mi formación.

Quiero dedicar un agradecimiento muy especial a mi tutora PhD. Brenda López Ulloa, quien ha sido una guía invaluable a lo largo de todo este proceso, más allá de ser mi tutora, se convirtió en una persona clave en mi desarrollo académico y personal, siempre ofreciendo una perspectiva constructiva y alentadora. Agradezco profundamente el seguimiento cercano que me brindó, su paciencia, y la visión de futuro que tiene para mí, la cual siempre me inspiró a seguir mejorando y a no rendirme.

Resumen

La fiebre Q, causada por *Coxiella burnetii*, es una enfermedad zoonótica que afecta tanto a humanos como a animales, su transmisión se da principalmente por inhalación de aerosoles contaminados, aunque en su mayoría es asintomática o leve, puede ocasionar complicaciones graves como neumonía o endocarditis. El diagnóstico serológico presenta limitaciones debido a que los anticuerpos específicos solo aparecen semanas después de la infección, dificultando su detección en fase aguda. La PCR en tiempo real (qPCR) ofrece una alternativa más eficaz al permitir una identificación temprana y precisa de *C. burnetii*.

Este estudio validó el uso de qPCR como método diagnóstico en Ecuador, donde la información sobre la bacteria es limitada. Se diseñaron cebadores y una sonda a partir de secuencias del gen IS1111, utilizando herramientas bioinformáticas como Primer-BLAST para seleccionar secuencias específicas. Se eligieron genes relevantes, como *isotrato deshidrogenasa (icd)*, *com1*, entre otros, para el diseño de los primers. Las secuencias fueron procesadas en el software UNGEN, lo que permitió seleccionar las secuencias más precisas.

Las pruebas fueron realizadas en el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI), utilizando muestras de hígado de ratón y sangre bovina. La optimización de la qPCR mostró una relación lineal entre la concentración del analito y el ciclo umbral, lo que confirma la sensibilidad y fiabilidad del método, aunque las muestras evaluadas no presentaron amplificación positiva, el control positivo de *C. burnetii* amplificó correctamente, demostrando que los primers seleccionados son adecuados.

La qPCR es una herramienta prometedora para la detección temprana de *C. burnetii* en Ecuador. La optimización de los primers y la validación del método refuerzan su potencial para mejorar la vigilancia y el diagnóstico de la fiebre Q, contribuyendo a un mejor control de la enfermedad en el país.

Palabras clave: Fiebre Q, *Coxiella burnetii*, Diagnóstico, PCR en tiempo real, IS1111, Primers.

Abstract

Q fever, caused by *Coxiella burnetii*, is a zoonotic disease that affects both humans and animals. It is primarily transmitted through the inhalation of contaminated aerosols. Although most cases are asymptomatic or mild, it can lead to serious complications such as pneumonia or endocarditis. Serological diagnosis presents limitations, as specific antibodies appear only weeks after infection, making detection in the acute phase difficult. Real-time PCR (qPCR) offers a more effective alternative, allowing for early and accurate identification of *C. burnetii*. This study validated the use of qPCR as a diagnostic method in Ecuador, a country with limited information about the bacterium. Primers and a probe were designed from sequences of the IS1111 gene using bioinformatics tools such as Primer-BLAST to select specific sequences. Relevant genes, such as isocitrate dehydrogenase (*icd*), *comI*, and others, were chosen for primer design. The sequences were processed using the UNGEN software, allowing for the selection of the most precise sequences.

The tests were conducted at the National Institute of Public Health and Research (INSPI), using samples of mouse liver and bovine blood. The optimization of qPCR showed a linear relationship between the concentration of the analyte and the threshold cycle, confirming the sensitivity and reliability of the method. Although the evaluated samples did not show positive amplification, the positive control of *C. burnetii* amplified correctly, demonstrating that the selected primers are suitable.

The qPCR is a promising tool for the early detection of *C. burnetii* in Ecuador. The optimization of the primers and the validation of the method strengthen its potential to improve surveillance and diagnosis of Q fever, contributing to better control of the disease in the country.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, Diagnosis, Real-time PCR, IS1111, Primers.

Índice

CAPÍTULO I.....	1
ANTECEDENTES.....	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.2.1. Justificación	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	5
1.4. Hipótesis	5
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1. Características microbiológicas de <i>Coxiella burnetii</i>	6
2.2. Epidemiología de <i>Coxiella burnetii</i>	9
2.2.1. Síntomas de la Enfermedad en Humanos	9
2.2.2. Diagnóstico y Tratamiento.....	10
2.2.3. Prevención y Control de <i>Coxiella burnetii</i>	11
2.3. Detección de <i>Coxiella burnetii</i>	11
2.3.1. Métodos tradicionales de detección	12
2.3.2. Métodos moleculares de detección	14
2.4. Ética en el uso de animales en investigación	16
2.5. Selección de las muestras.....	17

2.6. Estandarización de PCR en Tiempo Real	19
2.6.1. Curva estándar	20
CAPÍTULO III.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Diseño de Cebadores y Sondas	23
3.2. Mezcla de reacción	25
3.3 Extracción de ADN.....	28
3.5. Validación del Ensayo	29
3.6. Preparación de las placas de PCR en tiempo real	31
CAPÍTULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
4.1. Resultados	32
4.1.2. Curva estándar y Fluorimetría (validación de la técnica de cuantificación).	
.....	32
4.1.4. Control positivo y validación de primers.....	34
4.1.3. Resultados de PCR en tiempo real en sangre e hígado.....	36
4.2. Discusión.....	40
CAPÍTULO V.....	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	44
Referencias Bibliográficas	45

Índice de tablas

Tabla 1. Cebadores y Sondas de Hidrólisis para qPCR.	25
Tabla 2. Composición de los diferentes mixes de reacción para qPCR.....	27
Tabla 3. Ciclos y Temperaturas usadas en qPCR.	27
Tabla 4. Resultados de diluciones en Fluorómetro	32
Tabla 5. Comparación de la Eficiencia de Amplificación con Diferentes Mezclas de Reacción y Volúmenes de ADN.....	36
Tabla 6. Resultados de muestras evaluadas.	37

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de Vida <i>Coxiella burnetii</i>	8
Figura 2. Visualización de <i>Coxiella burnetii</i> en macrófagos alveolares mediante microscopía confocal y electrónica.	13
Figura 3. Curva estándar de diluciones seriadas del control positivo.	33
Figura 4. Prueba de qPCR con dos Mixes usados.	35
Figura 5. Prueba qPCR de muestras de sangre de vaca y tejido hepático de roedor.	39

Índice de Anexos

Anexo 1. Disección de roedor para obtener muestra de hígado.	55
Anexo 2. Muestras de hígado de roedor en tubos de almacenamiento.	55
Anexo 3. Kit de extracción para sangre de vaca.	55
Anexo 4. Alineamiento de secuencias de <i>Coxiella burnetii</i> en UGENE.	56
Anexo 5. Kit de extracción para tejido hepático de roedor.	56
Anexo 6. ADN extraído de sangre de vaca.	56
Anexo 7. Centrifugación de muestras de sangre de vaca.	57
Anexo 8. ADN de <i>C. burnetii</i>	57
Anexo 9. Enzima (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix).	57
Anexo 10. Equipo de flourometría.	58
Anexo 11. Kit para las diluciones con equipo Flourómetro.	58
Anexo 12. Distribución de placa para qPCR para saber que concentración de primers funciona mejor.	58
Anexo 13. Preparación de placa para qPCR: pipeteo preciso de reactivos.	59

Abreviaturas

3R: Reducción, Refinamiento y Reemplazo (principios éticos en el uso de animales para experimentación)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

AS: Espacio Alveolar

C. burnetii: *Coxiella burnetii* (nombre científico de la bacteria causante de la fiebre Q).

com1: Gen de la proteína de membrana externa de *Coxiella burnetii*.

cox: Ciclooxygenasa

Cq: Ciclo de cuantificación (utilizado en qPCR)

C. burnetii: *Coxiella burnetii* (nombre científico de la bacteria causante de la fiebre Q).

Cl: Cloro

CT: Número de ciclos en una reacción de PCR en tiempo real donde la fluorescencia del producto amplificado supera el umbral de detección.

DIM: Dosis infectiva mínima.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato (componentes esenciales para la síntesis de ADN en qPCR).

dsDNA: ADN de doble cadena (Double-Stranded DNA).

FAM: 6-carboxyfluoresceína (un marcador fluorescente).

GE: Equivalentes genómicos.

icd: Gen que codifica la isocitrato-deshidrogenasa.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

IS1111: Elemento transposón presente en el genoma de *Coxiella burnetii*.

Mg: Magnesio.

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

QpH1: Secuencia en plásmidos de *Coxiella burnetii*.

QpRS: Secuencia en plásmidos de *Coxiella burnetii*.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa

sod: Gen que codifica el superóxido dismutasa.

Simbología

1-10 microorganismos: Rango de cantidad de microorganismos.

°C: Grados Celsius

cm: Centímetros (unidad de medida de longitud).

H₂O: Agua

MgCl₂: Cloruro de magnesio (un reactivo utilizado en PCR)

ng: Nanogramo

nm: Nanómetro

μM: Micromolar (unidad de concentración)

μL: Microlitro (unidad de volumen)

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Introducción

La fiebre Q es una enfermedad provocada por la bacteria *Coxiella burnetii*, que pertenece a la familia Coxiellaceae y afecta a diversas especies animales, incluidos los seres humanos (Stanislav, et al, 2024). Las personas infectadas con *Coxiella burnetii* a menudo desarrollan una seroconversión sin síntomas clínicos evidentes, aunque algunos experimentan una enfermedad leve y autolimitada, parecida a la gripe, en ciertos casos, esta bacteria puede ocasionar cuadros más graves, como neumonía y problemas reproductivos (Spickler, 2017). En términos epidemiológicos, los mamíferos infectados eliminan el microorganismo resistente a la desecación en la orina, heces, leche y especialmente, a través de los productos relacionados con el parto, ya que en la placenta de los animales infectados se encuentran altas concentraciones de dicha bacteria (Fariñas y Collado, 2010). Una de las principales formas de transmisión de la fiebre Q es a través de la inhalación de aerosoles que contienen la bacteria, debido a que *Coxiella burnetii*, esta se propaga rápidamente por el aire y es sumamente resistente a diversas condiciones ambientales, lo que la convierte en una amenaza biológica (Fernandez, et al, 2023).

El diagnóstico de la fiebre Q, tanto en humanos como en animales, se basa principalmente en la serología (Baeza, et al, 2023). Los métodos serológicos más utilizados para detectar *Coxiella burnetii* son la inmunofluorescencia indirecta, la fijación del complemento y los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (Rousset, et al, 2007). Sin embargo, un inconveniente de estas técnicas es que el diagnóstico se retrasa, ya que los anticuerpos específicos de *Coxiella burnetii* suelen aparecer varias semanas después de la

infección y pueden persistir durante meses, por esta razón, se enfatiza que la serología no es la herramienta adecuada para detectar infecciones en fase aguda o para realizar estudios de búsqueda de fuentes de contagio, siendo la PCR una opción más efectiva en estos casos (Bruin, et al, 2011). La PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica altamente específica, sensible y reproducible, permitiendo detectar tan solo 5 equivalentes genómicos (GE) de *Coxiella burnetii* por reacción (Fernandez, et al, 2023). En este contexto, la validación de la qPCR como una herramienta diagnóstica precisa y accesible es fundamental para mejorar la detección de *Coxiella burnetii* y avanzar en la comprensión y control de la fiebre Q.

En Ecuador, la información e investigación sobre *Coxiella burnetii* es limitada, lo que ha dificultado la implementación de un método específico para su diagnóstico y control, así como una adecuada vigilancia epidemiológica, a pesar de que la fiebre Q es endémica en varias regiones del país, la enfermedad es a menudo pasada por alto por el personal médico y de laboratorio, lo que contribuye a un subregistro de casos y al desconocimiento de su verdadera prevalencia, esto plantea como necesidad urgente la implementación de técnicas diagnósticas actuales y confiables, como la qPCR, que proporcionen un diagnóstico preciso y rápido para la identificación y monitoreo de esta bacteria en muestras clínicas, además, la utilización de qPCR facilitará una mayor comprensión sobre la distribución y prevalencia de la fiebre Q, generando información útil para futuras investigaciones y el desarrollo de estrategias de control en Ecuador. La fiebre Q debe considerarse un problema de salud pública en el país, y es recomendable que se realicen más investigaciones para evaluar la relevancia clínica de esta infección, a fin de mejorar la atención médica y la prevención de esta zoonosis en la población (Echeverría, et al, 2019; Velásquez, et al, 2021).

1.2. Planteamiento del problema

La fiebre Q, causada por la bacteria *Coxiella burnetii*, en Ecuador, sigue siendo una enfermedad no diagnosticada, a pesar de su prevalencia entre animales, especialmente el ganado, y los trabajadores expuesto e incluso de algunos reportes que sugieren la presencia de la bacteria en diversas regiones del país, el diagnóstico adecuado es limitado debido a la falta de acceso a pruebas especializadas y la utilización de métodos serológicos tradicionales, que no siempre permiten detectar infecciones tempranas ni diferenciar entre casos recientes o antiguos, esto crea un desafío significativo para la implementación de medidas efectivas de control y prevención (Echeverría, et al, 2019).

Además, la información epidemiológica sobre la fiebre Q en Ecuador es escasa, lo que dificulta el monitoreo adecuado de la enfermedad y la identificación de reservorios potenciales fuera del ganado, como la fauna silvestre o las garrapatas. Esta falta de diagnóstico oportuno y preciso, junto con la escasa vigilancia epidemiológica, aumenta el riesgo de transmisión de la enfermedad tanto en animales como en personas, particularmente en comunidades rurales y trabajadores del sector ganadero, quienes están más expuestos a la bacteria.

1.2.1. Justificación

La Fiebre Q, originada por *Coxiella burnetii*, es una enfermedad zoonótica altamente transmisible y resistente en el ambiente, que afecta tanto a animales como a humanos, sin embargo, el diagnóstico microbiológico puede realizarse mediante técnicas de amplificación y detección del ADN bacteriano utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, aunque estas técnicas no están ampliamente disponibles (Fariñas y Collado, 2010).

Los primeros informes sobre fiebre Q en Ecuador datan de 2004, cuando se registraron casos de fiebre aguda indiferenciada en pacientes de la cuenca amazónica, de los cuales casi el 5% resultaron seropositivos para *Coxiella burnetii*, sin embargo, se desconocía la fuente de infección, ya que en esa zona no se crían grandes cantidades de ganado, lo que sugiere que otros reservorios, como animales silvestres o garrapatas, podrían estar involucrados en la transmisión. En 2015, un estudio sobre ganado lechero y mixto en Ecuador reportó una prevalencia de *C. burnetii* del 12,6%, con un porcentaje de 46,9% de rebaños infectados, lo que indica que el ganado es una fuente importante de la bacteria en el país (Echeverría, et al, 2019).

A pesar de estos hallazgos, la fiebre Q sigue siendo una enfermedad subdiagnosticada en Ecuador, principalmente debido a la falta de métodos diagnósticos adecuados. Las pruebas serológicas tradicionales tienen limitaciones, especialmente para detectar infecciones en fases tempranas de la enfermedad, lo que dificulta un diagnóstico preciso y temprano. La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real es una técnica molecular altamente sensible que permite la detección de *Coxiella burnetii* en muestras clínicas, incluso en etapas iniciales de la infección, lo que la convierte en una herramienta valiosa para el diagnóstico precoz.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Validar la técnica de PCR en tiempo real como método eficaz para la identificación de *Coxiella burnetii* en muestras clínicas, con el fin de mejorar el diagnóstico y manejo de la Fiebre Q.

1.3.2. Objetivos Específicos

1. Optimizar un conjunto de primers específico para la detección de *Coxiella burnetii* en la técnica de qPCR, asegurando su especificidad y sensibilidad.
2. Analizar las secuencias nucleotídicas de *Coxiella burnetii* a partir de fuentes científicas, para seleccionar las más apropiadas para el diseño de primers.
3. Implementar la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real en las muestras procedentes de muestras de sangre de vaca y tejido hepático de ratón para el diagnóstico molecular de *Coxiella burnetii*.

1.4. Hipótesis

El diseño y validación de primers específicos para la detección de *Coxiella burnetii* mediante PCR en tiempo real en muestras clínicas de origen animal permitirá un diagnóstico más rápido y preciso de la Fiebre Q en Ecuador, lo que contribuirá a mejorar la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad y facilitará futuros estudios sobre su epidemiología y biotecnología en el país.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Características microbiológicas de *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii es una bacteria de la familia Coxiellaceae que se presenta como cocobacilos Gram negativos, sin movilidad, y con una capacidad patógena intracelular obligada, puesto que, se reproduce dentro de fagolisosomas, estas bacterias tienen un tamaño que varía entre 0,4 y 1 micra de largo y entre 0,2 y 0,4 micras de ancho (Fariñas y Collado, 2010).

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal, la bacteria *Coxiella burnetii* exhibe un alto grado de pleomorfismo, es decir, presenta diferentes formas celulares. Se distinguen principalmente dos tipos: la forma celular grande, que es intracelular y metabólicamente activa, y la forma celular pequeña, también conocida como pseudoespora, que es extracelular, metabólicamente inactiva y tiene una estructura similar a las esporas, lo que la hace extremadamente infecciosa, además, se reconocen dos formas antigénicas de esta bacteria: la fase I, que es la forma virulenta que se encuentra en los hospedadores, y la fase II, que es avirulenta y se obtiene a través de cultivos celulares in vitro en condiciones de laboratorio (Código Sanitario para los animales terrestres. OIE, 2018).

Debido a su capacidad de persistir durante meses en ambientes adversos, como el polvo y las heces; y gracias a su alta infectividad, incluso en cantidades mínimas, *Coxiella burnetii* es considerada un agente de alto potencial para el bioterrorismo y la guerra biológica, lo que resalta aún más la necesidad de un diagnóstico y control adecuados de esta bacteria (Petri, 2024).

Coxiella burnetii se transmite de diversas maneras. Según el Ministerio de Trabajo y Economía Social de España, esta bacteria tiene una dosis infectiva mínima (DIM)

extremadamente baja, ya que basta con inhalar entre 1 y 10 microorganismos para causar la enfermedad. La principal vía de transmisión es la inhalación de bioaerosoles procedentes de animales infectados, como ovejas, cabras, vacas, gatos y perros. Estos bioaerosoles pueden generarse a partir de líquidos del parto, tejidos placentarios, fetos abortados, excretas, leche, canales y vísceras de animales sacrificados. También puede haber transmisión indirecta mediante materiales contaminados, como paja, estiércol, tierra, lana o ropa de personas expuestas. Aunque menos comunes, otras vías incluyen contaminación a través de heridas, la vía conjuntival y picaduras de garrapatas infectadas de las familias Ixodidae y Argasidae (Programa de vigilancia y control Fiebre Q. (EDO), 2023).

Las pseudoesporas de esta bacteria tienen una alta resistencia al calor y la desecación, lo que les permite mantenerse viables en el ambiente durante largos periodos y propagarse a grandes distancias con la ayuda del viento. Por ejemplo, en la lana pueden sobrevivir entre 7 y 9 meses a 20 °C y entre 12 y 16 meses a 4 °C (Ruano,2011). En la carne permanecen viables hasta 30 días a 4 °C, mientras que en la leche pueden persistir por 42 meses. En estiércol y polvo sobreviven hasta 120 días, en excrementos de garrapatas al menos 19 meses y, en el suelo, hasta seis meses después de la contaminación. La forma resistente de esta bacteria, las pseudoesporas, es fundamental para su capacidad de persistir y propagarse (Código Sanitario para los animales terrestres. OIE, 2018).

El ciclo de vida de *Coxiella burnetii*, involucra múltiples etapas y hospedadores, se presenta en dos formas: células grandes metabólicamente activas y células pequeñas altamente resistentes, también conocidas como “pseudósporas” (Abeykoon, et al, 2021). En el hospedador bovino, *C. burnetii* es fagocitada y se multiplica dentro de los macrófagos mediante el torrente sanguíneo, la infección puede diseminarse hacia diversos órganos y tejidos, como los pulmones, la glándula mamaria y el útero, por consiguiente, su transmisión a los seres humanos ocurre principalmente mediante contacto con fluidos durante el parto de animales infectados o al consumir leche cruda contaminada (Ruano,2011). Las garrapatas también actúan como vectores importantes, transmitiendo la bacteria a otros rumiantes domésticos y silvestres, perpetuando así el ciclo de infección. La forma resistente de la bacteria asegura su persistencia en el ambiente, facilitando su propagación (Programa de vigilancia y control Fiebre Q. (EDO), 2023).

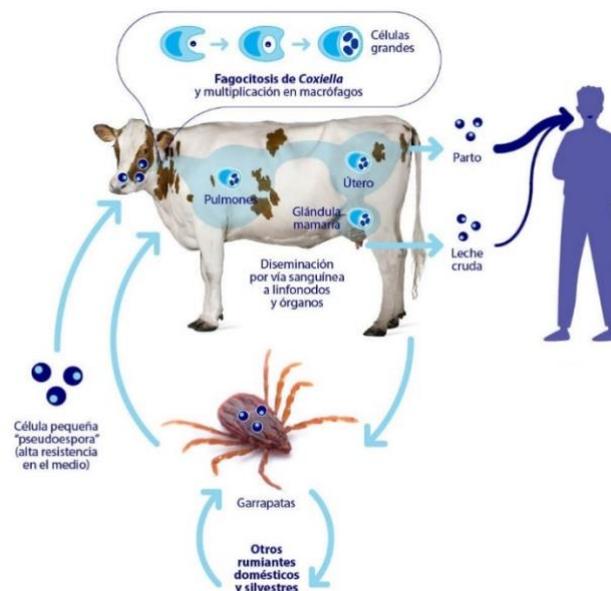


Figura 1. Ciclo de Vida *Coxiella burnetii*. El ciclo de vida de *Coxiella burnetii* se caracteriza por dos formas: una activa, que se multiplica dentro de las células, y una resistente, conocida como “pseudóspora”. En los bovinos, la bacteria es ingerida por los macrófagos y se distribuye a través del cuerpo por el torrente sanguíneo, afectando órganos como los pulmones, la glándula mamaria y el útero, los humanos pueden contagiarse al entrar en contacto con fluidos durante el parto o al consumir leche cruda contaminada, las garrapatas son también vectores clave, transmitiendo la bacteria a otros animales, lo que mantiene el ciclo de infección. La forma resistente permite que *C. burnetii* persista en el ambiente (Ruano,2011)

2.2. Epidemiología de *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii es una bacteria que tiene una distribución mundial, pero su prevalencia es mayor en zonas rurales y áreas donde se crían animales de pastoreo, como ovejas, cabras y vacas, a pesar de que los animales son los principales reservorios, la bacteria también puede encontrarse en otros mamíferos, como gatos y perros, aunque con menor frecuencia. (Sahu, et al, 2020). La principal fuente de contagio para los humanos es los bioaerosoles liberados durante el manejo de animales infectados, especialmente en situaciones de parto, ya que la bacteria se encuentra en fluidos biológicos como la placenta, los fetos abortados, y las secreciones vaginales. Además, personas que manipulan lana, estiércol o carne de estos animales tienen mayor riesgo de exposición (Abeykoon, et al, 2021).

En muchos casos la fiebre Q no se diagnostica debido a la falta de síntomas graves o específicos, la enfermedad es reconocida como un riesgo potencial en trabajadores de granjas, veterinarios, y en áreas donde se producen brotes. Existen también casos esporádicos en ambientes urbanos, pero la mayoría de las infecciones humanas están relacionadas con exposición directa a animales infectados o sus productos.

2.2.1. Síntomas de la Enfermedad en Humanos

La fiebre Q puede presentarse de forma aguda o crónica, los casos agudos son los más comunes y generalmente se manifiestan con síntomas semejantes a los de una infección respiratoria (Hoara, et al, 2019), lo que puede dificultar su diagnóstico:

- Fiebre alta y escalofríos, que pueden durar entre una y tres semanas.
- Dolor de cabeza intenso, similar al de una migraña.
- Malestar general, cansancio extremo y dolores musculares.

- Tos seca que puede persistir durante varios días.
- Dolor en el pecho o dificultad para respirar si la infección afecta los pulmones.
- Síntomas gastrointestinales como náuseas y vómitos.

En un porcentaje menor de personas, la enfermedad puede progresar a una forma crónica, que se asocia principalmente con endocarditis, especialmente en individuos inmunocomprometidos o con enfermedades preexistentes del corazón (Lacombe, et al, 2020). Esta forma de la enfermedad puede desarrollarse lentamente y ser mucho más difícil de tratar, lo que hace necesario un diagnóstico temprano para prevenir complicaciones graves (Sahu, et al 2020).

2.2.2. Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de la fiebre Q suele confirmarse mediante la detección de anticuerpos específicos contra *Coxiella burnetii* en la sangre del paciente. En algunos casos, también se puede realizar una prueba de qPCR o PCR para identificar el material genético de la bacteria. Las pruebas serológicas son clave, ya que la infección aguda se caracteriza por un aumento de los anticuerpos IgM y la infección pasada o crónica se detecta por la presencia de anticuerpos IgG (Melenotte, et al, 2020); (Luciani, et al, 2019).

El tratamiento de la fiebre Q en su fase aguda se realiza principalmente con antibióticos y en casos más graves, como la endocarditis o infecciones crónicas, puede ser necesario un tratamiento prolongado o combinado con otros antibióticos, es primordial iniciar el tratamiento lo antes posible para evitar complicaciones severas (Hoara, et al,2019).

2.2.3. Prevención y Control de *Coxiella burnetii*

Realizar una prevención de esta enfermedad es fundamental y se recomienda tomar medidas de control en los animales, como evitar el contacto directo con los fluidos de los animales en el momento del parto y la limpieza rigurosa de los lugares donde se manejan los animales, las personas que trabajen con animales infectados, como los veterinarios o los trabajadores de granjas, utilicen equipos de protección adecuados (mascarillas, guantes y ropa de protección) para reducir el riesgo de inhalar los bioaerosoles (Sahu, et al 2020).

La pasteurización de la leche y la cocción adecuada de la carne son medidas preventivas importantes, ya que la bacteria puede sobrevivir en estos productos si no se tratan correctamente. La implementación de buenas prácticas de higiene en las granjas y el manejo adecuado de los animales también son clave para reducir la propagación de la infección (Welch, et al, 2024).

2.3. Detección de *Coxiella burnetii*

La identificación de *Coxiella burnetii*, agente etiológico de la fiebre Q, ha sido un reto diagnóstico debido a su capacidad de permanecer latente y a su variabilidad en las manifestaciones clínicas, es por esto que a lo largo del tiempo, se han empleado diversas técnicas tradicionales para su detección, los cuales se incluyen desde los métodos microbiológicos, serológicos hasta microscópicos, aunque los avances en técnicas moleculares, como la PCR en tiempo real, han mejorado el diagnóstico, estos métodos tradicionales siguen siendo relevantes en muchos contextos y se realizan con los siguientes métodos (Sahu, et al, 2020).

2.3.1. Métodos tradicionales de detección

El aislamiento de *Coxiella burnetii* mediante cultivo bacteriano ha sido uno de los métodos tradicionales más utilizados, entre sus características del cultivo *C. burnetii* es una bacteria intracelular obligada, lo que significa que solo puede multiplicarse dentro de células hospedadoras y para su aislamiento, se requiere el uso de cultivos celulares, como fibroblastos o células Vero, que proporcionan el ambiente adecuado para su crecimiento y esto permite obtener un aislado puro del patógeno, lo que es útil para estudios posteriores, como la tipificación genética de las cepas (Valdivia & Villarroel, 2019).

Este método presenta varias limitaciones entre ellas están, el proceso de cultivo es notablemente lento y la bacteria tiene un ciclo de replicación prolongado, lo que puede demorar entre 2 a 6 semanas para obtener resultados positivos, posee riesgos biológicos por su alta infectividad, el manejo de *Coxiella burnetii* en el laboratorio representa una amenaza para el personal, especialmente cuando se trabajan con muestras de animales infectados y por último su baja sensibilidad que se da en muestras con bajas cargas bacterianas, como en infecciones tempranas o en pacientes con síntomas leves, el cultivo puede no ser efectivo (Eldin, et al, 2017).

La microscopía electrónica es una técnica tradicionalmente utilizada para la observación directa de *Coxiella burnetii* en muestras biológicas. Este enfoque es más efectivo cuando se emplean técnicas de tinción especializadas que resaltan las características morfológicas de la bacteria, como la tinción de Gram o Ziehl-Neelsen. En algunos casos, también se puede recurrir a tinciones como la de Giemsa o Kinyoun, las cuales mejoran la visibilidad de *C. burnetii* en las muestras (Dragan & Voth, 2020).

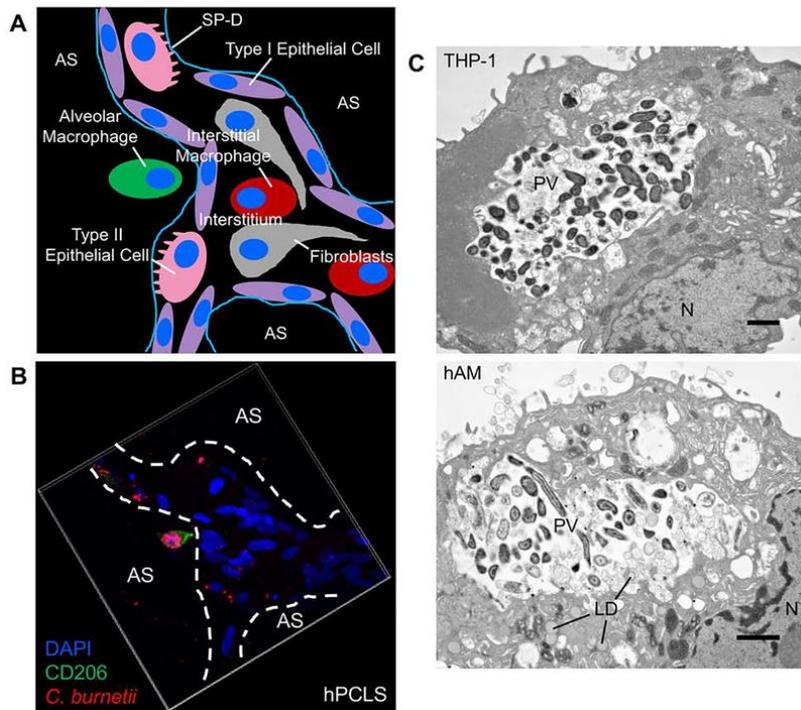


Figura 2. Visualización de *Coxiella burnetii* en macrófagos alveolares mediante microscopía confocal y electrónica. A. Esquema que representa las principales células presentes en el tejido pulmonar, como las células epiteliales alveolares de tipo I y II, macrófagos alveolares e intersticiales, fibroblastos y el espacio alveolar (AS). B. Imagen obtenida mediante microscopía fluorescente, utilizada para identificar la localización de *Coxiella burnetii* en un modelo de tejido pulmonar humano, los núcleos están teñidos de azul, los macrófagos se destacan en rojo y la bacteria aparece en verde. C. se presentan imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (Dragan & Voth, 2020).

Una de las principales ventajas de la microscopía electrónica es su capacidad para proporcionar una evaluación rápida de las muestras, lo que la hace útil para obtener resultados preliminares, además, es relativamente sencilla y económica en comparación con otros métodos, como el cultivo bacteriano o las pruebas moleculares (Relucenti, et al, 2021). No obstante, presenta desventajas significativas, entre las cuales destaca su baja sensibilidad, la cantidad de bacterias en las muestras puede ser insuficiente para su detección mediante microscopía, especialmente en etapas tempranas de la infección, además, debido al pequeño tamaño de la bacteria, su identificación puede ser compleja, particularmente en muestras que contienen una gran cantidad de otros microorganismos, lo que dificulta su reconocimiento (Afanasyev, et al, 2019).

2.3.2. Métodos moleculares de detección

Los métodos moleculares de detección de *Coxiella burnetii*, el agente causal de la fiebre Q, han transformado significativamente el diagnóstico de esta enfermedad al ofrecer una mayor sensibilidad, especificidad y rapidez que los métodos tradicionales (Frangoulidis, et al, 2022). Estas técnicas se basan en la identificación directa del material genético del patógeno, lo que permite una detección más precisa, incluso en etapas tempranas de la infección o cuando la carga bacteriana es baja (Mioni, et al, 2019).

La PCR convencional amplifica secuencias específicas de ADN de la bacteria, permitiendo su detección incluso en muestras con baja carga bacteriana, su principal ventaja es la alta sensibilidad, pero su desventaja es que no permite cuantificar el ADN ni detectar la infección en tiempo real, y está sujeta a riesgos de contaminación (Fernández, et al, 2004).

La PCR en tiempo real es una técnica molecular avanzada utilizada para amplificar y cuantificar el ADN en tiempo real durante el proceso de amplificación, a diferencia de la PCR convencional, que solo permite visualizar el producto amplificado al final del ciclo. La qPCR monitorea la acumulación del producto en cada ciclo de amplificación, proporcionando información más precisa y rápida sobre la cantidad de ADN presente en la muestra inicial (Terrones, et al,2019).

En la qPCR, el proceso comienza con la desnaturalización del ADN a altas temperaturas, separando las dos cadenas de ADN, luego se añaden los cebadores específicos, que son secuencias cortas de ADN diseñadas para unirse a las regiones de interés en el ADN de la muestra, posteriormente, se realiza la extensión de la cadena, donde una enzima, como la polimerasa, sintetiza nuevas cadenas de ADN, cuando el proceso va avanzando se genera un producto amplificado (Velasquillo, et al,2013);(Villalba, et al, 2021).

Lo que distingue a la PCR en tiempo real de la PCR convencional es la presencia de un sistema de monitoreo durante la amplificación se utilizan sondas o colorantes fluorescentes que emiten señales de luz cuando se unen al ADN amplificado las señales son detectadas por un equipo especializado, lo que permite que la cantidad de producto amplificado sea medida en tiempo real, es decir, a medida que avanza cada ciclo de amplificación, la intensidad de la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de ADN amplificado, lo que permite estimar la carga inicial de ADN en la muestra (Terrones, et al,2019).

Existen diferentes métodos de detección fluorescente, como el uso de sondas TaqMan (que contienen una secuencia específica de unión) o colorantes intercalantes, como SYBR Green, que se unen al ADN de doble cadena. Uno de los principales canales de fluorescencia utilizados en la qPCR es el canal FAM (Fluorescein Amidite) (Logan, et al, 2019). El FAM es un colorante fluorescente verde que emite señales cuando se excita a una longitud de onda específica. En las reacciones de qPCR, las sondas TaqMan, que incluyen el FAM en un extremo, se unen al ADN amplificado y, durante la amplificación, el FAM emite fluorescencia y esa señal es detectada en tiempo real, permitiendo la cuantificación precisa del ADN amplificado. La ventaja de utilizar el canal FAM es que permite la detección específica y sensible de pequeñas cantidades de material genético en la muestra (Saunders, et al, 2013).

Una de las grandes ventajas de la qPCR es su capacidad para cuantificar el ADN de manera precisa y específica, la técnica es altamente sensible y puede detectar incluso pequeñas cantidades de material genético, lo que la hace ideal para la detección temprana de infecciones o para estudios de expresión génica, además, al monitorear el proceso en tiempo real, la qPCR reduce el riesgo de contaminación cruzada, ya que no es necesario abrir los tubos después de cada ciclo (Logan,2009).

Por último, está la RT-PCR, que detecta ARN en lugar de ADN, se centra en la expresión genética de la bacteria, siendo útil para identificar infecciones activas; sin embargo, requiere también de equipos especializados y puede ser más compleja en su interpretación (Truong, et al, 2021). En cuanto a la hibridación de ácidos nucleicos, aunque menos utilizada que la PCR, esta técnica se basa en la unión de sondas específicas a secuencias de ADN de la bacteria, lo que permite detectar la presencia del patógeno, su principal ventaja es que tiene un riesgo menor de contaminación, pero es menos sensible y precisa en comparación con la PCR (Valdivia & Villarroel, 2019).

2.4. Ética en el uso de animales en investigación

El uso de animales en investigación científica es un tema ético y moralmente complejo, que requiere un equilibrio entre los beneficios potenciales de la investigación y el bienestar de los animales utilizados. La ética en el uso de animales para investigación se basa en principios fundamentales que buscan minimizar el sufrimiento animal y garantizar que los experimentos sean justificados científicamente (Osorio, et al, 2006).

A nivel internacional, existen diversas normativas y directrices que regulan el uso de animales en investigación, las cuales se enfocan en el respeto y el cuidado de los animales, así como en la minimización de su sufrimiento. Uno de los marcos éticos más conocidos es el de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), propuesto inicialmente por Russell y Burch (Álvarez, 2021). Este principio establece que los investigadores deben reemplazar el uso de animales por métodos alternativos siempre que sea posible, reducir el número de animales utilizados al mínimo necesario para obtener resultados válidos, refinar los procedimientos para minimizar el dolor y el sufrimiento de los animales (Osorio, et al, 2006).

En Ecuador, el uso de animales en investigación está regulado por una serie de leyes y normativas que buscan garantizar el bienestar de los animales y promover la investigación

científica responsable. La Ley Orgánica de Protección Animal (aprobada en 2017) establece un marco legal para la protección de los animales en el país, incluidas las disposiciones relacionadas con la investigación científica. Esta ley exige que las investigaciones que involucren animales sean justificadas, apropiadas y realizadas bajo condiciones que minimicen el sufrimiento y el estrés de los animales (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2021).

El Comité Nacional de Ética en Investigación en Ecuador supervisa y aprueba los proyectos de investigación que involucran animales. Todo proyecto de investigación que requiera el uso de animales debe ser evaluado por este comité, que revisa la metodología del estudio, la justificación científica del uso de animales y la aplicación de los principios éticos de las 3R (Álvarez,2021).

En el ámbito de la investigación biomédica y veterinaria, el país sigue normativas internacionales de bienestar animal, asegurando que se apliquen estándares éticos en el manejo y sacrificio de los animales en los laboratorios (Álvarez,2021). De esta forma, la legislación ecuatoriana cumple con los requisitos internacionales para garantizar que las investigaciones científicas sean realizadas de forma ética, con el objetivo de obtener resultados que beneficien tanto a la ciencia como a la sociedad, sin comprometer el bienestar de los animales (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2021).

2.5. Selección de las muestras

La elección de las muestras es un paso crucial en el diagnóstico de la fiebre Q ya que depende tanto del tipo de método diagnóstico utilizado como de la fase de la enfermedad y la especie animal involucrada. *Coxiella burnetii* afecta principalmente a animales de granja, pero

también puede encontrarse en animales silvestres, lo que complica su identificación en ciertas situaciones (Alvarez, et al,2019).

La sangre es una de las muestras más utilizadas en estudios serológicos y moleculares para la detección de *Coxiella burnetii*. Los anticuerpos específicos contra el patógeno pueden ser detectados mediante técnicas serológicas, mientras que el ADN de la bacteria puede ser identificado mediante PCR. En la fase aguda de la enfermedad, los niveles de anticuerpos pueden ser bajos, por lo que la detección molecular es más confiable para identificar la infección activa (Sahu, et al, 2020).

En especies como las ovejas, cabras y vacas, *C. burnetii* se encuentra en grandes concentraciones en la placenta y los líquidos fetales, especialmente en los casos de aborto o parto prematuro y en rumiantes como vacas y cabras, la leche puede ser un vehículo importante para la transmisión de *C. burnetii* a los humanos, y puede ser utilizada para la detección del patógeno mediante PCR, aunque la carga bacteriana en la leche suele ser más baja en comparación con otras muestras (Gamboa,et al, 2020); (Alvarez,et al,2019);(Welch, et al, 2024).

Las heces pueden ser útiles para la detección de *C. burnetii* en animales infectados, especialmente durante la fase crónica de la enfermedad, sin embargo, su uso como muestra es menos común, ya que la cantidad de bacteria en las heces suele ser baja y la sensibilidad de los métodos de detección puede verse afectada (Epelboin, et al,2023).

Los tejidos de órganos como el hígado, riñón, bazo y pulmones también pueden ser evaluados en casos de infecciones crónicas, especialmente cuando la bacteriemia es prolongada. Estos tejidos son útiles en la investigación de infecciones subclínicas o en estudios post-mortem de animales fallecidos por fiebre Q (Melenotte, et al,2016).

Coxiella burnetii afecta principalmente a animales de granja, pero también puede estar presente en una variedad de especies silvestres y domésticas, los principales animales en los que se presenta esta enfermedad son: ovejas y cabras tienen los principales reservorios de *C. burnetii*, y la fiebre Q es particularmente prevalente en estos animales debido a su tendencia a abortar cuando están infectados, la placenta, los líquidos fetales y las secreciones vaginales de estos animales son especialmente ricos en la bacteria (Gisbert, et al, 2024).

Las vacas también son una fuente importante de infección, particularmente en aquellos casos en los que hay abortos o problemas reproductivos, las secreciones genitales, la placenta y la leche de las vacas pueden contener *C. burnetii*, representando un riesgo tanto para otros animales como para los seres humanos que manipulan estos productos (Pérez, et al, 2024)

Coxiella burnetii también ha sido detectada en roedores y otros animales silvestres, aunque en menor medida, la bacteria se ha encontrado en estos animales, principalmente en sus excretas, hígado, bazo. (Freitas, et al, 2024).

2.6. Estandarización de PCR en Tiempo Real

La estandarización de la qPCR es esencial para garantizar la precisión, reproducibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos en los ensayos diagnósticos, este proceso implica la optimización de diversos parámetros experimentales, tales como las condiciones de amplificación, la concentración de los reactivos, la selección adecuada de cebadores y la calibración del equipo de PCR (Terrones, et al, 2019). En particular, se ajustan cuidadosamente las condiciones de temperatura para las fases de desnaturalización, hibridación y elongación, con el objetivo de asegurar que los cebadores se unan específicamente a las secuencias diana (Bustin, et al, 2020).

En un protocolo de PCR en tiempo real, la amplificación del ADN se lleva a cabo mediante ciclos de desnaturalización a altas temperaturas, seguidos de una fase de hibridación en la que los cebadores se unen a las secuencias de interés, y una fase de elongación para sintetizar el producto amplificado (Bruin, et al, 2011). La optimización de estos ciclos es crucial para obtener resultados específicos y sensibles, además, la concentración de reactivos como los dNTPs, el $MgCl_2$ y la polimerasa deben ser ajustadas para maximizar la eficiencia de la reacción sin comprometer la especificidad (Mattes, 2019). La validación de estos parámetros, a través de la estandarización, asegura que la PCR en tiempo real sea una técnica fiable para la detección de *C. burnetii*, permitiendo la cuantificación precisa del ADN y proporcionando una herramienta poderosa para el diagnóstico molecular, a través de la calibración y optimización constantes, se incrementa la sensibilidad y precisión del método, lo que resulta fundamental para la detección rápida y exacta de patógenos en diversas muestras biológicas (Basanisi, et al, 2020).

2.6.1. Curva estándar

La curva estándar en qPCR es una herramienta clave para la cuantificación precisa del ADN, ya que permite establecer una relación cuantitativa entre la concentración de ADN en las muestras y la señal de fluorescencia generada durante los ciclos de amplificación y para construir una curva estándar, se preparan una serie de muestras con concentraciones conocidas de ADN, que cubren un amplio rango de concentraciones, lo que permite establecer un espectro de calibración (Fajardo, et al, 2018).

En la qPCR durante cada ciclo de amplificación se registra el valor de Cq (Cycle quantification), que indica el ciclo en el cual la fluorescencia detectada supera un umbral predefinido (Mattes, 2019). La curva estándar se construye graficando el valor de Cq en el eje y (número de ciclos) contra la concentración de ADN conocida en el eje x (normalmente

expresada en unidades como copias de ADN por microlitro o concentración molar). Esta gráfica proporciona una ecuación matemática que describe la relación entre la concentración de ADN y el valor de C_q obtenido durante la amplificación (Gentle, et al,2001).

La utilidad principal de la curva estándar es que, al conocer el valor de C_q para una muestra desconocida, es posible calcular su concentración de ADN mediante la ecuación generada por la curva, esto permite realizar una cuantificación absoluta del ADN en la muestra, lo cual es fundamental para aplicaciones como la cuantificación de genes de interés, cargas virales, bacterianas o para estudios de expresión génica, además, la curva estándar también permite evaluar la eficiencia de amplificación (Fajardo,et al, 2018);(Wang, et al, 1989).

Una amplificación eficiente se caracteriza por una pendiente cercana a -3.32, lo que corresponde a una eficiencia cercana al 100%, lo que asegura que la reacción de PCR esté funcionando de manera óptima. Si la eficiencia es demasiado baja o alta, esto podría indicar problemas con los reactivos, los cebadores o las condiciones experimentales (Rutledge, et al,2003) ;(Larionov, et al, 2005).

La construcción de una curva estándar también permite comprobar la calidad de la reacción de qPCR, una curva estándar bien definida y con una relación lineal es indicativa de una amplificación precisa y sin interferencias (Fronhoffs, et al, 2002). Si la curva es irregular, plana o no lineal, puede sugerir problemas como inhibición de la PCR, contaminación o errores en los reactivos, sin embargo, la curva estándar no está exenta de limitaciones. Para su construcción, es esencial contar con muestras estándar con concentraciones conocidas y precisas de ADN, lo cual no siempre es posible, además, el rango de concentración de las muestras debe ser adecuado para que la curva estándar cubra toda la posible variabilidad de las muestras experimentales (Larionov, et al, 2005) ;(Wang, et al, 1989).

En algunos casos, las muestras pueden no tener una concentración estándar conocida, lo que obligaría a recurrir a métodos de cuantificación relativa, aunque estos no permiten determinar la cantidad exacta de ADN (Wang, et al, 1989).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de investigación multidisciplinaria en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

3.1. Diseño de Cebadores y Sondas

Se diseñaron cebadores y una sonda a partir de secuencias del gen IS111, el cual codifica una proteína de membrana externa. El proceso de diseño se llevó a cabo utilizando herramientas bioinformáticas, como Primer-BLAST (versión 2.10.1), disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, que permitió seleccionar secuencias específicas a partir de las disponibles en bases de datos públicas y estudios previos.

Se seleccionaron varios genes relacionados con *C. burnetii*, tales como el gen isótrato deshidrogenasa (*icd*), el gen que codifica la proteína de membrana externa (*comI*), un elemento de inserción multicopia (IS1111), ciclooxigenasa (*cox*), proteína de membrana externa (*ompA*) y el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). Para cada uno de estos se extrajeron las secuencias correspondientes y se analizaron.

Este paso fue esencial para asegurar que las secuencias seleccionadas fueran específicas de *C. burnetii*, evitando así posibles contaminaciones o resultados falsos positivos. Para ello, se utilizó BLAST, lo que permitió comparar las secuencias seleccionadas con aquellas almacenadas en bases de datos públicas y determinar las que presentaban una coincidencia precisa con *C. burnetii*, tras obtener las coincidencias más relevantes, se seleccionaron las secuencias que cumplían con los criterios de especificidad y sensibilidad establecidos en los protocolos.

Se consultó la base de datos NCBI para obtener información detallada sobre las secuencias, tales como su tamaño y los primers forward y reverse, asimismo, se evaluaron las dianas F (forward), R (reverse) y totales para determinar la especificidad de estos y su desempeño en qPCR. Este proceso permitió seleccionar los pares de primers óptimos para la detección del patógeno, asegurando un rendimiento eficiente y preciso.

En cuanto a las sondas, su selección se realizó mediante la revisión de diferentes protocolos investigados. La sonda elegida fue la que se encontraba en el protocolo seleccionado y se encontraba perfectamente alineada con el par de primers validado a través de los pasos previamente mencionados. Esta sonda complementa de manera eficaz el par de primers, optimizando así la especificidad y la eficiencia del ensayo de qPCR, lo que garantiza una detección precisa y confiable de *C. burnetii*.

Finalmente, se descargaron secuencias completas de *C. burnetii* desde fuentes confiables como NCBI, para ser procesadas en el software UNGEN, lo que fue fundamental para realizar un análisis detallado. Este análisis permitió seleccionar con mayor precisión los primers más eficaces, garantizando así una mayor fiabilidad y eficiencia en la identificación del ADN de *C. burnetii* en futuras pruebas.

Tabla 1. Cebadores y Sondas de Hidrólisis para qPCR.

Gen	Cebador o sonda	Designación	Secuencia de cebadores y sondas (5' -3')	Longitud de producto de amplificación (pb)
IS111	Primer Forward	IS1pri_F	CGCAGCACGTCAAACCG	146
IS111	Primer Reverse	IS1pri_R	TATCTTTAACAGCGCTTGAACGTC	146
	Sonda	Tqpro_IS1	FAM- ATGTCAAAAGTAACAAGAATGATCG TAAC-BHQ2	

Nota. Componentes esenciales utilizados en la técnica de qPCR para la amplificación y detección de una secuencia específica de ADN.

3.2. Mezcla de reacción

Para llevar a cabo las reacciones de qPCR, se prepararon dos mezclas de reacción distintas (MIX I y MIX II), con el objetivo de evaluar las condiciones óptimas para la amplificación específica del ADN de *Coxiella burnetii*.

La composición de cada mezcla se calculó con la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Primers

$$V = \frac{20 \mu l (0.2 \mu M)}{10 \mu M} = 0,4 \mu l$$

Sondas

$$V = \frac{20 \mu l (0.1 \mu M)}{10 \mu M} = 0,2 \mu l$$

La composición de cada mezcla incluía los siguientes componentes esenciales:

Enzima (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix): Se mantuvo la misma concentración de la enzima (10 μ M) en todas las mezclas para asegurar una reacción de amplificación eficiente y consistente.

Primers y Sonda: Los primers forward (PrimerF) y reverse (PrimerR) fueron utilizados a una concentración constante de 0,4 μ l, mientras que la sonda se mantuvo a 0,2 μ l en todos los mixes, asegurando una hibridación adecuada y una señal de fluorescencia precisa durante la reacción.

Agua (H₂O): Se ajustó la cantidad de agua en cada mezcla para equilibrar la concentración de los otros reactivos, optimizando así las condiciones de la reacción.

Control positivo de *Coxiella burnetii*: La cantidad de control positivo se redujo progresivamente para evaluar la sensibilidad y eficiencia de la amplificación bajo diferentes concentraciones del ADN objetivo.

Tabla 2. Composición de los diferentes mixes de reacción para qPCR

Reactivos	MIX I (4 μ l Control positivo de <i>C. burnetii</i>)	MIX II (3 μ l Control positivo de <i>C. burnetii</i>)
Enzima (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix)	10 μ l	10 μ l
PrimerF	0,4 μ l	0,4 μ l
PrimerR	0,4 μ l	0,4 μ l
Sonda	0,2 μ l	0,2 μ l
H ₂ O	5 μ l	6 μ l
Control positivo de <i>C. burnetii</i>	4 μ l	3 μ l
Total	20 μ l	20 μ l

Nota. Las concentraciones de los reactivos fueron ajustadas en cada mezcla para evaluar las condiciones óptimas de amplificación, variando principalmente la cantidad de agua y el control positivo, de acuerdo con las necesidades del protocolo y los recursos disponibles en el laboratorio.

Tabla 3. Ciclos y Temperaturas usadas en qPCR.

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95°C	5 min
Ciclos de amplificación	45	95°C	5 seg
Enfriamiento final	1	60°C	30 seg
	1	50°C	30 seg

Se usó la plantilla para amplificación por qPCR en tiempo real (Tabla 3), a continuación, se detallan los parámetros de temperatura, duración y ciclos para cada etapa del proceso.

Primera etapa- Desnaturalización inicial: Consiste en un solo ciclo a 95 °C durante 5 minutos, sin adquisición de datos. Esta etapa permite la separación de las cadenas de ADN, desnaturalizando la doble hélice en cadenas simples. La velocidad de aumento de temperatura (rampa) es de 4.40 °C/segundo.

Segunda etapa- Ciclos de amplificación: Se repiten 45 ciclos que incluyen, desnaturalización a 95 °C durante 5 segundos y alineamiento y extensión a 60 °C durante 30 segundos, con adquisición de datos en modo “Single”. La rampa de temperatura durante esta etapa es de 4.40 °C/segundo al subir y 2.20 °C/segundo al enfriar.

Tercera etapa- Enfriamiento final: Es un solo ciclo a 50 °C durante 30 segundos, sin adquisición de datos. Esta etapa estabiliza el sistema tras la amplificación. La rampa de temperatura al enfriar es de 2.20 °C/segundo.

3.3 Extracción de ADN

Se utilizaron extracciones de ADN en tejido hepático de roedor proveniente de Machala y sangre de bovino proveniente de Manabí.

Hígado de ratón: Las muestras de hígado fueron obtenidas de ratones provenientes de Machala facilitadas por el laboratorio del INSPI estos fueron cuidadosamente sacrificados según los procedimientos establecidos por el comité ético de Ecuador para investigaciones

científicas (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2021), se tomaron todas las precauciones necesarias para reducir el sufrimiento de los animales, garantizando que el sacrificio y la obtención de las muestras se realizaran de forma humanitaria.

Sangre bovina: Se recolectaron muestras de sangre de vacas provenientes de Manabí facilitadas por el laboratorio del INSPI, fueron extraídas en condiciones estériles para evitar cualquier tipo de contaminación.

El ADN de las muestras fue extraído utilizando el kit Quick-DNA de Zymo Research (cat #D3020, USA) para las muestras de sangre de vaca y el kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System de Promega (cat #A2360, USA) para el tejido hepático de roedor, siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit de Zymo Research está diseñado para obtener ADN de alta calidad y pureza de diversas muestras biológicas, proporcionando un proceso rápido y eficiente en menos de 30 minutos, lo cual es ideal para estudios de qPCR. Por su parte, el kit Wizard® SV de Promega permite una extracción eficiente de ADN genómico de alta pureza a partir de tejidos complejos como el hepático, facilitando su uso en aplicaciones moleculares como amplificación por qPCR y secuenciación.

3.5. Validación del Ensayo

La validación de la técnica se llevó a cabo mediante las siguientes pruebas:

Especificidad: Para asegurar que los cebadores y la sonda fueran específicos para *Coxiella burnetii*, se utilizaron muestras de ADN de diferentes patógenos como controles negativos. No se permitió amplificación en estas muestras para garantizar que el ensayo no detectara especies no relacionadas.

Curva estándar y eficiencia de reacción: Se construyó una curva estándar utilizando diluciones del ADN de control positivo de *Coxiella burnetii* y se calculó la eficiencia de amplificación para cada reacción, la cual debe estar entre el 90% y el 100% para garantizar un rendimiento adecuado del ensayo. Para la cuantificación del ADN en las diluciones de control positivo de *Coxiella burnetii*, se utilizó un equipo fluoróforo junto con el kit QuantiFluor® ONE dsDNA System de Promega que permite una cuantificación específica de ADN de doble cadena (dsDNA). Este kit ofrece una mayor sensibilidad en comparación con la medición por absorbancia a 260 nm, lo que lo hace adecuado para muestras con concentraciones bajas, también se usó el fluorómetro Quantus de Promega es un equipo compacto y de tamaño reducido que posibilita la cuantificación precisa y específica de ácidos nucleicos, este equipo permitió medir con precisión la concentración de ácidos nucleicos en las muestras, mide desde un rango de 1 ng/μL hasta 5000 ng/μL, cuenta con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm, esto facilitó la construcción de la curva estándar y la evaluación de la eficiencia del ensayo.

Para evaluar la eficiencia de la reacción de qPCR, se construyó una curva estándar utilizando el software GraphPad Prism, este análisis permitió establecer la relación entre la concentración del analito y el ciclo umbral (Ct), lo que es fundamental para determinar la eficiencia de amplificación de la PCR. La curva estándar se construyó a partir de diferentes concentraciones conocidas de ADN del patógeno, lo que permitió evaluar la precisión y sensibilidad de la reacción, además, mediante este enfoque, se pudo calcular la eficiencia de la amplificación, que se define como el grado en el que la reacción amplifica el ADN objetivo en función de la concentración inicial. El análisis en GraphPad Prism, facilitó la obtención de parámetros clave como la pendiente de la curva y el coeficiente de determinación (R^2), que son esenciales para verificar la calidad y reproducibilidad de los datos.

Reproducibilidad: Se evaluó la reproducibilidad de la técnica repitiendo los ensayos en diferentes días con las mismas condiciones y muestras para garantizar que los resultados fueran consistentes.

3.6. Preparación de las placas de PCR en tiempo real

La correcta preparación de las placas de qPCR, es un paso crucial para garantizar la precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos en este tipo de ensayos para esta investigación, las placas fueron preparadas meticulosamente para asegurar que cada reacción se realizara bajo condiciones uniformes y controladas, se organizaron las muestras biológicas (sangre e hígado), así como los controles negativos y positivos, en las posiciones correspondientes dentro de cada pocillo, se realizaron placas prueba con las diluciones y réplicas, siguiendo un diseño sistemático, además, se prestó especial atención a la cantidad y distribución de los reactivos en cada pocillo, así como a las condiciones de carga para evitar contaminación cruzada, es importante recalcar que este proceso fue fundamental para maximizar la eficiencia y fiabilidad de la amplificación del ADN objetivo durante la qPCR.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados

4.1.2. Curva estándar y Fluorimetría (validación de la técnica de cuantificación).

Se evaluó la concentración de muestra en las siguientes concentraciones:

Tabla 4. Resultados de diluciones en Fluorómetro

Diluciones	Concentración de ADN (ng/ul)
<i>C. burnetii</i> control positivo	0,08ng/ul
10 ⁻¹	0,043 ng/ul
10 ⁻²	0,0373 ng/ul
10 ⁻³	0,0155ng/ul
10 ⁻⁴	0,0145ng/ul
10 ⁻⁵	0,0135 ng/ul
10 ⁻⁶	0,0115ng/ul

Nota. Las concentraciones mostradas en la tabla fueron obtenidas mediante fluorimetría utilizando el equipo Quantus de Promega, los valores corresponden a las diluciones realizadas del control positivo y reflejan una disminución progresiva de la concentración de ADN desde la dilución 10⁻¹ hasta la 10⁻⁶. Cabe destacar que las concentraciones más bajas 10⁻⁵ y 10⁻⁶ se encuentran cerca del límite de detección, lo que podría explicar la baja eficiencia en estas diluciones durante las pruebas con qPCR.

La Figura 3, refleja una relación lineal con pendiente negativa y un coeficiente de determinación, lo que confirma que las diluciones se llevaron a cabo de manera adecuada y que las concentraciones disminuyen consistentemente, esto sugiere que el protocolo se realizó correctamente. Los primers tuvieron un buen desempeño hasta la dilución 10^{-4} , mientras que en las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} la concentración de ADN fue demasiado baja para ser detectada de manera eficiente, por esto se realizaron réplicas y se realizó la curva estándar como lo corroboran los valores obtenidos mediante fluorometría, donde las concentraciones eran menores a $0.0115 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y ahí es donde se pierde la sensibilidad, a pesar que el control positivo presentó una concentración inicial baja ($0.08 \text{ ng}/\mu\text{L}$), esto no afectó la funcionalidad del protocolo, que demostró ser confiable hasta la dilución 10^{-4} .

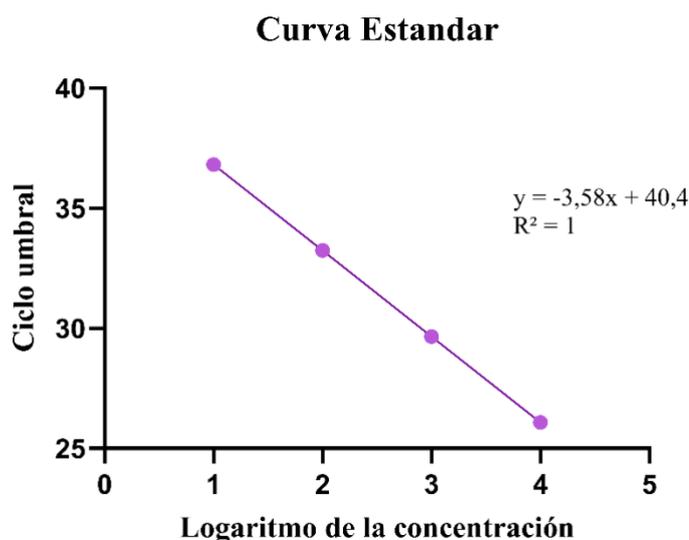


Figura 3. Curva estándar de diluciones seriadas del control positivo.

La gráfica de curva estándar muestra una relación lineal entre el logaritmo de la concentración (eje X) y el ciclo umbral (Ct, eje Y), los puntos representan las diluciones del control positivo, con una disminución del Ct a medida que aumenta la concentración del analito. La pendiente negativa -3.58 , sugiere que, por cada aumento en una unidad logarítmica de concentración, el ciclo umbral disminuye aproximadamente en 3.58 ciclos. El valor del

intercepto 40.4 indica el Ct esperado cuando el logaritmo de la concentración es cero (concentración no diluida) y por último el coeficiente de determinación, el valor 1 que confirma la precisión del ajuste lineal, lo que implica que los datos experimentales son reproducibles y confiables.

$$E = 10 \left(-\frac{1}{(-3.58)} \right) - 1 = 10^{0.279} - 1 = 0.901 \times 100 = 90.1 \%$$

4.1.4. Control positivo y validación de primers.

Para validar los primers, se utilizó un par de primers con un producto de amplificación de 146 pares de bases. Se prepararon varias mezclas de reacción en las que se ajustó la cantidad de agua añadida como se observa en la tabla 2.

El ADN del control positivo fue utilizado como referencia, incorporando 4 µl de ADN en el Mix I y 3 µl en el Mix II, ambas mezclas fueron ajustadas con diferentes volúmenes de agua para completar el volumen total de la reacción. Los resultados obtenidos indicaron que el Mix II (con 3 µl de ADN del control positivo) presentó una amplificación clara y consistente, lo que sugiere que los primers funcionaron eficazmente para amplificar el ADN objetivo. Por otro lado, el Mix I (con 4 µl de ADN) también mostró amplificación, pero con una intensidad de señal menor y una visibilidad reducida en comparación con el Mix II, es decir que los resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales empleadas, el volumen de 3 µl de ADN en el Mix II fue más adecuado para lograr una amplificación eficiente y el Mix I, aunque amplificó, no mostró una señal tan fuerte como la del segundo Mix, lo cual podría estar relacionado con una variabilidad en la cantidad de ADN disponible para la amplificación.

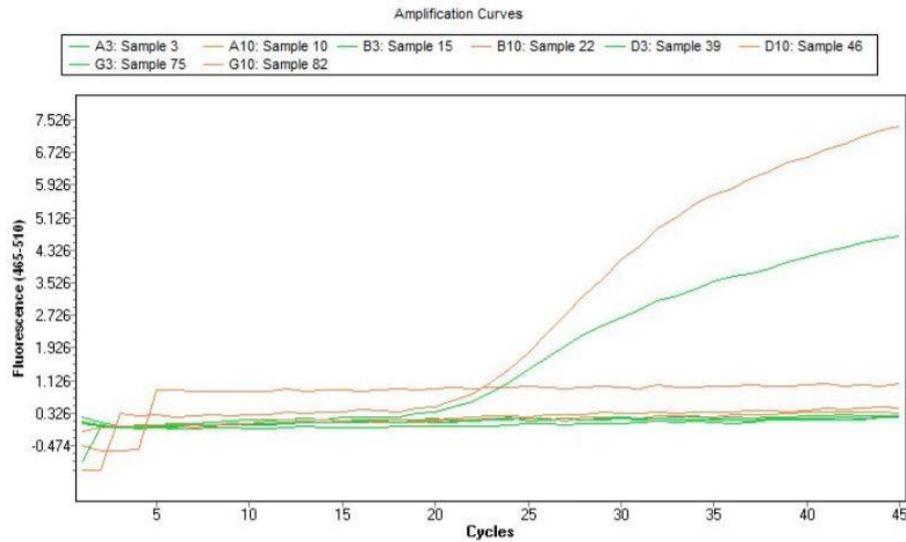


Figura 4. Prueba de qPCR con dos Mixes usados. Las curvas de amplificación obtenidas durante la qPCR muestran; En el eje X los ciclos de amplificación, que van de 1 a 45, mientras que en el eje Y se encuentra la fluorescencia medida en el canal 465-510 nm, indicando la acumulación del producto amplificado, la línea roja corresponde al Mix II, mientras que la línea azul representa el Mix I.

Las muestras con un aumento significativo en la fluorescencia después de un cierto número de ciclos (como la línea roja, Mix II) indican amplificación del ADN objetivo. Las líneas planas, por el contrario, representan ausencia de amplificación o niveles no detectables de ADN en esas condiciones. Esto sugiere que el Mix II es el más eficiente en las condiciones evaluadas.

Tabla 5. Comparación de la Eficiencia de Amplificación con Diferentes Mezclas de Reacción y Volúmenes de ADN.

MIX I (4 µl Muestra)	CT	MIX II (3 µl Muestra)	CT
Control positivo (4 µl de ADN + 16 ul de MIX I)	21.48	Control positivo (3 µl de ADN + 17 ul MIX II)	22.17
Control negativo (4 µl Agua + 16 ul de MIX I)	---	Control negativo (3 µl Agua + 17 ul MIX II)	---
Muestra de sangre de vaca (4 µl de ADN extraído + 16 ul de MIX I)	---	Muestra de sangre de vaca (3 µl de ADN extraído + 17 ul de MIX II)	---

Nota: Se muestran los resultados de la amplificación por qPCR utilizando dos mezclas de reacción diferentes, Mix I y Mix II, con variaciones en la cantidad de agua y ADN. El Control positivo con Mix I (4 µl de ADN) dio un ciclo umbral Ct de 21.48, mientras que el Control positivo con Mix II (3 µl de ADN) presentó un Ct de 22.17, el control negativo y la única muestra usada como se observa la distribución de la placa (Anexo 12) dieron negativas, por lo cual no hubo amplificación y no arrojaron valores de Ct.

Los resultados sugieren que el Mix II (con 3 µl de ADN) es más efectivo en términos de amplificación, mostrando una curva más estable y un Ct ligeramente más alto, aunque el Ct de Mix I fue más bajo, lo que podría sugerir una mayor cantidad de ADN amplificado inicialmente, la señal fue menos fuerte y más irregular, es decir que el volumen de 3 µl de ADN en Mix II es el más adecuado para lograr una amplificación eficiente y robusta para su utilización en las muestras.

4.1.3. Resultados de PCR en tiempo real en sangre e hígado.

En este estudio se emplearon dos tipos de muestras biológicas, sangre de vaca e hígado de ratón; se usaron específicamente estas muestras, puesto que, es donde se ha reportado la

presencia de *C. burnetii* en mayor cantidad y los animales seleccionados son los principales hospedadores. Con el fin de detectar *C. burnetii* a través de qPCR, se hace énfasis que la recolección de las muestras se llevó a cabo respetando estrictamente los protocolos éticos y las normativas vigentes que garantizan el bienestar de los animales utilizados en la investigación.

Las muestras biológicas analizadas, tanto de sangre de vaca como de hígado de ratón, dieron resultados negativos para la presencia de *Coxiella burnetii*, a pesar de la alta prevalencia de esta bacteria reportada en los bovinos y los ratones como hospedadores, los análisis mediante qPCR no detectaron ADN bacteriano en las muestras procesadas, estos resultados sugieren que, en este caso particular, *C. burnetii* no estuvo presente en las muestras.

Tabla 6. Resultados de muestras evaluadas.

Especie	Tipo de muestra	Código	Resultado de qPCR
Control positivo de <i>C. burnetii</i>	ADN sintético cuantitativo	BAA-4000SD™	21.56
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC130	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC145 1	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC145 2	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC147	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC149	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC150	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC235	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC241	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC247	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC250	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC251	Negativo

<i>Mus musculus</i>	Hígado	SC252	Negativo
<i>Mus musculus</i>	Hígado	SC253	Negativo
<i>Ratus ratus</i>	Hígado	SC254	Negativo
<i>Mus musculus</i>	Hígado	SC255	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M1B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M2B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M3B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M4B3	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M6B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M7B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M8B2	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M9B2	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M10B2	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M11B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M12B2	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M13B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M14B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M15B1	Negativo
<i>Bos taurus</i>	Sangre	M16B2	Negativo

En las pruebas realizadas mediante qPCR para la detección de *Coxiella burnetii* en las muestras de sangre y tejido hepático, no se observó amplificación en ninguna de las réplicas evaluadas, por esto no arrojó resultado en Ct, por lo cual sugiere que no se detectó ADN del

agente en las muestras analizadas, lo que está relacionado a la ausencia del patógeno y bacteria en estas, por otro lado, el control positivo amplificó correctamente, con valores de Ct consistentes y una curva de amplificación adecuada. Este resultado confirma que los primers y la sonda diseñados para el ensayo son funcionales y específicos para el ADN de *C. burnetii*. además, la correcta amplificación del control positivo descarta problemas técnicos en la reacción o en el protocolo empleado.

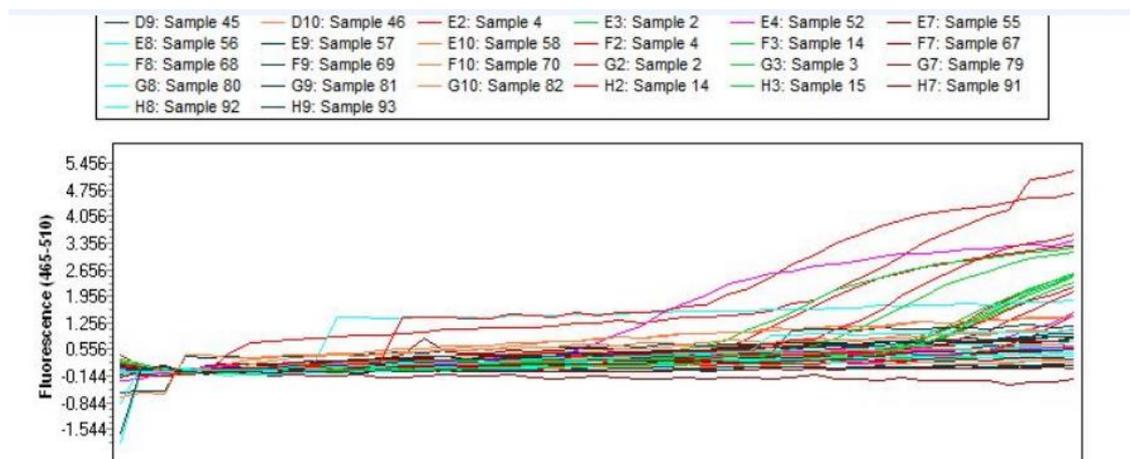


Figura 5. Prueba qPCR de muestras de sangre de vaca y tejido hepático de roedor.

La amplificación observada en esta qPCR se realizó en una misma placa con réplicas de las diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta la 10^{-6} las pruebas al dar negativas no tienen crecimiento la curva.

4.2. Discusión

Los resultados obtenidos en la curva estándar demuestran una relación lineal entre las diluciones seriadas y las concentraciones de ADN medidas por fluorimetría, con un coeficiente de determinación $R^2 = 1$ que refleja un ajuste adecuado y una ejecución precisa de las diluciones (Rutledge, et al,2003) ;(Larionov, et al, 2005). Esto confirma la confiabilidad del procedimiento y la consistencia en la preparación de las muestras, sin embargo, las concentraciones correspondientes a las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} se encuentran por debajo del límite de detección del equipo utilizado, lo cual explica la baja eficiencia observada en esas diluciones, esta situación está alineada con las recomendaciones de no utilizar menos de 0,25 μg de ADN genómico para la digestión y de incluir al menos 2 ng de ADN por reacción de PCR, como se sugiere en los protocolos estándar para asegurar una detección efectiva (Klymus, et al, 2020). Las concentraciones en estas diluciones avanzadas eran insuficientes para generar una señal detectable, a pesar de la funcionalidad de los primers en concentraciones más altas, explica la baja eficiencia observada en estas diluciones durante la qPCR (Terrones, et al,2019). Esto sugiere que la cantidad de ADN disponible en estas diluciones es insuficiente para generar una señal detectable, incluso cuando los primers diseñados son funcionales en concentraciones mayores.

La baja concentración del control positivo (0.08 ng/ μL) indica que la cantidad inicial de ADN era limitada, lo que podría haber afectado los resultados en diluciones más avanzadas. No obstante, el protocolo demostró ser eficiente y reproducible en diluciones hasta 10^{-4} , donde las concentraciones de ADN son adecuadas para su detección. Para mejorar la sensibilidad del método en diluciones más bajas, sería recomendable optimizar las condiciones del ensayo, como aumentar el volumen de ADN en las reacciones, implementar pasos adicionales de purificación para mejorar la calidad del material genético o ajustar la concentración de

reactivos clave, como los primers. Estos ajustes podrían extender el rango de detección y aumentar la eficiencia del protocolo (Karlen, et al,2007) ;(Rebrikov& Trofimov, 2006).

En la primera prueba no amplificó para el control positivo de *Coxiella burnetii* en duplicado , la qPCR no dio valores de CT y al usar el equipo de flourometría (Quantus de Promega), la concentración de este era muy bajo y no lo detectaba por esto se descarta esta prueba (Raith, et al, 2014) Es posible que el menor rendimiento del Mix I esté relacionado con varios factores:

Presencia de inhibidores: Un volumen más alto de ADN puede incrementar la cantidad de contaminantes residuales, como proteínas, sales o compuestos químicos presentes tras la extracción. Estos inhibidores, aunque en pequeñas cantidades no interfieran, pueden acumularse al aumentar el volumen de ADN y reducir la eficiencia de la reacción de PCR. (Demeke & Jenkins, 2010).

Desbalance en la mezcla de reactivos: La cantidad adicional de ADN en el Mix I pudo haber alterado la proporción entre los componentes de la reacción, como los primers, los dNTPs o la enzima polimerasa. Un desbalance en la relación entre ADN y reactivos podría dificultar la unión de los primers al ADN objetivo y, por ende, reducir la eficacia de la amplificación (Thornton & Basu, 2015).

Concentración óptima excedida: Los sistemas de PCR en tiempo real tienen un rango óptimo de concentración de ADN para funcionar eficientemente. Al usar un volumen mayor de ADN en el Mix I, es posible que se haya excedido ese rango, lo cual podría explicar la menor claridad y calidad de la curva de amplificación (Taylor, et al, 2019).

Los resultados obtenidos en la amplificación por qPCR con las mezclas de reacción (Mix I y Mix II) evidenciaron diferencias en los valores del ciclo umbral (Ct) y en la calidad

de las curvas de amplificación, aunque el Ct con Mix I fue más bajo (21.48) en comparación con Mix II (22.17), lo que en principio podría interpretarse como una mayor eficiencia de amplificación, la señal generada por Mix I fue menos estable, lo que afecta la confiabilidad de los resultados.

El uso de Mix II, a pesar de presentar un Ct ligeramente mayor, mostró una curva de amplificación más consistente y reproducible, esto es fundamental en experimentos donde la precisión y la confiabilidad de los resultados son prioritarias (Ruijter, et al, 2013). La diferencia en el volumen de ADN utilizado (4 μ l en Mix I frente a 3 μ l en Mix II) podría explicar esta variación, aunque Mix I utiliza menos muestra, la inestabilidad observada en su señal puede ser indicativa de desequilibrios en la reacción, lo que podría influir negativamente en la calidad de los resultados (Zhao, et al, 2021).

La elección de Mix II se basa en la necesidad de priorizar la estabilidad de la amplificación y la reproducibilidad de los datos, aspectos críticos en estudios que requieren alta precisión. Aunque un Ct más bajo puede ser indicativo de una mayor sensibilidad, la diferencia de 0.69 ciclos entre ambas mezclas es mínima y no representa una limitación significativa para la detección del ADN objetivo, por el contrario, el uso de Mix II asegura un rendimiento más confiable, incluso con un volumen menor de ADN, lo que optimiza el uso de recursos sin comprometer la calidad del análisis (Ruijter, et al, 2013).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La optimización de los primers específicos para *Coxiella burnetii* en la técnica de qPCR fue un paso fundamental para garantizar su efectividad en la detección del patógeno, a pesar de que las muestras no presentaron amplificación positiva, el control positivo mostró amplificación en condiciones de baja concentración, lo cual confirma que los primers son adecuados para la detección de *Coxiella burnetii*, lo que asegura su sensibilidad y potencial para futuras aplicaciones diagnósticas.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de *Coxiella burnetii* permitió seleccionar las secuencias más idóneas para el diseño de primers y este proceso fue clave para asegurar que los primers fueran lo suficientemente específicos y sensibles para detectar el patógeno sin interferencias, las secuencias seleccionadas fueron aquellas que pertenecen a regiones altamente conservadas del genoma del patógeno, lo que incrementa la precisión, fiabilidad de la detección y la elección correcta de estas secuencias se reflejó en la amplificación del control positivo, lo que validó la calidad del diseño en la práctica.

La implementación de qPCR en muestras de sangre de vaca y tejido hepático de ratón permitió evaluar la efectividad de la técnica en condiciones biológicas reales, aunque las muestras no resultaron positivas para *Coxiella burnetii*, el control positivo amplificó correctamente, lo que sugiere que el protocolo escogido de qPCR está funcionando de manera adecuada, de igual manera la curva estándar obtenida mostró una relación lineal clara entre la concentración del analito y el ciclo umbral, lo que demuestra que el ensayo es sensible y

preciso. Este resultado refuerza el potencial de la técnica para ser utilizada como herramienta confiable en el diagnóstico molecular de *Coxiella burnetii*, con aplicaciones en diversos contextos de salud animal.

5.2. Recomendaciones

Hacer más pruebas utilizando una mayor variedad de concentraciones de muestras, especialmente aquellas con baja carga patógena, para asegurar que los primers continúan siendo efectivos incluso en situaciones de detección de concentraciones muy pequeñas de *Coxiella burnetii*.

Ampliar la validación del protocolo a otros tipos de muestras biológicas, como orina o leche, para explorar si la detección de *Coxiella burnetii* puede ser igualmente efectiva en fluidos menos invasivos.

Repetir el análisis utilizando muestras de *Coxiella burnetii* provenientes de diferentes regiones geográficas o de diversas cepas, con el fin de evaluar si existe variabilidad genética que pueda afectar la eficacia del protocolo de detección.

Optimizar aún más los parámetros del qPCR para mejorar la detección en concentraciones extremadamente bajas de *Coxiella burnetii*.

Referencias Bibliográficas

- Abeykoon, A. H., Clark, N. J., Soares Magalhaes, R. J., Vincent, G. A., Stevenson, M. A., Firestone, S. M., & Wiethoelter, A. K. (2021). *Coxiella burnetii* in the environment: A systematic review and critical appraisal of sampling methods. *Zoonoses and public health*, 68(3), 165-181.
- Afanasyev, S. S., Kychkina, T. V., & Savvinova, L. N. (2019). Scanning electron microscope (advantages and disadvantages). In *Colloquium-journal* (No. 2-2 (26), pp. 25-27).
- Álvarez, D. M. D. C. D. (2021). Cultivos celulares: reducción histórica en el uso de animales de laboratorio. *Revista Fesahancccal*, 7(1), 17-24.
- Alvarez-Alonso, R., Barandika, J. F., Hurtado, A. Y., & Garcia-Perez, A. L. (2019). Monitoring of *Coxiella burnetii* infection during three consecutive farrowing periods in a goat flock after an outbreak of abortions.
- Martín-Baeza, A. M., Oviedo-Esteban, M., & Jiménez-Blanco, S. (2023). Un paciente con fiebre Q en el mundo rural. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 16(1), 55-57.
- Bruin, A., Groot, A., Heer, L., Bok, J., Wielinga, P. R., Hamans, M., Van Rotterdam B. J & Janse, I. (2011). Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6516-6523.
- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for successful PCR primer design. In *Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols* (pp. 5-22). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9809-2_2

- Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, 1977-1990.
- Dragan, A. L., & Voth, D. E. (2020). *Coxiella burnetii*: international pathogen of mystery. *Microbes and infection*, 22(3), 100-110.
- Echeverría, G., Reyna-Bello, A., Minda-Aluisa, E., Celi-Erazo, M., Olmedo, L., García, H. A., Garcia-Bereguiain MA., de Waard JH & On behalf of the UNU/BIOLAC network for infectious cattle diseases. (2019). Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in cattle and farm workers: is Q fever an underreported zoonotic disease in Ecuador? *Infection and drug resistance*, 701-706.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J., Maurin, M., & Raoult, D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 115-190.
- Epelboin, L., De Souza Ribeiro Mioni, M., Couesnon, A., Saout, M., Guilloton, E., Omar, S., Pommier De Santi, V., Davoust, B., Marié, J. L., Lavergne, A., Donato, D., Guterres, A., Rabier, S., Destoop, J., Djossou, F., Baudrimont, X., Roch, A., Cicuttin, G. L., Rozental, T., Nacher, M., Millán, J., Sampaio De Lemos, E. R., Fernandes, J., Duron, O., & Rousset, E. (2023). *Coxiella burnetii* infection in livestock, pets, wildlife, and ticks in Latin America and the Caribbean: A comprehensive review of the literature. *Current Tropical Medicine Reports*, 10(3), 94-137. <https://doi.org/10.1007/s41182-023-00414-w>
- Fajardo, J. J., Caicedo, R., & Pinilla, J. P. (2018). *Curva de calibración*.

- Fariñas, M. T. F., & Collado, C. M. (2010). Infección por *Coxiella burnetii* (fiebre Q). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 29-32.
- Fernández-Carrillo, J., del Olmo-Monge, J., Sellek, R. E., Ortega-García, M. V., Cabria-Ramos, J. C., & Bassy, O. (2023). Development of a specific real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Coxiella burnetii* strains from environmental soil samples. *Letters in Applied Microbiology*, 76(3), ovad030.
- Fernández-Cuenca, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 22(6), 355-360.
- Freitas, D., Júnior, A. A. P., de Sousa, P. S. F., Ximenez, L. L. L., Fernandes, J., & de Lemos, E. R. S. (2024). InvestigaçãO De *Coxiella Burnetii* eEm pPacientes cCom hHepatitisSem eEtiologia dDefinida nNo Rio De Janeiro. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 28, 104406.
- Fronhoffs, S., Totzke, G., Stier, S., Wernert, N., Rothe, M., Brüning, T., ... & Ko, Y. (2002). A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes*, 16(2), 99-110.
- Gamboa, R., Yamarilis, J., & Herrera, Y. (2020). Prevalencia de Infeccion de Animales por *Coxiella Burnetii*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 30(1), 578-583.
- Gentle, A., Anastasopoulos, F., & McBrien, N. A. (2001). High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *Biotechniques*, 31(3), 502-508.

- Gisbert, P., Hurtado, A., & Guatteo, R. (2024). Efficacy and Safety of an Inactivated Phase I *Coxiella burnetii* Vaccine to Control Q Fever in Ruminants: A Systematic Review. *Animals*, 14(10), 1484.
- González, A. S., Arjona, R. G., Guerrero, P. P., & Roca, J. R. (2022). Infecciones por Rickettsia y fiebre Q. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(54), 3163-3172.
- Hoara, M. C., Florescu, S. A., Piscu, S. A., Tardei, G., & Calistru, P. I. (2019). Clinical And Evolutive Aspects Of *Coxiella Burnetii* Infection. *Romanian Journal of Infectious Diseases/Revista Romana de Boli Infectioase*, 22(2).
- Kang, T. S. (2019). Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 574-585.
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermoud, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC bioinformatics*, 8, 1-16.
- Khademi, P., Tukmechi, A., Sgroi, G., Ownagh, A., Enferadi, A., Khalili, M. y Mardani, K. (2024). Técnicas moleculares y de genotipado en el diagnóstico de *Coxiella burnetii*: una descripción general. *Infección, genética y evolución*, 105655.
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Craig, A.J, Richard, F. L., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Antoninette, J. P., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C & Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2(3), 271-282.

- Lacombe, V., Planchais, M., Boud'Hors, C., Croué, A., Melenotte, C., Raoult, D., ... & Vandamme, Y. M. (2020). *Coxiella burnetii* endocarditis as a possible cause of ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology*, 59(9), e44-e45.
- Larionov, A., Krause, A., & Miller, W. (2005). A standard curve-based method for relative real time PCR data processing. *BMC bioinformatics*, 6, 1-16.
- Llarena, F. M. B., Murillo, J. M. S., Morgado, J. R. S., Benavente, A. R., Bueno, A. J. D., Martín, J. M. C., & Bueno, F. G. (2023). Fiebre Q. a propósito de 8 casos clínicos. Estudio, diagnóstico y tratamiento. *Badajoz Veterinaria*, (29), 30-39.
- Logan, E. B. J., Edwards, K., & Saunders, N. (s/f). *Current Technology and Applications*.
- Logan, J. M. J., & Edwards, K. J. (s/f). *An overview of real-time PCR platforms*. Genequantification.com.
- Luciani, L., L'ollivier, C., Million, M., Amphoux, B., Edouard, S., & Raoult, D. (2019). Introduction to measurement of avidity of anti-*Coxiella burnetii* IgG in diagnosis of Q fever. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(10), 10-1128.
- Mattes, W. (2019). The basics of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols in molecular toxicology* (pp. 1-40). CRC Press.
- Melenotte, C., Lepidi, H., Nappez, C., Bechah, Y., Audoly, G., Terras, J., Raoult, D., & Brégeon, F. (2016). Mouse model of *Coxiella burnetii* aerosolization. *Infection and Immunity*, 84(7), 2116-2123.
- Melenotte, C., Million, M., & Raoult, D. (2020). New insights in *Coxiella burnetii* infection: diagnosis and therapeutic update. *Expert review of anti-infective therapy*, 18(1), 75-86.

- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2021). *Acuerdo Ministerial No. 00038-2021: Reforma al Reglamento para Estudios Observacionales*. Recuperado de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/02/AM-00038-2021-23-Dic-Reforma-Reglamento-observacionales.pdf>
- Ministerio de Trabajo y Economía Social de España (EDO) (2023). Programa de vigilancia y control Fiebre Q, (EDO), Madrid, España.
- Mioni, M. D. S. R., Sidi-Boumedine, K., Morales Dalanezi, F., Fernandes Joaquim, S., Denadai, R., Reis Teixeira, W. S., Labruna, M. B., & Megid, J. (2019). New genotypes of *Coxiella burnetii* circulating in Brazil and Argentina. *Pathogens*, 9(1), 30. Recuperado de <https://doi.org/10.3390/pathogens9010030>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2018). Código Sanitario para los Animales Terrestres, 8^{va} ed. OIE, París, Francia.
- Osorio, A. M. (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Revista Colombiana de bioética*, 1(1), 163-183.
- Pérez, C. F., González, M. L., Rodríguez, O. S., Castro, R. H., Reynoso, B. A., López, E. H., & Resendiz, E. G. P. (2024). Coinfección con *Chlamydia abortus* y *Coxiella burnetii* en vacas, cabras y borregos que presentaron aborto. *Abanico veterinario*, 15(1), 9.
- Petri, W.A. (2024). Fiebre Q. Manual MSD. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/rickettsias-y-microorganismos-relacionados/fiebre-q?ruleredirectid=755>

- Rabaza, A., Fraga, M., Corbellini, L. G., Turner, K. M., Riet-Correa, F., & Eisler, M. C. (2021). Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk-tank milk from bovine dairy herds: Systematic review and meta-analysis. *One Health*, 12, 100208.
- Raith, M. R., Ebentier, D. L., Cao, Y., Griffith, J. F., & Weisberg, S. B. (2014). Factors affecting the relationship between quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and culture-based enumeration of *Enterococcus* in environmental waters. *Journal of applied microbiology*, 116(3), 737-746.
- Rebrikov, D. V., & Trofimov, D. Y. (2006). Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Applied biochemistry and microbiology*, 42, 455-463.
- Relucenti, M., Familiari, G., Donfrancesco, O., Taurino, M., Li, X., Chen, R., ... & Selan, L. (2021). Microscopy methods for biofilm imaging: focus on SEM and VP-SEM pros and cons. *Biology*, 10(1), 51.
- Rousset E. et al. 2007. Potencial diagnóstico comparativo de tres pruebas serológicas para la fiebre Q abortiva en rebaños de cabras. *Vet. Microbiol.* 124: 286–297.
- Ruano, L.M. (2022). Zoonosis causada por *Coxiella burnetii*. <https://ruminants.ceva.pro/es/coxiella-burnetii>.
- Ruijter, J. M., Pfaffl, M. W., Zhao, S., Spiess, A. N., Boggy, G., Blom, J., Rutledge, R. G., Sisti, D., Lievens, A., De Preter, K., Derveaux, S., Hellemans, J., & Vandesompele, J. (2013). Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, 59(1), 32-46.
- Rutledge, R. G., & Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic acids research*, 31(16), e93-e93

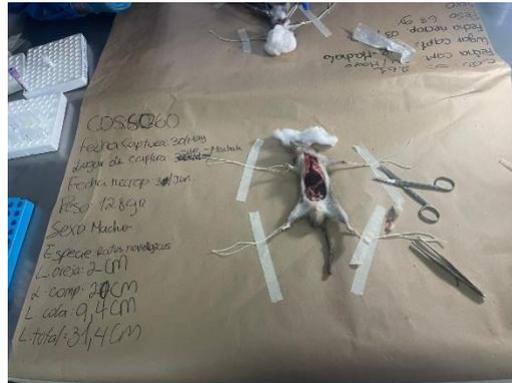
- Sahu, R., Rawool, D. B., Vinod, V. K., Malik, S. V. S., & Barbuddhe, S. B. (2020). Current approaches for the detection of *Coxiella burnetii* infection in humans and animals. *Journal of Microbiological Methods*, 179, 106087.
- Saunders, E. B. N., & Lee, M. A. (s/f). *Advanced Technologies and Applications*. Caister.com.
- Spickler, A. (2017). "Fiebre Q". The center for food Security & Public Health. cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/factsheets/
- Stanislav, N. S., Tartakovsky, I. S., & Rudakov, N. V. (2024). Current knowledge of the taxonomy and classification of representatives from the order Legionellales (Legionellaceae, Coxiellaceae) Phylum Pseudomonadota. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*, 26(2), 161-170.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification*, 3, 9-16.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in biotechnology*, 37(7), 761-774.
- Temesgen, Z., Baddour, L. M., & Rizza, S. (2022). *Un enfoque racional de las enfermedades infecciosas clínicas: Manual para no especialistas*. Elsevier Health Sciences.

- Tarqui-Terrones, K., Silva-Molina, J. I., Beltrán-Fabián, M., Zevallos-Vara, S., & Mayta-Huatuco, E. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN de *Giardia* spp. medidos por PCR convencional. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 36(3), 423-432.
- Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and simple method of qPCR primer design. *PCR primer design*, 173-179.
- Truong, A. T., Yun, B. R., Lim, J., Min, S., Yoo, M. S., Yoon, S. S., Yun, Y. M., Kim, J. T., & Cho, Y. S. (2021). Real-time PCR biochip for on-site detection of *Coxiella burnetii* in ticks. *Parasites & Vectors*, 14(1), 239. Recuperado de <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04646-0>
- Velásquez Serra, G. C., Molleda Martínez, P. E., Montalván Suárez, M. E., Bonifaz Balseca, C., Daher Nader, J. E., Albán Jácome, G. E., Ramírez Hecksher, A. M., Tobar Morán, M. R., Touriz Bonifaz, M. A., Falconí San Lucas, S. D. R., & Estallo, E. L. (2021). Evaluación de las enfermedades tropicales desatendidas a partir de los determinantes sociales de la salud. *Guayaquil, Ecuador*, 2020.
- Wang, A. M., Doyle, M. V., & Mark, D. F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9717-9721.
- Welch, J. L., Branan, M., Urie, N., Shrestha, R., Wiedenheft, A., Marshall, K., Robbe-Austerman, S., & Shanmuganatham, K. K. (2024). *Coxiella Burnetii* seroprevalence in domestic goat does in the United States: Prevalence, distribution, and associated risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 223, 106114.

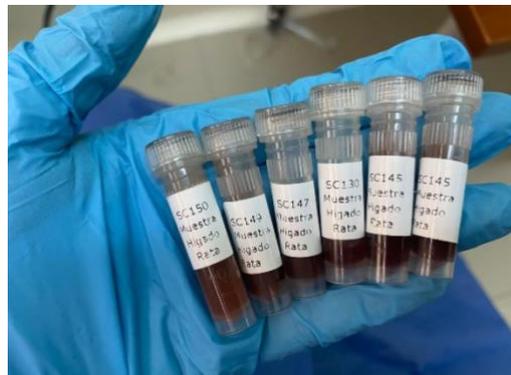
Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134 (2012).
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

Zhao, F., Maren, N. A., Kosentka, P. Z., Liao, Y. Y., Lu, H., Dudit, J. R., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, A. I., Ranney, T. G., & Liu, W. (2021). An optimized protocol for stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis. *Horticulture Research*, 8.

Anexos



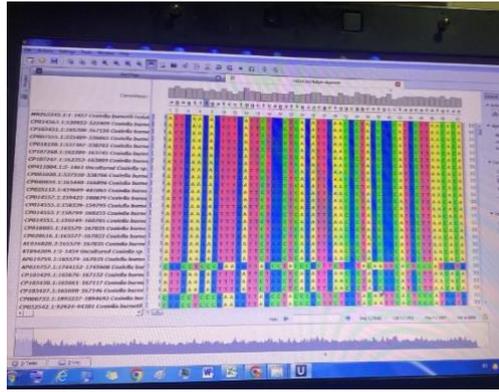
Anexo 1. Disección de roedor para obtener muestra de hígado.



Anexo 2. Muestras de hígado de roedor en tubos de almacenamiento.



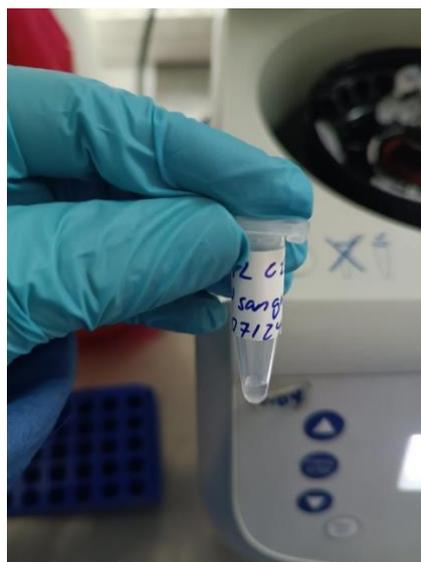
Anexo 3. Kit de extracción para sangre de vaca.



Anexo 4. Alineamiento de secuencias de *Coxiella burnetii* en UGENE.



Anexo 5. Kit de extracción para tejido hepático de roedor.



Anexo 6. ADN extraído de sangre de vaca.



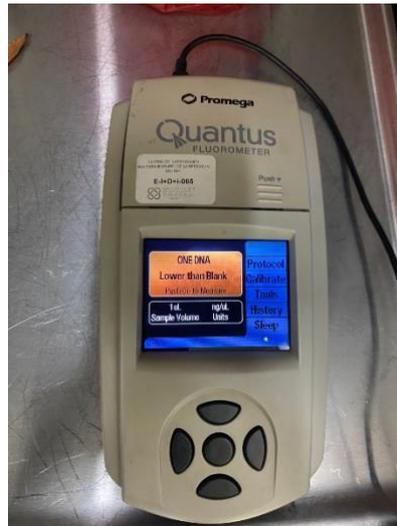
Anexo 8. Centrifugación de muestras de sangre de vaca.



Anexo 7. ADN de *C. burnetii*.



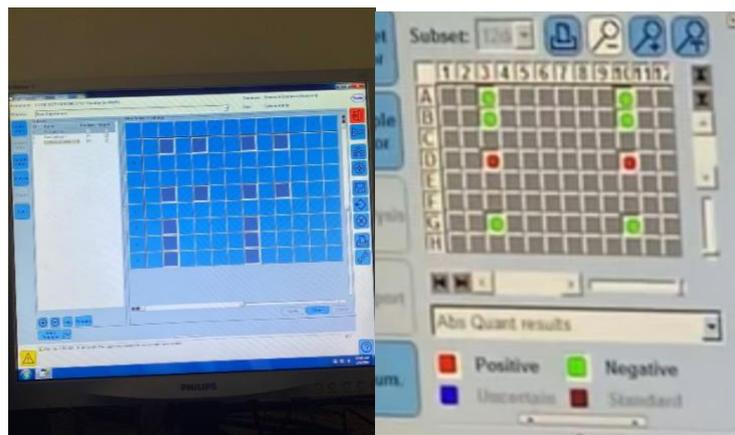
Anexo 9. Enzima (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix).



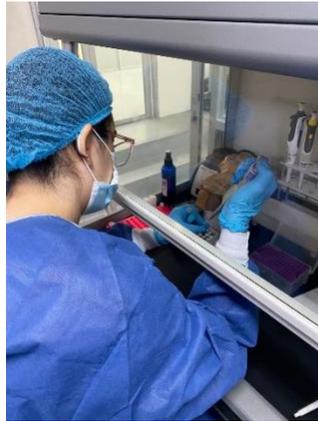
Anexo 10. Equipo de flourometría.



Anexo 11. Kit para las diluciones con equipo Flourómetro.



Anexo 12. Distribución de placa para qPCR para saber que concentración de primers funciona mejor.



Anexo 13. Preparación de placa para qPCR: pipeteo preciso de reactivos.