

Eva Machetti Mareca

Simplificación del proceso de
extracción de ácidos nucleicos en
muestras fecales para diagnóstico
por PCR en tiempo real

Director/es

GENZOR ASÍN, CARLOS GUSTAVO
GÓMEZ-MORENO CALERA, CARLOS

EXTRACTO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral [Extracto]

SIMPLIFICACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN
DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN MUESTRAS FECALES
PARA DIAGNÓSTICO POR PCR EN TIEMPO REAL

Autor

Eva Machetti Mareca

Director/es

GENZOR ASÍN, CARLOS GUSTAVO
GÓMEZ-MORENO CALERA, CARLOS

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2019

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



Simplificación del proceso de extracción de ácidos nucleicos en muestras fecales para diagnóstico por PCR en tiempo real

Memoria presentada por:

Dña. Eva Machetti Mareca para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Septiembre 2019

Esta Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias al apoyo económico prestado por el Ministerio de Economía y Competitividad, por la ayuda para contratos para la formación de doctores en empresas “Doctorados Industriales” otorgada a Dña. Eva Machetti Mareca y a la empresa Certest Biotec S.L. (DI-14-06615), durante los años 2015-2019.

*Nuestro miedo más profundo no es que seamos inadecuados.
Nuestro miedo más profundo es que somos poderosos sin límite.
Es nuestra luz, no la oscuridad lo que más nos asusta.
Nos preguntamos ¿quién soy yo para ser brillante, precioso, talentoso y
fabuloso?
En realidad ¿quién eres tú para no serlo? Eres hijo del universo.
El hecho de jugar a ser pequeño no sirve al mundo.
No hay nada iluminador en encogerte para que otras personas cerca de ti no se
sientan inseguras.
Nacemos para hacer manifiesto la gloria del universo que está dentro de
nosotros.
No solamente algunos de nosotros, está dentro de todos y cada uno.
Y mientras dejamos lucir nuestra propia luz, inconscientemente damos permiso
a otras personas para hacer lo mismo.
Al liberarnos de nuestro miedo, nuestra presencia automáticamente libera a los
demás.*

Nelson Mandela

(discurso de toma de posesión como presidente electo de Sudáfrica, 1994)

Basado en el poema escrito por Marianne Williamson

A mis padres,
por su apoyo incondicional

A mi abuelo Máximo,
por ser mi guía

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Carlos Genzor y Óscar Landeta, socios fundadores de Certest Biotec S.L., la oportunidad que me brindaron de formar parte de esta empresa, así como de ofrecerme la posibilidad de desarrollar la tesis doctoral.

En segundo lugar, querría agradecer al Dr. Carlos Genzor, como Director de Tesis, su continuo apoyo durante estos años de carrera científica y por todos los conocimientos que me ha transmitido. Gracias por todo el esfuerzo y tiempo que me has dedicado. Igualmente agradecer también al Dr. Carlos Gómez-Moreno, Director de Tesis, su apoyo incondicional, su tiempo y esfuerzo.

Agradecer también al Dr. Miguel Pocoví, su asesoramiento, ya que gracias a él he llegado hasta aquí.

Al equipo de personas que conforman Certest Biotec S.L. y en particular al departamento de biología molecular, por su gran apoyo. Un reconocimiento especial a María Martínez, Raquel Morales, Patricia Nadal e Inés Valledor, gracias por vuestra colaboración en este trabajo.

Al Departamento de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, que gracias a su colaboración ha sido posible el desarrollo de esta tesis. Gracias por vuestro asesoramiento y paciencia.

Durante estos años he tenido la suerte de trabajar con personas maravillosas. Gracias Conchi, Rebeca, Ángela, Raquel, Samuel, Esperanza, María, Silvia, Inés, Leyre, Ana y Teresa, por vuestra ayuda tanto a nivel profesional como a nivel personal. Sin vosotros, no hubiera sido lo mismo.

A mi familia de sangre y política, abuelos, tíos, primos, sobrinos, gracias a cada uno de vosotros por formar parte de mi vida, por las grandes conversaciones, y por estar siempre ahí, sean los kilómetros que sean, Zaragoza, Barcelona, Checa, Lérida, Sabiñánigo, Huesca, Teruel.

A todos mis amigos, que allá donde estén siempre puedo contar con ellos. Gracias por los buenos momentos, los viajes, las cenas, las risas y, sobre todo, por aguantarme y asesorarme en los peores momentos. Tengo mucha suerte de teneros.

A mis padres, gracias por su apoyo incondicional, por sujetarme en mis momentos más débiles y celebrar conmigo los más dulces. Gracias por cuidarme, educarme, y haber hecho que me convierta en lo que soy. Gracias por acompañarme siempre en el camino y ser mi modelo en la vida.

A Carlos, mi novio, no hay palabras para agradecer lo que has hecho por mí, sobre todo estos últimos meses tan complicados. Gracias por formar parte de mi vida, por tu apoyo, paciencia, y por traerme la alegría y la calma en este camino.

Gracias también a todos los que nos han dejado, porque siempre estáis presentes. Abuela, abuelo, estéis donde estéis, espero que os sintáis orgullosos de mí.

Índice

Resumen	1
Introducción y justificación de la unidad temática	5
<i>Evolución histórica del diagnóstico microbiológico</i>	7
Antecedentes del diagnóstico microbiológico: Desde la Edad Antigua hasta el siglo XVII. ...	7
Desarrollo del microscopio: Primeras observaciones de microorganismos.	7
Louis Pasteur y Robert Koch: Teoría germinal de las enfermedades infecciosas.....	8
Microbiología moderna: grandes avances en identificación, diagnóstico y tratamiento. ...	11
Situación actual: ¿Y ahora como nos encontramos?.....	15
<i>Microorganismos enteropatógenos y su incidencia</i>	20
Definición de enfermedad gastrointestinal	20
Diagnóstico de la diarrea infecciosa.....	21
Bacterias enteropatógenas.....	22
Métodos de diagnóstico de la diarrea bacteriana	26
Parásitos causantes de diarrea infecciosa	27
Métodos de diagnóstico de la diarrea de origen parasitario	29
Virus causantes de diarrea infecciosa	30
Métodos de diagnóstico en la diarrea infecciosa por virus	32
Vigilancia microbiológica a nivel autonómico (Aragón, España).....	33
<i>Técnicas de diagnóstico molecular: Métodos de extracción y PCR en tiempo real</i>	36
Extracción de ácidos nucleicos (DNA o RNA) de la muestra biológica para su posterior identificación por qPCR	36
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	41
Procesamiento rápido de la muestra fecal y su compatibilidad con los kits VIASURE <i>Real</i> <i>Time PCR Detection Kit</i> de Certest Biotec.....	47
Objetivos principales	49
Capítulo I Desarrollo de reactivo y procedimiento para el tratamiento de muestras fecales y su compatibilidad con qPCR	53
Capítulo II QPCR inhibitors / enhancers: the interference in the reaction by drugs, substances added in sample preparation and included in the reaction mix.	57
II.1 <i>Abstract</i>	61
II.2 <i>Introduction</i>	61
II.3 <i>Materials and methods</i>	62
II.3.1 RNA extraction	62
II.3.2 QPCR inhibitory samples.....	63
II.3.3 RT-qPCR assay	64
II.3.4 Data analysis	64
II.4 <i>Results</i>	65
II.4.1 The MCNI value for the compounds.....	65
II.4.2 Graphs representations	66
II.5 <i>Discussion</i>	67

II.6	Conclusions.....	74
Capítulo III	Comparison of two quick isolation methods for traditional nucleic acid extraction for qPCR in fecal samples	85
III.1	Abstract.....	89
III.2	Introduction.....	89
III.3	Materials and methods.....	91
III.3.1	Study design.....	91
III.3.2	NA isolation from fecal samples.....	91
III.3.2.1	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit (RM)	91
III.3.2.2	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (LB)	91
III.3.2.3	Copan MSwab™ (CM)	92
III.3.3	Routine diagnostic methods	92
III.3.4	qPCR assays.....	92
III.3.5	Data and statistical analysis	93
III.4	Results.....	94
III.4.1	Identification of gastrointestinal pathogens	94
III.4.2	Comparison of NA isolation methods.....	95
III.4.3	Comparison between routine diagnostic methods and molecular diagnostic procedures 99	
III.4.4	Inhibition in qPCR assays.....	100
III.5	Discussion.....	100
III.6	Conclusions.....	102
Capítulo IV	Comparison of six nucleic acid isolation methods to improve <i>Clostridium difficile</i> infection diagnosis in fecal specimens by qPCR.....	103
IV.1	Abstract.....	107
IV.2	Introduction.....	107
IV.3	Materials and methods.....	108
IV.3.1	Study design.....	108
IV.3.2	NA isolation from fecal samples.....	109
IV.3.2.1	Maxwell® RSC Blood DNA kit.....	109
IV.3.2.2	Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B.....	110
IV.3.2.3	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit.....	110
IV.3.2.4	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer.....	110
IV.3.2.5	Copan MSwab™.....	110
IV.3.2.6	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT.....	111
IV.3.3	qPCR assays.....	111
IV.3.4	Statistics and data analysis.....	111
IV.4	Results.....	112
IV.4.1	Comparison of NA isolation methods for identification of toxigenic <i>C. difficile</i>	112
IV.4.2	Comparison of different qPCR assays in conjunction with VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer and the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	114
IV.4.3	Inhibition in qPCR assays.....	115
IV.5	Discussion.....	115
IV.6	Conclusions.....	117
Discusión general.....		121

Conclusiones generales.....	127
Referencias bibliográficas	131
Abreviaturas	147

Índice Tablas

Tabla 1. Descubrimiento de las principales bacterias patógenas (1877-1906).....	10
Tabla 2. Eventos más relevantes del siglo XX.	12
Tabla 3. Métodos utilizados para el diagnóstico de microorganismos.....	18
Tabla 4. Vigilancia microbiológica durante el año 2018 en la comunidad autónoma de Aragón (España).....	34
Table 5 .Potentially Interfering Substances.	75
Table 6. Potentially Interfering Substances. Maximun concentration of no interference (MCM).	80
Table 7.Comparison of two quick procedures for routine test using stool samples ($n = 80$).	96
Table 8.Performance of three isolation methods measured by real-time PCR (VIASURE Real Time PCR Detection Kits) for the majority pathogens ($n > 3$).....	97
Table 9.Cq value obtained for minority pathogens ($n \leq 3$).	98
Table 10. Identification of toxigenic <i>C. difficile</i> by real-time PCR (VIASURE <i>C. difficile</i> assay) using six isolation methods.	113
Table 11. Performance of six isolation methods as measured by real-time PCR for the identification of toxigenic <i>C. difficile</i> (VIASURE <i>C. difficile</i> assay) ($n = 29$).	114
Table 12. Colors of the supernatants obtained using six nucleic acid isolation methods (samples that showed inhibition were diluted 1:4).....	118

Índice Figuras

Figura 1. Tasa* de mortalidad bruta debida a enfermedades infecciosas – Estados Unidos, 1900-1996†.Fuente: [57].	16
Figura 2. Las 10 principales causas de muerte a nivel global, 2016. Fuente:[58].	16
Figura 3. Las 10 principales causas de muerte en países de bajos ingresos, 2016. Fuente:[58].	17
Figura 4. Distribución por capítulos de la Clasificación internacional de Enfermedades. Año 2016.Fuente: [59].	17
Figura 5. Número de microorganismos más frecuentes por año, 2010-18. Fuente: [146].	35
Figura 6. Etapas utilizadas en la mayoría de los métodos de extracción de ácido nucleicos (No todas las etapas se usan en todos los procedimientos). Fuente: [161].	37
Figura 7. Protocolo térmico qPCR, etapas de desnaturalización, unión de cebadores y elongación de la nueva hebra. Fuente: [183].	42
Figura 8. Curva de amplificación de qPCR. Fuente: [183].	43
Figura 9. Mecanismo sonda <i>TaqMan</i> . Fuente: [187].	44
Figura 10. Diferentes tipos de fluoróforos. Fuente: [188].	45
Figura 11. Espectro de emisión para cada fluoróforo. Filtros y longitudes de onda a los que se detectan. Fuente: [189].	45
Figura 12. Diferentes tipos de quenchers. Fuente: [188].	46
Figura 13. Esquema del proceso de extracción de ácidos nucleicos y detección por qPCR o RT-qPCR.	47
Figura 14. Guía de instrucciones rápidas de los kits qPCR de Certest Biotec S.L. para la detección de patógenos. Fuente: [191].	48
Figure 15. Formamide (Number 73). Total inhibition behaviour. A. Cq value vs Concentration plot. B. Normalized % FI vs Concentration plot. C. Normalized % EA vs Concentration plot.	68
Figure 16. Toseína 2 mg/ml (Number 31). Partial inhibition behaviour. A. Cq value vs Concentration plot. B. Normalized % FI vs Concentration plot. C. Normalized % EA vs Concentration plot.	68
Figure 17. VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (Number 68). No affectation behaviour. A. Cq value vs Concentration plot. B. Normalized % FI vs Concentration plot. C. Normalized % EA vs Concentration plot.	69
Figure 18. D-(+)-Trehalose Dihydrate (Number 78). Enhancement behaviour. A. Cq value vs Concentration plot. B. Normalized % FI vs Concentration plot. C. Normalized % EA vs Concentration plot.	69
Figure 19. Espidifen 600 mg (Number 27). Total inhibition behaviour, retrotranscriptase more affected. A. Cq value vs Concentration plot. B. Normalized % FI vs Concentration plot. C. Normalized % EA vs Concentration plot.	70
Figure 20. Rifaldin 300 mg (Number 13). Total inhibition behaviour, fall in the fluorescence. A. Cq value vs Concentration plot. B. Normalized % FI vs Concentration plot. C. Normalized % EA vs Concentration plot. Note: Concentrations from 60 mg/ml to 214.29 mg/ml.	70
Figure 21 . Pathogens detected in 80 stool samples depending on the diagnostic method.	99
Figure 22 . Comparison of different quick methods for identification of toxigenic <i>C. difficile</i> . Values are reported as mean Cq values ± standard deviations. *P < 0.05.	115

Resumen

Los métodos convencionales para el diagnóstico de microorganismos enteropatógenos requieren gran tiempo y esfuerzo, además de que algunos son poco sensibles y específicos. Las técnicas moleculares han revolucionado el diagnóstico microbiológico y representan una clara alternativa a los métodos convencionales por su rapidez, sensibilidad y especificidad.

Dentro de las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se ha convertido en un método de diagnóstico muy utilizado en los últimos años. Se basa en copiar exponencialmente una secuencia específica de DNA bicatenario y visualizar, de forma continua, la acumulación de producto amplificado. Genera resultados en 1 o 2 horas, es sensible, específico y tiene buena reproducibilidad.

Para poder llevar a cabo los ensayos mediante la tecnología qPCR es necesaria una etapa previa de extracción de muestras biológicas con la que se obtienen los ácidos nucleicos necesarios para realizar el ensayo. Éstos servirán como sustrato de la reacción de amplificación para la identificación de un organismo específico o un grupo de organismos.

El método de extracción o purificación suele ser largo, complejo, pudiendo llegar a ser una fuente de error, además de que algunos utilizan productos tóxicos o corrosivos. El método de extracción ideal debe ser sensible, rápido, consistente, universal y fácil de usar. Así como presentar un riesgo mínimo para los usuarios. Por ello, el desarrollo de un método rápido y simple para el tratamiento de muestras biológicas es interesante para la mejora del diagnóstico, suponiendo un ahorro tanto en tiempo como en coste.

En la bibliografía están descritos algunos métodos rápidos de tratamiento de muestras biológicas para utilizarse directamente con la qPCR. Sin embargo, la mayoría de ellos están optimizados para sangre, plasma o cultivos. Debido a la heterogeneidad de las muestras fecales y la gran cantidad de sustancias inhibitoras que contienen, apenas hay métodos rápidos disponibles para este tipo de matriz biológica.

Por ello, el objetivo que se persigue en el presente proyecto es desarrollar un método de procesamiento de muestras fecales que sea rápido, sencillo, universal, que conlleve el menor riesgo posible para el usuario y que sea compatible con la tecnología qPCR. Este método mejoraría el diagnóstico de microorganismos enteropatógenos, lo que permitiría tratar a los pacientes de forma más rápida y dirigida. Además, para que este método pueda formar parte de un procedimiento de diagnóstico molecular tiene que cumplir una serie de requerimientos de reproducibilidad, estabilidad y funcionalidad clínica.

Por tanto, la presente memoria contiene el desarrollo del método (reactivo y procedimiento) para el tratamiento de muestras fecales que sea compatible con qPCR, además de dos estudios clínicos para evaluar su funcionalidad. También se lleva a cabo un estudio de posibles sustancias interferentes en la reacción de qPCR.

Para desarrollar un método (reactivo y procedimiento) válido para el tratamiento de muestras fecales se ha trabajado en la reducción o neutralización de inhibidores procedentes de la muestra biológica, en la lisis del patógeno y en la estabilidad de los ácidos nucleicos durante y tras el proceso.

Tras los ensayos realizados, el método de tratamiento de muestras fecales obtenido, *VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer*, cumple las siguientes características:

- Es rápido, siendo el tiempo total para realizarlo de aproximadamente 20 minutos. Mucho menos que métodos de extracción de rutina (70-90 minutos).
- Es sencillo, ya que son pocas etapas y fáciles de llevar a cabo.
- Es universal, ya que obtiene muy buenos resultados en la detección de patógenos de diferente naturaleza, partiendo del mismo sobrenadante, y sin tener que realizar modificaciones específicas según patógeno. Aunque no es el método más óptimo para alguno de ellos, se llega a un compromiso para ser lo más universal posible.
- Es seguro, como se concluye del análisis de riesgos llevado a cabo.
- Es reproducible. Además, el sobrenadante obtenido se puede utilizar en diferentes termocicladores con diversos kits de qPCR *VIASURE Real Time PCR Detection Kit* (monoplex o multiplex).
- Es estable, tanto la mezcla necesaria para llevar a cabo el procedimiento, como la integridad de los ácidos nucleicos contenidos en los sobrenadantes obtenidos por el método.
- No afecta a la reacción de amplificación. Tras realizar un estudio de inhibición se observa que la mezcla no influye en la qPCR. Por otro lado, los sobrenadantes obtenidos tienen menor coloración y prácticamente no producen inhibición en la reacción de amplificación en comparación con los obtenidos por otros métodos rápidos.
- Es específico y sensible. Según los resultados de las evaluaciones clínicas realizadas, muestra mejores características de funcionalidad con respecto a otros métodos rápidos disponibles en el mercado. Además, genera resultados muy similares a métodos de extracción, manuales y automáticos, que se utilizan de rutina en los laboratorios clínicos.

Aunque más pruebas son necesarias para seguir evaluando *VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer*, los resultados obtenidos hasta el momento indican que puede llegar a ser una gran herramienta junto con la técnica de qPCR en la simplificación del diagnóstico molecular.

Introducción y justificación de la unidad temática

Evolución histórica del diagnóstico microbiológico

El diagnóstico microbiológico persigue demostrar la presencia de microorganismos patógenos o sus productos en muestras de origen humano, animal o medioambiental. En la práctica médica se define como el proceso que permite la detección, cuantificación y caracterización de los patógenos para ayudar a definir el tratamiento más adecuado. Actualmente, existen multitud de técnicas que permiten la detección de diferentes microorganismos patógenos gracias a los avances realizados en los últimos años en los ámbitos de la microbiología, la inmunología y la biología molecular, lo que ha producido una mejora significativa en el diagnóstico y la atención de las enfermedades infecciosas [1, 2].

A lo largo de la historia las técnicas de diagnóstico han experimentado un gran progreso. De hecho, la evolución del diagnóstico microbiológico se puede dividir en cuatro grandes etapas: métodos de diagnóstico antiguos, desarrollo del microscopio, época de Pasteur y Koch y, por último, microbiología moderna.

Antecedentes del diagnóstico microbiológico: Desde la Edad Antigua hasta el siglo XVII.

En el antiguo Egipto y Mesopotamia, los primeros médicos realizaban diagnósticos y recomendaban tratamientos basándose en la observación de los síntomas clínicos. El test más antiguo conocido se realizaba en orina antes del 400 A.C., de forma que se vertía en el suelo y si los insectos acudían a ella se diagnosticaba al paciente de infección [3].

Alrededor del 300 A.C., Hipócrates, “Padre de la Medicina”, abogó por un protocolo diagnóstico que incluía saborear la orina del paciente, escuchar los pulmones y observar el color de la piel entre otros signos externos. La teoría humoral de Hipócrates sostenía que los cuatro elementos esenciales (tierra, aire, fuego y agua) estaban en constante movimiento manteniéndose en equilibrio. En el cuerpo, estos elementos estarían presentes en cuatro fluidos corporales o humores (sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra) y están relacionados con cualidades fisiológicas (calor, frío, seco y húmedo). Un desequilibrio de los mismos provocaba la aparición de enfermedades o discapacidades. Por ello, la doctrina hipocrática de la patología humoral atribuyó todas las enfermedades a los trastornos de los fluidos del cuerpo [3, 4].

Más tarde, Galeno (180 D.C.) desarrolló la teoría humoral de Hipócrates y se introdujo en el conocimiento de la anatomía y la fisiología. Las ideas de Galeno, así como su filosofía, tuvieron vigencia en la medicina europea hasta el siglo XVII. Durante casi catorce siglos, el diagnóstico se consideró superfluo y la terapia consistía básicamente en rezar, hacer penitencia e invocar a santos [3, 5].

No sería hasta el siglo XVII cuando, con el desarrollo del microscopio y el descubrimiento de pequeños “animalículos”, lo que conocemos hoy como microorganismos, daría lugar al origen del diagnóstico microbiológico.

Desarrollo del microscopio: Primeras observaciones de microorganismos.

Para poder relatar el desarrollo del microscopio hay que remontarse hasta el siglo XIII. En 1267 Roger Bacon describe en su obra *Opus majus* las lentes que ayudarían a ver mejor, las gafas. Este

tipo de lentes formarían más adelante parte de los telescopios y microscopios, aunque no serían inventados hasta trescientos años después. Estos instrumentos nacieron en torno a 1600, pero no hay una fecha concreta. Se cree que el descubrimiento de alinear dos lentes, una detrás de la otra, para generar un mayor aumento fue casual. Se desconoce quién lo descubrió, pero el hallazgo se atribuye a varios fabricantes alemanes, entre ellos Hans Janssen, su hijo Zacharias, Hans Lippershey o Jacob Metius. Tampoco se sabe quién inventó el primer microscopio. Diversas fuentes indican que Cornelius Drebbel (1572-1623), un alemán fabricante de instrumentos, realizó varios pero no hay evidencias de que él lo inventase [6].

Los primeros registros de observaciones microscópicas se realizaron en la abeja y el gorgojo por Federico Cesi y Francesco Stulli en 1625 y 1630. En 1658 Athanasius Kircher, un sacerdote jesuita, describió en *Scrutinium Pestis* que los pacientes con la peste tenían “gusanos” en su sangre. Lo que él pensaba que eran organismos probablemente fueran células de pus o glóbulos rojos de la sangre, ya que no habría podido ver *Yersinia pestis* con su microscopio de 32 aumentos [6, 7].

Más tarde, Anthony Van Leeuwenhoek (1632 – 1723), un mercader holandés, hizo unas lentes de gran calidad capaz de incrementar 200 veces el tamaño original. Esto le permitió descubrir los espermatozoides, los glóbulos rojos y hasta llegó a ver fluir la sangre en los capilares de la cola de los renacuajos. Aunque su mayor descubrimiento fue en 1676 al observar una gran cantidad de “animalículos” en agua estancada, que hoy identificamos como bacterias y protozoos. Leeuwenhoek escribió más de 200 cartas a la *Royal Society of England* describiendo sus observaciones y ésta encargó a Robert Hooke y Nehemiah Grew que construyeran los mejores microscopios para comprobarlo. En 1677 se confirmaron las observaciones de Leeuwenhoek. Los dibujos que realizó mostraban cocos, bacilos y espiroquetas. A parte de estos descubrimientos, también observó que al calentar el agua donde se encontraban los organismos, éstos morían. [7-9]

Aunque a finales del siglo XVII había evidencias de la existencia de microorganismos, entendidos como seres infravivibles, deberían pasar más de doscientos años para que se asociaran con las enfermedades.

Louis Pasteur y Robert Koch: Teoría germinal de las enfermedades infecciosas.

La idea de que los microorganismos no se generaban espontáneamente no era nueva, ya que había sido previamente descrita en los trabajos de Lazzaro Spallanzani (1729 – 1799). Este sacerdote italiano, convertido en científico, se opuso a la teoría de la generación espontánea descrita por el erudito inglés Needham y el reconocido naturalista francés Buffon. Spallanzani también describió los microorganismos anaeróbicos y corroboró el proceso de división celular [9, 10].

Sin embargo, no sería hasta la década de 1860 cuando, gracias a los trabajos de Louis Pasteur (1822-1895), se estableció la relación inequívoca entre microorganismos y enfermedad. Sus estudios asociando el crecimiento específico de microorganismos con la generación de productos específicos de fermentación formaron las bases de la biotecnología. También introdujo el proceso de pasteurización para evitar el deterioro de los productos una vez fabricados. Además, demostró la aparición de microorganismos en medio pre-esterilizado,

debido a la incorporación de gérmenes desde el exterior. Todo ello le permitió demostrar la naturaleza microbiana de las enfermedades infecciosas. También contribuyó a la identificación del agente causal del ántrax y desarrolló la vacuna contra el ántrax y contra la rabia [8, 10].

Un contemporáneo de Pasteur, Robert Koch (1843-1910), hizo grandes aportaciones al mundo de la microbiología. En 1876 descubrió el agente etiológico del ántrax (*Bacillus anthracis*), en 1882 el de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y en 1883-1884 el del cólera (*Vibrio cholerae*) [11].

Koch también descubrió diversos tintes para poder visualizar mejor las bacterias y desarrolló los medios de cultivo sólido. Al principio, las colonias crecían en una porción de patata y, aunque más tarde usó gelatina para solidificar los medios de cultivo líquidos, las propiedades de ésta y su digestión por algunos microorganismos no eran el procedimiento más adecuado. Gracias a Frau Angelina Hesse, esposa de uno de los ayudantes post-doctorales de Koch que añadía agar a la sopa como espesante, se comenzó a utilizar el agar como aditivo para solidificar los medios de cultivo, debido a su mayor punto de fusión y a que es un componente que no pueden utilizar las bacterias como nutriente. Mientras tanto, otro de los asistentes de Koch, Julius Petri diseñó un plato cubierto de poca profundidad donde se podían verter los medios, se enfriaban hasta que se volvían sólidos y además estaban protegidos de la contaminación. Por otro lado, los trabajos de Koch estimularon a otros científicos para desarrollar nuevos tintes y técnicas de tinción. Algunos de los más destacados fueron Paul Ehrlich, Franz Ziehl, Friedrich Neelsen y Hans Christian Gram, cuyos nombres se asocian a tinciones que se siguen utilizando en la actualidad en los laboratorios de microbiología [9, 12, 13].

Los postulados de Koch establecieron los primeros criterios científicos que permitían establecer de forma racional que un organismo concreto era la causa de una determinada enfermedad. Éstos se formalizaron entre 1884 y 1890 y surgieron a raíz de los trabajos que llevaron al descubrimiento del bacilo de la tuberculosis, aunque anteriormente varios científicos habían descrito ideas similares, como Jacob Henle, Edwin Klebs o Friedrich Loeffler [14]. Estos postulados especifican que:

1. El mismo organismo debe estar presente en todos los casos de la enfermedad.
2. El organismo debe cultivarse a partir de productos apropiados del huésped enfermo y debe aislarse en cultivo puro.
3. El organismo aislado debe causar la misma enfermedad cuando se inocula en un animal de experimentación apropiado.
4. El organismo debe ser recuperado por cultivo del animal inoculado enfermo.

Aunque estos son los postulados que hay que seguir para relacionar un organismo específico con una enfermedad en concreto, se han descrito excepciones a estas reglas. La primera vez el propio Koch, en 1884, con el cólera [14]. Más tarde, Koch intentó desarrollar una cura para la tuberculosis y, aunque no lo consiguió, descubrió la tuberculina (1890-1891), que serviría para el diagnóstico de la infección y que sigue siendo utilizada hoy en día. Por todo su trabajo, y la importancia que ha tenido en la historia, fue galardonado con el Premio Nobel en 1905 [11, 15].

Gracias a los trabajos de Pasteur y Koch y la ingente labor desarrollada por numerosos discípulos en los institutos que se crearon, se desarrolló una auténtica Edad Dorada de la microbiología. Se identificaron las principales bacterias patógenas y se realizaron grandes avances en inmunología

(**Tabla 1**). Entre otros, Emil von Behring descubrió la antitoxina diftérica y codesarrolló la terapia sérica para la difteria y el tétanos (ganó el Premio Nobel en 1901). Shibasaburo Kitasato, codescubrió la bacteria que causa la peste bubónica y desarrolló la terapia sérica para el tétanos. Por otro lado, Paul Ehrlich trabajó en hemólisis, autoinmunidad y quimioterapia antibacteriana y ganó el Premio Nobel en 1908. Richard Pfeiffer descubrió la bacteriólisis y fue pionero en la vacuna contra la fiebre tifoidea, y August von Wassermann estableció un test de fijación del complemento para el diagnóstico de sífilis [12, 16].

Tabla 1. Descubrimiento de las principales bacterias patógenas (1877-1906).

Año	Enfermedad	Organismo	Descubridor
1877	Carbunco (Ántrax)	<i>Bacillus anthracis</i>	R. Koch
1878	Supuración	<i>Staphylococcus</i>	R. Koch
1879	Gonorrea	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	A.L.S. Neisser
1880	Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	C.J. Eberth
1881	Supuración	<i>Streptococcus</i>	A. Ogston
1882	Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	R. Koch
1883	Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	R. Koch
1883	Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	T.A.E. Klebs; F. Loeffler
1884	Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	A. Nicholaier
1885	Diarrea	<i>Escherichia coli</i>	T. Escherich
1886	Neumonía	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	A. Fraenkel
1887	Meningitis	<i>Neisseria meningitidis</i>	A. Weischselbaum
1888	Salmonelosis	<i>Salmonella enteritidis</i>	A.A.H. Gaertner
1892	Gangrena gaseosa	<i>Clostridium perfringens</i>	W.H. Welch
1894	Peste	<i>Yersinia pestis</i>	S. Kitasato; A.J.E. Yersin (independientemente)
1896	Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	E.M.P. van Ermengem
1898	Shigelosis	<i>Shigella dysenteriae</i>	K. Shiga
1900	Fiebre paratifoidea	<i>Salmonella paratyphi</i>	H. Schottmüller
1905	Sífilis	<i>Treponema pallidum</i>	E. Hoffmann; F.R. Schaudinn
1906	Tosferina	<i>Bordetella pertussis</i>	J. Bordet; O. Gengou
Fuente: [16]			

Otros hallazgos importantes tuvieron lugar durante esta época. Se descubrió cómo se producía la transmisión de parásitos por vectores (mosquitos) gracias a Patrick Manson en 1877. Adolf Mayer (década 1880) y Dmitri Iwanowski (1892) demostraron, independientemente, que la enfermedad del mosaico del tabaco estaba causada por un organismo filtrable. Sin embargo, fue Martinus W. Beijerinck en 1898 quien describió el agente causal de la enfermedad y quien lo denominó como *contagium vivum fluidum* (germen soluble vivo), lo que hoy se conoce como virus. En ese mismo año, Friedrich Loeffler y Paul Frosch demostraron que la fiebre aftosa en animales estaba causada por un organismo de la misma naturaleza. Finalmente, en 1901 se identificó el primer virus humano, el virus de la fiebre amarilla, por el Mayor Walter Reed, médico del ejército de los Estados Unidos [17-22].

En este entorno tan prolífico en nuevos hallazgos se fundó en 1899 la Sociedad Americana de Microbiología [23].

Si bien se había avanzado muchísimo durante la última mitad del siglo XIX (la asociación entre organismo y enfermedad, el descubrimiento de múltiples agentes patógenos y el desarrollo de algunas técnicas de diagnóstico), no era más que el principio de lo que estaba por llegar.

Microbiología moderna: grandes avances en identificación, diagnóstico y tratamiento.

Han tenido lugar grandes descubrimientos a lo largo de este último siglo, tanto en identificación de nuevos microorganismos, como en la mejora de las técnicas diagnósticas y también en el desarrollo de tratamientos para combatir enfermedades.

A continuación se muestran, de forma resumida, los eventos más relevantes que han sucedido durante el siglo XX (**Tabla 2**) [8, 13, 24-27].

Gracias a la mejora en la identificación y en las pruebas diagnósticas, cada vez se han podido aislar más bacterias, hongos, parásitos y virus. Durante el siglo XX se han conseguido identificar una gran cantidad de microorganismos, pero dos de ellos destacan debido a su importancia en la historia reciente. En primer lugar, el descubrimiento en 1982 de *Helicobacter pylori* y su papel en la gastritis y en la úlcera péptica, por Barry J. Marshall y J. Robin Warren (galardonados con el Premio Nobel en 2005). Y, en segundo lugar, la identificación en 1983 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) por Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier, recibiendo ambos en 2008 el Premio Nobel por su trabajo [28-31].

Respecto a las técnicas diagnósticas, una gran variedad de medios de cultivo selectivos, específicos y enriquecidos se desarrollaron permitiendo un reconocimiento más rápido de la presencia de un determinado microorganismo. Por otro lado, el desarrollo del microscopio electrónico fue uno de los mayores avances realizados durante el siglo XX. Fue inventado por Ernst Ruska (ganador del Premio Nobel en 1986) y Max Knoll en 1931 y la ventaja con respecto al microscopio óptico fue que se pudieron observar elementos mucho más pequeños, con una mayor capacidad de resolución (hasta 2.2×10^{-10} m), permitiendo así visualizar virus por primera vez en 1939 [32-34].

Probablemente el mayor avance en el campo del diagnóstico microbiológico se ha debido al desarrollo de las técnicas de biología molecular. Durante el siglo XX, cinco han sido los descubrimientos más importantes que han dado lugar a esta nueva forma de diagnóstico: la electroforesis de proteínas (1937), la descripción del DNA (*Deoxyribonucleic acid*) (1953), el surgimiento de los inmunoensayos (1967), la síntesis de los anticuerpos monoclonales por hibridomas (1975) y la amplificación del DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (1983) [8, 35].

Tabla 2. Eventos más relevantes del siglo XX.

Año	Evento	Descubridor
1901	Descubrimiento de la antitoxina diftérica	E. von Behring
1901	Identificación del primer virus humano, virus de la fiebre amarilla	W. Reed
1905	Descubrimiento del agente causal de la sífilis, <i>Treponema pallidum</i>	E. Hoffmann; F.R. Schaudinn
1906	Desarrollo de un test para el diagnóstico de sífilis	A. Wassermann
1907-1908	Desarrollo de tratamientos para tripanosomiasis y sífilis	P. Ehrlich
1911	Etiología viral del sarcoma maligno en pollos	F.P. Rous
1915;1917	Descubrimiento de virus que infectan a bacterias (bacteriófagos)	F. d'Herelle; F. Twort
1918-1919	Pandemia de gripe española	-
1921	Vacuna BCG para la tuberculosis	A. Calmette; C. Guérin
1928	Descubrimiento de la penicilina	A. Fleming
1928	Descubrimiento de la transformación genética en neumococos, estableciendo la base de la genética molecular	F. Griffith
1931	Inención del microscopio electrónico	M. Knoll; E. Ruska
1935	Cristalización del virus del mosaico del tabaco	W.M. Stanley
1935	Descubrimiento de la actividad antimicrobiana de Prontosil (sulfonamida)	G.J.P. Domagk
1937	Desarrollo de la electroforesis de proteínas	E.A. Kabat; A. Tiselius
1939	Primera visualización de virus por microscopio electrónico	E. Ruska
1941	Introducción de cultivos celulares para el crecimiento de virus animales	J.F. Enders; F.C. Robbins; T.H. Weller
1944	Descubrimiento de la estreptomycinina	S. Waksman
1948	Se funda The World Health Organization (WHO)	-
1953	Descubrimiento de la estructura de doble hélice del DNA	F. Crick ; J. Watson
1954;1956	Vacuna inactivada (Salk) y atenuada (Sabin) para la poliomielitis	A. Sabin; J. Salk
1955	Descubrimiento de la DNA polimerasa	A. Kornberg
1959	Desarrollo de la técnica del radioinmunoensayo	S. Berson; R.S. Yallow
1966-1969	Surgimiento de inmunofluorescencia	S. Avrameas; G.B. Pierce
1969	Aislamiento de <i>Thermus aquaticus</i> , fuente de <i>Taq</i> DNA polimerasa	T.D. Brock; H. Freeze
1970	Identificación de retrovirus transcriptasa reversa	D. Baltimore; H. Temin
1971	Desarrollo de las pruebas ELISA	E. Engvall; P. Perlmann
1975	Síntesis de los anticuerpos monoclonales por hibridomas	G.J.F. Köhler; C. Milstein
1977	Se desarrollan métodos para secuenciar el DNA	W. Gilbert; A. Maxam; F. Sanger
1979	Se declara que el mundo está libre de viruela	-
1982	Se demuestra que úlceras gástricas de pacientes contienen <i>Helicobacter pylori</i>	B.J. Marshall; J.R. Warren
1983	Identificación del virus de la inmunodeficiencia humana, el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)	F. Barré-Sinoussi ; L. Montagnier
1983	Se desarrolla la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de DNA	K. Mullis
1995	Se secuencian el primer genoma completo en <i>Haemophilus influenzae</i>	C. Fraser; H. Smith; J.C. Venter

Fuente: [8, 13, 24-27]

La electroforesis consiste en la migración y separación de partículas o iones cargados eléctricamente debido a la aplicación de un campo eléctrico. Arne Tiselius (ganador del Premio Nobel en 1948) describió la electroforesis en 1930 y junto con Elvin A. Kabat la usaron para separar, por primera vez, proteínas del suero en 1937. La capacidad de la técnica para separar sustancias muy similares hizo que su utilización aumentase, especialmente desde 1950 debido a la introducción de electroforesis en papel y más tarde en geles de poliacrilamida y agarosa. De esta técnica han derivado una gran cantidad de métodos de entre los que destacan: electroforesis de zona en acetato de celulosa, electroforesis de alta resolución en agarosa, contraelectroforesis, radioinmunolectroforesis, electroinmunodifusión y, más recientemente, la electroinmunotransferencia de la que existen tres versiones: Western Blot (para proteínas), Northern Blot (para RNA) y Southern Blot (para DNA), las cuales han sido de gran utilidad en microbiología [8, 36, 37].

La primera vez que se aisló el DNA fue por Friedrich Miescher en 1869, sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando, debido a los procesos de transformación y mutación bacteriana, se sospechó que toda la información genética de las células estaba codificada por el DNA. A mediados de 1940 y principios de 1950, Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarthy, por un lado, y Al Hershey y Marta Chase, por otro, demostraron que el DNA era el portador de la información genética. En 1953, James Watson y Francis Crick describieron la estructura molecular del DNA, una doble hélice de bases púricas y pirimidínicas en la cual adenina (A) siempre se apareaba con timina (T) y citosina (C) con guanina (G), proporcionando así una primera visión del funcionamiento del DNA. Sin embargo, este importante hallazgo no solo fue debido a Watson y Crick, ya que dos semanas antes de la descripción del modelo de doble hélice, Maurice Wilkins y Rosalind Franklin usaron cristalografía de rayos X para demostrar que el DNA tiene una estructura helicoidal que se repite regularmente (de gran importancia las imágenes de difracción de rayos X de Franklin). Watson, Crick y Wilkins recibieron en 1962 el Premio Nobel por su aportación (Franklin falleció unos años antes sin poder optar a este premio) [9, 25, 38, 39].

En 1983, el DNA se consideró una herramienta muy útil cuando el Dr. Kary Mullis (ganador del Premio Nobel en 1993) inventó la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*-PCR). Esta técnica consiste en generar una gran cantidad de copias de un pequeño fragmento de DNA gracias al uso de secuencias específicas (cebadores) y una enzima que permite llevar a cabo este proceso (*Taq* DNA polimerasa). El DNA amplificado puede ser clonado directamente o ser usado en una amplia variedad de procedimientos analíticos. Esta tecnología posee una gran sensibilidad y especificidad de diagnóstico [35, 40].

Los inmunoensayos son un conjunto de procedimientos que se basan en la reacción de unión entre un antígeno (analito) y un anticuerpo, formando así un complejo inmune. El análisis se realiza al medir la actividad producida debida a la unión, ya sea de forma enzimática, por fluorescencia o por radiación. El primer inmunoensayo para la detección de insulina se desarrolló en 1959 por Solomon Berson y Rosalyn S. Yalow (recibiendo solo Yalow el Premio Nobel en 1977 debido a la muerte prematura de Berson unos años antes). Se generó el primer radioinmunoensayo (RIA) al marcar residuos de tirosina de insulina con yodo radioactivo (I^{131}), de tal forma que competía con insulina no marcada de la muestra para unirse con el anticuerpo [41, 42].

Entre 1966 y 1969 el grupo de Stratis Avrameas describió el acoplamiento exitoso antígeno-anticuerpo mediante el uso de enzimas como la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa, entre otras. También optimizaron el proceso de marcado y posterior acoplamiento a través de la química del glutaraldehído. Su propósito era utilizar los antígenos y anticuerpos marcados con enzimas para detectar la biomolécula complementaria por inmunofluorescencia. El grupo de G.B. Pierce también desarrolló la misma línea de investigación, mientras que el grupo de L. Wide generó una técnica (radio) inmunoabsorbente en la que los anticuerpos se insolubilizan mediante el acoplamiento a celulosa o bolas de Sephadex. Por otro lado, Peter Perlmann y Eva Evgall publicaron un artículo sobre el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA*) en 1971 demostrando la medición cuantitativa de anticuerpo (Inmunoglobulina G) en suero de conejo con fosfatasa alcalina como marcador. El mismo año, Bauke van Weemen y Anton Schuurs publicaron su trabajo sobre el ensayo inmunoenzimático (*Enzyme Immunoassay-EIA*), en el que se comprobó que era posible cuantificar en humanos concentraciones de gonadotropina coriónica en orina. Es cierto que la técnica ELISA ha sido más comercializada que la técnica EIA debido al desarrollado de microplacas donde el anticuerpo o el antígeno de interés se unen de forma no covalente al material de soporte. La posterior fijación de las biomoléculas complementarias marcadas con la enzima conduciría a la generación de la señal de detección [43, 44].

En 1975 César Milstein y Georges J. F. Köhler (ganadores del Premio Nobel en 1984) publicaron un artículo en *Nature* describiendo un método para generar gran cantidad de anticuerpos monoclonales con una especificidad predeterminada, a partir de hibridomas de ratón mantenidos en cultivo celular. Debido a que los anticuerpos monoclonales interactúan con otras moléculas (antígenos) de forma muy específica, no solo revolucionaron el campo de la investigación biomédica y del diagnóstico por ser usados como reactivos, sino que también permitieron la generación de un arsenal de terapias contra muchas enfermedades [45-48].

En cuanto a los tratamientos, al principio del siglo XX se habían identificado muchos organismos patógenos y existían algunas pruebas para su diagnóstico, pero los agentes terapéuticos eran relativamente pocos y muchas enfermedades comunes seguían siendo letales.

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por Sir Alexander Fleming fue fundamental para el inicio de la era de los antibióticos. Este hallazgo se dio de manera fortuita al no crecer bacterias en una placa contaminada con moho. Debido a las dificultades para su aislamiento, no fue hasta doce años después, en 1940, cuando dos científicos, Howard Florey y Ernst Chain, estuvieron interesados en la penicilina, pudiéndola producir en masa para usarla durante la Segunda Guerra Mundial. Por este gran descubrimiento los tres científicos fueron galardonados con el Premio Nobel en 1945. El éxito de esta nueva terapia fue tal que se inició la búsqueda de otras armas antimicrobianas. Gerhard Domagk (1895-1964) descubrió las sulfonamidas y ganó el Premio Nobel en 1939, mientras que Selman Waksman en 1944 (ganador del Premio Nobel en 1952) descubrió la estreptomina, el primer antibiótico efectivo contra la tuberculosis. Más tarde, se identificaron otros antibióticos de amplio espectro y surgieron los antibióticos semisintéticos [9, 23, 49-51].

Respecto a las vacunas, la primera desarrollada lo fue contra la viruela por Edward Jenner en 1797, con la peculiaridad de que nunca llegó a aislar el virus. Anteriormente se han descrito algunas de ellas, como la del ántrax, la de la rabia o algunos intentos para obtener una contra la

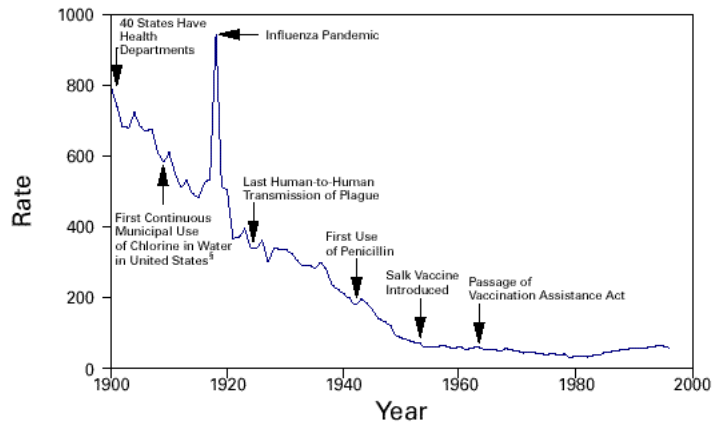
tuberculosis. Sin embargo, mientras que se estaban descubriendo y desarrollando muchos antibióticos, las opciones terapéuticas para combatir a los virus eran relativamente escasas. La vacuna Bacillus Calmette-Guérin (BCG) contra la tuberculosis fue administrada en humano por primera vez en 1921, aunque Albert Calmette y Camille Guérin comenzaron su investigación en el año 1900. Esta vacuna es, en la actualidad, la principal medida de prevención contra la tuberculosis. Por otro lado, la vacuna contra la poliomielitis no fue desarrollada hasta 1954-1956 por Jonas Salk y Albert Sabin, y más tarde, en la década de 1960, fueron desarrolladas las vacunas contra la rubeola, el sarampión y la parotiditis. Fue a partir de los años 70 cuando las vacunas comenzaron a aumentar considerablemente. En cuanto a los agentes antivirales, se desconoce cuál fue el primero en utilizarse en la práctica clínica, ya que se estaban realizando experimentos tanto con la idoxuridina como con la metisazona, pero lo que sí se sabe es que a partir de 1964 la quimioterapia antiviral fue una realidad [8, 9, 50, 52-54].

Las nuevas formas de diagnóstico, la capacidad de realizar mejores identificaciones de los microorganismos y el desarrollo de nuevas terapias han hecho que el siglo XX sea uno de los más prolíficos de la historia de la microbiología. Todo ello ha permitido que las enfermedades infecciosas sean más fáciles de diagnosticar y tratar, mejorando así la salud a nivel mundial. No obstante, las enfermedades emergentes y el resurgimiento de otras, en parte debido a microorganismos resistentes, hacen que el campo de la microbiología esté en constante evolución.

Situación actual: ¿Y ahora como nos encontramos?

Grandes pandemias han asolado el mundo desde la época antigua, pero algunas de ellas destacan por su fuerte repercusión en la historia de la humanidad. Por un lado, la peste, causada por *Yersinia pestis*, que consumió Europa en el siglo XIV y fue más conocida como La Muerte Negra. Mató, aproximadamente, de un tercio a la mitad de la población europea y se estima que a 40 millones de personas en todo el mundo. Por otro lado, aunque no a la misma escala de mortalidad, las pandemias de cólera (*Vibrio cholerae*) dejaron miles de muertos entre 1817 y 1920. Respecto a las pandemias virales, se puede hablar del gran alcance que han tenido tanto la viruela (poxvirus) como la gripe (influenzavirus). Aunque la viruela fue declarada por The World Health Organization (WHO) erradicada en 1979, se estima que hasta el siglo XVIII mató a más de 100 millones de personas en todo el mundo. La pandemia por el virus gripal de 1918-1919, también conocida como la gripe “española”, ha sido el único agente patogénico en la historia que ha devastado tanto en tan poco tiempo. Mató aproximadamente a 40 millones de personas, lo que supuso entre un 2-3% de la población mundial y con gran afectación, de forma inesperada, al grupo de edad de entre 15-35 años [9, 26, 55, 56].

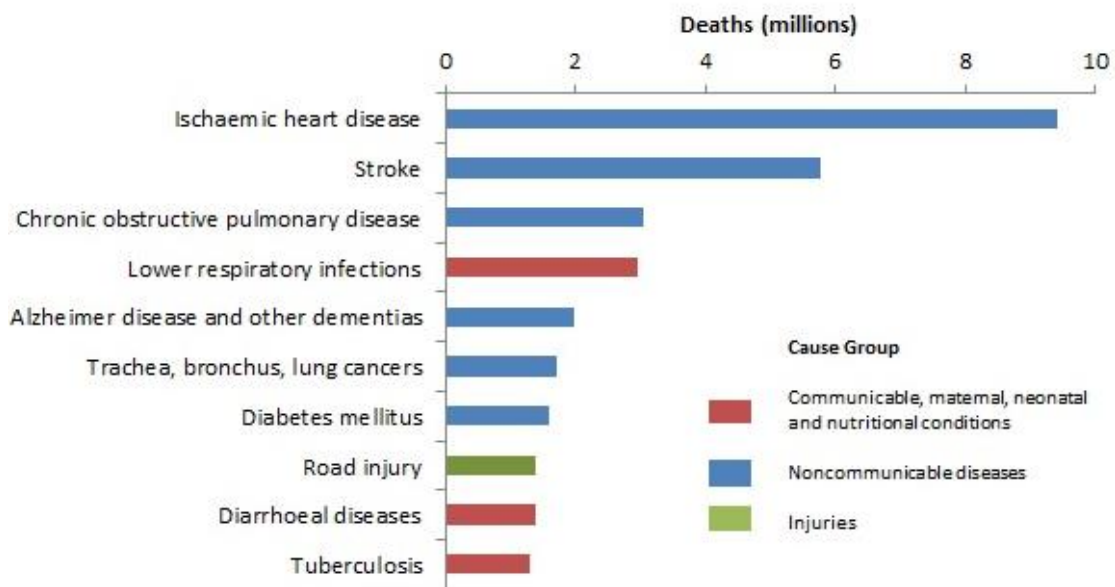
Es cierto que, gracias a los grandes avances acaecidos en el siglo XX, tanto en identificación como en diagnóstico y en tratamiento, las muertes causadas por enfermedades infecciosas han disminuido notablemente. En la **Figura 1** se puede observar el descenso de la mortalidad en Estados Unidos relacionado con grandes eventos acontecidos entre 1900-1996 (*Centers for Disease Control and Prevention- CDC*) [57].



*Per 100,000 population per year.
[†]Adapted from Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. JAMA 1999;281:61-6.
[§]American Water Works Association. Water chlorination principles and practices: AWWA manual M20. Denver, Colorado: American Water Works Association, 1973.

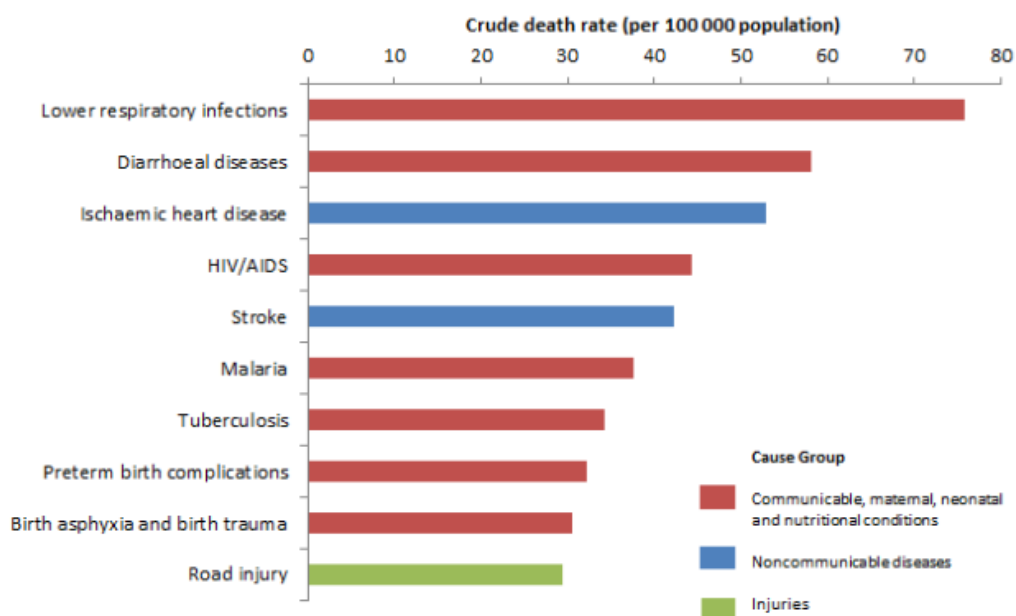
Figura 1. Tasa* de mortalidad bruta debida a enfermedades infecciosas – Estados Unidos, 1900-1996†.Fuente: [57].

Según WHO, en 2016, la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular son las causas mayoritarias de muerte a nivel global. Sin embargo, en los países de bajos ingresos, las enfermedades infecciosas siguen siendo la principal causa de mortalidad (**Figura 2 y Figura 3**) [58].



Source: Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.

Figura 2. Las 10 principales causas de muerte a nivel global, 2016. Fuente:[58].



Source: Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018. World Bank list of economies (June 2017). Washington, DC: The World Bank Group; 2017 (<https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/906319-world-bank-country-and-lending-groups>).

Figura 3. Las 10 principales causas de muerte en países de bajos ingresos, 2016. Fuente:[58].

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en España, al igual que a nivel mundial, las enfermedades circulatorias, las isquémicas de corazón y las cerebrovasculares, ocupan los primeros puestos en número de defunciones. En la **Figura 4**, se recoge un resumen que relaciona tipos de enfermedades con número de defunciones en España para el año 2016 [59].

Capítulos de la CIE-10	Nº de defunciones	%
Total Defunciones	410.611	100,0
Enfermedades del sistema circulatorio	119.778	29,2
Tumores	112.939	27,5
Enfermedades del sistema respiratorio	46.812	11,4
Enfermedades del sistema nervioso y de los órganos de los sentidos	25.236	6,1
Trastornos mentales y del comportamiento	20.980	5,1
Enfermedades del sistema digestivo	20.096	4,9
Causas externas de mortalidad	15.668	3,8
Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas	12.700	3,1
Enfermedades del sistema genitourinario	12.173	3,0
Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio	8.033	2,0
Enfermedades infecciosas y parasitarias	7.033	1,7
Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo	4.256	1,0
Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos y ciertos trastornos que afectan al mecanismo de la inmunidad	1.886	0,5
Enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo	1.523	0,4
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	846	0,2
Afecciones originadas en el periodo perinatal	637	0,2
Embarazo, parto y puerperio	15	0,0

Figura 4. Distribución por capítulos de la Clasificación internacional de Enfermedades. Año 2016.Fuente: [59].

Aunque el avance que se ha producido en los últimos años para mejorar la salud global con relación a patologías infectocontagiosas ha sido muy importante, no implica que enfermedades emergentes o reemergentes puedan producir brotes a nivel mundial. De hecho, en los pocos años transcurridos del siglo XXI, ya se han producido dos pandemias, aunque con un menor número de muertes asociadas. El brote en 2003 del síndrome respiratorio agudo severo (*Severe Acute Respiratory Syndrome-SARS*), causado por coronavirus, se propagó rápidamente de un continente a otro, produciendo más de 8.000 infecciones, con una mortalidad aproximada del 10%. Por otra parte, se ha estimado que la pandemia de gripe (influenza A H1N1) de 2009 produjo unas 284.000 muertes a nivel mundial durante el primer año de circulación del virus. Aun así, otras enfermedades están en el punto de mira, en parte debido a la gran alerta social que hay en torno a ellas. En concreto son el Síndrome respiratorio por coronavirus de Oriente Medio (*Middle East Respiratory Syndrome coronavirus-Betacoronavirus MERS-CoV*) y la enfermedad del virus Ébola [60-63].

Actualmente, las técnicas más utilizadas para el diagnóstico microbiológico, y que ya han sido descritas anteriormente, son la visión directa del microorganismo, el cultivo, la serología y las herramientas moleculares. En la **Tabla 3**, se recoge una comparativa de las mismas en términos de complejidad del análisis, el tiempo estimado de ejecución, ventajas y desventajas. Es cierto, que la aplicación de cada una de ellas, depende en gran medida del poder adquisitivo y los recursos de cada laboratorio, así como del microorganismo a identificar [2].

Tabla 3. Métodos utilizados para el diagnóstico de microorganismos.

Test	Complejidad en el análisis	Tiempo de análisis	Interpretación del resultado	Ventajas	Desventajas
Examen directo	Puede llevarse a cabo en un laboratorio clínico de rutina	1-3 h	Directo en correlación con los síntomas	Rapidez	Baja sensibilidad y especificidad; habilidad para la interpretación de resultados
Cultivo	Puede llevarse a cabo en un laboratorio clínico sofisticado o en un laboratorio de investigación	2-14 días	Definitivo	Se testa la sensibilidad fenotípica a fármacos	Conlleva mucho tiempo, baja sensibilidad; no todos los microorganismos se pueden cultivar
Serología	Puede llevarse a cabo en un laboratorio clínico grande y sofisticado	4-6 horas	Indirecto	Automatización	Los resultados son generalmente retrospectivos
Diagnóstico molecular	Puede llevarse a cabo solo en laboratorios clínicos o de investigación muy sofisticados	2.5 horas-2 días	Directo sin conocer la viabilidad microbiana	Alta sensibilidad y especificidad	Necesidad de instalación; falsos positivos pueden deberse a contaminación remanente y falsos negativos a la presencia de inhibidores en las muestras

Fuente: [2]

Las herramientas moleculares han proporcionado una nueva visión en el campo de la microbiología y gracias a ellas se ha podido conocer mejor la gran capacidad de los microorganismos para evolucionar, adaptarse y desarrollar resistencia a agentes antiinfecciosos. Quizá una de las mayores preocupaciones actualmente sea la presencia de bacterias multirresistentes. Estas “superbacterias” están asociadas a mayor tasa de mortalidad y morbilidad, debido a múltiples mutaciones que les confieren altos niveles de resistencia a los antibióticos específicos recomendados para su tratamiento. En algunos casos, las cepas superresistentes también tienen mayor virulencia y transmisibilidad. Todo ello hace que las

opciones terapéuticas se reduzcan, las estancias hospitalarias sean más costosas y prolongadas y el pronóstico sea más severo. Para reducir el desarrollo de bacterias multirresistentes, es necesario controlar y hacer buen uso de los tratamientos antibióticos [57, 64].

Por último, para lograr el éxito continuo en el control de enfermedades infecciosas, es necesario vigilar la aparición o la reaparición de enfermedades; desarrollar y difundir nuevos métodos de laboratorio y epidemiológicos; desarrollar nuevos antimicrobianos y vacunas; e investigar sobre los factores ambientales que facilitan la aparición de enfermedades. De hecho, desde WHO en Febrero de 2018, los expertos consideran que, debido al potencial patogénico y a la ausencia de medicamentos y/o vacunas eficaces, hay una necesidad urgente de investigar en las siguientes enfermedades: fiebre hemorrágica Crimea-Congo, Ébola, enfermedad del virus Marburg, fiebre de Lassa, MERS-CoV, SARS, enfermedad del virus Nipah, fiebre del Valle del Rift, Zika y enfermedad X (enfermedad desconocida por el momento pero que podría causar una epidemia internacional grave) [57, 65].

En conclusión, el campo del diagnóstico microbiológico ha tenido una gran evolución, con descubrimientos muy importantes a partir del siglo XVIII y el desarrollo de tratamientos y técnicas de diagnóstico en los siglos XIX y XX. Aunque se ha conseguido un gran avance, y una gran mejora en la salud global, las enfermedades emergentes y reemergentes son el principal problema en la actualidad. Por tanto, la mejora en técnicas de identificación y análisis, así como la investigación en nuevos tratamientos es esencial para poder realizar diagnósticos en menor tiempo y, de esta forma, aplicar el tratamiento más certero y eficaz.

Microorganismos enteropatógenos y su incidencia

Las enfermedades gastrointestinales son una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, siendo la diarrea el segundo motivo más frecuente de muerte en niños menores de cinco años. Globalmente, hay cerca de 1,7 billones de casos de enfermedad diarreica infantil al año y aproximadamente 525.000 muertes en niños menores de cinco años. Por otro lado, en Estados Unidos se estima que se producen en torno a 179 millones de episodios de diarrea aguda cada año, de los cuales 142 millones están causados por agentes no identificados. Como consecuencia de los casos de diarrea aguda se calcula que se producen aproximadamente 500.000 hospitalizaciones y unas 5.000 muertes anuales. A pesar de la fuerte asociación entre enfermedades gastrointestinales y factores como el deficiente saneamiento o el acceso restringido a agua potable, tanto países ricos como en vías de desarrollo se ven afectados por este tipo de enfermedades [66-69].

En la microbiota intestinal humana habitan trillones de microorganismos y se estima que por individuo residen entre 150 y 400 especies distintas, siendo las más comunes Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia. La microbiota también contiene arqueas metanogénicas (principalmente *Methanobrevibacter smithii*), eukarya (principalmente levaduras) y virus (más en concreto fagos). A pesar de que estos serían los componentes mayoritarios, las especies varían mucho entre individuos debido, en gran parte, a su alimentación [70, 71].

Con respecto a las heces, están compuestas mayoritariamente por agua (74.6%) aunque también contienen proteínas, grasas no digeridas, polisacáridos, biomasa bacteriana y residuos de alimentos no digeridos. Tienen un pH medio de 6.64 y la biomasa es el mayor componente (25%-54% de sólido seco) de la fracción orgánica. Varios estudios estiman que cada gramo de hez seca contiene alrededor de 10^{11} bacterias [72, 73].

En consecuencia, debido a la gran diversidad de especies presentes en la flora intestinal y el elevado número de células que contiene la materia fecal, la detección y diferenciación de microorganismos patógenos asociados a enfermedades gastrointestinales infecciosas representa un gran reto para el diagnóstico microbiológico.

Definición de enfermedad gastrointestinal

La enfermedad gastrointestinal se asocia a distintas condiciones que afectan al aparato digestivo, puede estar causada por muy diversos agentes (entre ellos los microorganismos enteropatógenos) y presenta una sintomatología que puede ser muy variable. Debido a esta diversidad de causas y sintomatología no hay una definición estándar para describirla. Puede cursar con diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre u otros síntomas sistémicos. De hecho, en algunas ocasiones, se puede presentar con vómitos sin apenas presencia de diarrea [74, 75].

La WHO define la diarrea como la presencia de tres o más deposiciones líquidas o sueltas al día. No se consideraría diarrea tener varias deposiciones de heces formadas ni las heces pastosas de niños alimentados con leche materna. Dependiendo del tiempo de duración, se pueden clasificar de la siguiente manera [67, 76]:

1. Aquellos episodios que duran menos de 7 días corresponden a diarrea aguda (acuosa o sanguinolenta).
2. Aquella que dura entre 7 y 13 días se denomina diarrea prolongada.
3. La que tiene entre 14 y 29 días de duración sería diarrea persistente.
4. Aquella que supera los 30 días de duración se denomina diarrea crónica.

Las enfermedades diarreicas, basándose en su patogenia y en los síntomas clínicos que presentan, pueden dividirse en tres categorías [69, 77]:

1. Diarrea acuosa aguda o diarrea secretora o coleriforme, asociada a diferentes patógenos como *Vibrio cholera* y rotavirus, se caracteriza por una pérdida muy importante de agua y electrolitos que puede llevar rápidamente a la deshidratación. Puede ser fatal especialmente en niños pequeños, ancianos y personas inmunocomprometidas.
2. Diarrea sanguinolenta aguda o diarrea invasiva o disenteriforme, que pueden protagonizar *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Entamoeba histolytica*. Los principales riesgos asociados a esta presentación incluyen deshidratación, daño intestinal, desnutrición y sepsis.
3. Diarrea persistente, normalmente asociada con etiología parasitaria, aunque a veces puede ser bacteriana. También por una causa no infecciosa, como la enfermedad inflamatoria intestinal o la celiaquía. Debido a la duración prolongada de la diarrea hay un riesgo de deficiencia de nutrientes, infección extraintestinal y deshidratación especialmente en niños, personas mayores e inmunocomprometidas.

La gastroenteritis infecciosa es más frecuente en países en vías de desarrollo debido, principalmente, a la deficiencia en el saneamiento y la falta de higiene. Pero también se asocia a diversos factores de riesgo en los países desarrollados: globalización, producción masiva e importación de alimentos, sistemas de agua que distribuyen a grandes segmentos de la población o uso generalizado de guarderías. Finalmente, el uso de determinados agentes antimicrobianos, la exposición a animales o algunas prácticas sexuales, entre otros, están también considerados factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades gastrointestinales [76].

Habitualmente, las enfermedades infecciosas gastrointestinales se transmiten a través de comida y/o agua contaminada, por vía fecal-oral o contacto persona-persona. La falta de una higiene adecuada de las manos es el principal mecanismo de transmisión. Según un informe de la WHO los agentes etiológicos de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos causaron 230.000 muertes en año 2010 [78-80].

Diagnóstico de la diarrea infecciosa

Para poder realizar el diagnóstico de la diarrea infecciosa es necesario contar con una muestra o producto patológico apropiado. Según la guía IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) del 2017, la muestra biológica óptima para el diagnóstico son las heces, preferiblemente en estado fresco. Respecto al método diagnóstico utilizado, la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica siguen usando métodos tradicionales de diagnóstico, como cultivos específicos,

detección de antígenos o examen microscópico con y sin tinciones especiales e inmunofluorescencia. Sin embargo, en muchas ocasiones, estos métodos no revelan la etiología de la infección diarreica. De hecho, el porcentaje de muestras en las que el enteropatógeno no es detectado puede llegar a ser muy alto, debido a varias razones [74, 76, 81]:

1. No todos los enteropatógenos se buscan de rutina.
2. Labilidad de algunos enteropatógenos.
3. Baja sensibilidad del método utilizado para la detección.
4. Enteropatógenos desconocidos.

Por ello, se recomienda el uso de otros métodos diagnósticos complementando a los métodos tradicionales. En la actualidad se tienden a utilizar, en mayor medida, herramientas de diagnóstico molecular, microbiología digital y técnicas de espectrometría de masas. Cada vez es más importante disponer de técnicas de diagnóstico rápido, en especial aquéllas que permiten la identificación de infecciones graves causadas por bacterias resistentes a antibióticos [74, 81].

Pero la detección de un microorganismo no implica inequívocamente enfermedad, ya que puede haber portadores sanos, o que haya varios patógenos presentes al mismo tiempo en un individuo. El fenómeno de la coinfección ha sido descrito en numerosas ocasiones en la literatura y ciertas asociaciones pueden incrementar la severidad de los síntomas. Por todo ello, la interpretación del resultado de la detección de enteropatógenos en muestras fecales debe realizarse con cautela [82, 83].

A continuación, detallaremos las características principales de cada uno de los grupos de microorganismos causantes de diarrea infecciosa.

Bacterias enteropatógenas

Se incluyen aquí, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* y los enterotipos patógenos diarreogénicos de *E. coli*: enterotoxigénicos, enteroinvasivos, enteropatógenos clásicos, enteroadherentes, enteroagregativos y enterohemorrágicos o verotoxigénicos. A estos hay que añadir *Clostridium difficile* que es una de las principales causas de diarrea asociada a antibióticos y a colitis pseudomembranosa a nivel mundial, habiéndose descrito en la actualidad un incremento de incidencia y severidad de la infección por este microorganismo debido, en parte, a la aparición de nuevas cepas hipervirulentas [84, 85].

Aeromonas

Bacterias Gram-negativas, con morfología bacilar, anaerobios facultativos, no formadoras de esporas y ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos. Aunque inicialmente se clasificaron dentro de la familia *Vibrionaceae*, tras varios análisis filogenéticos, se han posicionado en su propia familia, *Aeromonadaceae*. El género está compuesto por 17 grupos de hibridación de DNA representando un rango de genoespecies y fenoespecies. Los miembros del género se dividen en tres grupos diferenciados bioquímicamente: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas sobria*. Las especies que principalmente producen gastroenteritis son *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii* biovar *sobria*; mientras que *Aeromonas veronii* biovar *veronii*, *Aeromonas trota* y *Aeromonas jandaei* son mucho menos frecuentes. Se han asociado con brotes transmitidos por alimentos y también se aíslan de

pacientes con diarrea del viajero. Tienen la capacidad de crecer en el agua, especialmente en biopelículas, donde pueden ser resistentes a la cloración. Pueden causar desde gastroenteritis aguda, hasta septicemia, fascitis necrotizante, mionecrosis, infecciones oculares y de otras localizaciones. La forma más común en la que se presenta es como diarrea acuosa [86, 87].

Campylobacter

Bacterias Gram-negativas, con forma de bacilos ligeramente incurvados o espirilados, con un solo flagelo polar, flagelos bipolares o sin flagelos dependiendo de la especie. Además, no forman esporas, requieren ambientes nutricionales complejos y dependiendo de la especie crecen en condiciones anaeróbicas o microanaerofilicas. El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae*, con 26 especies, 2 especies provisionales y 9 subespecies. Está establecido que tanto *Campylobacter jejuni* como *Campylobacter coli* producen diarrea en humanos, siendo *Campylobacter jejuni* el principal causante de gastroenteritis a nivel mundial. Se está observando también que otras especies pueden estar contribuyendo a la etiología de la gastroenteritis, como *Campylobacter concisus*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter ureolyticus* y *Campylobacter upsaliensis*. *Campylobacter* spp se transmite a través del consumo de agua o alimentos contaminados, por contacto con animales o por contacto persona-persona (feco-oral o a través de fómites). El reservorio más común es el intestino de muchos animales, especialmente el ganado porcino y las aves. Las especies aviares son el huésped más frecuente, siendo el pollo la más habitual. La presentación clínica incluye diarrea acuosa o sanguinolenta que tiene una duración media de 6 días, con cólicos, fiebre y pérdida de peso. También estar puede involucrado en enfermedades extraintestinales como bacteriemia y cuadros reactivos como artritis o síndrome de Guillen-Barré [88-91].

Clostridium difficile

Bacteria Gram-positiva, formadora de esporas, anaerobia estricta, productora de toxinas y la principal causa de diarrea nosocomial asociada a antibióticos. Recientemente ha sido reclasificada desde *Peptoclostridium difficile* a *Clostridioides difficile*. Se transmite habitualmente por vía feco-oral y clínicamente puede producir formas asintomáticas, diarrea leve, colitis, colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico e incluso muerte. El organismo por sí mismo no es invasivo y la infección fuera del colon es extremadamente rara. *Clostridium difficile* produce tres toxinas, solas o en combinación: toxina A, toxina B y toxina binaria. El papel de la toxina binaria todavía se encuentra sometido a debate. A principios de la década de los 2000 se empezaron a registrar casos más graves de infección por *Clostridium difficile* debido a la emergencia del ribotipo 027 (NAP1 / BI / 027), que se caracteriza por resistencia a fluoroquinolonas, una esporulación eficiente, gran producción de toxinas y una tasa de mortalidad tres veces mayor que otros ribotipos menos virulentos como 001 o 014. Actualmente, diferentes ribotipos se han catalogado como cepas hipervirulentas (027, 078) ya que presentan resistencia a antibióticos y producen casos más severos de la enfermedad [92-96].

Escherichia coli

Bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* está ampliamente distribuido y habitualmente se encuentra en el intestino grueso del hombre y numerosas especies animales. Aunque la mayoría de las cepas de

Escherichia coli viven en el colon y rara vez producen enfermedad en individuos sanos, una serie de cepas patógenas pueden causar enfermedad intestinal y extraintestinal tanto en personas sanas como inmunocomprometidas. La *Escherichia coli* diarreogénica (ECD) se clasifica, con base a criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares, en cinco grupos, cada uno de ellos con factores de virulencia específicos: *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) y *Escherichia coli* Enterohemorrágica-productora de toxina shiga (EHEC/STEC). La forma de transmisión más habitual es a través de agua o alimentos contaminados. ETEC se asocia con diarrea acuosa en niños de países en vías de desarrollo y es la principal causa de diarrea del viajero en zonas endémicas. EIEC causa diarrea acuosa y disentería en los seres humanos y está muy relacionada con *Shigella* spp. por sus características genéticas, bioquímicas y de virulencia. EPEC está relacionada con diarrea infantil e induce una alteración histopatológica característica en el intestino. EAEC causa diarrea del viajero y también está asociada a episodios de diarrea en población infantil. Finalmente, EHEC/STEC corresponde al grupo más importante de patógenos transmitidos por alimentos, donde el cuadro de gastroenteritis puede complicarse con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico, caracterizado éste último por hemólisis, fallo renal y trombocitopenia. El serotipo más importante de este grupo es el O157:H7 [97-100].

Salmonella

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Bacteria Gram-negativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, no formadora de esporas, anaerobia facultativa y con forma bacilar. La mayoría son móviles por flagelos peritricos. Hoy en día, el género *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. A su vez, *Salmonella enterica* se puede dividir en 6 subespecies, que se clasifican en más de 2.200 serotipos o serovariedades por diferencias en su estructura antigénica. *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (subespecie I), es una causa importante de bacteriemia extrahospitalaria en países en vías de desarrollo. Puede sobrevivir en ambiente ácido, estableciendo infección en íleon terminal. Atendiendo a su capacidad patógena, *Salmonella enterica* serotipos Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B y Paratyphi C pueden referirse conjuntamente como salmonelas tifo-paratíficas, mientras que el resto de los serotipos se designan como salmonelas gastroentéricas.

Salmonella Typhi tiene como único reservorio al ser humano y causan la fiebre tifoidea y paratifoidea. Se transmiten principalmente a través de agua y comida contaminadas con heces humanas. El principal síntoma que presentan es fiebre muy alta (39°C-40°C) durante una semana. También pueden presentar dolor de cabeza, anorexia, tos seca, dolor de garganta, dolor abdominal y náuseas. El estreñimiento es un síntoma temprano frecuente, aunque muchos pacientes experimentan diarrea en algún momento de la enfermedad, ocasionalmente como diarrea sanguinolenta. Además, pueden presentar diversas complicaciones como hemorragia gastrointestinal, perforación intestinal o encefalopatía tifoidea que pueden llegar a causar incluso la muerte.

Respecto a los serotipos gastroentéricos, pueden infectar o colonizar a una amplia gama de animales. Se transmiten fundamentalmente por consumo de alimentos contaminados y, normalmente, causa enterocolitis autolimitada con diarrea [101, 102].

Shigella

Bacteria Gram-negativa, aerobia facultativa, bacilar, inmóvil y no formadora de esporas. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está relacionado genéticamente con *Escherichia coli*. Este género posee cuatro especies y cada especie varios serotipos: *Shigella dysenteriae* (serogrupo A, 15 serotipos), *Shigella flexneri* (serogrupo B, 19 serotipos y subserotipos), *Shigella boydii* (serogrupo C, 19 serotipos) y *Shigella sonnei* (serogrupo D, 1 serotipo). Los humanos son el único reservorio de *Shigella*. Son altamente transmisibles con una dosis infectante muy baja y la transmisión tiene lugar a través de alimentos contaminados con heces, por las manos, fómites o incluso por las moscas.

La forma más severa de la infección por *Shigella*, la disentería bacilar, está causada por *Shigella dysenteriae type 1*, la única especie que produce toxina shiga. La disentería se caracteriza por heces con sangre, moco, células inflamatorias y materia fecal, acompañado de tenesmo y dolores de tipo cólico. La diarrea acuosa, en lugar de disentería, puede ser también la expresión clínica como ocurre en pacientes infectados por *Shigella sonnei*. La infección por *Shigella* puede producir fiebre alta y complicaciones intestinales, entre las que se incluyen prolapso rectal, megacolon tóxico o perforación intestinal. Las complicaciones extraintestinales de la shigelosis, aunque son raras, pueden ocurrir. Puede causar septicemia, artritis reactiva o complicaciones neurológicas [100, 103, 104].

Vibrio

Bacterias Gram-negativas, fermentativas, anaerobias facultativas, con forma de vibrios, aparecen como bacilos ligeramente incurvados. Pertenecen a la familia *Vibrionaceae* y pueden formar parte de la microbiota natural de ambientes acuáticos, pescados y mariscos. El género *Vibrio* contiene aproximadamente 100 especies, de las cuales 12 se consideran como patógenas en humanos. Las más importantes son *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus*. Las enfermedades causadas por este género se pueden dividir en dos grandes grupos: cólera y cuadros no coléricos.

Vibrio cholerae es el agente causal del cólera. Aunque tiene más de 200 serogrupos, los casos de cólera son causados únicamente por el serogrupo O1 y el O139. El cólera es una enfermedad diarreica originada normalmente por ingestión de comida o agua contaminada, aunque también puede transmitirse de persona a persona. Se caracteriza por una diarrea acuosa aguda y, a menudo, se asocia con náuseas y vómitos.

Los vibrios no coléricos, que son los otros serotipos de *Vibrio cholerae* no-O1 y no-O139, pueden producir cuadros leves de diarrea sin carácter epidémico. *Vibrio parahaemolyticus* es un agente frecuente de diarrea transmitida por el consumo de pescados y mariscos que se consumen crudos o poco cocinados, siendo prevalente en países orientales con estos hábitos dietéticos y culinarios [105-107].

Yersinia enterocolitica

El género *Yersinia* pertenece a la familia *Yersiniaceae* y está compuesto por bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas, no esporuladas. El género se divide en 18 especies, de las cuales tres son las que causan enfermedad en mamíferos; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia pestis*. La especie *Yersinia enterocolitica* está subdividida en 6

biotipos. El biotipo 1A no es patógeno, mientras que los otros cinco biotipos (1B, 2-5) causan enfermedad en humanos o animales. El biotipo más frecuente responsable de infección en humanos es el biotipo 4, que está casi sistemáticamente asociado con el serotipo O:3 (4/O:3). El bioserotipo 2/O:9 también es uno de los más frecuentes en generar infección. Los cerdos son el principal reservorio del bioserotipo 4/O:3. La yersinosis entérica es una enfermedad que se transmite principalmente por la vía feco-oral a través de alimentos contaminados. La presentación clínica de la yersinosis incluye diarrea, dolor abdominal, fiebre y, a veces, vómitos. Aunque la infección suele ser leve y autolimitada, puede presentar cuadros graves como el síndrome pseudoapendicular o septicemia. La artritis reactiva y el eritema nodoso son las complicaciones secundarias más frecuentes [108-110].

Helicobacter pylori

Inicialmente denominada como *Campylobacter pylori*, es una bacteria Gram-negativa de la familia *Helicobacteraceae*. Microaerófila, en forma de bacilo ligeramente incurvado o espirilar y flagelada. Infecta a casi la mitad de la población mundial, siendo el estómago humano el principal reservorio. Posee unas características microbiológicas que le permiten sobrevivir en condiciones adversas como en el ácido gástrico. La transmisión de la infección ocurre principalmente a través de la vía feco-oral, en particular a través de agua y comida contaminada. La transmisión oral-oral también es posible, ya que la bacteria ha sido aislada en saliva y placa dental. La infección por *Helicobacter pylori*, aunque puede ser asintomática, es la principal causa de gastritis crónica y úlcera péptica. Tiene un papel determinante en el desarrollo del adenocarcinoma gástrico y del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa [111-113].

Métodos de diagnóstico de la diarrea bacteriana

El cultivo a partir de heces es la prueba de laboratorio de preferencia para la evaluación de enfermedades diarreicas bacterianas. Se incluyen múltiples medios de cultivo selectivos, diferenciales y de enriquecimiento, que se incuban en atmósferas y temperaturas de incubación apropiadas. Las colonias crecidas en los medios de cultivo se identifican mediante pruebas bioquímicas, espectrometría de masas (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS) y aglutinaciones con antisueros específicos. Estos métodos convencionales, consumen tiempo, requieren mucho trabajo y experiencia de microbiólogos clínicos. Los procedimientos actuales de cultivo de heces para la detección e identificación de bacterias enteropatógenas requieren, para completarse, de 3 a 5 días [82, 84, 101, 105, 114].

La detección de antígenos para el diagnóstico de enteropatógenos ha avanzado considerablemente ofreciendo unos kits estables de calidad controlada que pueden ser usados en los laboratorios, pero suelen ser costosos y su rendimiento depende de la buena calidad de captura y detección de anticuerpos. Varios estudios comparativos indican que las pruebas no moleculares, como el test de detección del antígeno de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y el EIA para toxinas A y B, son menos sensibles o menos específicas que las pruebas moleculares para la detección de *Clostridium difficile* [82, 84].

Los métodos moleculares se están utilizando cada vez más para la detección e identificación de bacterias patógenas, incluyendo las productoras de patología gastrointestinal. El DNA necesario para realizar estas pruebas puede ser aislado de muestras clínicas o de colonias aisladas en cultivo puro. Una marca genética específica y característica del microorganismo puede ser

determinada utilizando técnicas de secuenciación o mediante amplificación específica por PCR. Dos genes que tienen gran interés para la identificación de bacterias por estas aplicaciones son el 16S y el 23S rRNA. Además, también se pueden identificar genes de virulencia específicos presentes únicamente en cepas patógenas y que, por tanto, permiten su identificación diferenciándolas de las cepas comensales que comparten el mismo hábitat, interesante por ejemplo para el diagnóstico de *Escherichia coli* diarreogénica (ECD). Por otro lado, los ensayos de PCR en tiempo real permiten la detección simultánea de varias especies del mismo microorganismo, como en el caso de *Campylobacter* spp, de manera que se pueden detectar al mismo tiempo *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* [88, 99].

Además de las técnicas descritas para el diagnóstico directo de bacterias enteropatógenas, a partir de productos patológicos apropiados, en algunos microorganismos en concreto se utilizan técnicas moleculares específicas o un conjunto de técnicas para su diagnóstico. Por ejemplo, para diferenciar genoespecies dentro del género *Aeromonas*, ya que su identificación bioquímica es muy compleja y no concluyente, se ha diseñado un método molecular basado en el análisis de los patrones de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) del gen 16S rRNA [100].

Para la infección por *Clostridium difficile* existen dos ensayos que se consideran el *gold-standard* para su diagnóstico: el ensayo de neutralización de citotoxina y el cultivo toxigénico. Debido a la lentitud y complejidad de estos procedimientos, en la práctica habitual se suele utilizar un algoritmo de varias etapas para su diagnóstico, utilizando la detección de GDH junto con la detección por inmunocromatografía de sus toxinas, añadiendo posteriormente test de amplificación de ácidos nucleicos [94, 115].

Por último, el diagnóstico de *Helicobacter pylori* se puede realizar, bien con técnicas invasivas, por biopsia endoscópica para histopatología y cultivo, o con técnicas no invasivas, como la prueba de la urea en el aliento, las pruebas de detección inmune de antígeno en heces o pruebas serológicas [112].

Parásitos causantes de diarrea infecciosa

Entre los protozoos productores de patología gastrointestinal se encuentran *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba fragilis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica* y *Cyclospora cayetanensis* [84, 116].

Blastocystis

Blastocystis spp es el parásito más frecuente en muestras fecales de todo el mundo. La prevalencia de infección por *Blastocystis* es mayor que la de otros parásitos intestinales como *Giardia*, *Entamoeba* o *Cryptosporidium*. Es un protista eucariota, anaeróbico, unicelular que pertenece a la familia Blastocystidae. Tiene un tamaño de entre 6-40 µm. Se han identificado 17 subtipos hasta el momento. Los subtipos 1 a 4 son los que han producido más del 90% de los casos en humanos, siendo el subtipo 3 el más prevalente. Seis diferentes formas morfológicas han sido descritas: vacuolar, granular, ameboide, avacuolar, multivacuolar y quística. Según consenso taxonómico, todas las especies del género *Blastocystis*, independientemente del hospedador animal, reciben la misma denominación, por lo que la especie considerada propia del hombre, denominada *Blastocystis hominis*, es conocida en la actualidad como *Blastocystis*

spp. Se transmite por vía fecal-oral a través de agua o alimentos contaminados, aunque algunas evidencias indican que también puede transmitirse de forma zoonótica. Se calcula que más de mil millones de individuos en todo el mundo están colonizados por *Blastocystis*, y como no siempre la colonización se acompaña de manifestaciones clínicas, el potencial patógeno de este microorganismo sigue estando sometido a debate. Hay varios subtipos, cepas y especies y existen evidencias de que algunos subtipos son patógenos. Varios estudios demuestran la asociación de *Blastocystis* con una variedad de trastornos como diarrea, dolor abdominal, fatiga, estreñimiento, enfermedades crónicas gastrointestinales (síndrome del intestino irritable) y erupción cutánea o urticaria [117-119].

Cryptosporidium

Pertenece a la familia Cryptosporidiidae. Son parásitos intracelulares esféricos que infectan principalmente las células epiteliales del estómago o del intestino. La infección comienza cuando el hospedador ingiere ooquistes. Los ooquistes son el estado exógeno que permite su transmisión y cada uno presenta cuatro esporozoítos, los cuales invaden las células epiteliales del intestino delgado (íleon). Los ooquistes tienen un tamaño de entre 4-9 μm . Se han descrito 30 especies distintas, identificándose aproximadamente 20 como patógenas en humano. Las especies responsables de más del 90% de los casos de criptosporidiosis en humanos son *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum*. Se pueden transmitir directamente persona-persona, animal-humano, animal-animal o indirectamente a través de agua, comida o por aire. Los síntomas de criptosporidiosis incluyen fiebre, diarrea acuosa persistente, náuseas, vómitos y calambres abdominales [120, 121].

Cyclospora

Protista de la familia Eimeriidae con un tamaño de entre 8-10 μm . Se reconocen 19 especies de *Cyclospora*, que infectan a reptiles, insectívoros y primates. Está descrito que *Cyclospora cayetanensis* solo infecta a humanos, aunque no está claro si otros animales pueden albergar esta especie. Este protozoo se transmite a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados por ooquistes infecciosos. Normalmente infecta el intestino delgado, particularmente el yeyuno. Los síntomas de la ciclosporiasis, incluyen diarrea acuosa profusa, astenia, calambres abdominales, anorexia, fiebre discreta, náuseas y flatulencias. Además de en niños y personas mayores, puede ser particularmente severa en personas inmunodeprimidas, en las que puede desarrollarse ciclosporiasis extraintestinal, incluyendo enfermedad biliar, Síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva o inflamación ocular. Es endémico en países en desarrollo, aunque también se asocia con brotes esporádicos en países desarrollados [116, 122, 123].

Dientamoeba fragilis

Parásito protozoario unicelular perteneciente a la familia Dientamoebidae. Hay dos genotipos mayoritarios, genotipo 1 y genotipo 2 (cepa Bi/Pa), siendo el genotipo 1 el subtipo más común. Tiene distintos estados morfológicos con diferentes tamaños: trofozoíto, prequiste y quiste. El más grande sería el estado trofozoíto, entre 4-20 μm , aunque puede alcanzar 40 μm . El mecanismo de transmisión continúa siendo hoy en día objeto de debate, aunque tras la reciente descripción de la etapa quística, parece que el modo de transmisión es la vía feco-oral. La presentación clínica de la dientamoebosis puede variar desde asintomática hasta síntomas

gastrointestinales que incluyen alteraciones de la motilidad intestinal, dolor abdominal y diarrea. En el 50% de los casos se asocia con eosinofilia [124, 125].

Entamoeba

La amebiasis está causada por *Entamoeba histolytica*, parásito protozoario no flagelado. El género *Entamoeba*, de la familia Endamoebidae, está formada por 51 especies, de las cuales 8 se consideran patógenas. Entre la gran cantidad de especies de *Entamoeba* que infectan humanos hay tres indistinguibles morfológicamente con *Entamoeba histolytica* y que, por tanto, pueden complicar el diagnóstico: *Entamoeba moshkovskii* que puede causar diarrea, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba bangladesí*, que son consideradas no patógenas. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que *Entamoeba dispar* es capaz de causar lesiones intestinales y hepáticas.

Entamoeba histolytica puede existir como quiste infeccioso (10-15 μm) o como trofozoíto invasivo (15-40 μm). La transmisión se produce por la ingestión del quiste amebiano a través de agua o alimentos contaminados o por contacto persona-persona, ya sea a través de la vía feco-oral o por contacto sexual. La amebiasis puede ser asintomática pero también puede causar disentería amebiana produciendo diarrea acuosa o sanguinolenta, con calambres intestinales y pérdida de peso. Manifestaciones más graves de la infección son perforación del colón, peritonitis, necrosis intestinal o megacolon tóxico. El síntoma extraintestinal más frecuente es el absceso hepático amebiano, que se desarrolla cuando los trofozoítos se diseminan al hígado. En algunos casos también puede presentarse amebiasis pleuropulmonar [126-129].

Giardia

Giardia lamblia, también conocida como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, es un protozoo flagelado que pertenece a la familia Hexamitidae. Junto con *Cryptosporidium* es una causa común de brotes transmitidos por el agua. El género *Giardia* está constituido por 6 especies y solo una, *Giardia lamblia*, infecta a mamíferos. Por genotipos, se pueden distinguir 8 grupos distintos (A-H), de los cuáles A y B son los que pueden causar enfermedad en humanos y animales. La forma activa de *Giardia lamblia* es el trofozoíto (10-20 μm) que sale del quiste infeccioso (10-15 μm) y se adhiere al intestino delgado, donde induce inflamación epitelial, aplanamiento de vellosidades y diarrea debido a malabsorción. Se transmite a través de la ingestión del quiste infeccioso que puede estar presente en agua y comida contaminadas, por contacto persona-persona o contacto oral-anal. Aunque el reservorio principal es el hombre, también puede estar presente en otros mamíferos, lo que posibilita la transmisión zoonótica. Se incluye entre los agentes productores de diarrea del viajero. La giardiasis puede ser asintomática, o presentar diarrea (normalmente autolimitada), flatulencia, dolor y distensión abdominales. Uno de los síntomas más característicos es la pérdida de peso. No suele presentar fiebre, vómitos o diarrea sanguinolenta. [130-132].

Métodos de diagnóstico de la diarrea de origen parasitario

El examen microscópico es el método tradicional para comprobar si hay parásitos en heces. Se realiza previa aplicación de métodos de concentración y exige, para detectar algunos protozoos, técnicas de tinción para diferenciar los de tamaño más pequeño y para observar detalles morfológicos de su estructura que permiten la identificación. La microscopía se utiliza tanto en países en vías de desarrollo como en muchos países desarrollados. La ventaja de la microscopía

frente a otras técnicas es que necesita un equipamiento y reactivos mínimos para llevarse a cabo. Sin embargo, es un método que consume mucho tiempo y requiere mucho trabajo y un alto nivel de destreza para una óptima interpretación. Además, puede tener una baja sensibilidad y especificidad. De hecho, se han indicado sensibilidades tan bajas como 54,8% y 66,4% para *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente [82, 84, 116, 117, 124].

El cultivo de algunos parásitos es complejo y muy laborioso por lo que no suele utilizarse en la práctica habitual. A ello se une el uso cada vez mayor de las técnicas moleculares para el diagnóstico e identificación de patógenos. No obstante, el cultivo de parásitos es esencial para diversas áreas de investigación, en las que se necesitan grandes cantidades de parásitos libres de bacterias y hongos. Puede ser útil para investigaciones epidemiológicas, investigación molecular y desarrollo de vacunas y nuevos tratamientos efectivos. Algunos parásitos cultivables son *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Blastocystis* spp, *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium* y *Giardia* [133].

La detección microscópica que usa anticuerpos marcados con fluorescencia ha incrementado la sensibilidad y especificidad de la detección de parásitos, pero es un método que consume mucho tiempo y requiere equipamiento apropiado. Para superar estas limitaciones se desarrollaron las pruebas de detección rápida de antígenos fecales para *Giardia*, *Cryptosporidium* y *Entamoeba histolytica*. En ellas se incluyen tanto los métodos inmunocromatográficos como los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En la práctica, la especificidad y particularmente la sensibilidad de estas pruebas son altamente variables, pudiendo dar falsos positivos y negativos [82, 84, 116].

Debido a estas limitaciones, tanto de la observación microscópica como de los ensayos inmunológicos, se han desarrollado métodos basados en la detección de DNA. Los ensayos moleculares, no obstante, son particularmente sensibles a la calidad y pureza del DNA de partida, por lo que la elección de un método de extracción eficiente es un paso crítico. El desarrollo de métodos de detección de PCR a tiempo real ha mejorado la detección de parásitos. La mayoría de estas nuevas pruebas se basan en ensayos PCR multiplex, donde se pueden identificar varios microorganismos al mismo tiempo en una sola reacción. Dependiendo de la casa comercial utilizada la especificidad del ensayo y la sensibilidad alcanzan entre 95-100%. Para el diagnóstico de algunas enfermedades como la amebiasis la PCR está considerada el *gold-standard* [116, 129].

También existen otros métodos que se utilizan en la identificación de parásitos como la secuenciación (*Next-Generation Sequencing* - NGS), la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), las técnicas de amplificación isoterma o el uso de biosensores [116].

Virus causantes de diarrea infecciosa

La gastroenteritis viral aguda es la segunda enfermedad infecciosa más común a nivel mundial. Los agentes víricos entéricos más frecuentemente detectados son rotavirus, norovirus, astrovirus humano, adenovirus entérico y sapovirus. Otros virus como virus Aichi, parechovirus y bocavirus han sido descritos recientemente en pacientes con diarrea, pero su asociación con la gastroenteritis infecciosa no ha sido todavía establecida claramente [84, 134].

Adenovirus

La familia Adenoviridae está formada por virus icosaédricos (70-100 nm de diámetro), desnudos, con DNA lineal de doble cadena (dsDNA). Se clasifican en 7 especies (A-G) identificándose más de 70 serotipos. Los adenovirus del subgrupo F, serotipos 40 y 41, son reconocidos como los causantes más frecuentes de gastroenteritis aguda. Otros serotipos que se han identificado esporádicamente en pacientes con diarrea son los serotipos 18 y 31 (del subgrupo A) y el serotipo 52 (del subgrupo G). La transmisión de adenovirus puede ocurrir por gotas de aerosol, transmisión fecal-oral o por fómites contaminados. Adenovirus normalmente causa infecciones del tracto respiratorio superior en niños y adultos, pero también puede provocar enfermedad gastrointestinal, oftalmológica, genitourinaria y neurológica. La mayoría de las infecciones por adenovirus son limitadas y afectan en mayor medida a pacientes inmunocomprometidos. Algunos estudios sugieren que el adenovirus es un agente frecuente de diarrea nosocomial [134-136].

Astrovirus

Pertenece a la familia Astroviridae. Es un virus icosaédrico, pequeño (28-41 nm de diámetro), con apariencia de estrella, desnudo, con RNA monocatenario positivo ((+) ssRNA). Se reconocen tres grupos divergentes: el clásico, el Melbourne y el HMO. El clásico está formado por 8 genotipos distintos (1-8) asociados a enfermedad gastrointestinal, siendo el genotipo 1 el más prevalente. Por otro lado, el Melbourne contiene al menos tres cepas (MLB1, MLB2 y MLB3); y el HMO (Virginia/Human-Mink-Ovine-like) contiene al menos cinco cepas (VA1, VA2, VA3, VA4, VA5). La asociación de estos dos últimos con enfermedad está todavía por determinar. No está claro el mecanismo de transmisión. Estudios realizados sugieren que astrovirus puede cruzar barreras entre especies, pero no se ha demostrado que este tipo de transmisión produzca enfermedad. Puede ser asintomático o producir diarrea acuosa acompañada de fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal y anorexia. También se ha descrito como agente causal de encefalitis y meningitis [137, 138].

Norovirus

Inicialmente denominado virus Norwalk, pertenece a la familia Caliciviridae. Es pequeño (27-40 nm de diámetro), sin envoltura y con RNA monocatenario positivo ((+) ssRNA). Según la secuencia del aminoácido VP1, hay al menos 7 genogrupos distintos (genogrupo I (GI) a GVII) con más de 40 genotipos. Las infecciones por norovirus humano están causadas por GII (mayoritariamente GII.4), GI y, de forma limitada, GIV. La vía feco-oral, directa e indirecta, es el principal modo de transmisión aunque hay otros descritos como, por ejemplo, a través del aerosol producido en el vómito. Varios factores potencian la transmisibilidad de norovirus, siendo uno de ellos la pequeña cantidad de inóculo necesario para que se produzca la infección (< 100 partículas virales). Puede ser asintomático, aunque las manifestaciones más comunes son vómitos y diarrea, generalmente con un período corto de duración. También se pueden presentar náuseas y dolor abdominal. De forma extraintestinal puede generar fiebre, dolor de cabeza, síntomas respiratorios, afectación del sistema nervioso central e incluso convulsiones [139, 140].

Rotavirus

La infección por rotavirus es la causa principal de gastroenteritis grave en niños menores de 5 años. Pertenece a la familia Reoviridae. Es un virus icosaédrico (70 nm de diámetro), no envuelto, con RNA de doble cadena (dsRNA) y con una estructura compleja que comprende 11 segmentos de dsRNA. Se han descrito 10 especies diferentes de rotavirus (A-J), siendo la especie A la que causa con más frecuencia infección. Esta especie puede clasificarse en diferentes genotipos, basándonos en las diferencias de los segmentos 7 (denominado G) y 4 (denominado P). Hasta la fecha, se han descrito 32 genotipos G y 47 genotipos P, predominando globalmente 6 tipos del G (G1, G2, G3, G4, G9 y G12) y 3 del P (P[4], P[6] y P[8]). De hecho, son 6 cepas de la especie rotavirus A las que representan más del 90% de los rotavirus A circulantes a nivel mundial: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] and G12P[8]. Sin embargo, la enfermedad por rotavirus frecuentemente está causada por cepas poco comunes como la G9P[6]. El virus se transmite principalmente a través de la vía feco-oral o por contacto persona-persona y se necesitan pocos viriones para causar la enfermedad. También se puede transmitir a través de fómites contaminados. Aunque en algunas ocasiones puede ser asintomática, la infección por rotavirus normalmente causa diarrea no sanguinolenta de duración relativamente corta. Además, puede producir vómitos, malestar y fiebre. En los casos más graves, la diarrea aguda y los vómitos pueden resultar en una rápida deshidratación, pudiendo producir incluso la muerte [141, 142].

Sapovirus

Denominado previamente como Calicivirus Humano o Virus Tipo Sapporo pertenece a la familia Caliciviridae al igual que norovirus. Es un virus pequeño (30-38 nm de diámetro), icosaédrico, sin envoltura y con RNA monocatenario positivo ((+) ssRNA). Según la secuencia del aminoácido VP1, hay 5 genogrupos reconocidos (GI-GV) y 9 adicionales que han sido propuestos recientemente (GVI-GXIV). Hasta la fecha, los genotipos que infectan a humanos son GI, GII, GIV y GV, mientras que GIII infecta a ganado porcino. Los genogrupos de sapovirus humano se clasifican en 16 genotipos (7 genotipos para GI y GII, respectivamente, 1 genotipo para GIV y otro para GV). La transmisión se produce a través de la vía feco-oral. También puede transmitirse por contacto persona-persona, por heces contaminadas o vómitos, y a través de superficies, comida o agua contaminadas. Como para norovirus, la dosis infectante para producir la enfermedad es baja. Los síntomas clínicos predominantes son diarrea y vómitos, aunque también se pueden presentar náuseas, calambres abdominales/estomacales, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia y malestar. Los síntomas gastrointestinales suelen ser limitados. También se han descrito casos asintomáticos [143, 144].

Métodos de diagnóstico en la diarrea infecciosa por virus

El *gold-standar* para la identificación de virus entéricos es el cultivo viral, principalmente para la detección de rotavirus, adenovirus y enterovirus. Pero debido a que otros virus gastrointestinales son difíciles de cultivar, como astrovirus, norovirus y sapovirus, otras técnicas, como las moleculares, están siendo cada vez más utilizadas para mejorar el diagnóstico [135, 145].

El examen con microscopía electrónica puede ser utilizado para la identificación de un gran rango de virus, incluyendo adenovirus, norovirus, y rotavirus. Pero este método es complejo,

requiere disponer de microscopio electrónico y de una gran experiencia para su interpretación. La microscopía electrónica fue inicialmente el único método utilizado para diagnosticar norovirus, pero su uso ha sido limitado debido a su baja sensibilidad y especificidad. El inmunomarcaje en microscopía electrónica puede ser usado para aumentar la sensibilidad gracias a la adición de anticuerpos específicos a la muestra. Con él se han podido diferenciar morfológicamente los grupos A, B y C de rotavirus. Sin embargo, el inmunomarcaje solo es útil cuando las muestras son tomadas en las primeras etapas de la gastroenteritis, además de que es laborioso y consume mucho tiempo [84, 134].

Por otro lado, las pruebas de detección del antígeno se utilizan para la identificación de una gran variedad de virus enteropatógenos como rotavirus, astrovirus, adenovirus y norovirus. Suelen ser simples y rápidas y su rendimiento depende de la buena calidad de captura y detección de anticuerpos (por ejemplo, tienen baja sensibilidad en el caso de norovirus). Su sensibilidad suele ser superior a los métodos convencionales pero inferior a los métodos moleculares [82, 84].

Con el desarrollo de las técnicas moleculares se ha conseguido mejorar el diagnóstico de las infecciones producidas por virus gastrointestinales con respecto a los métodos convencionales. Varias técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, y particularmente PCR, PCR a tiempo real y PCR multiplex, son usadas actualmente de rutina en los laboratorios clínicos. Permiten un diagnóstico rápido, con una alta sensibilidad y especificidad. Estas técnicas ofrecen también protocolos estandarizados, lo que posibilita la automatización del proceso. Las técnicas de amplificación isoterma son cada vez más populares debido a que son fáciles de realizar, rápidas y con una interpretación sencilla. De hecho, la amplificación isotérmica mediada por bucle (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP) y la tecnología NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) están empezando a ser utilizadas de rutina en los laboratorios para detectar virus gastrointestinales [134].

Otras técnicas que se pueden utilizar en la identificación de virus gastrointestinales son el ensayo de inmunoadherencia-hemoaglutinación (*Immune adherence hemagglutination assay* - IAHA) y el RIA [134].

Vigilancia microbiológica a nivel autonómico (Aragón, España)

A nivel autonómico, en cada trimestre y al final de año, se recogen los datos procedentes de los hospitales de la red asistencial pública de la comunidad autónoma de Aragón sobre microorganismos patógenos detectados. También se realiza a nivel nacional, con los datos autonómicos, y a nivel europeo e internacional.

Estos datos son muy útiles para controlar, en este caso a nivel autonómico, cuáles son los microorganismos enteropatógenos con mayor incidencia en la región. El avance en las técnicas diagnósticas no solo permite mejorar el diagnóstico, sino también tener datos de gran utilidad para la vigilancia epidemiológica. A continuación, en la **Tabla 4** se muestran los datos obtenidos del Boletín del Sistema de Información Microbiológica de Aragón (SIM) del año 2018 en lo que se refiere a microorganismos enteropatógenos. Además del número de casos en el año, se indica la incidencia acumulada anual por cada 100.000 habitantes [146].

Tabla 4. Vigilancia microbiológica durante el año 2018 en la comunidad autónoma de Aragón (España).

Microorganismo	Número de casos total en el año 2018	Incidencia acumulada anual por 100.000 habitantes
Adenovirus 40/41	20	1,5
Adenovirus no tipado	110	8,4
Astrovirus	36	2,7
<i>Campylobacter jejuni</i>	941	71,5
<i>Campylobacter coli</i>	135	10,3
Otros <i>Campylobacter sp</i>	180	13,7
<i>Cryptosporidium sp</i>	134	10,2
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	0,2
<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica	1	0,1
<i>Giardia lamblia</i>	255	19,4
Norovirus	67	5,1
Rotavirus	439	33,4
<i>Salmonella</i> grupo B	248	18,8
<i>Salmonella Typhimurium</i>	21	1,6
<i>Salmonella sp</i> no Typhi ni Paratyphi	105	8,0
<i>Salmonella</i> grupo D	66	5,0
<i>Salmonella Enteritidis</i>	35	2,7
<i>Salmonella</i> grupo C	17	1,3
<i>Salmonella</i> grupo C1	27	2,1
<i>Salmonella</i> grupo C2	4	0,3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	22	1,7
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3	8	0,6

Fuente: [146]

A lo largo del año 2018, a nivel de patología gastrointestinal, los microorganismos que predominan son *Campylobacter*, *Salmonella* y rotavirus. En el caso de rotavirus y adenovirus, el grupo etario más afectado es el de los menores de 14 años.

Cuando se compara la situación microbiológica en Aragón en el periodo 2010-2018, se advierte un aumento de las detecciones, pudiendo haber influido la incorporación de nuevas técnicas diagnósticas. A nivel gastrointestinal sobre todo destaca el incremento en los aislamientos de *Campylobacter sp* (Figura 5).

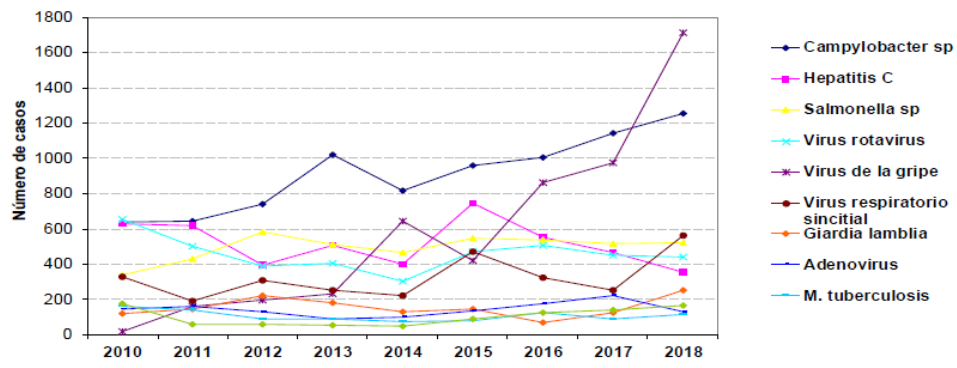


Figura 5. Número de microorganismos más frecuentes por año, 2010-18. Fuente: [146].

Técnicas de diagnóstico molecular: Métodos de extracción y PCR en tiempo real

Las técnicas utilizadas hoy en día para el diagnóstico de microorganismos enteropatógenos son el cultivo, los métodos inmunológicos, como inmunocromatografía, EIA convencional, ELISA, o el examen microscópico. Sin embargo, todas estas técnicas tienen debilidades importantes. Por ello, se tiende a emplear otras tecnologías con el propósito de lograr un diagnóstico más rápido, sensible y específico [84].

Las técnicas moleculares han revolucionado el diagnóstico microbiológico y representan una alternativa a los métodos convencionales debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad. Algunas de ellas son PCR, LAMP y la hibridación fluorescente in situ (FISH) [147, 148].

La PCR reproduce *in vitro* el proceso fisiológico de la duplicación del DNA en las células, amplificando exponencialmente una secuencia específica de DNA bicatenario. Además de la PCR Convencional (también llamada PCR en punto final), existen variantes de la misma, como son la qPCR, la PCR con transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) y la multiplex qPCR. La qPCR permite la cuantificación continua y precisa del DNA que se va formando. La RT-qPCR se basa en el mismo principio que la qPCR pero se utiliza para la detección y amplificación de RNA gracias a la transcriptasa reversa o retrotranscriptasa, que transforma RNA en DNA complementario (cDNA). Por último, la multiplex qPCR permite la detección simultánea de diferentes patógenos gracias a los conjuntos de cebadores/sondas específicos según diana [147-149].

Una ventaja importante de los métodos moleculares es que son capaces de diferenciar especies (por ejemplo, *Cryptosporidium hominis* frente a *Cryptosporidium parvum* o *Entamoeba histolytica* frente a *Entamoeba dispar*) u otros subtipos patógenos (por ejemplo, subtipos de *Escherichia coli* diarrogénica) que son imposibles de distinguir morfológicamente. Estos métodos son rápidos, con la capacidad de generar resultados clínicamente relevantes en cuestión de horas tras la extracción del ácido nucleico. Sin embargo, algunas de las limitaciones que tienen son la incapacidad de distinguir entre la infección y la colonización o la detección de una carga de patógenos insignificante que puede estar relacionada, o no, con la clínica que presenta el paciente. Por ello, los resultados deben interpretarse en un contexto clínico. Además de la detección de una baja carga de enteropatógenos, se pueden obtener falsos positivos debido a la detección de microorganismos no viables, DNA/RNA libres, o incluso por amplificaciones no específicas [81, 82].

La utilización de métodos moleculares en los laboratorios de microbiología clínica aporta grandes ventajas para el diagnóstico de infecciones. También está permitiendo profundizar en el conocimiento de la enfermedad y el comportamiento epidemiológico de los patógenos causantes, tomar las medidas de control adecuadas para el paciente y promover el uso racional de antivirales y antibióticos.

Extracción de ácidos nucleicos (DNA o RNA) de la muestra biológica para su posterior identificación por qPCR

La extracción de ácido nucleicos es una etapa clave en la biología molecular, ya que marca el punto de partida de cualquier kit de diagnóstico molecular. Una vez obtenido el ácido nucleico

aislado, éste servirá como molde de la reacción de amplificación para la identificación de un organismo específico o de un grupo de organismos. Este apartado recoge la evolución de los métodos de extracción de ácidos nucleicos y los diferentes métodos que se utilizan en la actualidad [150, 151].

El primer científico que aisló DNA fue Friedrich Miescher, en 1869, mientras estudiaba la composición química de las células. Durante sus experimentos identificó una nueva sustancia en el núcleo de las células que denominó nucleína. Desarrolló dos protocolos para poder separar las células del núcleo del citoplasma y así poder aislar este nuevo compuesto que difería de proteínas y otras sustancias celulares. El primero no produjo suficiente material para continuar con un análisis más extenso, pero con el segundo obtuvo mayores cantidades de nucleína purificada. En 1889 Richard Altman renombraría nucleína por el término con el que se le conoce en la actualidad, ácido nucleico. En 1958 Matthew Meselson y Franklin W. Stahl, al demostrar la replicación semiconservativa del DNA, desarrollaron un procedimiento de rutina para la extracción de DNA a partir de muestras bacterianas de *Escherichia coli*, utilizando un protocolo de centrifugación de gradiente de densidad salino [25, 152].

Respecto al RNA, los primeros experimentos que tratan de purificarlo se remontan a 1951 cuando E. Volkin y C. E. Carter utilizaron cloruro de guanidinio para su extracción. Más tarde, en 1960, C.G. Kurland realizó el primer aislamiento usando centrifugación con cloruro de cesio (CsCl). En 1968 se introdujo el aislamiento de RNA con fenol:cloroformo por K. S. Kirby. Y más tarde, A. Ullrich *et al.*, en 1977, y J. M. Chirgwin *et al.*, en 1979, publicaron un método que utilizaba tiocianato de guanidinio en vez de cloruro de guanidinio. Estos métodos eran laboriosos y tenían baja reproducibilidad. No fue hasta 1987 cuando Piotr Chomczynski y Nicoletta Sacchi desarrollaron un método de un solo paso (*single-step*) para la extracción de RNA, mucho más sencillo, combinando tiocianato de guanidinio con fenol y cloroformo. Este método se extendió por P. Chomczynski en 1993 para el aislamiento simultáneo de RNA, DNA y proteínas [153-159].

La mayoría de los métodos de extracción se dividen en tres etapas: a) liberación del material genético de la muestra (célula u organismo) por lisis; b) separación del ácido nucleico de la muestra; y c) purificación por eliminación de sustancias que pueden inhibir el material genético o la técnica molecular posterior. Existe una cuarta etapa, opcional, la concentración del ácido nucleico, importante cuando su concentración es baja [160] (**Figura 6**).

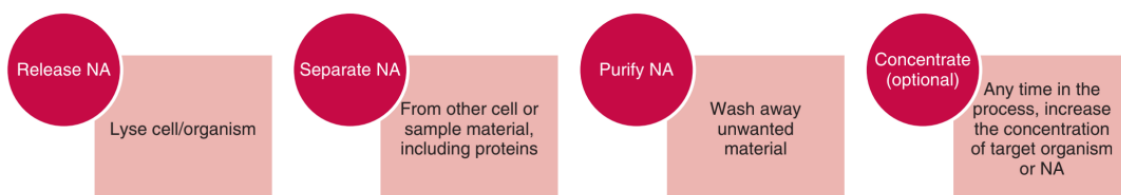


Figura 6. Etapas utilizadas en la mayoría de los métodos de extracción de ácido nucleicos (No todas las etapas se usan en todos los procedimientos). Fuente: [161].

La extracción de ácidos nucleicos es un paso clave en ciertos procedimientos llevados a cabo en el laboratorio y es necesario elegir el método de extracción adecuado teniendo en cuenta una serie de consideraciones. Esto incluye requisitos técnicos, eficiencia en el tiempo, efectividad en

el coste, especímenes biológicos que se van a utilizar, su forma de recolección y de almacenaje. Los métodos que existen hasta el momento de extracción de ácidos nucleicos son costosos, temporal y económicamente [162, 163].

Debido al alto riesgo de degradación del RNA durante el procedimiento, se debe tener especial precaución con las RNAsas, ya sea porque se introducen durante la manipulación (tubos de plástico, guantes, saliva, ...) o porque están presentes en las muestras. Tienen que ser inactivadas lo antes posible con inhibidores o por tratamiento químico. Uno de los reactivos que más se utilizan para este fin es el tiocianato de guanidinio, que es un agente desnaturante caotrópico fuerte. También se puede minimizar la degradación del RNA reduciendo el tamaño de la muestra utilizada en la extracción [163].

Por otro lado, moléculas que copurifican con los ácidos nucleicos pueden inhibir reacciones enzimáticas como la PCR o interferir en la detección de la qPCR bloqueando la luz o distorsionando el ruido de fondo de la fluorescencia. Las moléculas que tienen que ser eliminadas son nucleasas/proteínas, polisacáridos, sales, solventes como alcoholes, pigmentos como el grupo hemo, o ácidos húmicos. También, si la técnica de análisis posterior es más robusta y, por tanto, menos sensible a la interferencia de las sustancias, el método de preparación de la muestra puede ser menos óptimo. Por ejemplo, en la tecnología PCR se utilizan potenciadores de la reacción o *Taq* polimerasa más resistente a los inhibidores. Por otro lado, también es importante tener en cuenta los reactivos que se utilizan en la extracción, ya que tienen que ser eliminados o inactivados antes de realizar el análisis molecular posterior, como agentes caotrópicos y otras sales, alcoholes o proteasas [161, 164, 165].

A continuación, se detallan los métodos más utilizados para la extracción de DNA Y RNA.

Métodos basados en soluciones

Se pueden encontrar diferentes tipos en función de los reactivos y metodología utilizados:

Uso de disolventes orgánicos

Estos protocolos provienen de métodos de extracción de RNA y se basan, principalmente, en el método *single-step* de P. Chomczynski y N. Sacchi de tiocianato de guanidinio en medio ácido, en combinación con fenol y cloroformo y una pequeña centrifugación. Las principales etapas de este método suelen ser lisis celular por la adición de detergentes/agentes caotrópicos como dodecilsulfato sódico (SDS) o tiocianato de guanidinio, seguido de extracción orgánica y precipitación en alcohol. En la extracción orgánica, el RNA queda en la fase acuosa superior, mientras que el DNA y proteínas quedan en la interfase o en la fase orgánica inferior en condiciones ácidas. El tiocianato de guanidinio también es efectivo para inactivar ribonucleasas [150, 155, 163].

Debido a que estos métodos implican el uso de reactivos tóxicos y corrosivos, se requiere de personal cualificado y equipos de protección individual [162].

Precipitación salina o salting-out

En 1988, S. A. Miller *et al.* publicaron un protocolo de extracción que usa altas concentraciones de sal para la purificación de ácido nucleico por precipitación de proteínas. El protocolo tradicional incluye una ruptura celular inicial y digestión con SDS-proteinasa K, seguido de la

adición de altas concentraciones de sal, normalmente 6 M de cloruro de sodio. La mezcla se centrifuga para que precipiten las proteínas y en el sobrenadante queda el ácido nucleico que se transfiere a un vial limpio. Éste se puede precipitar utilizando etanol o isopropanol [162, 166, 167].

Extracción alcalina

La lisis alcalina, descrita por H.C. Bimboim y J. Doly en 1979, ha sido utilizada para aislar el DNA plasmídico al desnaturalizar de forma selectiva, en medio álcali, el DNA cromosómico de alto peso molecular. Proteínas bacterianas, paredes celulares rotas y DNA cromosómico desnaturalizado se mezclan formando grandes complejos recubiertos por dodecil sulfato. El DNA plasmídico puede recuperarse del sobrenadante después de eliminar el material desnaturalizado por centrifugación [168, 169].

Gradiente de centrifugación isopícnica

Aunque inicialmente fue utilizado para extraer RNA, hoy en día es raro su uso en el laboratorio. Se lisa la muestra con tiocianato de guanidio y después se genera un gradiente de centrifugación con CsCl o con CsTFA (trifluoroacetato de cesio). Tras esto, el RNA capturado en la fracción de densidad apropiada se precipita con etanol. También se ha utilizado para el aislamiento de DNA [153, 163].

Métodos basados en el uso de fases sólidas

La purificación de ácidos nucleicos con el uso de fases sólidas se remonta a 1979 con B. Vogelstein y D. Gillespie que utilizaron sílica en forma de polvo para purificar fragmentos de DNA previamente separado por electroforesis en gel de agarosa [170].

En estos métodos, una fase sólida absorbe el ácido nucleico bajo condiciones particulares de pH y concentración de sales a través de los siguientes principios: 1) uniones de hidrógeno a una matriz hidrófila en presencia de un agente caotrópico; 2) intercambio iónico usando un intercambiador aniónico bajo condiciones acuosas y 3) mecanismos de exclusión de tamaño o por afinidad [169].

Las fases sólidas pueden ser de magnetita, sílica, matrices de celulosa, partículas de vidrio o polvo, o intercambiadores aniónicos entre otros. Normalmente esta purificación se realiza utilizando una columna de centrifugación (*spin column*), aunque también puede realizarse con bolas magnéticas, equipos automatizados o chips de microfluídica también llamados *“Lab-on-a Chip”* [150, 169].

La mayoría de estos métodos siguen una serie de pasos similares para conseguir la ruptura celular, la adsorción del ácido nucleico a la fase sólida, una serie de lavados para eliminar posibles proteínas u otros compuestos químicos, y una elución final con pH y tampón específicos en la que se obtiene el material genético [163].

A continuación, se describen los métodos en función de la fase sólida que se utiliza:

Métodos que utilizan matrices de sílica

La sílica, cargada positivamente, tiene una gran afinidad por la carga negativa de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se unen a las superficies de sílica en condiciones específicas

(concentración y pH), especialmente en presencia de agentes caotrópicos. El sodio juega un papel muy importante como puente catiónico ya que atrae al oxígeno cargado negativamente del esqueleto de fosfato del ácido nucleico. Las impurezas se eliminan tras una serie de lavados y la elución del ácido nucleico se da en condiciones de baja fuerza iónica usando tampón TE (Tris-EDTA) o agua estéril desionizada [160, 169].

Los microchips de silicio son sistemas de análisis miniaturizados que permiten también la separación y detección de ácido nucleico purificado. El DNA se captura, lava y eluye en las superficies de dióxido de silicio (sílica) de los chips. Se utilizan agentes caotrópicos como reactivos de unión, soluciones de etanol para los lavados y agua para la elución [171].

La diatomita es un compuesto que contiene gran cantidad de sílica (entre el 80%-95%) y también se utiliza para la purificación de ácidos nucleicos. En presencia de agentes caotrópicos se unen a la sílica presente en la diatomita. Los ácidos nucleicos se eluyen con agua o con tampón de concentración salina baja [172, 173].

Métodos que utilizan resinas de intercambio iónico

Diferentes resinas de intercambio iónico son utilizadas como parte del proceso de purificación de los ácidos nucleicos.

Las resinas aniónicas, cargadas positivamente, pueden unir los grupos fosfato del esqueleto del ácido nucleico. Por ejemplo, el protocolo de D. B. Seligson *et al.* utiliza una columna con grupos dietilaminoetil celulosa (DEAE Celulosa) cargados positivamente para unir ácidos nucleicos. La unión de material genético y otras impurezas se puede alterar por diferentes concentraciones de sal y variaciones del pH [174].

En algunos casos, si las resinas tienen carga negativa (catiónicas) son capaces de unir sustancias cargadas positivamente y que pueden estar unidas a los ácidos nucleicos (con carga negativa). En este caso, a diferencia del resto, las resinas no unen el ácido nucleico, si no impurezas o sustancias que pueden producir inhibición posterior. Un ejemplo es la resina Chelex[®]-100 (Bio-Rad), copolímero de estireno divinilbenceno que contiene parejas de iones iminodiacetato. Muy utilizado en protocolos de extracción de DNA de muestras forenses como resina de intercambio iónico quelante, ya que une iones metálicos polivalentes que suelen ser cofactores de nucleasas [150, 175].

Métodos basados en el uso de partículas magnéticas

Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos que utilizan la separación magnética se comenzaron a utilizar para extraer DNA plasmídico de lisados de células bacterianas por T. L. Hawkins *et al.* en 1994 [176].

Las partículas magnéticas, con un diámetro entre 0,5-10 μm ., contienen uno o varios núcleos magnéticos como la magnetita (Fe_3O_4) o la maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) y están recubiertas de una matriz de polímeros o sílica con grupos terminales funcionales. El protocolo consiste en añadir un tampón de lisis a la muestra, incubar durante un tiempo determinado y añadir las partículas magnéticas con un tampón de unión. Tras un período de tiempo, el pellet magnético se inmoviliza usando un imán externo y se descarta el sobrenadante. El pellet se lava y se obtiene el ácido nucleico gracias a un tampón de elución. Una ventaja de este método es que no utiliza

centrifugación, lo cual permite obtener ácidos nucleicos menos degradados y facilita la automatización [177].

Métodos basados en la filtración en gel

Los ácidos nucleicos se pueden separar de otras moléculas por su tamaño a través de una matriz de gel. Esta matriz de gel suele ser un *spin column* con un tamaño específico de poro que permite pasar moléculas más grandes y retiene dentro del poro a las más pequeñas. Este método sirve para separar los ácidos nucleicos de moléculas más pequeñas, pero las que tienen tamaño similar copurifican con los ácidos nucleicos. Sephadex y sus derivados son las matrices más comúnmente utilizadas para esta aplicación [160].

Métodos de unión en superficie de papel

En este caso, el lisado de células se añade a un papel de celulosa para realizar un aislamiento rápido del material genético. El papel, tratado químicamente, contiene reactivos de lisis y de unión que se combinan con la muestra cuando es añadida. La etapa de lisis y unión se producen en el propio papel. Una vez que la combinación reactivos y muestra está seca, se realizan varios lavados del papel con agua estéril y se eluyen los ácidos nucleicos con un pequeño volumen de agua desionizada o tampón TE [178].

Algunos de estos métodos, o la combinación de varios, se han integrado en equipos semi- o totalmente automatizados, capaces de realizar desde la lisis de las muestras hasta algunas aplicaciones posteriores como la qPCR. Tanto el uso de partículas magnéticas como matrices de sílica se utilizan ampliamente en plataformas automatizadas. Algunas de sus ventajas son menor riesgo de error por pipeteo y menor tiempo de ejecución. Su inconveniente es que son equipos con un precio muy elevado [160, 162, 179].

Algunos de estos métodos también han sido integrados en los chips de microfluídica o cartuchos “*Lab-on-a Chip*”, donde se combina tanto la extracción como la detección del ácido nucleico. Son fáciles de usar, tienen un número reducido de etapas y generan una respuesta rápida. Pero son equipos con un coste elevado, se procesan pocas muestras de vez y no están disponibles para todo tipo de matrices biológicas [180, 181].

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La tecnología de qPCR se ha convertido en los últimos años en el método diagnóstico muy utilizado por su alta sensibilidad, fiabilidad, buena reproducibilidad y amplio rango dinámico a partir de gran variedad de muestras biológicas, incluso las de calidad deficiente [182, 183].

La qPCR permite la monitorización continua de la acumulación del producto amplificado en cada ciclo, que es directamente proporcional a la intensidad de la señal fluorescente. De este modo, se puede identificar DNA específico presente en una muestra, o RNA si hay un paso previo de retrotranscripción (RT-qPCR). La monitorización continua de la reacción se puede realizar gracias al instrumento termociclador en tiempo real, que presenta un software específico para la detección de la señal y el análisis de resultados [151, 184].

La qPCR combina, en el mismo tubo de reacción, la química de la PCR convencional con la detección del producto amplificado por indicadores fluorescentes. Esto permite que tanto la

reacción como la detección se realicen en el mismo ensayo, en aproximadamente una hora, siendo mucho más rápido que la PCR convencional. Al igual que la PCR, la qPCR utiliza un protocolo térmico con ciclos de amplificación, producidos por el termociclador, dividido en tres etapas: a) desnaturalización del DNA bicatenario a 95°C; b) unión de los *primers* o cebadores a la secuencia específica a temperaturas más bajas y c) elongación de la nueva hebra formada (**Figura 7**). De esta manera, de una secuencia específica se consiguen obtener millones de copias de la misma [183].

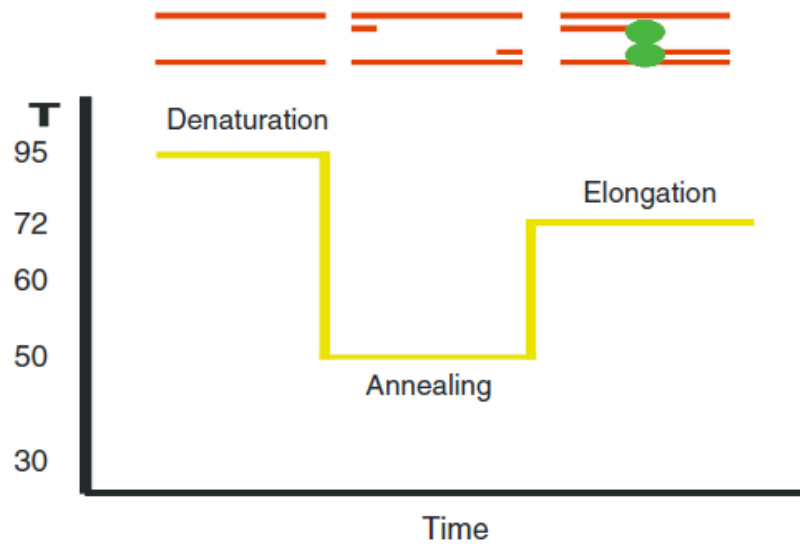


Figura 7. Protocolo térmico qPCR, etapas de desnaturalización, unión de cebadores y elongación de la nueva hebra. Fuente: [183].

Las principales ventajas de la qPCR comparadas con la PCR estándar son la reducción del tiempo del ensayo, el menor riesgo de contaminación (ya que no precisa de análisis post-PCR), la mejora de la sensibilidad y la posibilidad de testar varios patógenos a la vez (multiplex qPCR) [151, 185].

La qPCR necesita de un indicador fluorescente que genere una señal cuando el producto se está formando. Durante los ciclos iniciales, la señal es débil y no se puede distinguir de la línea base (ruido). A medida que se acumula producto amplificado se genera una señal fluorescente que incrementa exponencialmente generando la curva de amplificación. En un momento dado la señal alcanza la saturación en la fase denominada plateau (**Figura 8**) [183].

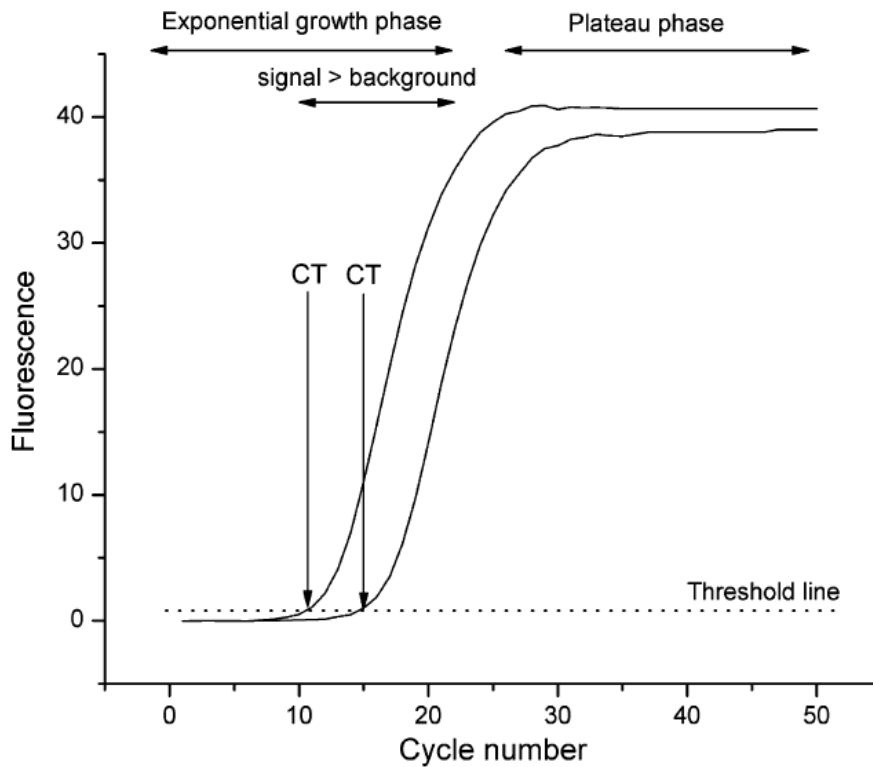


Figura 8. Curva de amplificación de qPCR. Fuente: [183].

Existen un gran número de moléculas fluorescentes para la detección continua del producto amplificado en el termociclador en tiempo real.

Por un lado, se encuentran los fluorocromos no específicos que son los que se unen al DNA de doble cadena ya que se intercalan entre pares de bases adyacentes no siendo específicos de secuencia. Entre ellos se encuentran el bromuro de etidio, SYBR® Green, EvaGreen y BOXTO entre otros [186].

Por otro lado, se encuentran las sondas de hidrólisis y las sondas de hibridación. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis (*TaqMan*), oligonucleótidos que contienen una molécula fluorescente en el extremo 5' (fluoróforo) y una molécula apantalladora de fluorescencia en el extremo 3' (*quencher* o apantallador) (**Figura 9**). Estas sondas de hidrólisis están diseñadas para unirse a una zona específica de la región del DNA molde. Durante la etapa de extensión de la reacción de amplificación, gracias a la actividad 5'->3' exonucleasa de la *Taq* polimerasa, se escinde la sonda, lo que produce que fluoróforo y *quencher* se alejen generando una señal fluorescente. Al final de cada ciclo se registra la fluorescencia emitida por el fluoróforo, que es proporcional a la cantidad de producto formado [151, 187].

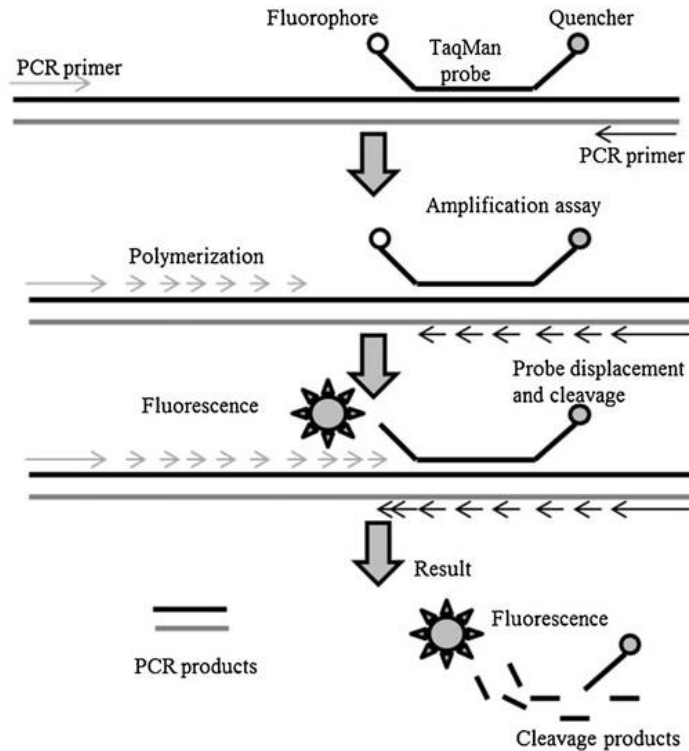


Figura 9. Mecanismo sonda *TaqMan*. Fuente: [187].

Existen distintas combinaciones fluoróforo-*quencher* que pueden ser utilizadas. Los diferentes fluoróforos que existen se distinguen por excitarse y emitir a una determinada longitud de onda del espectro (**Figura 10**). Si se quiere detectar una sola secuencia específica, los fluoróforos más utilizados son FAM, TET o HEX, ya que dan fluorescencias más intensas y pueden ser excitados y detectarse en todos los termocicladores. Por otra parte, si se quieren detectar dos o más secuencias específicas en el mismo ensayo de qPCR (multiplex qPCR), se necesitan dos o más fluoróforos con longitudes de onda de absorción y emisión distintas y bien separadas entre sí (superposición espectral mínima) (**Figura 11**). La mayoría de los instrumentos tienen filtros de excitación y emisión para minimizar la superposición espectral entre fluoróforos. También los softwares de los equipos cuentan con un algoritmo matemático para determinar la contribución de la emisión de cada uno de los fluoróforos presentes en la reacción de amplificación [188, 189].

Es decir, cada fluoróforo se asocia a una reacción de qPCR concreta del ensayo. Habitualmente, se denomina canal a la zona del espectro donde se detecta la fluorescencia emitida y que está vinculada a un fluoróforo determinado. Por ejemplo, en el canal FAM se detecta la señal de emisión de fluorescencia a $\lambda \sim 520$ nm, producida por la escisión de la sonda con fluoróforo FAM al generarse producto amplificado.

Fluorophore Labels for Fluorescent Hybridization Probes

Fluorophore	Alternative fluorophore	Excitation (nm)	Emission (nm)
FAM		495	515
TET	CAL Fluor Gold 540 ^a	525	540
HEX	JOE, VIC ^b , CAL Fluor Orange 560 ^a	535	555
Cy3 ^c	NED ^b , Quasar 570 ^a , Oyster 556 ^d	550	570
TMR	CAL Fluor Red 590 ^a	555	575
ROX	LC Red 610 ^e , CAL Fluor Red 610 ^a	575	605
Texas Red	LC Red 610 ^e , CAL Fluor Red 610 ^a	585	605
LC Red 640 ^e	CAL Fluor Red 635 ^a	625	640
Cy5 ^c	LC Red 670 ^e , Quasar 670 ^a , Oyster 645 ^d	650	670
LC Red 705 ^e	Cy5.5 ^c	680	710

^aCAL and Quasar fluorophores are available from Biosearch Technologies.

^bVIC and NED are available from Applied Biosystems.

^cCy dyes are available from Amersham Biosciences.

^dOyster fluorophores are available from Integrated DNA Technologies.

^eLC (LightCycler) fluorophores are available from Roche Applied Science.

Figura 10. Diferentes tipos de fluoróforos. Fuente: [188].

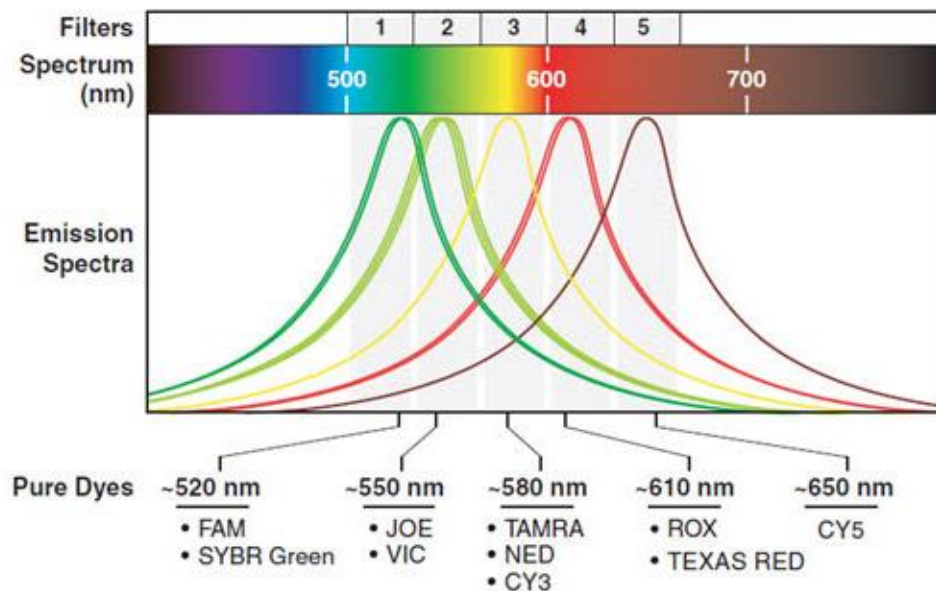


Figura 11. Espectro de emisión para cada fluoróforo. Filtros y longitudes de onda a los que se detectan.

Fuente: [189].

Por otro lado, existen diferentes tipos de *quencher* (**Figura 12**). Para elegir la combinación fluoróforo-*quencher* apropiada ésta debe tener una superposición espectral suficiente para que el fluoróforo no emita nada de fluorescencia cuando el *quencher* lo esté apantallando. Para fluoróforos con máxima emisión entre 500 y 550 nm como las fluoresceínas (incluidos FAM, TET y HEX) se apantallan mejor con *quenchers* con máximos de absorción entre 450 y 550 nm, como dabcy1 o BHQ-1. Fluoróforos con máxima emisión superior a 550 nm, como rodaminas (incluidos TMR, ROX, y Texas Red) y cianinas (incluyendo Cy3 y Cy5) son mejor apantallados con *quenchers* con máximos de absorción superiores a 550 nm, como BHQ-2 o BHQ-3 [188].

Quencher Labels for Fluorescent Hybridization Probes

Quencher	Absorption maximum (nm)
DDQ-I ^a	630
Dabcyl	475
Eclipse ^b	530
Iowa Black FQ ^c	532
BHQ-1 ^d	534
QSY-7 ^e	571
BHQ-2 ^d	580
DDQ-II ^a	630
Iowa Black RQ ^c	645
QSY-21 ^e	660
BHQ-3 ^d	670

^aDDQ or Deep Dark Quenchers are available from Eurogentec.

^bEclipse quenchers are available from Epoch Biosciences.

^cIowa quenchers are available from Integrated DNA Technologies.

^dBHQ or Black Hole Quenchers™ are available from Biosearch Technologies.

^eQSY quenchers are available from Molecular Probes.

Figura 12. Diferentes tipos de quenchers. Fuente: [188].

Parámetros de la qPCR

A continuación se van a describir los parámetros más importantes asociados a la curva de amplificación de la qPCR (**Figura 8**) [182, 185, 190]:

- Línea base (*baseline*): se define como los ciclos de qPCR en los que la señal fluorescente del producto acumulado está por debajo del límite de detección del instrumento. Por defecto, los softwares de los instrumentos suelen establecer la línea base entre los ciclos 3 y 15.
- Fluorescencia: valor de la fluorescencia de emisión en cada punto de tiempo habitualmente expresado como unidad de fluorescencia relativa (*Relative Fluorescence Unit*- RFU).
- Umbral (*Threshold* - Th): se calcula como diez veces la desviación estándar del promedio de la señal fluorescente de la línea base entre los ciclos 3 y 15. La señal fluorescente que se detecta por encima del valor umbral se considera una señal real que puede utilizarse para definir el valor de ciclo de cuantificación (Cq) de una muestra. El valor umbral se puede cambiar manualmente en cada experimento, para que se encuentre en la región de amplificación exponencial de todas las curvas presentes.
- Ciclo de cuantificación (Cq o Ct): se define como el número de ciclo en que la señal fluorescente del producto acumulado es significativamente mayor que el nivel de detección mínimo, es decir, que el valor umbral. El número de ciclos necesarios para que la fluorescencia asociada a la amplificación supere el valor umbral es inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra original. Es decir, a mayor cantidad de ácido nucleico a detectar se produce un valor de Cq más temprano. A menor cantidad, la curva de amplificación comienza más tarde, obteniéndose valores de Cq más retrasados y cercanos a los últimos ciclos de amplificación (entre 35-40).

Procesamiento rápido de la muestra fecal y su compatibilidad con los kits VIASURE *Real Time PCR Detection Kit* de Certest Biotec

Para llevar a cabo el ensayo por qPCR (o RT-qPCR) se requiere la purificación previa de los ácidos nucleicos contenidos en las muestras biológicas. A pesar de haberse mejorado esta etapa, continúa siendo larga y tediosa, y en ocasiones una fuente de error [162, 163].

La detección de patógeno/s a través de los kits de qPCR desarrollados por Certest Biotec S.L. se realiza por la adición de DNA (o RNA que será transformado en cDNA) extraído de muestras biológicas al producto liofilizado (**Figura 13**). Actualmente, para poder conseguir el DNA o RNA se utilizan kits comerciales de extracción de ácidos nucleicos.

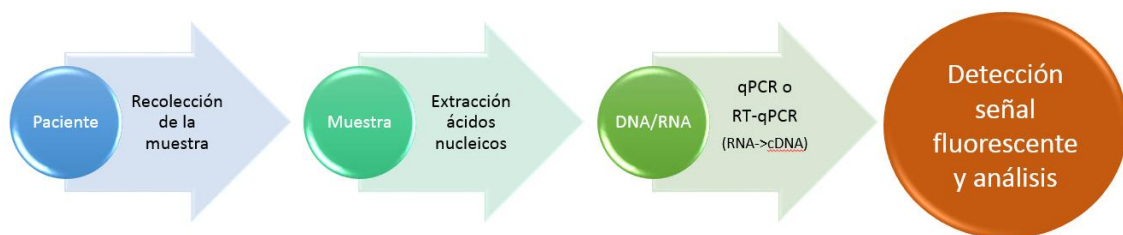


Figura 13. Esquema del proceso de extracción de ácidos nucleicos y detección por qPCR o RT-qPCR.

El kit de qPCR de Certest está formado por un conjunto de 96 pruebas, en formato de 12 tiras de 8 pocillos (o formato placa de 96 pocillos), con las correspondientes tapas ópticas. La mezcla de reacción, con todos los reactivos para realizar la qPCR, se encuentra estabilizada y dispensada de forma individual en cada uno de los tubos o pocillos. De esta forma se puede identificar, en cada uno de ellos, uno o varios patógenos dependiendo de si es formato monoplex o multiplex [191].

Una vez que se separan el número de pocillos (desde tira o placa) requeridos para el ensayo, se añade a cada uno de ellos 15 µl de tampón de rehidratación. Posteriormente, se adiciona a cada uno 5 µl de ácido nucleico previamente extraído (DNA o RNA), incluyendo también en el ensayo un control positivo y un control negativo de la reacción. Se colocan las tiras en el termociclador y se inicia el protocolo específico de amplificación. Finalmente, el equipo registra la señal fluorescente y se procede al análisis de los resultados (**Figura 14**). Estos kits de qPCR detectan patógenos de diferente naturaleza (bacterias, parásitos, virus), ya sea un único organismo o un grupo de organismos, un gen de virulencia o genes o mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana. Se pueden utilizar para la detección de diferentes infecciones: gastrointestinales, respiratorias, transmitidas por garrapatas, de transmisión sexual, ..., y son compatibles con un gran número de termocicladores disponibles en el mercado [191].

Existen una gran variedad de métodos para la extracción de ácidos nucleicos, pero la mayoría de ellos son largos, con muchas etapas y algunos utilizan productos tóxicos o corrosivos. Además, la aplicación exitosa de las técnicas qPCR o RT-qPCR depende en gran medida de la integridad, el rendimiento y la pureza del ácido nucleico aislado [162, 163].



Figura 14. Guía de instrucciones rápidas de los kits qPCR de Certest Biotec S.L. para la detección de patógenos. Fuente: [191].

El método de extracción ideal debe ser sensible, rápido, consistente, flexible y fácil de usar. La flexibilidad es la capacidad de obtener DNA o RNA de una gran cantidad de células o de diferentes tipos de organismos desde muestras biológicas de distintos orígenes. También debe presentar un riesgo mínimo para los usuarios, así como minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras [161, 162].

En los últimos años se han descrito algunos métodos rápidos de tratamiento de muestras para que éstas puedan ser utilizadas directamente en la PCR. La mayoría de estos métodos están optimizados para sangre, plasma o cultivos pero, debido al difícil procesamiento de las muestras fecales, hay pocos métodos rápidos disponibles para este tipo de matriz biológica. Además, las muestras fecales contienen un gran número de inhibidores de la qPCR como polisacáridos, urea, glucolípidos, hemoglobina y heparina entre otros, lo que hace que sea una matriz más compleja de tratar, ya que estos compuestos tienen que ser eliminados para que la qPCR funcione correctamente [192-194].

Por estas razones, el objetivo del presente proyecto de investigación es simplificar el proceso de extracción de ácidos nucleicos, desarrollando un método de procesamiento rápido de muestras fecales que sea sensible, sencillo, universal (flexible), que conlleve el menor riesgo posible para los usuarios y que sea compatible con la tecnología qPCR. Este método mejoraría el diagnóstico de microorganismos enteropatógenos, lo que permitiría tratar a los pacientes de forma más rápida y dirigida, facilitando así su curación.

Objetivos principales

Desarrollar un método (reactivo y procedimiento) para el tratamiento de muestras fecales, compatible con la tecnología qPCR y su aplicación en diagnóstico molecular, que sea:

- a. sencillo,
- b. rápido,
- c. universal, es decir, válido para microorganismos enteropatógenos de diferente naturaleza (bacterias, parásitos y virus)
- d. y seguro, es decir que, en la medida de lo posible, los reactivos que contenga no sean nocivos para el usuario final.

Este sistema tiene que cumplir una serie de requerimientos de reproducibilidad, estabilidad y funcionalidad clínica, para poder formar parte de un procedimiento de diagnóstico molecular.

Capítulo I Desarrollo de reactivo y procedimiento para el tratamiento de muestras fecales y su compatibilidad con qPCR

Este Capítulo no se encuentra disponible en esta versión de la memoria.

**Capítulo II QPCR inhibitors /
enhancers: the interference in the
reaction by drugs, substances added
in sample preparation and included in
the reaction mix.**

El tratamiento rápido de muestras fecales puede no ser suficiente para reducir o neutralizar todas las sustancias presentes en la muestra, pudiendo afectar de esta manera a la reacción de qPCR. Además, diferentes reactivos que se utilizan de rutina para el tratamiento de muestras biológicas también pueden interferir en la reacción de amplificación. De acuerdo con el Reglamento (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro, el ensayo de qPCR tiene que cumplir unos requerimientos de funcionalidad. Esto implica saber cómo de robusta es la reacción y cómo le afectan diferentes compuestos añadidos. Por ello, se realiza un estudio de diferentes sustancias y reactivos en diferentes concentraciones para evaluar cómo afectan a la reacción de qPCR. Este estudio está pendiente de ser enviado para publicación.

II.1 Abstract

Background: The real-time polymerase chain reaction (qPCR) has become a powerful tool for rapid diagnosis. It is well-known that diverse substances can interfere in the reaction producing unintended results. This study tested 87 substances, in several concentrations, used for patient treatment, ingested by the patients, added during sample preparation or included in the reaction mix to evaluate their inhibitor/enhancer potential.

Methods: Several concentrations of each substance were added directly over the qPCR reaction mix. The qPCR assay used in this study was VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit that detected four targets in four different reactions. The 87 compounds were evaluated with two different approaches, based on the quantification cycle (C_q) and the end-point fluorescence intensity (FI); and based on the individual amplification efficiency (E_A) of each individual reaction. The maximum concentration of no interference (MCNI) of each substance was calculated for both approaches. Also, all substances concentrations were plotted depending on the three parameters (C_q, FI, and E_A).

Results: MCNI values for both approaches were very similar; however, the one based on C_q and FI was more restrictive. Graphical representations showed that compounds could follow four general behaviors: a total inhibition in one or several concentrations (64.4%), partial inhibition (19.5%), no affectation (9.2%) and enhancement (6.9%). In addition, two specific behaviors have been also identified; the more affectation over retrotranscription compared to DNA polymerase reaction (9.2%) and the gradual fall of the fluorescence with dependence on the fluorophore (2.3%).

Conclusions: The comparison performed with previous studies has been made carefully due to methodologies were different. However, the results suggested that the qPCR assay used in the present study withstood higher inhibitors concentrations, so it was more robust. Several inhibitors not described in the literature to date were identified, which facilitates the success of qPCR for rapid diagnosis, and particularly for developing pre-qPCR processing systems.

II.2 Introduction

In the last few years, real-time polymerase chain reaction (qPCR) has become a powerful analytical tool, not only in diagnostic applications but also in various scientific fields. [195] This method monitors the amplification of specific DNA/RNA fragments, owing to a previous reverse transcription for RNA. For its sensitivity, precision, and reproducibility is used for rapid detection of DNA sequences [196] [197]

Some reagents and compounds can inhibit the assay, affecting the limit of detection, the limit of quantification and the amplification efficiency [198] [199]. PCR inhibitors constitute a heterogeneous group of chemical substances presented in clinical, food and environmental samples or introduced during sample preparation [200]. A big number of components have been identified as PCR inhibitors: NaCl, KCl and other salts; ionic detergents; ethanol; EDTA; hemoglobin, immunoglobulin and lactoferrin in blood; complex polysaccharides, bilirubin and bile salts in stool; urea in urine or humic compounds and heavy metals in soils and sediments [195, 197-199, 201-204]. On the other hand, nontarget genetic material or laboratory items such

as glove powder, laboratory plasticware and pollen can inhibit the amplification process [201, 205].

Although a wide range of inhibitors is reported, the mechanisms of PCR inhibition are often unclear. Compounds can disturb amplification by directly affecting the enzymes (thermostable DNA polymerase and/or reverse transcriptase); altering the ion composition in the reactions; degrading or catching nucleic acids or interfering with the cell lysis step [195, 201, 205]. Also, the quality and quantity of inhibitors varies due to different samples, so PCR inhibition affectation depends on sample type and composition [206].

The presence of inhibitors on real-time amplification plot can be measured with the detection of quantification cycle (C_q) at later cycles and/or lower plateau fluorescence values at the end of the reaction relative to an uninhibited control. If the affectation is total there is not amplification but if the inhibition is partial, C_q, fluorescence or both will be affected [201, 207].

In the literature has also been described other substances that may improve amplification reaction and are known as amplification enhancers. Betaine, bovin serum albumin, tetramethylammonium chloride, polyhydroxyl alcohols (glycerol, ethylene glycol or 1,2-propanediol), nonionic detergents (Tween 20 or Triton X-100) and organic solvents (formamide or dimethylsulphoxide) are some examples of facilitators [165, 206, 208]. However, the same compound has been reported to act as both enhancer and attenuator in the same system depended on the concentration. Even the combination of facilitators may cause PCR inhibition [198, 205].

Thus, the presence of inhibitors can increase error, reduce assay resolution and produce false results in qPCR assays. A correct identification and quantification of qPCR inhibition are crucial for a precise interpretation of the obtained results. Different studies have been performed about PCR inhibitors, but there is little information about the effect of drugs for treatment of diseases. In fact, the compounds present in medications could interference in amplification reaction [209].

Therefore, the present study tried to characterize the interference of some substances in qPCR assays. According to the regulation (EU) 2017/746 on in vitro diagnostic medical devices, the product must comply with performance requirements, therefore, it is necessary to study how these substances affect in the reaction. The compounds selected from the current paper are, on one hand, substances used for patient treatment (e. g. therapeutic drugs, anticoagulants) or ingested by the patient (e.g. over the counter medications and others). On the other hand, substances added during sample preparation (e.g. preservatives, stabilizers) and substances included in the reaction mix (e.g. salts, detergents). The compounds were evaluated using a qPCR reaction to identify the highest concentration of substance can withstand and consequently the inhibitor-resistant of qPCR assays.

II.3 Materials and methods

II.3.1 RNA extraction

Different nucleic acids were added to the reaction in order to identify the affectation of the possible inhibitory substances.

On one hand, Sanofi Pasteur influenza vaccine (2011/2012 campaign) was employed and contained follow strains of influenza virus (inactivated, fractionated): strain derivative of A/California/7/2009 (H1N1); strain similar to A/Perth/16/2009 (H3N2) and B/Brisbane/60/2008. Total RNA was extracted using VIASURE RNA-DNA Extraction Kit (Certest Biotec S.L., Spain). For the experiments two different dilutions in nuclease free water (NFW) of extracted was used. On the other hand, nucleic acid positive for respiratory syncytial virus (RSV) was added. The sample was isolated using COBAS® Ampliprep Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics) and a dilution (in NFW) of isolated was used for the study. Furthermore, all extraction procedures were performed according to manufacturer's instructions.

II.3.2 QPCR inhibitory samples

In this study a total of 87 compounds were tried as potentially interfering substances. Two global types were defined, substances used for patient treatment or ingested by the patient and substances added during sample preparation or included in the reaction mix.

The first type, therapeutic drugs or over the counter medications, was divided into the following categories (**Table 5 – end of this chapter**, Numbers 1-46): antacids, antibiotic, anticoagulant, antidiarrheal, antiemetic, antihistamine, antipyretic, antitussive, antiviral, bronchodilators, corticosteroid, expectorant/mucolytic, homeopathic medicinal preparation, isotonic seawater solution, laxative, oral rehydration solutions, probiotic and proton pump inhibitor.

The second type, substances introduced during sample preparation, nucleic acid extraction or presented in the qPCR reaction mixture were divided into the following categories (**Table 5 – end of this chapter**, Numbers 47-87): blood extraction, buffer, enzyme, inorganic acid, inorganic base, ionic detergent, non-ionic detergent, pH indicator, protein, quick isolation procedure, reactive, salt, sugar and transport medium.

Solid compounds were dissolved into NFW. Then a series of two-fold dilutions of solutions were performed and tested in qPCR.

Two antibiotics were not used like drugs but were also tested to know their effect in the reaction, Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x) from Life Technologies (California, USA) and Kanamycin Sulfate (Ph. Eur., BP) pure, pharma grade BC from Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain). All medicines were locally purchased in Spain.

For blood extraction tubes, a known volume of NFW was added, BD Vacutainer® Citrate Tubes 2.70 ml; BD Vacutainer® Plastic K3EDTA tube with Lavender BD Hemogard™ Closure 3.00 ml; BD Vacutainer® Plastic Lithium Heparin tube with Green BD Hemogard™ Closure 4.00 ml; BD Vacutainer® Serum Separator Tubes (BD SSTTM II Advance) 5.00 ml and VACUETTE® Z Serum (Sep) Clot Activator 5.00 ml.

In **Table 6 – end of this chapter**, the initial concentrations of the substances were detailed. For drugs, this value belonged to active principle/s with only a few exceptions (some medications without specific information about components).

II.3.3 RT-qPCR assay

All possible inhibitory substances were tested with VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit. All VIASURE Real Time PCR Detection Kits contain the same master mix but differ by the primer-probe design. In addition to the *Taq* polymerase, this kit includes a reverse transcriptase to generate complementary DNA from an RNA template.

QPCR assays were carried out in CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The reaction consisted of 15 µl pre-mix (5 µl concentrated rehydration buffer (supplied by manufacturer), 5 µl extracted vaccine and 5 µl extracted acid nucleic positive to RSV) and 5 µl of different substances in increasing concentrations. The non-inhibited positive control consisted of adding 5 µl NFW instead of 5 µl inhibition compound. In this way results could be compared with a positive control without interference affectation. Reaction conditions were: 45°C for 15 minutes, 95°C for 2 minutes, followed by 45 cycles of 95°C for 10 seconds and 60°C for 50 seconds with fluorescence acquisition after each 60°C step. For VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV*, targets were amplified and detected in FAM channel (*Flu A*), HEX channel (internal control), ROX channel (*Flu B*) and Cy5 channel (*RSV A/B*). Each reaction was amplified in duplicate.

II.3.4 Data analysis

Two different non-inhibited control samples were used. In the first part of the study, it was used a control where targets amplified approximately in Cq ~ 18 for *FluA* and *FluB*; Cq ~ 23 for internal control and Cq ~ 28 for *RSV*. It could see that in the compounds of this part of the study, the Cy5 channel usually was more affected than the others. However, all targets had the same tendency, but the limit value of the MCNI value was specified by *RSV* target. Due to this, for the rest of the study, we have changed the non-inhibited control samples for standardized more the study. In the second part, it was used a positive control where targets amplified approximately in Cq ~ 28 for *FluA*, *FluB* and *RSV* and Cq ~ 23 for internal control. In this case, all targets usually had the same pattern.

On the other hand, two different approaches have been followed to evaluate the degree of interference of compounds in qPCR reaction: Cq value and end-point fluorescence intensity (FI) and the individual amplification efficiency (E_A).

The first measurement of inhibition was based on Cq value and FI. A reaction may be categorized into inhibition, enhancement, and no affectation.

In the case of inhibition was defined as the decrease of FI and/or Cq increase. It could be distinguish between total and partial inhibition. Total inhibition was considered when both duplicate were negative (no amplification or mean Cq value > 40). Partial inhibition was detected if a) only one replicate was positive (Cq value < 40), b) mean Cq value of duplicate was delayed 2 or more Cq respect to control mean Cq value and/or mean FI value of duplicate was lower 75% control mean FI value [208, 210]. In addition, when duplicate mean Cq value was advanced in 2 or more Cq with respect control mean Cq value and/or mean FI value was higher 25% control mean FI value was considered enhancement. No affectation was defining when there was not variation either Cq or FI (between limits described above).

Compound dilution where there was not inhibition was considered the maximum concentration of no interference (MCNI). It was necessary serially dilutions 1:2 of compounds until reach this value. The MCNI value was for the global reaction although each target could be affected in different way depended on the compound. Therefore, the MCNI value in global reaction for the first approach was defined as the concentration which two or more channels were not affected and the others could have partial inhibition as long as mean Cq value shift was less than 1 and mean fluorescence value was between 50%-100% of control value.

The second measurement of inhibition was based on E_A . In the presence of inhibitors, reactions crossed the detection threshold at later cycles and the exponential phase slopes decreased. The plateau fluorescence values reached was lower and E_A decreased [201]. PCR efficiency was defined as the fold increase of the amount of DNA per cycle and had a theoretical maximum of 2 (=100 %) [211].

For doing this, LinRegPCR program Version 2017.1 was used to calculate PCR efficiency from individual qPCR reactions [212]. The parameter calculated for the comparative was the percentage of E_A , as $\% E_A = \text{Log}(E) / \text{Log}(2)$ (E: Mean individual E_A of duplicate. Each individual E_A was calculated by LinRegPCR software) [213]. Therefore, individual efficiency qPCR reactions were analyzed and compared to non-inhibited control sample. For a better comparison, the $\% E_A$ was normalized with the non-inhibited control sample.

Ideally the $\% E_A$ must be 100 % but it is difficult to achieve. Therefore, we have considered an acceptable $\% E_A$ between 80%-115%. Low $\% E_A$ indicates that the reaction was slowed down due to the presence of inhibitors. Significantly higher $\% E_A$ may suggest an experimental error [198, 214]. Consequently, a reaction may be categorized into inhibition and no affectation. If $\% E_A$ was found between 80% -115%, there was no affectation, while if $\% E_A$ was lower than 80% there was inhibition. Inhibition can be total (no amplification observed) or partial (one replicate amplified). If $\% E_A$ was higher than 115% was considered an experimental error and the value was excluded from the study. It was necessary serial dilutions 1:2 of compounds until reaching the MCNI value, such as in the first approach. Each target must be affected in a different way, so the MCNI value of qPCR assay was considered the concentration to which the four targets had $\% E_A$ higher than 80 %.

All compounds were graphed as Cq vs Concentration, Normalized $\% FI$ vs Concentration and Normalized $\% E_A$ vs Concentration. For an improved comparison, it has been calculated the $\% FI$ normalized with the non-inhibited control sample. These graphs were plotted with OriginPro, Version 2017. The concentrations indicated in the graphical representations are those added directly over the qPCR reaction, no final concentrations on the well reaction.

II.4 Results

II.4.1 The MCNI value for the compounds

For each compound, the two approaches were performed and the MCNI values were calculated. **Table 6 – end of this chapter**, showed both MCNI values in the case of therapeutic drugs or over the counter medications and for substances introduced during sample preparation, nucleic acid extraction or presented in the qPCR reaction mixture. However, the MCNI values for the two

different analyses were not always the same. In fact, it seemed that the MCNI value based on Cq value and FI was more restrictive than the one based on the % E_A. This was because the Cq could be higher and/or FI lesser but the sigmoidal form of the curve remained, so the % E_A was between 80%-115%. Therefore, we considered that the MCNI value of the compound was lower concentration between these two values.

II.4.2 Graphs representations

We have categorized the behavior of each compound into total inhibition, partial inhibition, no affectation, and enhancement. Also, two specific behaviors were identified and were contained in partial and total inhibition: more retrotranscriptase affectation and the fall in the fluorescence.

Total inhibition was related to the no amplification of one or several targets in a determinate concentration, then there usually was a partial inhibition and at below concentrations of the compound, there was no affectation (**Figure 15**). In the study, 56 of 87 compounds (64.4%) presented this type of behavior. Although in most cases, all targets were affected in the same way, it should be noted that in one drug, the antacid Almax 500 mg, Flu A target (FAM channel) was less affected than the others, in both FI and Cq values as the % E_A. In addition, at high concentrations of lysozyme, the RSV target (Cy5 channel) was more affected, the Cq value was higher and the % E_A was lower, than the others.

Partial inhibition was the case in which the qPCR reaction was affected, in one or more targets, but it always amplified (it was like the second part of the total inhibition). Generally, at lower concentrations of the compound, there was no affectation (**Figure 16**). The number of compounds that presented this behavior was 17/87 (19.5%).

No affectation was considered when none of the three graphs presented changes (**Figure 17**). Only 8 compounds (9.2%) did not influence in the qPCR reaction at any concentration. These substances were the antihistamine Ebastel Forte Flas 20 mg, two blood extraction types (BD Vacutainer® Serum Separator Tubes (BD SSTTM II Advance) and VACUETTE® Z Serum (Sep) Clot Activator), one quick isolation procedure (VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer) and four transport mediums (ESwab®, Mswab®, Puritan® Opti-Swab™ and Puritan® Uni-Tranz-RT™).

Enhancement was referred to one or more targets that have been increased their FI and/or decreased their Cq value. Only 6 substances (6.9%) presented this behavior, the expectorant Iniston Antitusivo y Descongestivo jarabe, the laxative MovicolSabor Neutro 13,7 g polvo, the non-ionic detergent Tween 20 for molecular biology, the protein BSA Low Endotoxin-30% Solution, the reactive Betaine Ultrapure MB Grade, and the sugar D-(+)-Trehalose Dihydrate. Although all of them improved the qPCR reaction, not all targets have been affected in the same way. For example, high concentrations of D-(+)-Trehalose Dihydrate enhanced the fluorescence of all targets, but the Cq value is the same for all concentrations (**Figure 18**). On the other side, MovicolSabor Neutro 13,7 g polvo increased FI value at high concentrations but also decreased the Cq value in RSV target. In the case of Tween 20, at higher concentrations of 50% (v/v) produced partial inhibition, however at the range 12.5% (v/v)-50% (v/v) increased the fluorescence intensity.

In addition, other two specific behaviors were identified and were contained in partial and total inhibition. Some graphs indicated that determinate substances affected more retrotranscriptase reaction than to DNA polymerase reaction (**Figure 19**). It was possible to distinguish this due to the RNA targets Flu A (FAM channel), Flu B (ROX channel) and RSV A/B (Cy5 channel) needed retrotranscriptase to transform RNA to cDNA. However, the internal control (HEX channel) was a synthetic DNA and it only needed DNA polymerase reaction to be amplified and detected. This means that if the HEX channel was less affected than the other channels, it implied that the inhibitor substance influenced more over the reverse transcriptase. In the study, the 8 compounds (9.2%) that presented this behavior were the antibiotic Piperacilina/Tazobactam Accord 4g/0,5g polvo, three antipyretics (Efferalgan® 1 g, Enantyum 25 mg and Espidifen 600 mg), the probiotic MegaLevure, the inorganic base Potassium hydroxide, and the salts Ammonium sulfate and Potassium chloride.

The other specific behavior observed was the fall in the fluorescence (**Figure 20**). In this case, the FI graph (Normalized % FI vs Concentration) sometimes showed that the affectation in the fluorescence was higher in the targets which detection has been found in the left part of the emission spectrum (smaller wavelengths). Therefore, the FAM channel (Flu A) was the most affected and the influence decreased for HEX channel (internal control), ROX channel (Flu B) and Cy5 channel (RSV A/B), being the last one the less affected. Only two substances (2.3%) presented this pattern, the antibiotic Rifaldin 300 mg, and the pH indicator Phenol red solution. It should be noted that Rifaldin 300 mg was orange in color and Phenol red solution was the red color.

II.5 Discussion

There are different substances that can interfere in qPCR amplification. It is important to know which they are and what type of affectation they can produce in the reaction. In this way, the present study tested 87 compounds to know the maximum concentration of each of them for the no alteration of the qPCR reaction.

There are few studies performed about the interference of substances used for patient treatment (e. g. therapeutic drugs, anticoagulants) or ingested by the patient (e.g. over the counter medications and others). For example, a study performed in 2017 in China evaluated the potential interfering of 14 medicines over the real-time Methylation-specific PCR. This study included stool softeners, anti-diarrhea and laxative products; antacids and stomach medicine; anti-inflammatory drugs and pain relievers [209]. They found that none of the compounds, at the concentrations indicated, affected the qPCR reaction. Some of the substances used in common with the present study were phenoxymethylpenicillin potassium, ibuprofen, omeprazole, levofloxacin, and paracetamol. The comparison between the two studies should be done carefully. First, both methodologies were not the same. In the case of the Chinese study, the substances were added to a biological sample matrix and extracted. After this, the compounds isolated were added to the qPCR reaction. Second, the study only tested one concentration of each compound, so this one had not to be the limit concentration of inhibition. In fact, the no affectation concentration of the compounds of Chinese study was less than the corresponding MCNI global value of this study, except in the case of omeprazole. Although in the drugs tested, the concentration of the active principle has been considered for doing all

calculations, the excipients of each medicine can vary and can produce that the limit could change between products with the same active principle. Another study tested the inhibition of diverse compounds directly added over a PCR assay [215]. In this case, ampicillin and rifampicin showed no-inhibition concentration below the MCNI global values of this study, but the concentration where there was inhibition did not be determined.

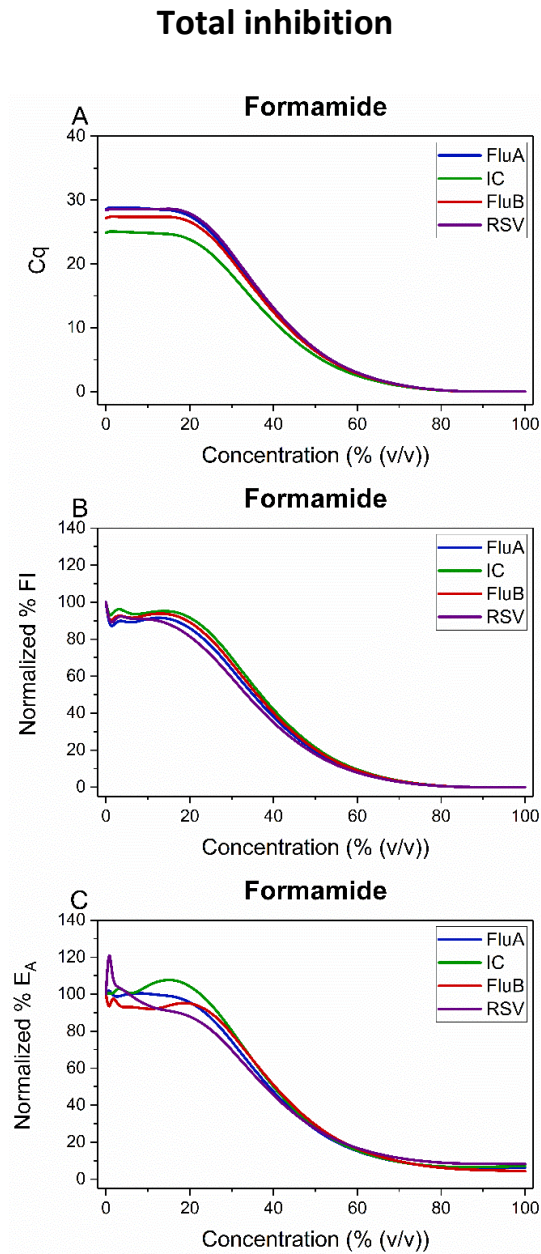


Figure 15. Formamide (Number 73). Total inhibition behaviour. **A.** Cq value vs Concentration plot. **B.** Normalized % FI vs Concentration plot. **C.** Normalized % EA vs Concentration plot.

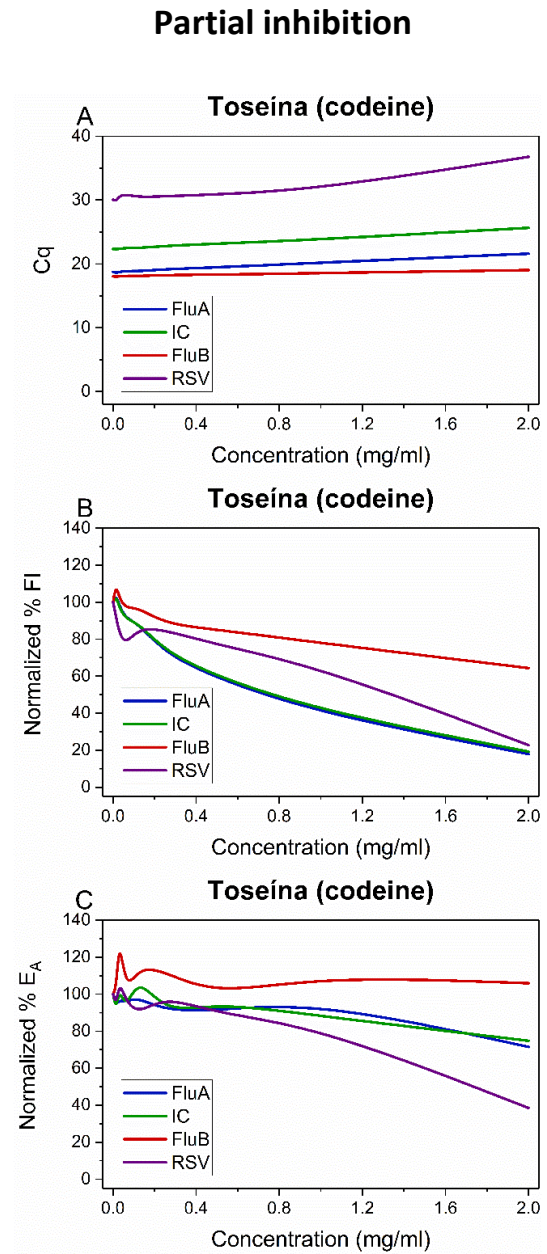


Figure 16. Toseína 2 mg/ml (Number 31). Partial inhibition behaviour. **A.** Cq value vs Concentration plot. **B.** Normalized % FI vs Concentration plot. **C.** Normalized % EA vs Concentration plot.

No affectation

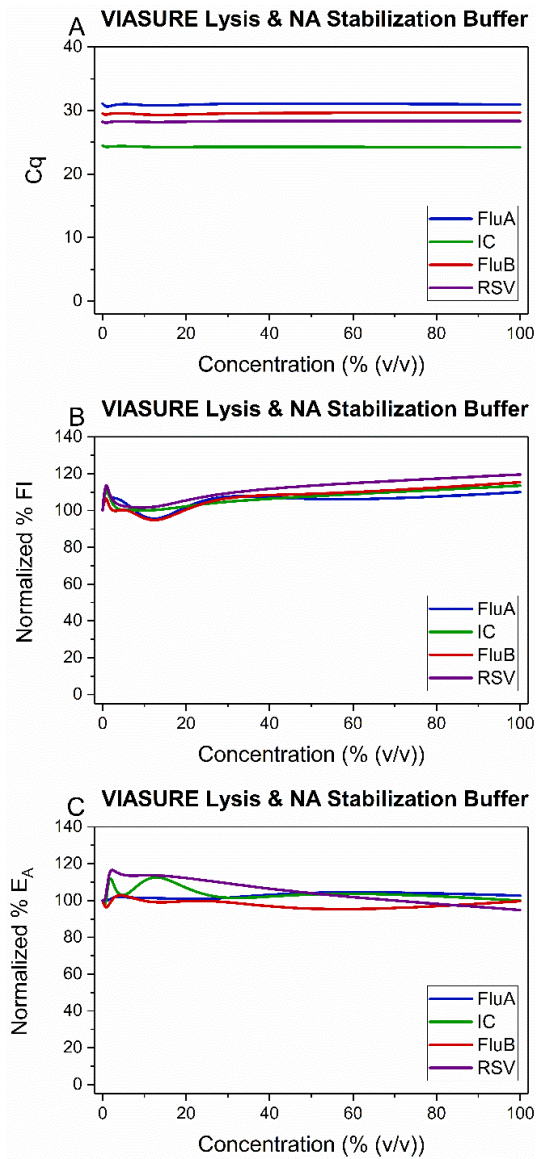


Figure 17. VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (Number 68). No affectation behaviour. **A.** Cq value vs Concentration plot. **B.** Normalized % FI vs Concentration plot. **C.** Normalized % E_A vs Concentration plot.

Enhancement

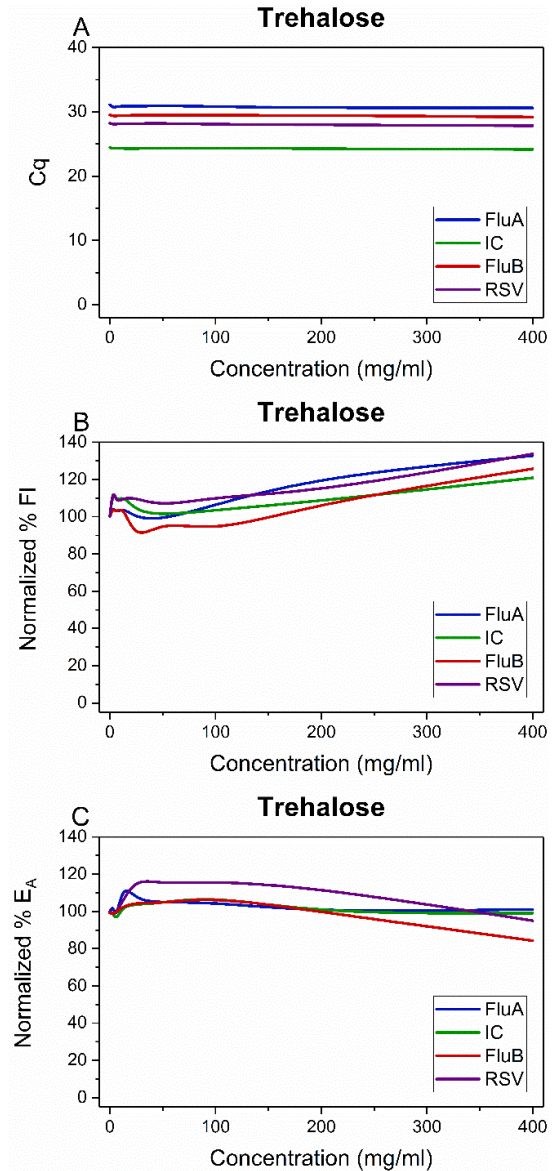


Figure 18. D-(+)-Trehalose Dihydrate (Number 78). Enhancement behaviour. **A.** Cq value vs Concentration plot. **B.** Normalized % FI vs Concentration plot. **C.** Normalized % E_A vs Concentration plot.

Retrotranscriptase affection

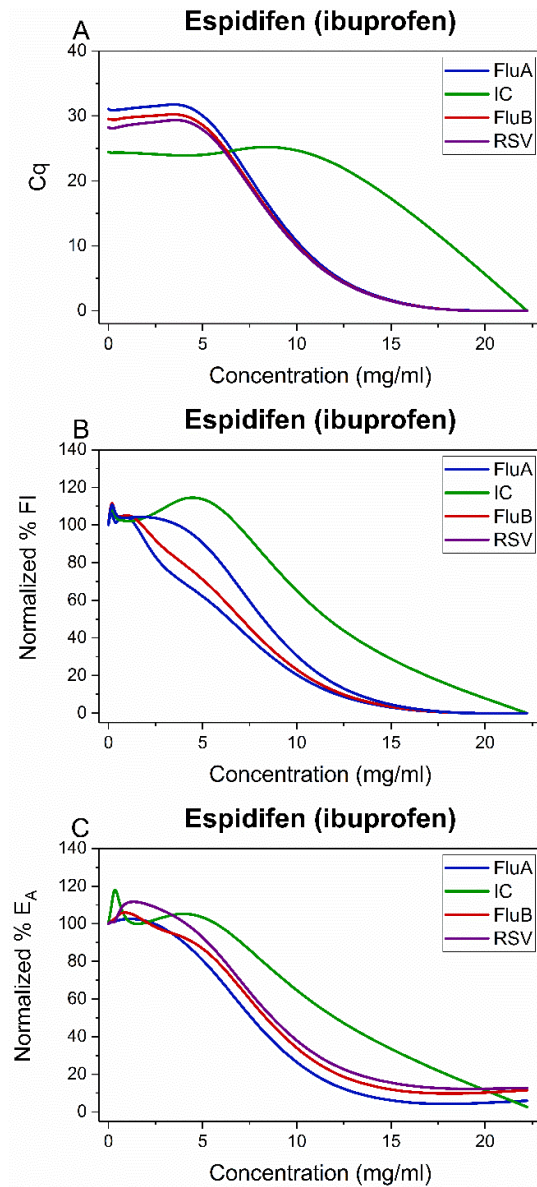


Figure 19. Espidifen 600 mg (Number 27). Total inhibition behaviour, retrotranscriptase more affected. **A.** Cq value vs Concentration plot. **B.** Normalized % FI vs Concentration plot. **C.** Normalized % E_A vs Concentration plot.

Fall fluorescence

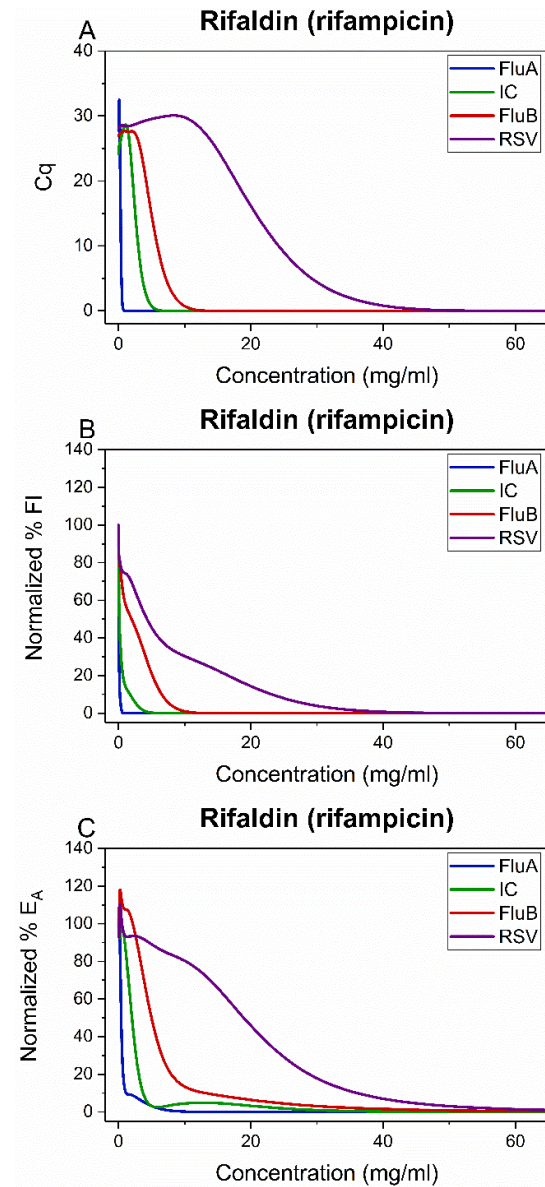


Figure 20. Rifaldin 300 mg (Number 13). Total inhibition behaviour, fall in the fluorescence. **A.** Cq value vs Concentration plot. **B.** Normalized % FI vs Concentration plot. **C.** Normalized % E_A vs Concentration plot. Note: Concentrations from 60 mg/ml to 214.29 mg/ml

One possible limitation of the present study might have been the use of two different non-inhibited control samples. However, all the MCNI values for the global reaction were well-calculated because the same RSV non-inhibited control was used in the two parts of the study, that it was critical because had the highest C_q value. Other limitations were, the substances were added directly over the qPCR reaction, without any type of treatment; and it has not been into account the degradation routes that take place in the human body in the case of substances used for patient treatment or ingested by the patient [216]. Therefore, it cannot be known exactly the MCNI value of the substances. However, this study presented the affectation of several substances over qPCR assay that could be useful for developing direct pre-processing buffers or for knowing how can affect possible inhibitors when biological samples matrix are directly adding into the qPCR reaction [199].

Diverse substances inhibited total or partially qPCR assay at determined concentrations. The type of inhibition and the possible mechanisms of several of them have been described in the literature. For example, sodium dodecyl sulfate (SDS) acts as a strong inhibitor of PCR reactions at concentrations greater than 0.01%, due to the strong anion-like SDS is adsorbed on the surface of the polymerase inhibiting the enzyme reaction [217]. The same concentration was reported in the present study. The NaOH alters pH of reaction and it produces the inhibition, or for MgCl₂ in which the inhibition of the polymerase reaction may be caused by Mg²⁺ changing the composition of the PCR buffer. The concentration ranges that they did not affect the reaction were 0-50 mM for NaOH and 0-10 mM for MgCl₂ [217]. In the present study, the MCNI values for these compounds were very close to the cited below. The difference may be that they were not tested the same concentrations values. On the other hand, it has been described that 4 mM EDTA produced partial inhibition and at higher concentrations (greater than 6 mM) inhibited totally the reaction [218]. In the case of the Tris-EDTA (TE) buffer tested in the present study, had the same pattern and produced total inhibition at greater concentrations than 12.5x (12.5 mM EDTA). In addition, this behavior was also observed with the addition of heparin, which reduced the fluorescence intensity to 66% at a concentration of 1 IU and inhibited the detection with concentrations greater than 5 IU. And with the addition of proteinase K, that reduce the fluorescence intensity to 33% at concentration of 0.005 mg/ml and inhibited totally at concentrations greater than 0.04 mg/ml [218]. In the present study, it has been observed the same behavior and the total inhibition has been produced in greater concentrations than 54.7 IU for HIBOR 3,500 UI anti Xa/0.2 ml (Bemiparin Sodium) and greater than the range of 10-20 mg/ml for proteinases K. It has been observed that depended on the type of proteinase K used, the MCNI value changed a little. It could be due to the different production of each proteinase K commercially available. While EDTA inhibits PCR by chelating Mg²⁺ ions, which are necessary for polymerase activity; heparin binds to DNA through divalent cations as Mg²⁺ ions or to unpaired nucleotides exposed during the denaturation of double-stranded DNA [215, 219]. In this way, heparin avoids the interaction between DNA and DNA polymerase producing inhibition. In addition, proteinase K acts as PCR inhibitor degrading DNA polymerase [200, 218]. Other substances that have been described in the literature as inhibitors were casein, dithiothreitol (DTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, and potassium chloride with concentration values of inhibition (when have been determined) were in the same order that the present study obtained [197, 200, 215]. In general, the comparison, between the values

obtained and the ones reported in the literature, suggested that the qPCR assay used withstood, in this study, greater concentrations of inhibitors substances better.

Although almost all substances that inhibit total or partially qPCR assay affected all targets in the same way, there were some exceptions. For example, lysozyme affected further the Cy5 target than the others. Although lysozyme has been described in the literature as PCR inhibitor, we were not able to find any studies indicating the qPCR mechanism of inhibition [215]. In the case of the antacid almagate ($\text{Al}_2\text{Mg}_6(\text{OH})_{14}(\text{CO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, Almax[®]), that has been described as a drug with high capacity to neutralize acid, neither studies have been found about affectation in qPCR assays or mechanisms of inhibition [220]. In this study, it has been observed that Almax 500 mg affected in a lesser degree FAM target than the others. Maybe, it changed the pH of reaction or, as this compound is a hydroxycarbonate of aluminum and magnesium, the presence of aluminum/magnesium inhibited the qPCR assay [221]. Due to the lack of information about the identities and mechanisms of many inhibitors makes it necessary to carry out more studies about them and, in that way, know better how can avoid the inhibition.

Regarding the compounds that did not produce changes in the qPCR reaction at any concentration, almost all are used as transport mediums or as blood extraction and quick isolation methods. It is important that the chemicals include in this type of products do not interfere in the qPCR reaction. Due to their function, they could be used, sometimes along with some type of quick treatment like heating, directly in the qPCR amplification [217]. Therefore, if the compounds produce inhibition, they could perform a misdiagnosis. For this reason, the importance of know what the affectation of these products over the qPCR reaction was.

It is well described in the literature that several compounds facilitate PCR reaction. Facilitators or enhancers were used to increase the specificity of PCR or to resist the effects of inhibitors, but some might inhibit PCR assay at determined concentrations [215, 222]. For example, Tween 20 and BSA were described as facilitators at low concentrations and as inhibitors at high concentrations. In the present study, Tween 20 at higher concentrations of 50% (v/v) produced partial inhibition, but at the range 12.5% (v/v)-50% (v/v) raised the fluorescence intensity. It has been described in the literature that Tween 20 was inhibitor at concentrations higher than 10% and enhancer at 2.5% (v/v), but in the presence of inhibitors [215, 223]. On the other hand, BSA enhanced fluorescence intensity at the range 1.88% (w/v)-30% (w/v) (18.8 g/l-300 g/l) and it did not show inhibition behaviors. In previous studies, the inhibition concentration was higher to 25 mg/ml and the enhancer behavior was in the concentration range 0.1 g/l-1.28 g/l [215, 222]. It has been described that the BSA is the most commonly used PCR facilitator due to its excellent binding capacity to inhibitors as heme, melanin, phenols... that preferred bind to BSA instead of polymerase. For Tween 20, the mechanism remains unclear [222]. In addition to this, betaine and trehalose were described as enhancers. In the case of the trehalose has been previously tested in the range concentrations 0.2 mol/L- 0.6 mol/L and in all cases, there was a strongly enhanced of the PCR efficiency. For betaine, at 1 mol/L also significantly increased PCR efficiency, but at 2 mol/L the amplification efficiency decreased. That suggested that betaine concentrations must be adjusted more carefully than do trehalose concentrations [224]. In the present study, trehalose had an enhancer behavior at the highest concentration tested (400 mg/ml = 1.06 mol/L) but at lower concentrations, there was no affectation. For betaine, there was enhancement of Cy5 target at the highest concentration (5 mol/L) and partial inhibition for the

rest of the targets (until 2.5 mol/L) (data not shown). Both are described as *Taq* polymerase thermostabilizers [224]. On the other hand, other substances like casein, DMSO, and formamide that are described as enhancers, but in the present study did not present this behavior [222]. In addition, these substances have been also described as inhibitors [200, 215, 225]. All these results suggested that it was necessary more quantity of facilitators to enhance the qPCR assay, implying that the qPCR reaction used in this study was very robust. Also, the previous studies measured the potential enhancement of the compounds in presence of well-known inhibitors or biological matrix that contained inhibitors, so the comparison performed could not be the most appropriate [226]. Therefore, the use of enhancers and their concentrations in qPCR assays must be done carefully.

In addition to the general behaviors observed in the study, it has been described other two more specific and presented in a few compounds. On the one hand, there were substances that affected more over reverse transcriptase reaction in front of the DNA polymerase reaction. In the literature, it has been described as some inhibitors that reduced the activity of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV RT). They were formamide, DMSO, glycerol, EDTA, guanidine hydrochloride, guanidine isothiocyanate, SDS, glycogen, or heparin [227]. The present study has not intended to prove that these compounds did not affect RT activity. Only indicate that there had been some drugs, salts and one inorganic base that affected more the RT reaction than the previously reported. In fact, a study described that the impact of inhibitors on reverse transcription were different depending on the MMLV RT used (wild type or mutant) [228]. Due to the lack of studies about the inhibition over the RT reaction, there is not enough information to give an explanation for the action mode of the compounds described in the present study.

On the other hand, two colored substances, the pH indicator Phenol red solution, and the antibiotic Rifampin 300 mg, affected in increasing order from Cy5 target to FAM target. They could be considered as fluorescence inhibitors because they directly affect the fluorescence detection. Regarding the mechanisms of inhibition that have been described for fluorescence reducers, they may form precipitates blocking fluorescence or interact with the fluorophore [222]. Also, in the case of hydrolysis probes, changes in the ion content of the reaction could affect probe hybridization; or the reduced 5'-3' exonuclease activity of DNA polymerase, due to some substances, could inhibit the hydrolysis of probes necessary for the fluorescence emission [222]. In this case, it would be possible that both compounds interfered with the excitation/emission wavelengths of the fluorophores. There are two main mechanisms by which a compound can directly interfere with a fluorescence assay: quenching and autofluorescence [229]. In the case of quenching, a compound can absorb light itself and attenuate the intensity of the excitation or emission light from the assay. The unwanted interception of the light is called the inner filter effect and could lead to false positives or negatives depending on the assay [229]. For example, it has been described that the humic substances, consisting of fluorescent compounds, inhibited qPCR amplification through the quenching of the fluorescence signal of double-stranded DNA binding dyes [230, 231]. A similar mechanism could explain the behavior of the pH indicator Phenol red solution and the antibiotic Rifampin 300 mg. In fact, both have been described as fluorescent molecules. In the case of Rifampin, did not exhibit naturally strong fluorescence. However, if it is oxidized the structure is altered and it is converted to a fluorescent product, which maximum fluorescence occurs at 480 nm when the excitation wavelength is 370 nm [232].

For the pH indicator phenol red, it has been described as highly fluorescent when excited at 440 nm [233]. The possible explanation of why FAM target was more affected than Cy5 target could be that the fluorophore used for FAM target was nearest in the emission spectrum of the interfering compounds than the fluorophore for the Cy5 target [188].

In addition, this study has been performed only in one product. However, due to all VIASURE Real Time PCR Kits include the same master mix and most substances affected all targets in the same way, this study could be applied in all VIASURE Real Time PCR Kits.

II.6 Conclusions

In the present study, 87 compounds, used for patient treatment, ingested by patients, added during sample preparation or included in the reaction mix, were tested in different concentrations in the qPCR assay. The MCMI value of each one has been calculated and different behaviors have been observed distinguishing among total inhibition, partial inhibition, no affectation, and enhancement. In addition, it has been described other two specific behaviors, the more affectation over retrotranscription compared to DNA polymerase reaction and the gradual fall of the fluorescence depending on the fluorophore. Although no mechanisms of inhibition have been studied, the inhibitor substances must be well-known to achieve the full potential of qPCR for rapid diagnosis, and more specifically for developing pre-qPCR processing systems. In addition, results obtained suggested that the qPCR assay used was well optimized, therefore the reaction was robust. In summary, this study presented the identification of several inhibitors not described in the literature until now; nevertheless, it is necessary to perform more studies about inhibitors and their action mechanisms.

Table 5 .Potentially Interfering Substances.

Number	Category	Generic Name	Active principle/s	Producer
1	Antacids	Almax 500 mg Comprimidos masticables	Almagate	Industrias Farmacéuticas Almirall, S.A. (Barcelona, Spain)
2	Antibiotic	Amoxicilina/ácido clavulánico cinfa 875 mg/125 mg polvo para suspensión oral en sobres EFG	Amoxicillin-Clavulanic acid	Laboratorios Cinfa, S.A. (Pamplona, Spain)
3	Antibiotic	Benzetacil 600,000	Benzathine Penicillin	Laboratorio Reig Jofré, S.A (Barcelona, Spain)
4	Antibiotic	Bronquidiazina C.R. Suspensión Oral	Tolu Balsam Syrup-Sodium Benzoate-Bromhexine Hydrochloride-Sulfamethoxazole-Trimethoprim	Faes Farma, S.A. (Vizcaya, Spain)
5	Antibiotic	Ciprofloxacino NORMON 500 mg comprimidos recubiertos con película EFG	Ciprofloxacin	Laboratorios Normon, S.A. (Madrid, Spain)
6	Antibiotic	Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x)	Penicillin G sodium-Streptomycin Sulfate-Amphotericin B	Life Technologies (California, USA)
7	Antibiotic	Gobemicina 1 g (Ampicilina)	Ampicillin	Laboratorios Normon, S.A. (Madrid, Spain)
8	Antibiotic	Kanamycin Sulfate (Ph. Eur., BP) pure, pharma grade BC	Kanamycin	Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain)
9	Antibiotic	Monurol 3 g granulado para solución oral en sobres EFG	Fosfomicin	Zambon, S.A. (Barcelona, Spain)
10	Antibiotic	PENILEVEL cápsulas	Penicillin V Potassium	Laboratorios ERN, S.A (Barcelona, Spain)
11	Antibiotic	Piperacilina/Tazobactam Accord 4g/0,5g polvo para solución para perfusión EFG	Piperacillin-Tazobactam	Accord Healthcare, S.L.U. (Barcelona, Spain)
12	Antibiotic	Rhodogil 750,000 U.I./125 mg comprimidos recubiertos con película	Spiramycin-Metronidazole	Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A (Madrid, Spain)
13	Antibiotic	Rifaldin 300 mg cápsulas duras	Rifampicin	Sanofi, S.A. (Paris, France)
14	Antibiotic	Tavanic 500 mg comprimidos recubiertos con película	Levofloxacin	Sanofi, S.A. (Paris, France)
15	Anticoagulant	HIBOR 3,500 UI anti Xa/0.2 ml	Bemiparin Sodium	Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A (Madrid, Spain)
16	Antidiarrheal	Fortasec 2 mg cápsulas duras	Loperamide Hydrochloride	Laboratorios Dr. Esteve, S.A. (Barcelona, Spain)
17	Antiemetic	Metoclopramida Kern Pharma 1 mg/ml solución oral EFG	Metoclopramide	Kern Pharma, S.L. (Barcelona, Spain)
18	Antihistamine	BILAXTEN 20 mg comprimidos	Bilastine	Faes Farma, S.A. (Vizcaya, Spain)
19	Antihistamine	Couldina con ácido acetilsalicílico	Acetylsalicylic acid-Chlorphenamine-Phenylephrine.	Laboratorios ALTER, S.A. (Madrid, Spain)

Table 5 (continued).

Number	Category	Generic Name	Active principle/s	Producer
20	Antihistamine	Ebastel Forte Flas 20 mg liofilizados orales	Ebastine	Industrias Farmacéuticas Almirall, S.A. (Barcelona, Spain)
21	Antihistamine	Loratadina cinfa 10 mg comprimidos EFG	Loratadine	Laboratorios Cinfa, S.A. (Pamplona, Spain)
22	Antihistamine	Polaramine 2 mg comprimidos	Dexchlorpheniramine	Merck Sharp & Dohme Spain, S.A (MSD) (Madrid, Spain)
23	Antipyretic	Adiro® 100 mg	Acetylsalicylic acid	Bayer Bitterfeld GmbH (Bitterfeld-Wolfen, Germany)
24	Antipyretic	Antalgin 550 mg	Naproxen	Atnahs Pharma UK Limited (Basildon, United Kingdom)
25	Antipyretic	Efferalgan® 1 g comprimidos efervescentes	Paracetamol	Bristol-Myers Squibb S.A. (Madrid, Spain)
26	Antipyretic	Enantyum 25 mg	Dexketoprofen Trometamol	Laboratorios Menarini, S.A. (Barcelona, Spain)
27	Antipyretic	Espidifen 600 mg granulado para solución oral sabor menta EFG	Ibuprofen	Zambon, S.A. (Barcelona, Spain)
28	Antipyretic	Nolotil 575 mg cápsulas duras	Metamizole	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany)
29	Antitussive	Angileptol comprimidos para chupar sabor menta-eucalipto	Chlorhexidine Hydrochloride-Benzocaine-Enoxolone	Alfasigma S.p.A. (Pomezia, Italy)
30	Antitussive	Flutox 3,54 mg/ml jarabe	Cloperastine Fendizoate	Zambon, S.A. (Barcelona, Spain)
31	Antitussive	Toseína 2 mg/ml solución oral	Codeine Phosphate Hemihydrate	Italfarmaco S.A. (Madrid, Spain)
32	Antiviral	Amantadine Level 100 mg cápsulas duras	Amantadine	Laboratorios ERN, S.A (Barcelona, Spain)
33	Antiviral	Ribavirina Teva 200 mg cápsulas duras EFG	Ribavirin	Teva, B.V. (Haarlem, Holland)
34	Bronchodilators	Ventolin 100 microgramos/inhalación suspensión para inhalación en envase a presión	Salbutamol	GlaxoSmithKline (GSK) (Brentford, United Kingdom)
35	Corticosteroid	Prednisona Kern Pharma 30 mg comprimidos EFG	Prednisone	Kern Pharma, S.L. (Barcelona, Spain)
36	Expectorant/Mucolytic	Fluimucil Forte 600 mg	Acetylcysteine	Zambon, S.A. (Barcelona, Spain)
37	Expectorant/Mucolytic	Iniston Antitusivo y Descongestivo jarabe	Dextromethorphan-Pseudoephedrine-Triprolidine	Johnson & Johnson, S.A. (New Jersey, USA)
38	Expectorant/Mucolytic	Iniston Mucolítico 50 mg/ml solución oral	Carbocysteine	Johnson & Johnson, S.A. (New Jersey, USA)
39	Expectorant/Mucolytic	Mucosan Retard 75 mg	Ambroxol Hydrochloride	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany)
40	Homeopathic medicinal preparation	Echinaprax	Anas barbariae C200, Echinacea angustifolia D8, Cuprum D10.	Laboratorios Homeopáticos Praxis, S.L. (Zaragoza, Spain)
41	Isotonic seawater solution	Rinasal	Isotonic seawater solution	Laboratorios Cinfa, S.A. (Pamplona, Spain)
42	Laxative	MovicolSabor Neutro 13,7 g polvo para solución oral en sobre	Macrogol 3350-Potassium Chloride-Sodium Bicarbonate-Sodium Chloride.	Norgine Pharmaceuticals Limited (Harefield, United Kingdom)

Table 5 (continued).

Number	Category	Generic Name	Active principle/s	Producer
43	Oral rehydration solutions	Citorsal, Solución de Rehidratación Oral	Calcium Lactate anhydrous-Magnesium Sulfate anhydrous-Citric acid anhydrous-Sodium Citrate anhydrous-Sodium Chloride anhydrous-Potassium Chloride anhydrous-Sodium Phosphate anhydrous-Glucose (monohydrate).	Laboratorios ERN, S.A (Barcelona, Spain)
44	Probiotic	βi-OralSuero, Sabor fresa	Distilled water, Glucose, Sodium Citrate, Acidulant (E-514(ii)), Potassium Chloride, Sweetener (E-950), Strawberry flavour, Stabilizer (E-414, vegetable oil), Sweetener (E-955), Food colour (E-120), Lactobacillus reuteri Protectis DSM 17938. Straw: Lactobacillus reuteri Protectis DSM 17938 (100 millions UFC).	Casen Recordati, S.L. (Zaragoza, Spain)
45	Probiotic	MegaLevure STICKS	Saccharomyces boulardii-Lactobacillus rhamnosus-Lactobacillus helveticus-Bifidobacterium longum-Fructooligosaccharides-Vitamin D3.	Laboratorios SALVAT, S.A. (Barcelona, Spain)
46	Proton pump inhibitor	Omeprazol NORMON 20 mg cápsulas duras gastrorresistentes EFG	Omeprazole	Laboratorios Normon, S.A. (Madrid, Spain)
47	Blood extraction	BD Vacutainer® Citrate Tubes	Sodium citrate	Becton, Dickinson and Company (BD) (New Jersey, USA)
48	Blood extraction	BD Vacutainer® Plastic K3EDTA tube with Lavender BD Hemogard™ Closure	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA)	Becton, Dickinson and Company (BD) (New Jersey, USA)
49	Blood extraction	BD Vacutainer® Plastic Lithium Heparin tube with Green BD Hemogard™ Closure	Lithium Heparin	Becton, Dickinson and Company (BD) (New Jersey, USA)
50	Blood extraction	BD Vacutainer® Serum Separator Tubes (BD SST™ II Advance)	Silica	Becton, Dickinson and Company (BD) (New Jersey, USA)
51	Blood extraction	VACUETTE® Z Serum (Sep) Clot Activator	Silica	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria)
52	Buffer	Tris-EDTA (TE) buffer solution	Tris-EDTA (TE) buffer	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
53	Enzyme	Lysozyme (from egg white) ≥ 30 000 FIP-U/mg	Lysozyme	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
54	Enzyme	Proteinase K	Proteinase K	Blirt S.A. (Gdańsk, Poland)
55	Enzyme	Proteinase K	Proteinase K	Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain)
56	Enzyme	Proteinase K, recombinant PCR Grade	Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
57	Enzyme	Proteinase K Solution	Proteinase K	Bioline (London, United Kingdom)
58	Enzyme	Proteinase K (VIASURE RNA-DNA Extraction Kit)	Proteinase K	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spain)
59	Inorganic acid	Hydrochloric acid 37% (HCl)	Hydrochloric acid (HCl)	Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain)

Table 5 (continued).

Number	Category	Generic Name	Active principle/s	Producer
60	Inorganic base	Potassium hydroxide (KOH)	Potassium hydroxide (KOH)	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
61	Inorganic base	Sodium Hydroxide pellets for analysis	Sodium hydroxide (NaOH)	Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain)
62	Ionic detergent	Sodium dodecyl sulfate solution	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
63	Non-ionic detergent	Triton™ CG-110	Triton™ CG-110	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
64	Non-ionic detergent	Tween 20 for molecular biology	Tween 20	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
65	pH indicator	Phenol red solution	Phenol red	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
66	Protein	BSA Low Endotoxin-30% Solution	Bovine Serum Albumin (BSA)	H2B (Limoges, France)
67	Protein	Casein from bovine milk-powder	Casein	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
68	Quick isolation procedure	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	TRIS HCl, resins, detergents, distilled water.	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spain)
69	Reactive	Betaine Ultrapure MB Grade	Betaine	USB Products. Affymetrix, Inc. (Ohio, USA)
70	Reactive	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
71	Reactive	DL-Dithiothreitol	Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
72	Reactive	Ethanol absolute pure	Ethanol	Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain)
73	Reactive	Formamide	Formamide	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
74	Reactive	Glycerol (Vegetal origin) USP GLR	Glycerol	Labbox Labware, S.L. (Barcelona, Spain)
75	Salt	Ammonium sulfate for molecular biology ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
76	Salt	Magnesium chloride solution for molecular biology (MgCl ₂)	Magnesium chloride (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
77	Salt	Potassium chloride for analysis (KCl)	Potassium chloride (KCl)	Panreac Applichem ITW Reagents (Barcelona, Spain)
78	Sugar	D-(+)-Trehalose Dihydrate, molecular biology grade	Trehalose	Life Sciences Advanced Technologies, Inc. (Florida, USA)
79	Transport medium	eNat® Specimen Collection and Preservation Optimized for Molecular Applications	Guanidine Thyocyanate, TRIS-EDTA, HEPES, Detergent.	COPAN Flock Technologies (Brescia, Italy)
80	Transport medium	ESwab® Multiple Specimen Collection and Transport System Modified Liquid Amies	Modified Liquid Amies medium: Sodium Chloride, Potassium Chloride, Calcium Chloride, Magnesium Chloride, Monopotassium Phosphate, Disodium Phosphate, Sodium Thioglycolate, distilled water.	COPAN Flock Technologies (Brescia, Italy)

Table 5 (continued).

Number	Category	Generic Name	Active principle/s	Producer
81	Transport medium	FecalSwab™ Optimal Universal Collection, Transport & Preservation System of Feces and Rectal Swabs for Enteric Diagnostics	Modified Cary Blair medium: Chloride salts, Sodium salts, Phosphate buffer, L-Cysteine, Agar, distilled water.	COPAN Flock Technologies (Brescia, Italy)
82	Transport medium	Mswab® Specimen Collection and Preservation Optimized for Molecular and Culture Applications	TRIS HCl, EDTA, TRIS Base, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Bovine Serum Albumin, distilled water.	COPAN Flock Technologies (Brescia, Italy)
83	Transport medium	PrimeStore® MTM	Guanidine thiocyanate, TCEP, Sodium Citrate, N-Lauroylsarcosine Sodium (NLS), Antifoam A, TRIS, EDTA, Ethanol (molecular grade), HCl, Nuclease-free water.	Longhorn Vaccines and Diagnostics LLC (Texas, USA)
84	Transport medium	Puritan® Opti-Swab™ Liquid Amies Collection & Transport System	Modified Liquid Amies medium: Sodium Chloride, Monopotassium Phosphate, Calcium Chloride, Disodium Phosphate, Potassium Chloride, Magnesium Chloride, Sodium Thioglycolate.	Puritan Medical Products CO (Maine, USA)
85	Transport medium	Puritan® Uni-Tranz-RT™ (for the collection and preservation of Virus, Chlamydia and Mycoplasma)	Hank's balanced salts: L-Glutamic acid, Bovine Serum Albumin, Phenol Red, Gelatin, Colistin, Sucrose, Amphotericin B, L-Cysteine, Vancomycin, HEPES, pH: 7.3 ± 0.2.	Puritan Medical Products CO (Maine, USA)
86	Transport medium	REAL Mini System- Total Fix	Mercury, Formaldehyde and PVA free medium.	Durviz, S.L. (Valencia, Spain)
87	Transport medium	Transport Medium Vircell (for collection and preservation of Virus, Chlamydia and Mycoplasma)	Hank's balanced salt solution: HEPES, Gelatin, Bovine Serum Albumin, Sucrose and compatible antibiotics.	Vircell, S.L. (Granada, Spain)

Table 6. Potentially Interfering Substances. Maximun concentration of no interference (MCMI).

Number	Generic Name	Initial Concentration (Units)	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 1. Cq and FI limits.	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 2. Efficency amplification.	Type of inhibition
1	Almax 500 mg Comprimidos masticables	222.22 mg/ml	≤ 1.74 mg/ml	≤ 3.47 mg/ml	Total inhibition (FluA less affected)
2	Amoxicilina/ácido clavulánico cinfa 875 mg/125 mg polvo para suspensión oral en sobres EFG	175.00 mg/ml-25.00 mg/ml	≤ 10.94 mg/ml-1.56 mg/ml	≤ 21.88 mg/ml-3.13 mg/ml	Total inhibition
3	Benzetacil 600,000	150,000.00 UI/ml	≤ 9,375.00 UI/ml	≤ 9,375.00 UI/ml	Total inhibition
4	Bronquidiazina C.R. Suspensión Oral	43.33 mg/ml-33.33 mg/ml-0.53 mg/ml-53.33 mg/ml-10.67 mg/ml	≤ 0.68 mg/ml-0.52 mg/ml-0.01 mg/ml-0.83 mg/ml-0.17 mg/ml	≤ 0.68 mg/ml-0.52 mg/ml-0.01 mg/ml-0.83 mg/ml-0.17 mg/ml	Total inhibition
5	Ciprofloxacino NORMON 500 mg comprimidos recubiertos con película EFG	200.00 mg/ml	≤ 50.00 mg/ml	≤ 25.00 mg/ml	Partial inhibition
6	Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x)	10,000.00 units/ml-10,000.00 µg/ml-25.00 µg/ml	≤ 312.50 units/ml-312.50 µg/ml-0.78 µg/ml	≤ 1,250.00 units/ml-1,250.00 µg/ml-3.13 µg/ml	Total inhibition
7	Gobemicina 1 g (Ampicilina)	250.00 mg/ml	≤ 7.81 mg/ml	≤ 15.63 mg/ml	Total inhibition
8	Kanamycin Sulfate (Ph. Eur., BP) pure, pharma grade BC	25.00 mg/ml	≤ 3.13 mg/ml	≤ 3.13 mg/ml	Total inhibition
9	Monurol 3 g granulado para solución oral en sobres EFG	666.67 mg/ml	≤ 5.21 mg/ml	≤ 10.42 mg/ml	Total inhibition
10	PENILEVEL cápsulas	800.00 mg/ml	≤ 25.00 mg/ml	≤ 50.00 mg/ml	Total inhibition
11	Piperacilina/Tazobactam Accord 4g/0,5g polvo para solución para perfusion EFG	42.86% (w/v)	≤ 0.33% (w/v)	≤ 0.33% (w/v)	Total inhibition (Retrotranscriptase affectation)
12	Rhodogil 750,000 U.I./125 mg comprimidos recubiertos con película	272,272.27 U.I./ml-45.45 mg/ml	≤ 8,522.73 U.I./ml-1.42 mg/ml	≤ 34,090.91 U.I./ml-5.68 mg/ml	Total inhibition
13	Rifaldin 300 mg cápsulas duras	214.29 mg/ml	≤ 0.05 mg/ml	≤ 0.21 mg/ml	Total inhibition (Fall fluorescence)
14	Tavanic 500 mg comprimidos recubiertos con película	400.00 mg/ml	≤ 6.25 mg/ml	≤ 12.50 mg/ml	Total inhibition
15	HIBOR 3,500 UI anti Xa/0.2 ml	3,500.00 UI	≤ 0.85 UI	≤ 6.84 UI	Total inhibition
16	Fortasec 2 mg cápsulas duras	1.43 mg/ml	≤ 0.04 mg/ml	≤ 1.43 mg/ml	Partial inhibition
17	Metoclopramida Kern Pharma 1 mg/ml solución oral EFG	1.00 mg/ml	≤ 0.13 mg/ml	≤ 0.13 mg/ml	Total inhibition
18	BILAXTEN 20 mg comprimidos	40.00 mg/ml	≤ 0.63 mg/ml	≤ 0.63 mg/ml	Total inhibition
19	Couldina con ácido acetilsalicílico	71.43 mg/ml-0.20 mg/ml-0.88 mg/ml	≤ 0.28 mg/ml-0.00 mg/ml-0.00 mg/ml	≤ 0.28 mg/ml-0.00 mg/ml-0.00 mg/ml	Total inhibition
20	Ebastel Forte Flas 20 mg liofilizados orales	100.00 mg/ml	≤ 100.00 mg/ml	≤ 100.00 mg/ml	No affectation
21	Loratadina cinfa 10 mg comprimidos EFG	6.67 mg/ml	≤ 3.33 mg/ml	≤ 1.67 mg/ml	Partial inhibition

Table 6 (continued).

Number	Generic Name	Initial Concentration (Units)	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 1. Cq and FI limits.	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 2. Efficiency amplification.	Type of inhibition
22	Polaramine 2 mg comprimidos	10.00 mg/ml	≤ 1.25 mg/ml	≤ 2.50 mg/ml	Total inhibition
23	Adiro® 100 mg	26.67 mg/ml	≤ 0.42 mg/ml	≤ 0.83 mg/ml	Total inhibition
24	Antalgin 550 mg	458.33 mg/ml	≤ 3.58 mg/ml	≤ 3.58 mg/ml	Total inhibition
25	Efferalgan® 1 g comprimidos efervescentes	9.52 mg/ml	≤ 0.60 mg/ml	≤ 1.19 mg/ml	Total inhibition (Retrotranscriptase affectation)
26	Enantyum 25 mg	16.67 mg/ml	≤ 8.33 mg/ml	≤ 8.33 mg/ml	Partial inhibition (Retrotranscriptase affectation)
27	Espidifen 600 mg granulado para solución oral sabor menta EFG	22.22 mg/ml	≤ 2.78 mg/ml	≤ 2.78 mg/ml	Total inhibition (Retrotranscriptase affectation)
28	Nolotil 575 mg cápsulas duras	359.38 mg/ml	≤ 2.81 mg/ml	≤ 5.62 mg/ml	Total inhibition
29	Angileptol comprimidos para chupar sabor menta-eucalipto	4.17 mg/ml-3.33 mg/ml-2.50 mg/ml	≤ 0.07 mg/ml-0.05 mg/ml-0.04 mg/ml	≤ 0.26 mg/ml-0.21 mg/ml-0.16 mg/ml	Total inhibition
30	Flutox 3,54 mg/ml jarabe	3.54 mg/ml	≤ 3.54 mg/ml	≤ 0.44 mg/ml	Partial inhibition
31	Toseína 2 mg/ml solución oral	2.00 mg/ml	≤ 0.50 mg/ml	≤ 1.00 mg/ml	Partial inhibition
32	Amantadine Level 100 mg cápsulas duras	333.33 mg/ml	≤ 2.60 mg/ml	≤ 2.60 mg/ml	Total inhibition
33	Ribavirina Teva 200 mg cápsulas duras EFG	72.73 mg/ml	≤ 4.55 mg/ml	≤ 36.36 mg/ml	Partial inhibition
34	Ventolin 100 microgramos/inhalación suspensión para inhalación en envase a presión	1,000.00 mg/ml	≤ 1,000.00 mg/ml	≤ 500.00 mg/ml	Partial inhibition
35	Prednisona Kern Pharma 30 mg comprimidos EFG	33.33 mg/ml	≤ 4.17 mg/ml	≤ 4.17 mg/ml	Partial inhibition
36	Fluimucil Forte 600 mg	428.57 mg/ml	≤ 3.35 mg/ml	≤ 3.35 mg/ml	Total inhibition
37	Iniston Antitusivo y Descongestivo jarabe	2.00 mg/ml-6.00 mg/ml-0.25 mg/ml	≤ 0.25 mg/ml-0.75 mg/ml-0.03 mg/ml	≤ 0.50 mg/ml-1.50 mg/ml-0.06 mg/ml	Enhancement
38	Iniston Mucolítico 50 mg/ml solución oral	50.00 mg/ml	≤ 0.78 mg/ml	≤ 3.13 mg/ml	Total inhibition
39	Mucosan Retard 75 mg	83.33 mg/ml	≤ 2.60 mg/ml	≤ 2.60 mg/ml	Total inhibition
40	Echinaprax	100.00% (v/v)	≤ 1.56% (v/v)	≤ 6.25% (v/v)	Total inhibition
41	Rinasal	100.00%(v/v)	≤ 25.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Partial inhibition
42	MovicolSabor Neutro 13,7 g polvo para solución oral en sobre	420.06 mg/ml-1.60 mg/ml-5.72 mg/ml-11.23 mg/ml	≤ 420.06 mg/ml-1.60 mg/ml-5.72 mg/ml-11.23 mg/ml	≤ 210.03 mg/ml-0.80 mg/ml-2.86 mg/ml-5.62 mg/ml	Enhancement

Table 6 (continued).

Number	Generic Name	Initial Concentration (Units)	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 1. Cq and FI limits.	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 2. Efficacy amplification.	Type of inhibition
43	Citorsal, Solución de Rehidratación Oral	0.09 mg/ml-0.05 mg/ml-0.06 mg/ml-0.52 mg/ml-0.12 mg/ml-0.30 mg/ml-0.14 mg/ml-10.00 mg/ml	≤ 0.01 mg/ml-0.01 mg/ml-0.01 mg/ml-0.06 mg/ml-0.01 mg/ml-0.04 mg/ml-0.02 mg/ml-1.25 mg/ml	≤ 0.00 mg/ml-0.00 mg/ml-0.00 mg/ml-0.02 mg/ml-0.00 mg/ml-0.01 mg/ml-0.00 mg/ml-0.31 mg/ml	Partial inhibition
44	Ri-OralSuero, Sabor fresa	100.00% (v/v)	≤ 12.50% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Total inhibition
45	MegaLevure STICKS	171.43 mg/ml-1.71.10 ⁹ UCF/ml-1.14.10 ⁹ UCF/ml-1.14.10 ⁹ UCF/ml-142.86 mg/ml-0.71 µg/ml	≤ 10.71 mg/ml-1.07.10 ⁸ UCF/ml-7.14.10 ⁷ UCF/ml-7.14.10 ⁷ UCF/ml-8.93 mg/ml-0.05 µg/ml	≤ 10.71 mg/ml-1.07.10 ⁸ UCF/ml-7.14.10 ⁷ UCF/ml-7.14.10 ⁷ UCF/ml-8.93 mg/ml-0.05 µg/ml	Partial inhibition (Retrotranscriptase affectation)
46	Omeprazol NORMON 20 mg cápsulas duras gastrorresistentes EFG	0.018 mg/ml	≤ 0.0001 mg/ml	≤ 0.0001 mg/ml	Total inhibition
47	BD Vacutainer® Citrate Tubes	100.00%(v/v)	≤ 12.50% (v/v)	≤ 50.00% (v/v)	Partial inhibition
48	BD Vacutainer® Plastic K3EDTA tube with Lavender BD Hemogard™ Closure	100.00%(v/v)	≤ 25.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Total inhibition
49	BD Vacutainer® Plastic Lithium Heparin tube with Green BD Hemogard™ Closure	100.00%(v/v)	≤ 3.13% (v/v)	≤ 6.25% (v/v)	Total inhibition
50	BD Vacutainer® Serum Separator Tubes (BD SST™ II Advance)	100.00%(v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
51	VACUETTE® Z Serum (Sep) Clot Activator	100.00%(v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
52	Tris-EDTA (TE) buffer solution	100.00x	≤ 6.25x	≤ 6.25x	Total inhibition
53	Lysozyme (from egg white) ≥ 30 000 FIP-U/mg	10 mg/ml	≤ 0.63 mg/ml	≤ 1.25 mg/ml	Total inhibition (RSV more affected)
54	Proteinase K	20.00 mg/ml	≤ 0.31 mg/ml	≤ 0.04 mg/ml	Total inhibition
55	Proteinase K	20.00 mg/ml	≤ 0.04 mg/ml	≤ 0.04 mg/ml	Total inhibition
56	Proteinase K, recombinant PCR Grade	20.00 mg/ml	≤ 0.16 mg/ml	≤ 0.08 mg/ml	Total inhibition
57	Proteinase K Solution	20.00 mg/ml	≤ 0.04 mg/ml	≤ 0.04 mg/ml	Total inhibition
58	Proteinase K (VIASURE RNA-DNA Extraction Kit)	20.00 mg/ml	≤ 0.16 mg/ml	≤ 0.16 mg/ml	Total inhibition
59	Hydrochloric acid 37% (HCl)	1.00 M	≤ 0.13 M	≤ 0.13 M	Total inhibition
60	Potassium hydroxide (KOH)	1.00 M	≤ 0.13 M	≤ 0.13 M	Total inhibition (Retrotranscriptase affectation)
61	Sodium Hydroxide pellets for analysis	2.00 M	≤ 0.13 M	≤ 0.06 M	Total inhibition
62	Sodium dodecyl sulfate solution	10.00% (w/v)	≤ 0.01% (w/v)	≤ 0.04% (w/v)	Total inhibition
63	Triton™ CG-110	100.00% (v/v)	≤ 0.78% (v/v)	≤ 1.56% (v/v)	Total inhibition

Table 6 (continued).

Number	Generic Name	Initial Concentration (Units)	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 1. Cq and FI limits.	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 2. Efficiency amplification.	Type of inhibition
64	Tween 20 for molecular biology	100.00% (v/v)	≤ 50.00% (v/v)	≤ 50.00% (v/v)	Enhancement
65	Phenol red solution	0.50% (w/v)	≤ 0.0010% (w/v)	≤ 0.0039% (w/v)	Total inhibition (Fall fluorescence)
66	BSA Low Endotoxin-30% Solution	30.00% (w/v)	≤ 30.00% (w/v)	≤ 30.00% (w/v)	Enhancement
67	Casein from bovine milk-powder	1.32 mg/ml	≤ 0.66 mg/ml	≤ 1.32 mg/ml	Partial inhibition
68	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
69	Betaine Ultrapure MB Grade	5.00 M	≤ 2.50 M	≤ 2.50 M	Enhancement
70	Dimethyl sulfoxide	100.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Total inhibition
71	DL-Dithiothreitol	1.00 M	≤ 0.02 M	≤ 0.50 M	Total inhibition
72	Ethanol absolute pure	99.90% (v/v)	≤ 6.24% (v/v)	≤ 12.49% (v/v)	Total inhibition
73	Formamide	100.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Total inhibition
74	Glycerol (Vegetal origin) USP GLR	100.00% (v/v)	≤ 50.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Partial inhibition
75	Ammonium sulfate for molecular biology ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.00 M	≤ 0.06 M	≤ 0.06 M	Total inhibition (Retrotranscriptase affectation)
76	Magnesium chloride solution for molecular biology (MgCl ₂)	100 mM	≤ 25.00 mM	≤ 25.00 mM	Partial inhibition
77	Potassium chloride for analysis (KCl)	1.00 M	≤ 0.13 M	≤ 0.25 M	Total inhibition (Retrotranscriptase affectation)
78	D-(+)-Trehalose Dihydrate, molecular biology grade	400.00 mg/ml	≤ 400.00 mg/ml	≤ 400.00 mg/ml	Enhancement
79	eNat [®] Specimen Collection and Preservation Optimized for Molecular Applications	100.00% (v/v)	≤ 1.56% (v/v)	≤ 3.13% (v/v)	Total inhibition
80	ESwab [®] Multiple Specimen Collection and Transport System Modified Liquid Amies	100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
81	FecalSwab [™] Optimal Universal Collection, Transport & Preservation System of Feces and Rectal Swabs for Enteric Diagnostics	100.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	Total inhibition
82	Mswab [®] Specimen Collection and Preservation Optimized for Molecular and Culture Applications	100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
83	PrimeStore [®] MTM	100.00% (v/v)	≤ 1.56% (v/v)	≤ 1.56% (v/v)	Total inhibition
84	Puritan [®] Opti-Swab [™] Liquid Amies Collection & Transport System	100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
85	Puritan [®] Uni-Tranz-RT [™] (for the collection and preservation of Virus, Chlamydia and Mycoplasma)	100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	≤ 100.00% (v/v)	No affectation
86	REAL Mini System- Total Fix	100.00% (v/v)	≤ 0.78% (v/v)	≤ 0.78% (v/v)	Total inhibition

Table 6 (continued).

Number	Generic Name	Initial Concentration (Units)	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 1. Cq and FI limits.	Maximum concentration of no interference (MCNI). Analysis 2. Efficacy amplification.	Type of inhibition
87	Transport Medium Vircell (for collection and preservation of Virus, Chlamydia and Mycoplasma)	100.00% (v/v)	≤ 25.00% (v/v)	≤ 50.00% (v/v)	Partial inhibition

Capítulo III Comparison of two quick isolation methods for traditional nucleic acid extraction for qPCR in fecal samples

De acuerdo con el Reglamento (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro, para que VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* pueda formar parte de un procedimiento de diagnóstico molecular, es necesario comprobar su funcionalidad con diversas evaluaciones clínicas. Por ello, se lleva a cabo una primera evaluación en colaboración con el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, en la que el método se compara con otro sistema de procesamiento rápido (MSwab de Copan), y con un método de extracción manual (VIASURE *RNA-DNA Extraction Kit*). El estudio se realiza con el excedente de muestras fecales que han sido sometidas al análisis clínico de rutina. Los resultados obtenidos de los diferentes métodos se comparan con el diagnóstico hospitalario. Este estudio está pendiente de ser publicado.

III.1 Abstract

Introduction: Gastrointestinal infections significantly affect health globally. Real-time or quantitative PCR (qPCR) has become a routine and robust technique for improving the diagnosis. Commercial extraction procedures for obtaining nucleic acids to carry out the amplification are usually expensive and time-consuming and require reagents that are dangerous to human health. This study evaluated two quick isolation processes in fecal specimens in comparison to a traditional extraction method in combination with qPCR. The results were contrasted with those from routine diagnostic methods.

Methods: This study was carried out on 80 stool samples from patients with clinical suspicion of gastrointestinal disease. Nucleic acids were obtained using three types of isolation procedures. The reference method was a commercially available kit with a silica-based matrix, the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit. Two rapid processes were compared to it: VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer and a transport medium compatible with PCR reagents, Copan MSwab™. Both yielded nucleic acids following a simple and rapid boiling procedure. Microorganisms were detected with VIASURE Real Time PCR gastrointestinal panel.

Results: A total of 127 pathogens (69 bacteria, 18 parasites, 40 viruses) in 74 positive samples were detected with the reference method. Coinfections were observed in 46% of total specimens. The most identified pathogens were adenovirus, *Campylobacter* spp., toxigenic *Clostridium difficile*, and rotavirus. Overall percent agreement, positive predictive value, and negative predictive value of both quick isolation methods were generally high (>90%) for most pathogens identified. However, quantification cycle values obtained for VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer were closer to the reference method than Copan MSwab™, most significantly so for the RNA virus. The processing time for the rapid procedures was about a third of the traditional method. However, the number of pathogens detected by molecular tools was higher than with routine methods, without 100% concordance between results.

Conclusions: qPCR assays improve gastrointestinal diseases diagnosis, detecting a large number of pathogens in a short time. Both quick isolation processes are simple and rapid and compatible with qPCR, which can improve the rapid diagnosis. In comparison with Copan MSwab™, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer identified the most microorganisms, and the quantification cycle values were closer to the reference method.

III.2 Introduction

Gastrointestinal diseases affect several million people worldwide and are a leading cause of child mortality and morbidity [69]. Almost 1.7 billion cases of diarrheal disease are reported every year, along with about 760,000 deaths in children under 5 years [116]. These diseases result from different enteric microorganisms, including bacteria, parasites, and viruses. Because the causative agent is not determined in up to 80% of cases, inappropriate use of antibiotics is common [116]. Therefore, rapid and accurate detection of gastrointestinal pathogens is needed to reduce inappropriate antibiotic use and increase treatment effectiveness [234].

Traditional diagnostic procedures such as culture methods, microscopic examination, and biochemical and immunology-based testing may not be universally available, can involve

comparatively low sensitivity and specificity, and are time-consuming [235]. Given the limitations of conventional diagnostic methods, the development of real-time or quantitative PCR technology (qPCR) has become a routine and robust technique that has improved detection and identification of infectious diseases [116, 149, 234].

The template necessary to carry out qPCR is usually obtained from a previous process known as nucleic acid (NA) extraction. This procedure must be efficient, robust, and compatible with specific and sensitive qPCR to achieve the best results in pathogen identification [160, 236]. Also, many factors should be considered for selecting the appropriate NA extraction method. These factors include the sample type from which the NA is isolated (for example blood, urine, stool, or sputum), organism to identify (as bacteria, virus, or parasite), and the desired NA target material (RNA and/or DNA) [160].

Fecal samples are among the most difficult specimens for NA isolation not only because of the presence of unknown PCR inhibitors but also because of its highly variable consistency and components depending on gut flora, lifestyle, nutrition, or environment [200]. In the literature, some inhibitors have been characterized and may include polysaccharides, bile salts, urea, glycolipids, hemoglobin, heparin, non-target NAs, and heavy metals [200, 208, 237]. Furthermore, the number of inhibitors present in the biological matrix can also vary between samples. Consequently, one of the main objectives of NA isolation is to remove or reduce PCR inhibitors for successful qPCR amplification. Thus, several procedures have been developed to remove or inactivate these types of compounds [200, 208, 237, 238].

Currently, many kits are commercially available for NA extraction. Often DNA and RNA are extracted separately, although some kits can co-extract both at the same time from different types of sources [160, 162, 163, 239]. Many of them are expensive, can be used only by qualified personnel, and are time-consuming, and sometimes they rely on reagents that are dangerous for human health [162, 163]. Therefore, it would be of interest to have a quick, simple, and universal procedure that is valid for NA isolation in fecal samples and can detect the most common gastrointestinal disease pathogens.

A novel procedure for processing stool specimens, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (LB), recently developed at Certest Biotec (Spain), is presented in this study. Included among its main components are resins, detergents, and an appropriate buffer. It is easy-to-use and fast, without toxic reagents, and can isolate bacterial, viral, and parasite DNA/RNA from stool specimens by using a simple and rapid boiling procedure, taking less than 30 minutes.

Consequently, this article evaluated two quick processes for NA isolation in fecal samples, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (LB) and Copan MSwab™ (CM) (transport medium compatible with PCR reagents, Italy). Each one was compared to the reference method (RM), VIASURE RNA-DNA Extraction Kit (Certest Biotec), a commercially available kit using a silica-based matrix. The results were also compared with those acquired through routine diagnostic methods.

III.3 Materials and methods

III.3.1 Study design

Eighty clinical fecal specimens left over from a prospective observational study were submitted for routine analysis of enteropathogens. Specimens were collected at Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza) during one month (July 2017).

The main inclusion criteria were fecal samples that had a previous clinical positive diagnosis for one or more pathogens (through immunology-based test, microscopy, and/or culture). Samples also were chosen to represent patients of all ages and both sexes and a wide range of consistency and color. Characterized samples were stored at -20°C until use.

III.3.2 NA isolation from fecal samples

In this study, three types of isolation procedures were carried out. The RM VIASURE RNA-DNA Extraction Kit (non-reference standard) is a commercially available kit using a silica-based matrix from Certest Biotec (Spain). The two quick isolation processes tested and compared with RM were VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (LB), recently developed by Certest Biotec (Spain), and Copan MSwab™ (CM) (Italy), a transport medium compatible with reagents of qPCR.

Stool measurements were standardized by using the same amount of starting material to enable direct comparison of procedures. Therefore, all samples were taken with FLOQSwabs™ from Copan (Italy), which yielded 100–150 mg of fecal specimen per sample (data not shown). The three procedures were performed the same day to avoid sample degradation from freeze–thaw cycles [240].

All supernatants obtained in these processes were stored before analyses at 4°C if the qPCR amplification was performed on the same day or at -20°C if the test was carried out the day following NA isolation.

The three isolation procedures are described briefly below.

III.3.2.1 VIASURE RNA-DNA Extraction Kit (RM)

RM was designed for extraction and purification of DNA/RNA from several sample sources using a mini-spin column system. The preparation of the starting biological material and NA isolation were completed following the manufacturer's instructions. In this case, the procedure followed was bacterial/viral NA isolation from the supernatant of stool suspension.

The DNA/RNA extraction process was based on sample lysis, using a specific buffer including proteinase K. It also was based on the interaction of NA with silica membranes in optimal buffer conditions. After washing steps, NAs were finally eluted in 100 µl Elution Buffer.

III.3.2.2 VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (LB)

With this assay, the procedure was as follows: a fecal sample was added to 1 ml LB. This fecal suspension was incubated for 5 minutes at 100°C, mixed by snap vortexing for 10 seconds, and

then centrifuged at maximum speed (around 17,500 ×g) for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant was transferred into a clean collection vial and directly used in qPCR.

III.3.2.3 Copan MSwab™ (CM)

CM is a molecular medium for collection, transportation, and processing of clinical specimens that is compatible with PCR Master Mixes. It can be used with both rapid direct and traditional NA extraction methods for the detection of pathogens with molecular amplification assays.

The procedure for NA isolation was performed according to the manufacturer's instructions, although with some modifications. For all samples, the boiling step was 5 minutes at 100°C, and the centrifugation was at 10,000 ×g for 2 minutes. Finally, the supernatant was transferred into a clean tube, and a 1:4 dilution was made in nuclease-free water for use in qPCR.

III.3.3 Routine diagnostic methods

Routine tests for clinical diagnostics were performed at Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza). Several specific identification methods were carried out depending on the suspected pathogen. Bacteria were cultured using standard methods for *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Plesiomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. Colonies identified as presumptive pathogens were confirmed using Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and serological and/or biochemical tests. On the other hand, viruses were detected in fecal specimens with rapid immunochromatographic tests (CerTest Rota+Adeno+Astro+Noro from Certest Biotec; Spain). Finally, parasites were identified by microscopic examination of formaldehyde-fixed samples along with specific staining techniques for proper microscopic detection and identification of the parasite.

III.3.4 qPCR assays

After NA isolation, supernatants were tested for the most common gastrointestinal disease pathogens using the VIASURE Real Time PCR Detection Kit gastrointestinal panel. These tests have been designed for specific detection and differentiation of bacteria, viruses and parasites in clinical samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection.

In this study microbiological gastrointestinal pathogens or toxins tested were *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., toxigenic *Clostridium difficile*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)/*Shigella*, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC subgroup of EHEC), *Shigella dysenteriae* Typ1, *Yersinia enterocolitica*, *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, adenovirus, astrovirus, norovirus GI and GII, rotavirus, and sapovirus.

Although most populations infected with *Helicobacter pylori* develop no clinical symptoms, it was included in the present study because it is an important risk factor for the development of gastric cancer and mucosal-associated lymphoid tissue lymphoma [241].

Consequently, 15 VIASURE Real Time PCR Detection kits were used to identify microorganisms: VIASURE *Aeromonas* + *Yersinia enterocolitica* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Clostridium difficile* toxins A/B Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *E. coli* EHEC + EPEC + EIEC Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *E. coli* ETEC + EIEC Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Helicobacter pylori* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Salmonella*; *Campylobacter* & *Shigella*/EIEC Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Salmonella*; *Campylobacter* & *Y. enterocolitica* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Blastocystis hominis* + *Dientamoeba fragilis* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Cryptosporidium*; *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Adenovirus* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Astrovirus* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Norovirus GI* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit; VIASURE *Rotavirus* Real Time PCR Detection Kit; and VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit.

qPCR assays were performed following the manufacturer's recommendations in a thermocycler (Cobas Z480; Roche Diagnostics). The reaction consisted of 15 µl of rehydration buffer and 5 µl of supernatants previously obtained in each of the procedures. Amplification protocol depended on the desired NA target material (DNA or RNA) to detect. The DNA program involved one cycle at 95°C for 2 minutes for initial denaturation, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds and annealing/ data collection at 60°C for 50 seconds. The RNA program was the same as for DNA but with prior heating at 45°C for 15 minutes for reverse transcription. Targets were amplified and detected in FAM channel, HEX channel, ROX channel, and Cy5 channel.

III.3.5 Data and statistical analysis

The quantification cycle (C_q) is defined as the point at which the fluorescence intensity increases above the detectable level and corresponds proportionally to the initial number of template DNA/RNA molecules in the sample [235].

The 80 supernatants obtained for each isolation method were tested using 15 respective VIASURE Real Time PCR Kits for the identification of 23 pathogens. In some cases, there were not enough RM NAs for the PCR assays. Thus, the detection was not complete in *Aeromonas* spp. ($n = 65$), EHEC ($n = 73$), EPEC ($n = 73$), STEC (EHEC) ($n = 73$), *Shigella dysenteriae* Typ1 ($n = 73$), and *Yersinia enterocolitica* ($n = 78$). Consequently, the total number of analyses (depending on the pathogen) performed in each method was 1795.

In this study, only a single test by the isolation process/qPCR assay was carried out. No replicates were performed. With a C_q value ≤ 40 , the sample was considered positive for a determinate pathogen. In RM, if the C_q value was 35–40 (random positive), the sample was considered positive when amplified in two different runs. For C_q values >40 (in any process), the sample was considered negative.

All runs were considered valid because the internal NA and positive and negative controls passed. The assay was repeated in duplicate in the case of an anomalous result resulting from a possible pipetting error. If there were not enough samples, the result was excluded from the study because of a lack of repeated data. This occurred in six analyses: *Aeromonas* spp. ($n = 1$), *Campylobacter* spp. ($n = 2$), toxigenic *Clostridium difficile* ($n = 1$), rotavirus ($n = 1$), and sapovirus ($n = 1$). Thus, there were 1789 data points for each isolation method.

In addition, if the internal NA control was negative, that could be because of the presence of inhibitors in the reaction that evaded removals [237]. Therefore, it was necessary to make a 1:4 or 1:10 sample dilution before addition for qPCR. Results obtained were included in the study.

The statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2010 for Windows and SPSS software v22.0 for Windows (SPSS Ibérica, Madrid, Spain). An initial exploratory analysis of all variables was carried out. Continuous variables were expressed as means with standard deviations, whereas qualitative variables were expressed as frequencies and percentages.

On the other hand, the results obtained in RM were considered as “true results”. Therefore, RM was the internal reference standard in this study. Overall percent agreement (OPA), positive predictive value (PPA), and negative predictive value (NPA) and their respective confidence intervals (95%CI) were calculated from the number of true-positive (TP), false-positive (FP), false-negative (FN), and true-negative (TN) results. The 95% CI was calculated using the modified Wald method, with GraphPad QuickCalcs.

The comparison of differences among different NA isolation processes was carried out on Cq values. ANOVA for correlated samples was used for normally distributed metric data. Bonferroni corrections were made for multiple comparisons. Non-parametric tests (Friedman and Wilcoxon tests) were used for skewed data. A $P < 0.05$ was considered significant.

III.4 Results

III.4.1 Identification of gastrointestinal pathogens

The 80 positive fecal samples for routine diagnostic methods were tested using molecular diagnostics (RM), and 127 pathogens (69 bacteria, 18 parasites, and 40 viruses) were identified in 74 specimens. Coinfections in stool samples are quite common and have been previously described in the literature [83, 242]. In 34/74 of positive samples (45.9%), two or more agents were diagnostic.

In this study, 69 bacteria were identified. *Campylobacter* spp. and toxigenic *Clostridium difficile* were both found in 16/127 (12.6%), followed by EPEC in 10/127 (7.9%), *Salmonella* spp. in 9/127 (7.1%), *Helicobacter pylori* in 8/127 (6.3%), and *Aeromonas* spp. in 5/127 (3.9%). STEC (EHEC) (2/127; 1.6%), *Yersinia enterocolitica* (2/127; 1.6%), and EIEC/*Shigella* (1/127; 0.8%) were also observed. No EHEC, ETEC, or *Shigella dysenteriae* Type 1 were detected.

The results revealed a total of 18 parasites. The most frequently detected was *Blastocystis hominis* (8/127; 6.3%) followed by *Dientamoeba fragilis* (7/127; 5.5%), and *Giardia lamblia* (3/127; 2.4%). *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* were not found.

In addition, 40 viruses were detected. Most of the viral infections were caused by adenovirus (18/127; 14.2%) and rotavirus (16/127; 12.6%). Norovirus GI and GII were both found (both 2/127; 1.6%), and astrovirus and sapovirus were also identified (both 1/127; 0.8%).

III.4.2 Comparison of NA isolation methods

Because RM was considered the internal reference standard in this study, OPA, PPA, and NPA were calculated (**Table 7**). The OPA of most targets for both isolation methods exceeded 96.0%, with the exception in CM for *Aeromonas* spp. (95.3%; 95%CI: 86.6%–98.9%), adenovirus (91.3%; 95%CI: 82.8%–96.0%), and rotavirus (92.4%; 95%CI: 84.1%–96.8%).

Among positive samples, most targets isolated with LB showed a PPA > 90.0%. However, some pathogens had a lower percentage such as *Aeromonas* spp. (80.0%; 95%CI: 36.0%–98.0%), *Helicobacter pylori* (87.5%; 95%CI: 50.8%–99.9%), *Dientamoeba fragilis* (57.1%; 95%CI: 25.0%–84.3%), norovirus GI (50.0%; 95%CI: 9.5%–90.6%), and rotavirus (87.5%; 95%CI: 62.7%–97.8%). The totals of ‘no identified samples’ were 10/127 (7.9%; 95%CI: 4.2%–14.0%) and for these specimens, the corresponding RM Cq values were above 30.

Also, most microorganisms processed with CM presented a PPA > 90.0%, but some targets obtained equal to or less percentage than LB: *Aeromonas* spp. (40.0%; 95%CI: 11.6%–77.1%), *Helicobacter pylori* (75.0%; 95%CI: 40.1%–93.7%), *Blastocystis hominis* (87.5%; 95%CI: 50.8%–99.9%), *Dientamoeba fragilis* (57.1%; 95%CI: 25.0%–84.3%), adenovirus (61.1%; 95%CI: 38.5%–79.8%), and rotavirus (68.8%; 95%CI: 44.2%–86.1%). In addition, STEC (EHEC) and norovirus GI were not detected in CM supernatants. With this isolation method, the number of ‘no identified samples’ was 28/127 (22.1%; 95%CI: 15.7%–30.1%), and the corresponding RM Cq values were above 28, except for two rotavirus samples whose Cq values were 12.

The NPA of all targets for both processing methods was generally high (>98.0%) among the characterized samples.

Additionally, Cq values (mean \pm standard deviation) of NA isolation processes were compared. **Table 8** shows the only qPCR-positive samples ($n > 3$) for the three isolation methods, so the number of samples differed from total pathogens identified. The statistical comparison among the three isolation procedures indicated significant differences ($P = 0.000$) in all pathogens and processes ($n = 97$). The Cq value was significantly lower for RM (23.15 ± 7.36) than LB (24.88 ± 7.32) and CM (27.74 ± 6.81). Also, for each pathogen, methods differed significantly ($P < 0.05$). Two-by-two comparisons are shown in **Table 8**. For RM-LB, *Campylobacter* spp., *Blastocystis hominis* and rotavirus differed, but Cq mean values were no higher than 3. Conversely, $P < 0.05$ for RM-CM and LB-CM for each pathogen (except for *Helicobacter pylori* and *Blastocystis hominis* for which LB and CM did not differ). In the case of RM-CM, the Cq mean value difference was 2–9.

In addition, Cq values from qPCR-positive samples of minority pathogens ($n \leq 3$) were higher for CM than for RM and LB (**Table 9**). In some pathogens, particularly in viruses (astrovirus and norovirus GII), there were more than 10 cycles of difference in CM Cq values with respect to RM, while for LB there was a 1–6 Cq value shift. Also, STEC (EHEC) and norovirus GI were not detected in CM (LB identified 2/2 STEC (EHEC) and 1/2 norovirus GI).

Table 7. Comparison of two quick procedures for routine test using stool samples ($n = 80$).

Target	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer				Copan MSwab™, a				VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (% [95%CI]) ^b			Copan MSwab™ (% [95%CI]) ^b		
	TP	FP	FN	TN	TP	FP	FN	TN	OPA	PPA	NPA	OPA	PPA	NPA
<i>Aeromonas</i> spp.* #	4	0	1	59	2	0	3	59	98.4 (90.9, 100)	80.0 (36.0, 98.0)	100 (92.7, 100)	95.3 (86.6, 98.9)	40.0 (11.6, 77.1)	100 (92.7, 100)
<i>Campylobacter</i> spp.*	16	0	0	62	15	0	1	62	100 (94.4, 100)	100 (77.3, 100)	100 (93.0, 100)	98.7 (92.4, 100)	93.8 (69.7, 100)	100 (93.0, 100)
<i>Clostridium difficile</i> toxin A/toxin B*	16	0	0	63	15	0	1	63	100 (94.4, 100)	100 (77.3, 100)	100 (93.1, 100)	98.7 (92.5, 100)	93.8 (69.7, 100)	100 (93.1, 100)
EHEC #	0	1	0	72	0	0	0	73	98.6 (91.9, 100)	-	98.6 (91.9, 100)	100 (94.0, 100)	-	100 (94.0, 100)
EIEC/ <i>Shigella</i>	1	0	0	79	1	0	0	79	100 (94.5, 100)	100 (16.8, 100)	100 (94.4, 100)	100 (94.5, 100)	100 (16.8, 100)	100 (94.4, 100)
EPEC #	9	0	1	63	9	0	1	63	98.6 (91.9, 100)	90.0 (57.4, 100)	100 (93.1, 100)	98.6 (91.9, 100)	90.0 (57.4, 100)	100 (93.1, 100)
ETEC	0	0	0	80	0	0	0	80	100 (94.5, 100)	-	100 (94.5, 100)	100 (94.5, 100)	-	100 (94.5, 100)
<i>Helicobacter pylori</i>	7	0	1	72	6	0	2	72	98.8 (92.6, 100)	87.5 (50.8, 99.9)	100 (93.9, 100)	97.5 (90.8, 99.8)	75.0 (40.1, 93.7)	100 (93.9, 100)
<i>Salmonella</i> spp.	9	0	0	71	9	0	0	71	100 (94.5, 100)	100 (65.6, 100)	100 (93.9, 100)	100 (94.5, 100)	100 (65.6, 100)	100 (93.9, 100)
STEC (EHEC) #	2	0	0	71	0	0	2	71	100 (94.0, 100)	100 (29.0, 100)	100 (93.9, 100)	97.3 (90.0, 99.8)	0 (0, 71.0)	100 (93.9, 100)
<i>Shigella dysenteriae</i> Type 1 #	0	0	0	73	0	0	0	73	100 (94.0, 100)	-	100 (94.0, 100)	100 (94.0, 100)	-	100 (94.0, 100)
<i>Yersinia enterocolitica</i> #	2	0	0	76	2	0	0	76	100 (94.4, 100)	100 (29.0, 100)	100 (94.2, 100)	100 (94.4, 100)	100 (29.0, 100)	100 (94.2, 100)
<i>Blastocystis hominis</i>	8	0	0	72	7	0	1	72	100 (94.5, 100)	100 (62.8, 100)	100 (93.9, 100)	98.8 (92.6, 100)	87.5 (50.8, 99.9)	100 (93.9, 100)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	0	0	80	0	0	0	80	100 (94.5, 100)	-	100 (94.5, 100)	100 (94.5, 100)	-	100 (94.5, 100)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	4	0	3	73	4	0	3	73	96.3 (89.1, 99.2)	57.1 (25.0, 84.3)	100 (94.0, 100)	96.3 (89.1, 99.2)	57.1 (25.0, 84.3)	100 (94.0, 100)
<i>Entamoeba histolytica</i>	0	0	0	80	0	0	0	80	100 (94.5, 100)	-	100 (94.5, 100)	100 (94.5, 100)	-	100 (94.5, 100)
<i>Giardia lamblia</i>	3	0	0	77	3	0	0	77	100 (94.5, 100)	100 (38.3, 100)	100 (94.3, 100)	100 (94.5, 100)	100 (38.3, 100)	100 (94.3, 100)
Adenovirus	17	0	1	62	11	0	7	62	98.8 (92.6, 100)	94.4 (72.4, 100)	100 (93.0, 100)	91.3 (82.8, 96.0)	61.1 (38.5, 79.8)	100 (93.0, 100)
Astrovirus	1	0	0	79	1	0	0	79	100 (94.5, 100)	100 (16.8, 100)	100 (94.4, 100)	100 (94.5, 100)	100 (16.8, 100)	100 (94.4, 100)
Norovirus GI	1	0	1	78	0	0	2	78	98.8 (92.6, 100)	50.0 (9.5, 90.6)	100 (94.4, 100)	97.5 (90.8, 99.8)	0 (0, 71.0)	100 (94.4, 100)
Norovirus GII	2	0	0	78	2	0	0	78	100 (94.5, 100)	100 (29.0, 100)	100 (94.4, 100)	100 (94.5, 100)	100 (29.0, 100)	100 (94.4, 100)
Rotavirus*	14	0	2	63	11	1	5	62	97.5 (90.7, 99.8)	87.5 (62.7, 97.8)	100 (93.1, 100)	92.4 (84.1, 96.8)	68.8 (44.2, 86.1)	98.4 (90.7, 100)
Sapovirus*	1	0	0	78	1	0	0	78	100 (94.4, 100)	100 (16.8, 100)	100 (94.4, 100)	100 (94.4, 100)	100 (16.8, 100)	100 (94.4, 100)

a: TP, true positive; FP, false positive; FN, false negative; TN, true negative

b: CI, confidence interval; OPA, overall percent agreement; PPA, positive percent agreement; NPA, negative percent agreement

*Excluded samples due to lack of repeated data ($n = 1$ *Aeromonas* spp.; $n = 2$ *Campylobacter* spp.; $n = 1$ *Clostridium difficile* toxin A/toxin B; $n = 1$ rotavirus; $n = 1$ sapovirus).

Less than 80 samples. Not enough RM nucleic acid. *Aeromonas* spp. ($n = 65$), EHEC ($n = 73$), STEC (EHEC) ($n = 73$), EPEC ($n = 73$), *Shigella dysenteriae* Type 1 ($n = 73$), and *Yersinia enterocolitica* ($n = 78$)

Table 8. Performance of three isolation methods measured by real-time PCR (VIASURE Real Time PCR Detection Kits) for the majority pathogens ($n > 3$).

Target	Number of samples	RM mean Cq value (\pm SD) ^{a,d}	LB mean Cq value (\pm SD) ^{b,d}	CM mean Cq value (\pm SD) ^{c,d}	P value (RM-LB) ^{a,b}	P value (RM-CM) ^{a,c}	P value (LB-CM) ^{b,c}
All pathogens	97	23.15 \pm 7.36	24.88 \pm 7.32	27.74 \pm 6.81	0.000*	0.000*	0.000*
<i>Campylobacter</i> spp.	15	23.79 \pm 4.29	26.41 \pm 3.77	28.98 \pm 3.65	0.001*	0.000*	0.000*
<i>Clostridium difficile</i> toxin A/toxin B	15	26.61 \pm 2.40	28.25 \pm 2.59	30.23 \pm 2.79	0.077	0.000*	0.004*
EPEC	8	26.98 \pm 4.63	26.50 \pm 4.76	29.43 \pm 4.67	1.000	0.012*	0.001*
<i>Helicobacter pylori</i>	6	32.86 \pm 0.76	33.05 \pm 1.23	35.12 \pm 1.78	1.000	0.045*	0.159
<i>Salmonella</i> spp.	9	21.24 \pm 4.62	22.26 \pm 4.75	25.62 \pm 6.37	0.242	0.023*	0.021*
<i>Blastocystis hominis</i>	7	27.20 \pm 6.34	29.43 \pm 5.18	30.65 \pm 5.23	0.011*	0.009*	0.064
Adenovirus	11	20.54 \pm 10.35	21.79 \pm 12.42	23.40 \pm 11.99	0.362	0.002*	0.002*
Rotavirus	11	11.38 \pm 1.82	14.13 \pm 3.60	20.05 \pm 5.03	0.009*	0.003*	0.004*
a: RM, reference method (VIASURE RNA-DNA Extraction Kit)							
b: LB, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer							
c: CM, Copan MSwab™							
d: SD, standard deviation							
Note: Only qPCR-positive samples for three methods were included, so numbers of samples differ from total pathogens identified.							
P values of 2-x-2 comparisons were calculated with ANOVA except for rotavirus, for which the Wilcoxon test was used.							
*P < 0.05, indicating significant differences.							

Table 9. Cq value obtained for minority pathogens ($n \leq 3$).

Target	Sample	RM ^a Cq value	LB ^b Cq value	CM ^c Cq value	ΔCq RM-LB ^{a,b}	ΔCq RM-CM ^{a,c}	ΔCq LB-CM ^{b,c}
<i>Aeromonas</i> spp.	1	23.09	27.95	28.90	4.86	5.81	0.95
<i>Aeromonas</i> spp.	1	22.80	25.30	25.90	2.50	3.10	0.60
<i>Aeromonas</i> spp.	1	32.58	33.77	ND	1.19	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	1	33.61	ND	ND	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	1	31.59	32.62	ND	1.03	-	-
EIEC/ <i>Shigella</i>	1	13.69	16.49	18.05	2.80	4.36	1.56
STEC (EHEC)	1	31.59	32.62	ND	1.03	-	-
STEC (EHEC)	1	35.24	35.75	ND	0.51	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	23.99	25.05	28.44	1.06	4.45	3.39
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	21.81	23.19	24.97	1.38	3.16	1.78
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	33.96	ND	ND	-	-	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	33.95	ND	36.96	-	3.01	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	29.75	32.13	34.78	2.38	5.03	2.65
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	33.65	38.39	ND	4.74	-	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	32.18	34.65	34.15	2.47	1.97	0.50
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	33.24	33.88	34.96	0.64	1.72	1.08
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	34.45	ND	ND	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i>	1	25.92	28.06	29.70	2.14	3.78	1.64
<i>Giardia lamblia</i>	1	28.32	29.59	31.29	1.27	2.97	1.70
<i>Giardia lamblia</i>	1	24.52	26.33	26.76	1.81	2.24	0.43
Astrovirus	1	12.32	17.42	29.04	5.10	16.72	11.62
Norovirus GI	1	28.57	34.30	ND	5.73	-	-
Norovirus GI	1	34.70	ND	ND	-	-	-
Norovirus GII	1	19.76	20.81	36.40	1.05	16.64	15.59
Norovirus GII	1	16.90	18.88	28.49	1.98	11.59	9.61
Sapovirus	1	15.54	21.61	21.61	6.07	6.07	0.00
a: RM, reference method (VIASURE RNA-DNA Extraction Kit)							
b: LB, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer							
c: CM, Copan MSwab™							
ND: Not detected							

In terms of processing time, LB offered the fastest results (~20 minutes), while CM was carried out in ~30 minutes. Both required minimal user training. In contrast, RM required the longest time (~80 minutes) and had to be performed by qualified personnel. The indicated treatment time corresponds to the processing of four samples.

III.4.3 Comparison between routine diagnostic methods and molecular diagnostic procedures

Microbiological diagnosis identified 83 pathogens in 80 stool specimens. However, because of the coinfections described above, RM, LB, and CM detected 127, 118, and 100 pathogens, respectively, in 74 samples. Six fecal samples were negative for these molecular processes. **Figure 21** shows the pathogens identified according to each procedure method.

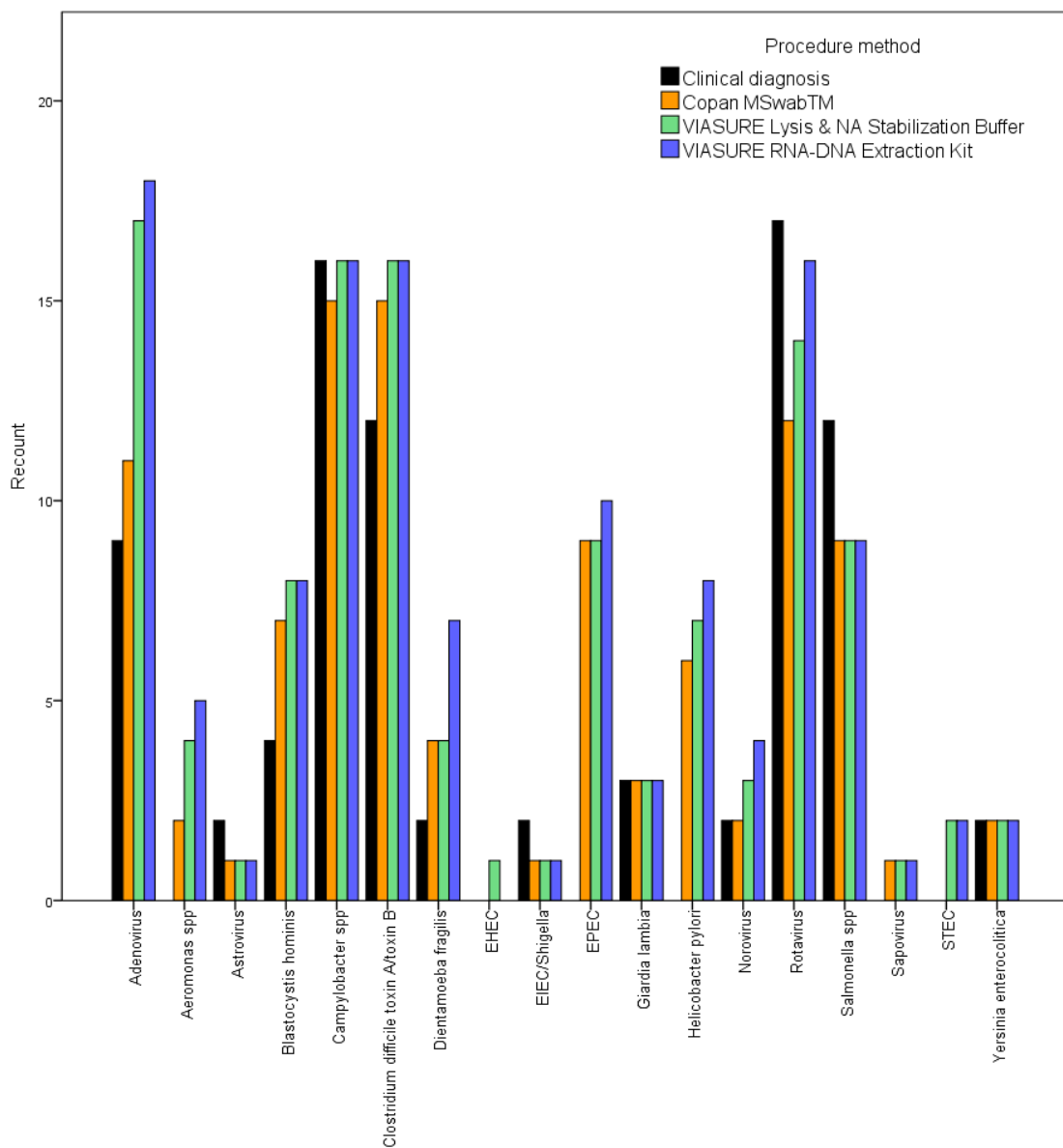


Figure 21 . Pathogens detected in 80 stool samples depending on the diagnostic method.

Although the number of pathogens detected by molecular diagnostics was higher than routine diagnostic methods, there was not 100% concordance between results. RM and LB differed from microbiological diagnosis in 16 samples (16/80, 20.0%), as did CM in 21 (21/80, 26.3%). Routine diagnostic methods identified more positive samples for EIEC/*Shigella*, *Salmonella* spp., astrovirus, and rotavirus than did molecular diagnostics but did not detect *Aeromonas* spp., EHEC, EPEC, *Helicobacter pylori*, STEC, and sapovirus. It should be noted that not all routine detection procedures were performed in all samples.

III.4.4 Inhibition in qPCR assays

Internal NA control (IC), included in qPCR assays, was an indicator of inhibitors present in samples when the isolation treatment was not enough to remove them. The inhibition would be expected to depend on the type of isolation and qPCR test used.

In this study, IC was inhibited in several reactions. In fact, CM supernatants were unable to be used directly in qPCR, and it was necessary to make a 1:4 dilution in nuclease-free water before they were added to the reaction. After amplification, qPCR inhibition was observed in some analyses (55/5367, 1.0%). Direct supernatants were used, except in CM (1:4), as noted. The number of inhibited reactions was 4/1789 (0.2%) with RM supernatants, 13/1789 (0.7%) with LB, and 38/1789 (2.1%) with CM. In addition, qPCR inhibition was not detected when supernatant dilution (RM, LB, and CM) was 1:10, as recommended by the qPCR manufacturer.

The most affected tests were VIASURE *Clostridium difficile* toxins A/B Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit, and VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit.

Furthermore, the color of LB and CM supernatants that produced inhibited reactions was observed. Almost all samples were transparent after isolation processes except 2/13 (15.4%) colored LB samples (1 transparent-brown and 1 transparent-yellow) and 8/38 (21.1%) colored CM samples (3 transparent-brown, 4 transparent-yellow, and 1 yellow).

III.5 Discussion

In the last few years, rapid diagnosis of gastrointestinal diseases has been needed to decrease response time and apply the most appropriate treatment. Thus, the aim of this study was to find an easy-to-use and fast diagnosis method to improve analysis. For this reason, we evaluated two rapid isolation processes and compared them with a traditional extraction method in combination with qPCR assays. In addition, there was a comparison between routine diagnosis and molecular biology results. This study suggests several main conclusions.

In the evaluation of agreement among the procedures, OPA, PPA, and NPA of the quick isolation methods were generally high (>90%) in most pathogens represented. However, PPA of some analytes in both methods showed poorer performance (lower in CM than in LB). Pathogens associated with lower PPA were *Aeromonas* spp., *Helicobacter pylori*, *Dientamoeba fragilis*, norovirus GI, and rotavirus. The literature describes some of these as difficult to extract. For example, the coccoid form of *Helicobacter pylori* is thought to be responsible for transmission by both fecal–oral and oral–oral routes and are difficult to lyse, which affects subsequent detection [243, 244].

NA isolation in parasites, in contrast, depends on parasitic stage (e.g., cyst, spores, eggs), and some authors recommend additional mechanical disruption for efficient isolation. Although in *Dientamoeba fragilis* the existence of a cyst stage has been described, usually it is found as a trophozoite [245]. Thus, in this case, the problem may be that the samples were detected in Cq values above 30 in RM, and depending on the quick process and the test, the samples were not identified. The same reasoning can be applied for *Aeromonas* spp., in which problematic samples had Cq values > 30 in RM. However, some samples contain large amounts of RNAses, and RNA is, of course, particularly unstable in their presence. Thus, if proteins were not correctly removed or inactivated from samples, RNA viruses could have been affected [160]. LB and, above all, CM had a big Cq value difference with RM (in CM until 17 cycles difference) in norovirus GI and rotavirus. These results may suggest that the CM method removes or inactivates RNAses less well than LB, which would be consistent with the inhibition results observed previously.

In terms of quick isolation processes, LB yielded closer results to RM than CM. For LB, Cq mean values were near those of RM, and differences were no higher than an average of 3 Cq. Concentrations in qPCR are expressed on a logarithmic scale, and Cq between 10-fold serial dilutions is theoretically 3.322 cycles. Therefore, a delay of 3 Cq implies that the difference in real numbers (copies, ng) is almost one order of magnitude [235].

In the case of CM, the Cq mean value difference was 2–9, so the difference in real numbers is up to three orders of magnitude. On the other hand, the number of 'no identified samples' in LB was less than in CM. This loss can be manageable depending on the number of cells required to infect successfully. This number is known as the 'infective dose' and varies across pathogen species. For instance, *Giardia lamblia* and norovirus require 10 and 55 cells or viruses, respectively, to start an infection. *Helicobacter pylori* and *Yersinia enterocolitica* need 10^4 and 10^6 cells for developing disease [246]. However, the infective dose is not enough information to predict the disease progress. Thus, it is necessary to correlate the infection stage with Cq values. Few studies have been performed and data suggest that no clear Cq value cutoff differentiates between symptomatic and asymptomatic infections although if there is a correlation between Cq value and the clinical course of infections [247, 248]. Further studies are needed to establish the 'no identified samples' limit for methods. For this reason, an approximation was carried out. Based on bibliography, the missing data acceptance limit must be less than 10% as long as RM Cq values of 'no identified samples' are above 30 [249].

We also evaluated processing time and method complexity. LB and CM reduce the required time by approximately a third relative to RM. In addition, because of the number of steps needed, RM is more complicated than LB and CM. The simplicity of quick processes is a great advantage over traditional extraction procedures. Also, it was not necessary to perform a 1:4 dilution before its addition to qPCR, so the LB process would be the easiest method.

Coinfections have largely been described in the literature, and molecular diagnostic tools allow their identification in stool samples. Sometimes, coinfections of determinate pathogens occur relatively frequently, such as *Clostridium difficile* and norovirus, producing increased severity of gastrointestinal diseases symptomatology [83]. More associations have been described, such as rotavirus and adenovirus or rotavirus and *Cryptosporidium* spp., and multiple pathogens have been found in 29% samples [250]. However, in the present study, 45.9% of samples were coinfecting with two or more pathogens, with being rotavirus and adenovirus as the most often

observed association. The higher rate for coinfection compared to previous findings may be because of the greater sensitivity of qPCR in comparison with other methods or the small sample size in the present study [250].

Compared to routine diagnostic methods, a higher number of pathogens and coinfections were identified by the qPCR gastrointestinal panel in a shorter time. However, these results must be carefully considered. Routine detection procedures identified more positive samples than qPCR for EIEC/*Shigella*, *Salmonella* spp., astrovirus, and rotavirus. Some viruses, such as rotavirus, degrade during long-term storage at 4°C. In this study, all samples used were frozen, but freeze–thawing cycles can damage genetic material [251]. Also, the use of enrichment media, such as selenite broth to recover *Salmonella* spp. from feces, slows the diagnostic process but can identify more than qPCR.

In addition, inhibitors present in stool samples are relatively common, and their effects can modify the qPCR reaction, producing false results [208]. Although it is not necessary to isolate ultra-purified NA, it is essential to remove or inactivate substances that may inhibit qPCR assays [238]. These results indicated that the three procedures were compatible with VIASURE Real Time PCR Kits, and the inhibition presented in this study was low (1.0%). According to results obtained with quick processes, LB was more applicable than CM because an additional step of 1:4 dilution in nuclease-free water was not required before addition to the reaction. The numbers of inhibited reactions also were higher in CM than in LB and RM.

On the other hand, the study showed that some qPCR tests were more susceptible to inhibition. As has been reported, certain primers can be more affected by inhibition than others [252]. Furthermore, different colors of isolate that produced inhibited reactions were observed, and although it might have affected the reaction, it was not the main factor. In RM, all isolates that generated inhibited reactions were colorless, compared to 2/13 (15.4%) in LB and 8/38 (21.1%) in CM that had color. In fact, protocols to remove colored metabolites from plants have been developed to facilitate RNA isolation for PCR applications [253].

III.6 Conclusions

The use of qPCR assays improves gastrointestinal disease diagnosis because of the detection of a large number of pathogens in less time than conventional methods. The optimal diagnosis procedure must have a balance among diagnostic accuracy, processing time, and processing difficulty. This study presents two quick isolation methods, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (LB) and Copan MSwab™ (CM), which are simple, fast, and compatible with qPCR. Both can be used in the identification of gastrointestinal pathogens (bacteria, parasites, and viruses), although LB shows better performance characteristics because it detects most microorganisms and the related C_q values are closer to RM in comparison to CM.

Capítulo IV Comparison of six nucleic acid isolation methods to improve *Clostridium difficile* infection diagnosis in fecal specimens by qPCR.

Para que VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* pueda formar parte de un procedimiento de diagnóstico molecular, según el Reglamento (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro, es necesario comprobar su funcionalidad con diversas evaluaciones clínicas. Por ello, se lleva a cabo una segunda evaluación en colaboración con el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, en la que el método se compara con otros sistemas de procesamiento rápidos y convencionales (manuales y automáticos) para la detección de *Clostridium difficile* toxigénico. Este estudio está pendiente de ser publicado.

IV.1 Abstract

Clostridium difficile infection (CDI) is an important cause of morbidity and mortality worldwide. Making a CDI diagnosis can be difficult and complex, and improved diagnostic tools are needed to rapidly identify CDI and to determine optimal treatment. Real-time PCR (qPCR) is a rapid and sensitive molecular technique that is increasingly used as a diagnostic tool. This study evaluated six nucleic acid isolation methods that can be used to detect toxigenic *C. difficile* in conjunction with the VIASURE Real Time PCR Detection Kit. The VIASURE Real Time PCR Detection Kit was also compared with another commercial qPCR test. We found that conventional isolation methods (automatic or manual silica matrix-based techniques) in combination with the VIASURE Real Time PCR Detection Kit had the lowest mean quantification cycle (Cq) values and identified the highest number of positive samples. However, these techniques are expensive and time-consuming. VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer was also evaluated due to its ease of use and rapid turnover time, and the results were similar to those using conventional methods. Thus, this method represents a good alternative for CDI diagnosis compared to other commercially available rapid isolation qPCR methods.

IV.2 Introduction

Clostridium difficile is a Gram-positive, anaerobic spore-forming bacillus that can cause asymptomatic disease or lead to mild diarrhea, colitis, pseudomembranous colitis, toxic megacolon, and even death [94, 254-256]. *C. difficile* produces three toxins, either alone or in combination: toxin A (encoded by the *tcdA* gene), toxin B (the *tcdB* gene), and binary toxin (Cdt locus). Binary toxin comprises two distinct proteins, an enzymatic protein (CdtA) and a cell binding protein (CdtB). The role of the binary toxin remains a matter of debate [96, 255].

C. difficile infection (CDI) was described in the 1980s [257, 258]. The main risk factors for CDI are antibiotic exposure and organism exposure (usually through admission to a healthcare facility) [94, 255]. Although exposure to antimicrobials is important, it does not always precede CDI. Broad-spectrum antibiotics eliminate intestinal microbiota, thereby allowing *C. difficile* overgrowth and toxin production in the colon [254]. Advanced age, malignant hematological disorders, cytotoxic drugs, non-surgical gastrointestinal procedures, and anti-ulcer medication have also been described as risk factors [255].

In diagnosing CDI, it is difficult to differentiate between *C. difficile* carriage and disease. Indeed, *C. difficile* toxins can be detected in stool samples from asymptomatic patients [259]. For this reason, the CDI diagnosis criteria include fever, abdominal pain, three or more episodes of unformed stool in 24 hours, and a positive toxigenic *C. difficile* test result from diarrheal fecal samples [259, 260].

The incidence and severity of CDI have increased in developed countries since 2000. The attributable mortality of CDI was 1.5% or lower before 2000 but has ranged from 4.5% to 5.7% in endemic periods since 2000. In the United States, *C. difficile* caused approximately 453,000 incident infections in 2011 and was associated with nearly 29,000 deaths [94, 260-262].

CDI rates have risen in association with the emergence of hypervirulent strains such as toxinotype V, PCR ribotype 078 (NAP7/BK/078) and North American toxinotype III, PCR ribotype 027 (NAP1/BI/027) [254]. Variant *C. difficile* strains carry polymorphisms and deletions in the regulatory *tcdC* gene that enhance toxin production. For example, NAP1/BI/027 produces the binary toxin, is fluoroquinolone-resistant, and has a partial deletion in the *tcdC* gene. This strain produces 23-fold more toxin B *in vitro* compared to wild-type *C. difficile*, which implicated in the severe illness and high mortality [263]. Toxin hyperproduction has also been reported for other ribotypes, such as 001 and 078 [257].

There are two reference standard assays that are considered the gold standard for CDI diagnosis, namely the *C. difficile* cytotoxin neutralization assay (CCNA) and toxigenic culture (TC). CCNA is based on the cytopathic effects of *C. difficile* strains, while TC is based on the detection of toxin production in the microorganism after its isolation by culture. Both assays have long turnaround times that range from 1 to 5 days from the time of stool sample collection, and both are relatively labor-intensive [94, 256, 264-267]. To overcome these challenges, the toxin A/B enzyme immunoassay (EIA) was developed for CDI diagnosis. Toxin A/B EIA is one of the most used diagnostic tests because it is easy to use and result interpretation is objective; however, it has lower sensitivity and specificity than the reference standards [94, 264, 266]. Accordingly, the use of glutamate dehydrogenase (GDH) detection and nucleic acid amplification tests (NAATs) represent advances in laboratory diagnosis of CDI. It is not yet clear which approach is best, so two- or three-stage algorithms have been designed [256, 264, 267]. Use of the assays as standalone tests is not recommended due to their limitations in specificity and sensitivity, which can lead to false-positive or false-negative CDI diagnosis [94, 256, 264, 266].

Improved diagnostic tools are needed to rapidly and reproducibly identify CDI and to determine the optimal treatment. In particular, it would be helpful to reduce the cost and the turnover time of NAATs. Toward this end, the current study evaluated six methods for isolating nucleic acids (NAs) from fecal samples, including two automatic methods and four manual methods (three of which were quick procedures). These methods were used in conjunction with specific and sensitive qPCR to optimize CDI diagnosis. We also compared two commercially available qPCR tests, the VIASURE *Clostridium difficile* toxins A/B Real Time PCR Detection Kit from Certest Biotec (Spain) and the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay from Quidel (San Diego, California, USA) in combination with rapid NA isolation methods.

IV.3 Materials and methods

IV.3.1 Study design

This retrospective study utilized leftover fecal samples that were collected from April 2014 to November 2017 at the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza). The main inclusion criteria for the specimens were a positive qPCR result for toxigenic *C. difficile* (data not shown) and sufficient stool quantity for the isolation procedures. After the first qPCR analysis, the characterized samples were stored at -20°C until this evaluation.

Because the samples were leftover fecal specimens, informed consent for the use of the material was not required. This protocol was approved by the Clinical Ethics Research Committee of

Aragon (Spain) and followed the ethical guidelines for Good Laboratory Practices as established by The Ministry of the Presidency of Spain (RD 1369/2000).

IV.3.2 NA isolation from fecal samples

This study evaluated and compared six NA isolation methods. Two were automatic NA isolation methods, the Maxwell® RSC Blood DNA kit from Promega (Madison, Wisconsin, USA) and the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B from Zinexts Life Science (Taiwan). The other four were manual methods. One kit, the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit from Certest Biotec (Spain), uses a silica-based matrix, while the other three are quick and simple procedures: VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer, which was recently developed by Certest Biotec (Spain); Copan MSwab™ from Copan (Italy); and Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT from Quidel (San Diego, California, USA). VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer can isolate both DNA and RNA using a rapid boiling method, while Copan MSwab™ is a rapid boiling method that uses a transport medium that is compatible with PCR reagents. The Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT uses dilution to reduce PCR inhibitors in the sample and isolate NAs.

Regarding the transfer of the fecal specimens into sample reagent, some kits (namely the Copan MSwab™ and the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT) have their own swabs, i.e. FLOQSwabs™ from Copan (Italy) (catalog number 503CS01) and the HydraFlock 6" Sterile Micro Ultrafine Flock Swab from Puritan (Guilford, Maine, USA) (catalog number 25-3318-H), respectively. For the other methods, samples were obtained using FLOQSwabs™ from Copan (Italy) (catalog number 516CS01). The amount of the fecal specimen that was acquired depended on the type of swab that was used. The amount was approximately 145 mg for the 503CS01 Copan swab, 70 mg for the HydraFlock 25-3318-H Puritan swab, and 70 mg for the 516CS01 Copan swab (data not shown). The six isolation methods were all performed the same day to avoid sample degradation due to freeze-thaw cycles [240].

All supernatants that were obtained were stored at 4°C until qPCR analysis; after use, they were stored at -20°C. The exception was the specimens processed using the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT, which were stored at room temperature (20°C to 25°C) following the manufacturer's recommendations. Supernatant color was also observed.

The six NA isolation methods are briefly described below and were performed according to the manufacturers' instructions. The starting biological sample quantity and the final volumes obtained varied for the different methods.

IV.3.2.1 *Maxwell® RSC Blood DNA kit*

Sample processing using a Maxwell® kit was performed on Promega's robotics platform, the Maxwell® RSC Instrument. The procedure involves automated extraction based on paramagnetic beads that bind to DNA/RNA. The kit that is used depends on the biological sample source. In this study, the Maxwell® RSC Blood DNA protocol was adapted for NA isolation from fecal samples.

The fecal sample was added to 600 µl of lysis buffer and mixed by vortexing for 1 minute. This mixture was incubated for 5 minutes at 95°C and then centrifuged at 15,500×g for 5 minutes. Next, 300 µl of supernatant was added to 30 µl of proteinase K (supplied in the kit), and the final

mix was incubated for 20 minutes at 56°C. After centrifugation at 15,500×g for 2 minutes, 300 µl of the supernatant was added to well 1 of the Maxwell® cartridge along with 300 µl of nuclease-free water. The Maxwell® RSC Blood DNA protocol was performed following the manufacturer's recommendations, and the final elution volume was 50 µl.

IV.3.2.2 Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B

This method was based on automatic extraction using paramagnetic beads, somewhat similar to the technique used in the Maxwell® kit. The difference between the two platforms is that the Magpurix Instrument can transfer liquids from one location to another, while the Maxwell® kit involves transfer of the magnetic beads with no liquid handling. Here we used the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B as adapted for use with stool samples.

The fecal sample was added to 300 µl of nuclease-free water, mixed by vortexing for 10 seconds, and centrifuged at 825×g for 30 seconds. We then loaded 200 µl of the supernatant into the sample tube. The protocol was performed following the manufacturer's instructions, and the final elution volume was 100 µl.

IV.3.2.3 VIASURE RNA-DNA Extraction Kit

The VIASURE RNA-DNA Extraction Kit was designed for the extraction and purification of DNA/RNA from several sample sources using a mini spin column system. The starting biological material was prepared and the NA isolation was performed following the manufacturer's instructions. In this case, we used the procedure for bacterial NA isolation from the supernatant of a stool suspension.

The fecal sample was added to 300 µl of nuclease-free water, mixed by vortexing for 10 seconds, and centrifuged at 825×g for 30 seconds. Next, 200 µl of the supernatant was subjected to lysis using a specific buffer with proteinase K followed by binding of the NAs in the sample to a silica membrane-based column in optimal buffer conditions. After washing steps, NAs were eluted in 100 µl of elution buffer.

IV.3.2.4 VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer

VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer involves the use of resins, detergents, and a buffer. This system is easy to use, rapid, uses no toxic reagents, and can isolate bacterial, viral, and parasite DNA/RNA from stool specimens via a simple and rapid boiling procedure.

The fecal sample was suspended in 1000 µl of VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer, incubated for 5 minutes at 100°C, mixed by snap vortexing for 10 seconds, and centrifuged at maximum speed (around 17,500×g) for 5 minutes. The supernatant was transferred into a clean collection vial and was used directly in qPCR.

IV.3.2.5 Copan MSwab™

The Copan MSwab™ is a molecular medium for collecting, transporting, and processing clinical specimens. This medium is compatible with PCR Master Mixes and can be used with both rapid

direct and traditional NA extraction methods for detecting pathogens using molecular amplification assays.

Due to *Clostridium difficile* is a Gram-positive bacterium, the fecal sample was suspended in 1000 µl of the medium, incubated for 10 minutes at 100°C, and centrifuged at 10,000×g for 2 minutes. The supernatant was transferred into a clean tube and used directly in qPCR.

IV.3.2.6 Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT

Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT is a simple and rapid procedure that uses a dilution step that reduces inhibitor concentrations to obtain NA. The fecal sample was suspended in 500 µl of Process Buffer 1, and 30 µl was then added to 570 µl of Process Buffer 2. The supernatant was used directly in qPCR.

IV.3.3 qPCR assays

Each of the six NA isolation methods produced supernatant solutions that contained NAs that were isolated from the fecal samples. The NA isolation methods were compared by qPCR using the VIASURE *Clostridium difficile* Tox A/B Real Time PCR Detection Kit (VIASURE *C. difficile* assay) developed by Certest Biotec (Spain). The qPCR assay was performed following the manufacturer's recommendations using a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). For the reactions, 5 µl of supernatant from each method was added to 15 µl of rehydration buffer. The cycling conditions were as follows: 2 minutes at 95°C for 1 cycle; 10 seconds at 95°C and 50 seconds at 60°C for 45 cycles (data collection). The targets were detected in the FAM channel (toxins A and B) and HEX channel (internal process control). Positive and negative controls were included in each qPCR run.

In addition, NAs in the supernatant obtained from the Lyra™ Direct Stool PREP KIT procedure were also amplified with the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay from Quidel (California, USA). This assay was performed following the manufacturer's recommendations using a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). For the reaction, 5 µl of supernatant from the processed samples were added to 15 µl of rehydrated Master Mix. The cycling conditions were as follows: 2 minutes at 95°C for 1 cycle; 5 seconds at 92°C, 5 seconds at 57°C, and 25 seconds at 68°C for 14 cycles; 5 seconds at 92°C, 5 seconds at 57°C, and 25 seconds at 68°C for 34 cycles (data collection). The targets were detected in the VIC channel (toxins A and B) and the Cy5 channel (process control). Positive and negative controls were included in each qPCR run.

IV.3.4 Statistics and data analysis

The results of the VIASURE *C. difficile* assay were expressed as the mean quantification cycle (Cq) value of triplicate qPCR assays. The sample was positive if 2 of 3 results were positive and the mean Cq value was < 40. If only 1 of 3 results was positive, the mean Cq value was ≥ 40, or there was no amplification, the sample was considered negative. All runs were considered valid since the internal process, positive and negative controls passed. The VIASURE *C. difficile* assay was performed in triplicate in case there was an anomalous result due to pipetting error. If the internal process control was negative, this could be due to inadequate removal of sample

inhibitors [237]. In this case, samples were diluted 1:4 in nuclease-free water before being used for qPCR. These results were included in the study.

Only one result per sample was obtained for the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay. This result had to be adjusted to compare it with the results of the other methods, because in the qPCR using the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay samples, data were collected in the last 34 cycles. In contrast, for the VIASURE *C. difficile* assay, data were collected during all of the cycles. Thus, the first 15 cycles of the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay had to be taken into account. Accordingly, the final Cq for the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay was the sum of the obtained Cq and 15. A sample was considered positive when amplification was detected, independent of the final Cq value. The sample was negative only if the positive and process controls were considered valid. Two samples were excluded from the study because the process controls were negative even after 1:4 sample dilution.

An initial exploratory analysis of all variables was performed. Continuous variables were expressed as means with standard deviations, and qualitative variables were expressed as frequencies and percentages.

The Cq values (means \pm standard deviations) were compared for the different NA isolation methods. Study variables were checked for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and using ANOVA for correlated samples. Bonferroni corrections were performed for multiple comparisons.

Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2010 for Windows and SPSS software v22.0 for Windows (SPSS Ibérica, Madrid, Spain), and $P < 0.05$ was considered significant.

IV.4 Results

IV.4.1 Comparison of NA isolation methods for identification of toxigenic *C. difficile*

A total of fifty-seven leftover fecal samples were analyzed that were identified as being positive for toxigenic *C. difficile*. The isolated NAs from the six isolation methods were evaluated with the VIASURE *C. difficile* assay. The number of samples in which no NAs were detected was 3/57 (5.3%) for Maxwell® RSC Blood DNA kit; 6/57 (10.5%) for the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B; 3/57 (5.3%) for the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit; 8/57 (14.0%) for VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer; 22/57 (38.6%) for Copan MSwab™; and 21/57 (36.8%) for the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT (**Table 10**). Interestingly, one sample that was positive previously was negative using all of the methods. Samples that were negative for NAs using the Maxwell® RSC Blood DNA kit, the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit, and VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer had initial Cq values greater than 30. Cq values (means \pm standard deviations) were also calculated (**Table 10**). Only data obtained for qPCR-positive samples with all six isolation methods ($n = 29$) are shown in the table. The lowest mean Cq value was found for the Maxwell® RSC Blood DNA kit.

Table 10. Identification of toxigenic *C. difficile* by real-time PCR (VIASURE *C. difficile* assay) using six isolation methods.

Isolation method	<i>n</i> = 57		<i>n</i> = 29
	Toxigenic <i>C. difficile</i> identified	No detected samples	Mean Cq value (±SD) ^a
Maxwell® RSC Blood DNA kit	54 (94.7%)	3 (5.3%)	28.17 ± 3.00
Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	51 (89.5%)	6 (10.5%)	29.72 ± 2.28
VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	54 (94.7%)	3 (5.3%)	29.16 ± 2.37
VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	49 (86.0%)	8 (14.0%)	30.54 ± 2.85
Copan MSwab™	35 (61.4%)	22 (38.6%)	32.93 ± 3.03
Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	36 (63.2%)	21 (36.8%)	33.96 ± 2.62
^a SD, standard deviation			
Note: The mean Cq value (±SD) was only calculated for samples that were qPCR-positive using all six methods (<i>n</i> = 29).			

In terms of mean Cq values, there were significant differences ($P = 0.000$) between the six methods ($n = 29$), and the two-by-two comparisons are shown in **Table 11**. There were no statistically significant differences in mean Cq values between the Maxwell® RSC Blood DNA kit and the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit, which had the lowest mean Cq values. The Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B did not show significantly different mean Cq values versus the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit and versus VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer, but the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit and VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer had significantly different mean Cq values. Therefore, the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B and VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer had mean Cq values that were higher than those of the Maxwell® RSC Blood DNA kit and the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit. Furthermore, there were no significant differences between the mean Cq values of the Copan MSwab™ and the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT, and these methods had the highest mean Cq values.

In terms of processing time, the Maxwell® RSC Blood DNA kit took the longest (85 minutes, including 45 minutes for pretreatment and 40 minutes for automatic extraction), followed by the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit (80 minutes) and the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B (70 minutes, 10 minutes for pretreatment and 60 minutes for automatic extraction). In contrast, the fastest methods were the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT (10 minutes), VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer (20 minutes), and Copan MSwab™ (30 minutes). The indicated treatment times correspond to processing four samples.

Specimen color was observed before and after processing (**Table 12 – end of this chapter**). The supernatants from the Maxwell® RSC Blood DNA kit, the Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, and the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit were colorless. For the quick procedures, 45/57 (78.9%) of the supernatants obtained using VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer were colorless, as were 36/57 (63.2%) of those obtained using the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT. Only 6/57 (10.5%) of those from the Copan MSwab™ were colorless.

Table 11. Performance of six isolation methods as measured by real-time PCR for the identification of toxigenic *C. difficile* (VIASURE *C. difficile* assay) ($n = 29$).

Comparison of mean Cq values between methods		
Method 1	Method 2	P value
Maxwell® RSC Blood DNA kit	Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	0.002*
Maxwell® RSC Blood DNA kit	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	0.140
Maxwell® RSC Blood DNA kit	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	0.000*
Maxwell® RSC Blood DNA kit	Copan MSwab™	0.000*
Maxwell® RSC Blood DNA kit	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	0.000*
Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	0.539
Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	0.385
Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	Copan MSwab™	0.000*
Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	0.000*
VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	0.004*
VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	Copan MSwab™	0.000*
VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	0.000*
VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	Copan MSwab™	0.001*
VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	0.000*
Copan MSwab™	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT	0.425
Note: only samples that were positive by qPCR using all six methods were included		
P values of 2-x-2 comparisons were calculated with ANOVA		
*P < 0.05. Significant difference		

IV.4.2 Comparison of different qPCR assays in conjunction with VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer and the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT

This study also compared two qPCR assays, namely the VIASURE *C. difficile* assay and the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay. Three combinations of isolation method and qPCR assay were tested: VIASURE-VIASURE (VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer and the VIASURE *C. difficile* assay); Quidel-Quidel (Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT and the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay); and Quidel-VIASURE (the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT and VIASURE *C. difficile* assay). Two samples were excluded from this part of the study because there was no amplification of the process control in the Lyra™ Direct *C. difficile* Assay ($n = 55$). The number of samples in which *C. difficile* was not detected 8/55 (14.5%) for the VIASURE-VIASURE combination; 21/55 (38.2%) for the Quidel-Quidel combination; and 20/55 (36.4%) for the Quidel-VIASURE combination. The Cq values (means \pm standard deviations) were compared for samples with positive results using the three combinations ($n = 29$) (**Figure 22**). The lowest mean Cq value was for the VIASURE-VIASURE combination, and this value was significantly different from the mean Cq values of the other combinations ($P < 0.05$). There were no statistical differences between the Quidel-Quidel and the Quidel-VIASURE combinations.

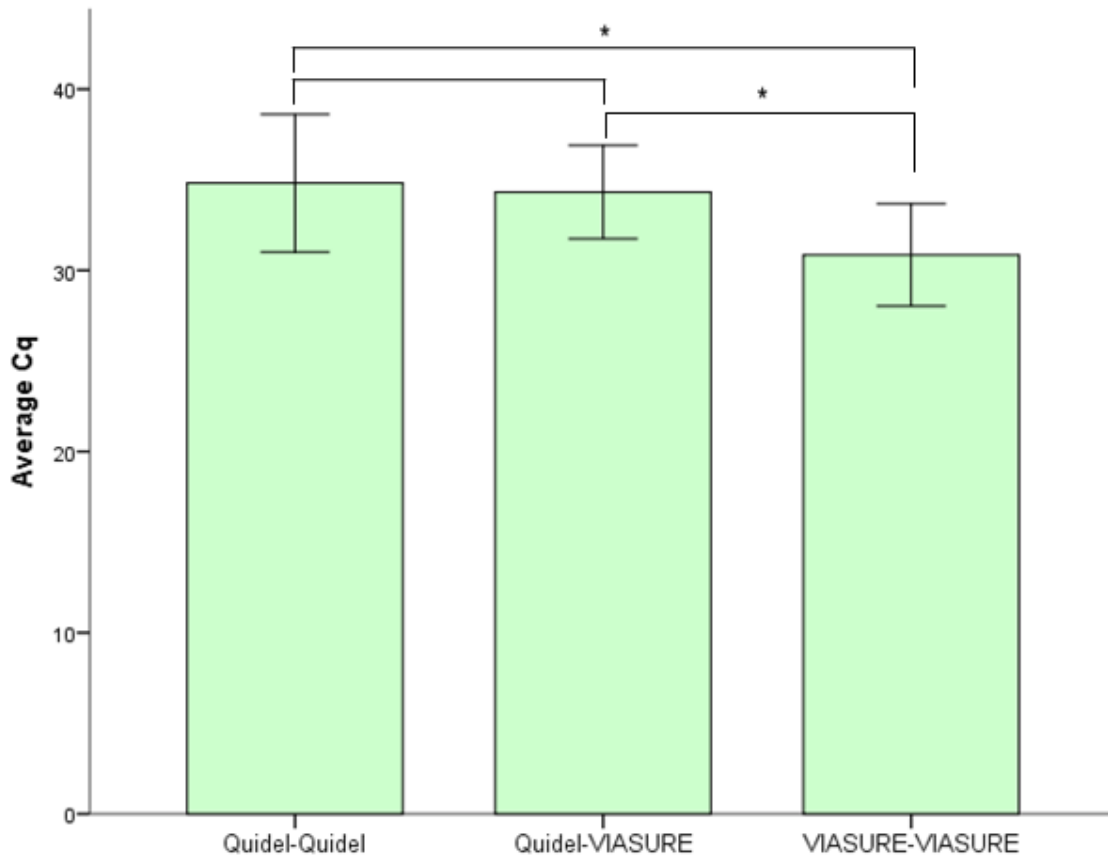


Figure 22 . Comparison of different quick methods for identification of toxigenic *C. difficile*. Values are reported as mean Cq values \pm standard deviations. * $P < 0.05$.

IV.4.3 Inhibition in qPCR assays

To avoid assay inhibition, we used a 1:4 dilution for 9/57 (15.8%) of the Copan MSwab™ samples and for 2/57 (3.5%) of the VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer samples. The Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT method includes a dilution of 1:20. The colors of the specimens are listed in **Table 12 – end of this chapter**. For Copan MSwab™ samples that showed inhibition, 5/9 (55.6%) were brown, 2/9 (22.2%) were dark brown, 1/9 (11.1%) was light brown, and 1/9 (11.1%) was light red. The two samples that showed inhibition using VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer were both light yellow.

IV.5 Discussion

The rapid detection of toxigenic *C. difficile* is crucial for timely identification and treatment of the infection. In the last few years, CDI mortality rates have become a major burden on the healthcare systems worldwide [261]. Improving NAATs would speed up and lower the cost of CDI diagnosis. Here, we described and compared the use of different NA isolation methods in conjunction with the VIASURE Real Time PCR Detection Kit for the early detection of toxigenic *C. difficile*. We also compared a qPCR assay to another commercially available test.

Regarding the comparison of the different NA isolation methods for the identification of toxigenic *C. difficile* found that none of the methods positively detected all samples that had previously been identified as being positive for toxigenic *C. difficile*. In fact, in the first qPCR analysis, some samples had Cq values greater than 30 (data not shown); however, in the present study, not all of the isolation methods could detect the pathogen. Specimens were stored at -20°C after the first qPCR analysis and were thawed for this study, and freeze-thaw cycles can affect the isolation method [240]. In addition, long-term storage at -20°C and a lack of sample preservation with stabilizers may have led to degradation of the genetic material [240, 268]. Thus, one of the limitations of this study was that we used frozen specimens rather than fresh samples.

Notably, there were significant differences among the NA isolation methods. Conventional methods detected the pathogen in more samples and had lower mean Cq values, with the Maxwell® RSC Blood DNA kit and the VIASURE RNA-DNA Extraction Kit giving the best results. However, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer, which is a quick method, had the same mean Cq value as the conventional methods and identified almost the same number of positive samples as one of the automatic methods, Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B. Nevertheless, although there were statistically significant differences, the difference in mean Cq values was 3 (at most) between VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer and the conventional procedures. Furthermore, use of VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer reduced processing time by approximately one-third relative to automatic and manual silica matrix-based methods. Regarding the other quick isolation procedures, there were no significant differences between Copan MSwab™ and the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT, which had the highest mean Cq values and did not detect pathogens in 30% of the positive samples. Thus, of the quick methods, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer obtained results that were the most similar to those obtained using conventional methods.

In addition to comparing different isolation procedures, we also tested and compared two qPCR assays. The Lyra™ Direct *C. difficile* Assay and VIASURE *C. difficile* assay qPCR tests are similar, but the detection levels differed depending on the isolation procedure that was used. The same results were obtained with Quidel-Quidel (Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT plus Lyra™ Direct *C. difficile* Assay) and with Quidel-VIASURE (Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT plus VIASURE *C. difficile* assay). Nevertheless, VIASURE-VIASURE (VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer plus VIASURE *C. difficile* assay) identified a greater number of positive samples and had a lower mean Cq value. The Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT method involves a dilution step, so the reaction should not be affected by PCR inhibitors. The different results that we obtained might be due to the fact that the Quidel isolation process does not have a thermal heating step, and the buffer may not be enough to lyse cell walls. Thus, all genetic material may not be released [269].

The level of inhibition depends on the type of isolation method that is used. Sample dilution reduces PCR inhibitors, so samples were diluted 1:4 in 15.8% Copan MSwab™ and 3.5% VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer samples to avoid inhibition, while the Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT method includes a 1:20 dilution step [237]. Regarding the color of the supernatants, we observed that most time-consuming methods produced the samples that had the least color. In contrast, and in the fastest methods (particularly the VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer

and Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT methods), almost all supernatants were colorless or light yellow. However, Copan MSwab™ supernatants were darker, and many of these samples showed PCR inhibition; thus, these may suggest that the isolation procedure determines the degree of PCR inhibition. In fact, swabs used for the Copan MSwab™ method collected more stool sample (approximately 145 mg) than the other procedures (approximately 70 mg). Thus, PCR inhibition depends on sample processing and on the amount of sample matrix [204]. Perhaps the results would be better if the Copan MSwab™ method used swabs that collected less stool sample or if a dilution was made before adding the supernatant to the qPCR reaction. Regarding colored compounds, it seems that they affect the PCR reaction, but they are not the only factor to consider in terms of PCR inhibition. In this respect, protocols that remove colored metabolites and inhibitory substances from tissues that are rich in colored substances have been described that help reduce inhibition in applications that involve genetic material [253].

IV.6 Conclusions

In summary, this study compared six NA isolation methods that were used in conjunction with the VIASURE *Clostridium difficile* Tox A/B Real Time PCR Detection Kit (VIASURE *C. difficile* assay). The more time-consuming methods (automatic and manual silica matrix-based methods) performed better than the rapid procedures. However, VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer represents a compromise between identification and speed and should be considered an alternative method for the rapid diagnosis of CDI. Better results were obtained with VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer plus VIASURE *C. difficile* assay compared to the use of a commercial rapid isolation qPCR test (Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT plus Lyra™ Direct *C. difficile* Assay).

Table 12. Colors of the supernatants obtained using six nucleic acid isolation methods (samples that showed inhibition were diluted 1:4).

Biological sample code	Dilution	Color before treatment	Maxwell® RSC Blood DNA kit	Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	Copan MSwab™	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT
			Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment
1	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Yellow	Colorless
2	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Colorless
3	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Brown	Light yellow
3	1:4	Dark brown	-	-	-	-	Light brown	-
4	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Yellow	Colorless
5	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
6	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless
7	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Light yellow
8	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Yellow	Colorless
9	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Light yellow
10	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Green	Colorless
11	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Colorless
12	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Light yellow
13	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
14	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Brown	Light brown
14	1:4	Brown	-	-	-	-	Light brown	-
15	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Light yellow
16	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
17	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Light yellow
18	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Brown	Light brown
18	1:4	Brown	-	-	-	-	Light brown	-
19	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Brown	Dark yellow
19	1:4	Brown	-	-	-	-	Light brown	-
20	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Light yellow
21	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
22	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
23	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Light yellow
24	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
25	-	Light red	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
26	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Light yellow
26	1:4	Light brown	-	-	-	-	Colorless	-
27	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Light yellow

Table 12 (continued).

Biological sample code	Dilution	Color before treatment	Maxwell® RSC Blood DNA kit	Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	Copan MSwab™	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT
			Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment
28	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Dark brown	Yellow
28	1:4	Dark brown	-	-	-	Colorless	Colorless	-
29	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Brown	Light yellow
30	-	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
31	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless
32	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Brown	Light brown
33	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Dark brown	Light brown
34	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless
35	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Brown	Light brown
35	1:4	Brown	-	-	-	Colorless	Light brown	-
36	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless
37	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Light yellow
38	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Dark yellow	Colorless
39	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light red	Colorless
39	1:4	Light brown	-	-	-	-	Colorless	-
40	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless
41	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
42	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Yellow	Colorless
43	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Brown	Colorless
44	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
45	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Dark yellow	Colorless
46	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Light yellow
47	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
48	-	Brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
49	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
50	-	Dark red	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless
51	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Colorless
52	-	Black	Colorless	Colorless	Colorless	Light brown	Dark brown	Light brown
52	1:4	Black	-	-	-	-	Light brown	-
53	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Colorless
54	-	Dark red	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Yellow	Colorless
55	-	Light brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Light yellow	Colorless

Table 12 (continued).

Biological sample code	Dilution	Color before treatment	Maxwell® RSC Blood DNA kit	Magpurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B	VIASURE RNA-DNA Extraction Kit	VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer	Copan MSwab™	Lyra™ Direct Stool Sample PREP KIT
			Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment	Color after treatment
56	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless
57	-	Dark brown	Colorless	Colorless	Colorless	Colorless	Brown	Colorless

Discusión general

En el presente proyecto de investigación se ha pretendido desarrollar un método (reactivo y procedimiento) para el tratamiento de muestras fecales que sea sencillo, rápido, universal, seguro y compatible con la tecnología qPCR.

En esta memoria se ha presentado el desarrollo del método VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* (reactivo y procedimiento). Es sencillo, rápido, compatible con qPCR, conlleva el menor riesgo para el usuario, y es válido para el tratamiento de muestras fecales, independientemente de la naturaleza del microorganismo (bacteria, parásito o virus).

Consta de pocas etapas, fáciles de realizar y con una duración de aproximadamente 20 minutos. Además, el material y los equipos requeridos para llevarlo a cabo se encuentran habitualmente en el laboratorio. También, como concluye el análisis de riesgos realizado, es seguro para su manipulación por el usuario.

Si bien es cierto, este método no es el más óptimo para algunos enteropatógenos, como *Campylobacter* spp, *Cryptosporidium* spp y *Salmonella* spp, donde los mejores resultados se obtienen cuando se aplican tratamientos térmicos más largos. Sin embargo, con un tratamiento térmico corto, se llega a un compromiso para la obtención de buenos resultados tanto en bacterias y parásitos como en virus. Por otro lado, se observa que las RNAsas son dependientes de muestra y afectan más a Rotavirus (virus dsRNA) que a otros virus RNA, como Astrovirus (virus ssRNA) o Norovirus GII (virus ssRNA). Aunque el método se ha optimizado para que la actividad RNAsa esté lo más reducida posible, con el control del pH y la adición de neutralizadores, puede que la identificación de Rotavirus se vea afectada.

Para que VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* pueda formar parte de un procedimiento de diagnóstico molecular, tiene que cumplir una serie de requerimientos de reproducibilidad, estabilidad y funcionalidad clínica.

Se realizan diferentes ensayos, inter-lote e inter-termociclador, donde se concluye que el método es reproducible, y que los sobrenadantes obtenidos pueden ser utilizados en diferentes termocicladores, además de ser compatibles con diversos kits de qPCR VIASURE *Real Time PCR Detection Kit*, en formato monoplex y multiplex.

Respecto a los ensayos de estabilidad, el reactivo tiene una durabilidad de al menos 2 años y, en cuanto a los sobrenadantes obtenidos (almacenados a -20°C) son estables hasta al menos 4 meses, pudiéndose así repetir el análisis de qPCR.

En el estudio de sustancias interferentes se comprueba que el reactivo de VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* no interfiere en la qPCR de VIASURE *Real Time PCR Detection Kit*. En este estudio también se observa que otras sustancias y compuestos afectan a la reacción de qPCR de distinta manera, ya sea con inhibición total o parcial de la reacción, no afectación o potenciación. Tras aplicar dos métodos de análisis distintos (Cq y FI frente a E_A), se obtienen valores muy parecidos de concentración máxima de no interferencia para cada uno de los compuestos, aunque el análisis Cq y FI es algo más restrictivo. Aunque se identifican diferentes comportamientos, parece que, en comparación con estudios sobre inhibición de qPCR descritos en la literatura, la reacción de qPCR VIASURE *Real Time PCR Detection Kit* soporta mayores concentraciones de inhibidores. Eso implica que la reacción está bien optimizada y es robusta frente a sustancias interferentes.

Respecto a la funcionalidad de VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer*, se realizan dos evaluaciones clínicas distintas para comprobar la sensibilidad, especificidad y el rendimiento del método.

En la primera evaluación se compara el reactivo (VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer*) con un método de extracción manual (VIASURE *RNA-DNA Extraction Kit*) y un medio de transporte compatible con qPCR (Copan MSwab). Todos los resultados obtenidos se comparan con los *gold-standard* para cada tipo de microorganismo.

Los valores OPA para VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* y Copan MSwab™ son, en general, altos (> 96,0%), con la excepción de Copan MSwab™ para algunos enteropatógenos. También, los valores PPA y NPA son relativamente altos, > 90,0% y > 98,0%, para ambos métodos. Sin embargo, VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* identifica un mayor número de muestras y obtiene un valor de media de Cq menor con respecto a Copan MSwab™. Por tanto, VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* es más próximo a la referencia (VIASURE *RNA-DNA Extraction Kit*). Además, los sobrenadantes obtenidos con Copan MSwab™ tienen en general más color y generan más inhibición en la reacción de la qPCR que VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer*. En cuanto a duración de los tratamientos, VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* y Copan MSwab™ se llevan a cabo en 20 y 30 minutos, y VIASURE *RNA-DNA Extraction Kit* conlleva aproximadamente 80 minutos. Por otro lado, el número de patógenos identificados por diagnóstico molecular es muy superior a los identificados por los métodos de diagnóstico rutinario, observándose un gran número de coinfecciones presentes en las muestras.

En la segunda evaluación se compara el rendimiento de VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* con métodos de aislamiento de material genético, tanto automáticos como manuales, que se utilizan de rutina en los laboratorios. El estudio se lleva a cabo con muestras positivas a *Clostridium difficile* toxigénico.

Los métodos de tratamiento de muestra que obtienen menor media de Cq e identifican un mayor número de muestras son uno de los sistemas de extracción automática (Maxwell®) y el sistema de extracción manual (VIASURE *RNA-DNA Extraction Kit*), sin haber diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, ambos tienen tiempos de procesamiento largos (80-85 minutos). Con VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer*, los resultados están en el orden de los obtenidos por los métodos tradicionales, pero se reduce más de un tercio el tiempo necesario para realizar el tratamiento. Dentro de los métodos rápidos, VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer*, obtiene los mejores resultados, menor media de Cq y sobrenadantes con menor color, lo que genera menores problemas de reducción de fluorescencia en la reacción de qPCR.

En esta segunda evaluación también se observa que los ciclos de congelación/descongelación afectan significativamente a las muestras, degradando el material genético y generando falsos negativos. Cómo se conserva la muestra es un punto importante a tener en cuenta para la óptima detección de enteropatógenos.

Con las dos evaluaciones clínicas realizadas se puede concluir que VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* presenta mejores características de funcionalidad con respecto a otros métodos rápidos, y genera unos resultados muy similares a métodos de extracción que se utilizan de rutina en los laboratorios clínicos.

Por todo ello, aunque es necesario realizar más pruebas para seguir validando el método, VIASURE *Lysis & NA Stabilization Buffer* cumple con los requisitos establecidos, pudiendo llegar a ser una gran herramienta junto con la técnica de qPCR en la simplificación del diagnóstico molecular de enteropatógenos.

Conclusiones generales

En el presente proyecto de investigación se ha pretendido desarrollar un método (reactivo y procedimiento) válido para el tratamiento de muestras fecales, que sea rápido, sencillo, universal, que conlleve el menor riesgo posible para el usuario y que sea compatible con la tecnología qPCR.

Finalmente, el método obtenido, *VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer*, cumple las siguientes características:

1. Es rápido, ya que el tiempo total necesario para llevarlo a cabo es de aproximadamente 20 minutos. Este tiempo es mucho menor en comparación con métodos de extracción que se realizan de rutina en el laboratorio, cuya duración es de 70-90 minutos.
2. Es sencillo, ya que son pocas etapas y fáciles de llevar a cabo. Además, el material y los equipos requeridos para realizarlo se encuentran habitualmente en los laboratorios.
3. Es universal, ya que obtiene muy buenos resultados en la detección de patógenos de diferente naturaleza, partiendo del mismo sobrenadante, y sin tener que realizar modificaciones específicas según patógeno. Aunque no es el método más óptimo para alguno de ellos, se llega a un compromiso para ser lo más universal posible.
4. Es seguro, ya que al realizar el análisis de riesgos de la mezcla que compone *VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer*, se obtiene que, las sustancias, a las concentraciones utilizadas en la mezcla, no suponen un riesgo específico para el usuario.
5. Es reproducible. Además, el sobrenadante obtenido se puede utilizar en diferentes termocicladores con diversos kits de qPCR *VIASURE Real Time PCR Detection Kit* (monoplex o multiplex).
6. Es estable, tanto la mezcla necesaria para llevar a cabo el procedimiento, como la integridad de los ácidos nucleicos contenidos en los sobrenadantes obtenidos por el método.
7. No afecta a la reacción de amplificación. Tras realizar un estudio de inhibición se observa que la mezcla contenida en *VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer* no influye en la qPCR. Por otro lado, los sobrenadantes obtenidos tienen menor coloración y prácticamente no producen inhibición en la reacción de qPCR en comparación con los obtenidos por otros métodos rápidos.
8. Es específico y sensible. Según los resultados de las evaluaciones clínicas realizadas, muestra mejores características de funcionalidad con respecto a otros métodos rápidos disponibles en el mercado. Además, genera resultados muy similares a métodos de extracción, manuales y automáticos, que se utilizan de rutina en los laboratorios clínicos.
9. Aunque más pruebas son necesarias para continuar validando *VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer*, cumple con las condiciones requeridas inicialmente para poder ser un método rápido de procesamiento de muestras fecales. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que puede llegar a ser una gran herramienta junto con la técnica de qPCR en la simplificación del diagnóstico molecular.

Por otro lado, también se obtienen las siguientes conclusiones derivadas de lo realizado en el proyecto de investigación:

10. Las RNAsas producen mayor degradación en Rotavirus (virus dsRNA) que en Norovirus GII (virus ssRNA) y Astrovirus (virus ssRNA).

11. La actividad de las RNAsas tiene gran dependencia del pH.
12. La reacción qPCR de VIASURE soporta mayores concentraciones de inhibidores en comparación con lo descrito bibliográficamente para otras reacciones de PCR. Eso implica que la reacción está bien optimizada y es robusta frente a sustancias interferentes.
13. Gracias al uso de técnicas moleculares es posible detectar un mayor número de enteropatógenos en muestras biológicas. Ello provoca que la tasa de coinfección sea mayor por qPCR con respecto a otros métodos de diagnóstico. Una mayor identificación de microorganismos enteropatógenos puede ser útil en el diagnóstico clínico.
14. La integridad de los ácidos nucleicos se ve muy afectada por los ciclos de congelación/descongelación de la muestra fecal, siendo un punto crítico para su determinación por qPCR. Por tanto, para aplicar esta técnica, es preferible trabajar con muestras fecales frescas.

Referencias bibliográficas

1. Banerjee P., Sulaiman I.M., Schneider G., Ray U., Jagadeesan B. **Novel Microbial Diagnostic Methods for Clinical, Environmental, and Food Samples.** *BioMed Research International.* 2017, **2017**:1-3.
2. Tang Y.W., Persing D.H. **Diagnostic Microbiology.** In: *Encyclopedia of Microbiology.* Third edition. Academic Press; 2009: 308-320.
3. Berger D. **A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory. Part 1—Ancient times through the 19th century.** *MLO: medical laboratory observer.* 1999, **31**(7):28-30.
4. Bujalkova M., Straka S., Jureckova A. **Hippocrates' humoral pathology in nowadays' reflections.** *Bratislavské lekárske listy.* 2001, **102**(10):489-492.
5. Méndez F.G.R., Botella M., Vargas L. **Medicina y teorías de la enfermedad en el Viejo Mundo. La antigüedad remota.** *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.* 2001, **14**(3):178-195.
6. Bardell D. **The Biologists' Forum: The invention of the microscope.** *Bios.* 2004, **75**(2):78-84.
7. Hajdu S.I. **The first use of the microscope in medicine.** *Annals of Clinical & Laboratory Science.* 2002, **32**(3):309-310.
8. Terrés-Speziale A.M. **Perspectivas en diagnóstico microbiológico.** *Revista mexicana de patología clínica.* 2002, **49**(3):153-164.
9. Guardino R.F. **Early history of microbiology and microbiological methods.** In: *Encyclopedia of rapid microbiological methods. Volume 1.* First edition. PDA/DHI Publishers; 2005: 1-27.
10. Schwartz M. **The life and works of Louis Pasteur.** *Journal of Applied Microbiology.* 2001, **91**(4):597-601.
11. Kaufmann S.H.E., Schaible U.E. **100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus.** *Trends in Microbiology.* 2005, **13**(10):469-475.
12. Blevins S.M., Bronze M.S. **Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology.** *International Journal of Infectious Diseases.* 2010, **14**(9):e744-e751.
13. Sumbali G., Mehrotra R. *Principles of microbiology.* First edition. Tata McGraw-Hill; 2009.
14. Grimes D.J. **Koch's Postulates — Then and Now.** *Microbe Magazine.* 2006, **1**(5):223-228.
15. **Robert Koch – Biographical** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1905/koch/biographical/>.
16. Brock T.D. *Robert Koch, a life in medicine and bacteriology.* First edition. Science Tech Publishers; 1988.
17. Cox F.E.G. **History of Human Parasitology.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2002, **15**(4):595-612.
18. Cox F.E.G. **George Henry Falkiner Nuttall and the origins of parasitology and Parasitology.** *Parasitology.* 2009, **136**(12):1389-1394.
19. Artenstein A.W. **The discovery of viruses: advancing science and medicine by challenging dogma.** *International Journal of Infectious Diseases.* 2012, **16**(7):e470-e473.
20. Weeks B.S., Alcamo I.E. *Microbes and society.* Second edition. Jones and Bartlett Publishers; 2008.
21. Rott R., Siddell S. **One hundred years of animal virology.** *Journal of General Virology.* 1998, **79**(11):2871-2874.
22. Tan S.Y., Ahana A. **Walter Reed (1851-1902): on the cause of yellow fever.** *Singapore Medical Journal.* 2010, **51**(5):360-361.
23. Berger D. **A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory. Part 2--Laboratory science and professional certification in the 20th century.** *MLO: medical laboratory observer.* 1999, **31**(8):32-38.

24. Brown J. **Virology**. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. First edition. John Wiley & Sons, Ltd; 2001: 25032-25040.
25. Dahm R. **Friedrich Miescher and the discovery of DNA**. *Developmental Biology*. 2005, **278**(2):274-288.
26. Lederberg J. **Infectious History**. *Science*. 2000, **288**(5464):287-293.
27. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1954** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1954/summary/>.
28. Ahmed N. **23 years of the discovery of Helicobacter pylori: is the debate over?**. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2005, **4**:17.
29. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2005/summary/>.
30. Gallo R.C., Montagnier L. **The discovery of HIV as the cause of AIDS**. *The New England Journal of Medicine*. 2003, **349**(24):2283-2285.
31. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/summary/>.
32. Goldsmith C.S., Miller S.E. **Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses**. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009, **22**(4):552-563.
33. Isenberg H.D. **Clinical Microbiology: Past, Present, and Future**. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, **41**(3):917-918.
34. Ruska E. **The development of the electron microscope and of electron microscopy**. *Reviews of Modern Physics*. 1987, **59**(3):627-638.
35. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger. Principles of Biochemistry*. Fifth edition. W.H. Freeman; 2009.
36. Vesterberg O. **History of electrophoretic methods**. *Journal of Chromatography A*. 1989, **480**:3-19.
37. Tiselius A., Kabat E.A. **An Electrophoretic Study of Immune Sera and Purified Antibody Preparations**. *Journal of Experimental Medicine*. 1939, **69**(1):119-131.
38. Maddox B. **The double helix and the 'wronged heroine'**. *Nature*. 2003, **421**(6921):407-408.
39. **Maurice Wilkins – Facts** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/wilkins/facts/>.
40. Bartlett J.M.S., Stirling D. **A Short History of the Polymerase Chain Reaction**. In: *PCR Protocols*. Second edition. Humana Press; 2003: 3-6.
41. Darwish I.A. **Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances**. *International Journal of Biomedical Science*. 2006, **2**(3):217-235.
42. Wu A.H. **A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry**. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **369**(2):119-124.
43. Hosseini S., Vázquez-Villegas P., Rito-Palomares M., Martínez-Chapa S.O. **Fundamentals and History of ELISA: The Evolution of the Immunoassays Until Invention of ELISA**. In: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): From A to Z*. First edition. Springer Singapore; 2018: 1-18.
44. Lequin R.M. **Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**. *Clinical Chemistry*. 2005, **51**(12):2415-2418.
45. Köhler G., Milstein C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity**. *Nature*. 1975, **256**(5517):495-497.
46. Zola H., Roberts Thomson P. **Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses**. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. First edition. John Wiley & Sons, Ltd; 2013: 15602-15608.

47. **Georges J.F. Köhler – Facts** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1984/kohler/facts/>.
48. **César Milstein – Facts** on Nobel Media AB 2019. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1984/milstein/facts/>.
49. Tan S.Y., Tatsumura Y. **Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin.** *Singapore Medical Journal*. 2015, **56**(7):366-367.
50. Maruta H. **From chemotherapy to signal therapy (1909-2009): A century pioneered by Paul Ehrlich.** *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2009, **3**(2):37-40.
51. Kresge N., Simoni R.D., Hill R.L. **Selman Waksman: the father of antibiotics.** *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**(48):e7.
52. Luca S., Mihaescu T. **History of BCG Vaccine.** *Maedica (Buchar)*. 2013, **8**(1):53-58.
53. Plotkin S. **History of vaccination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, **111**(34):12283-12287.
54. Bauer D.J. **A History of the Discovery and Clinical Application of Antiviral Drugs.** *British Medical Bulletin*. 1985, **41**(4):309-314.
55. Cohn S.K.J., Weaver L.T. **The Black Death and AIDS: CCR5-Delta32 in genetics and history.** *QJM: An International Journal of Medicine*. 2006, **99**(8):497-503.
56. Reid A.H., Taubenberger J.K., Fanning T.G. **The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology.** *Microbes and Infection*. 2001, **3**(1):81-87.
57. **Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of Infectious Diseases** on Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1999 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm>.
58. **The top 10 causes of death** on World Health Organization (WHO). 2018 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
59. **Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2016** on Instituto Nacional de Estadística (INE). 2017 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: http://www.ine.es/prensa/edcm_2016.pdf.
60. Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P.Y., Bandaranayake D., Breiman R.F., Brooks W.A., Buchy P. *et al.* **Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study.** *The Lancet Infectious Diseases*. 2012, **12**(9):687-695.
61. LeDuc J.W., Barry M.A. **SARS, the First Pandemic of the 21st Century.** *Emerging Infectious Diseases*. 2004, **10**(11):e26.
62. Bala M.O., Chehab M.A.H., Selim N.A.A. **MERS: an emerging disease of the 21st century.** *International Journal Of Community Medicine And Public Health*. 2017, **4**(7):2202-2207.
63. Kaner J., Schaack S. **Understanding Ebola: the 2014 epidemic.** *Globalization and Health*. 2016, **12**(1):53.
64. Davies J., Davies D. **Origins and evolution of antibiotic resistance.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010, **74**(3):417-433.
65. **List of Blueprint priority diseases** on World Health Organization (WHO). 2018 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en/>.
66. Liu L., Oza S., Hogan D., Chu Y., Perin J., Zhu J., Lawn J.E., Cousens S., Mathers C., Black R.E. **Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals.** *The Lancet*. 2016, **388**(10063):3027-3035.
67. **Diarrhoeal disease** on World Health Organization (WHO). 2017 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/diarrhoeal-disease>.

68. Scallan E., Griffin P.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Hoekstra R.M. **Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents.** *Emerging Infectious Diseases.* 2011, **17**(1):16-22.
69. Fletcher S.M., McLaws M.L., Ellis J.T. **Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: systematic review and meta-analysis.** *Journal of Public Health Research.* 2013, **2**(1):42-53.
70. Davenport E.R., Sanders J.G., Song S.J., Amato K.R., Clark A.G., Knight R. **The human microbiome in evolution.** *BMC Biology.* 2017, **15**(1):127.
71. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. **Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota.** *Nature.* 2012, **489**(7415):220-230.
72. Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. **The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* 2015, **45**(17):1827-1879.
73. Sender R., Fuchs S., Milo R. **Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body.** *PLOS Biology.* 2016, **14**(8):e1002533.
74. Riddle M.S., DuPont H.L., Connor B.A. **ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults.** *The American Journal of Gastroenterology.* 2016, **111**(5):602-622.
75. Roy S.L., Scallan E., Beach M.J. **The rate of acute gastrointestinal illness in developed countries.** *Journal of Water and Health.* 2006, **4**(S2):31-69.
76. Shane A.L., Mody R.K., Crump J.A., Tarr P.I., Steiner T.S., Kotloff K., Langley J.M., Wanke C., Warren C.A., Cheng A.C. *et al.* **2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea.** *Clinical Infectious Diseases.* 2017, **65**(12):e45-e80.
77. Pawlowski S.W., Warren C.A., Guerrant R. **Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea.** *Gastroenterology.* 2009, **136**(6):1874-1886.
78. Gilbert G.L. **Improving foodborne disease surveillance in NSW.** *New South Wales Public Health Bulletin.* 2008, **19**(2):1-2.
79. Presterl E., Diab-El Schahawi M., Lusignani L.S., Paula H., Reilly J.S. **Gastroenteritis: Gastrointestinal Infections.** In: *Basic Microbiology and Infection Control for Midwives.* First edition. Springer International Publishing; 2019: 131-141.
80. WHO. *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.* First edition. World Health Organization; 2015.
81. Vila J., Gómez M.D., Salavert M., Bosch J. **Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2017, **35**(1):41-46.
82. Operario D.J., Houpt E. **Defining the causes of diarrhea.** *Current Opinion in Infectious Diseases.* 2011, **24**(5):464-471.
83. Stokely J.N., Niendorf S., Taube S., Hoehne M., Young V.B., Rogers M.A., Wobus C.E. **Prevalence of human norovirus and Clostridium difficile coinfections in adult hospitalized patients.** *Clinical Epidemiology.* 2016, **8**:253-260.
84. Dunbar S.A., Zhang H., Tang Y.-W. **Advanced Techniques for Detection and Identification of Microbial Agents of Gastroenteritis.** *Clinics in Laboratory Medicine.* 2013, **33**(3):527-552.
85. Tejan N., Datta P., Gupta V. **Bacterial diarrhoea: A comprehensive review.** *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2018, **9**(12):5015-5031.
86. Igbiosa I.H., Igumbor E.U., Aghdasi F., Tom M., Okoh A.I. **Emerging Aeromonas species infections and their significance in public health.** *The Scientific World Journal.* 2012, **2012**:1-13.
87. Janda J.M., Abbott S.L. **The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2010, **23**(1):35-73.

88. Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Man S.M. **Global Epidemiology of Campylobacter Infection.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2015, **28**(3):687-720.
89. Man S.M. **The clinical importance of emerging Campylobacter species.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2011, **8**(12):669-685.
90. Natsos G., Koutoulis K.C., Sossidou E., Chemaly M., Mouttotou N.K. **Campylobacter spp. infection in humans and poultry.** *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.* 2018, **67**(2):65-82.
91. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P. **Campylobacter spp. as a Foodborne Pathogen: A Review.** *Frontiers in Microbiology.* 2011, **2**:200.
92. Kirk J.A., Banerji O., Fagan R.P. **Characteristics of the Clostridium difficile cell envelope and its importance in therapeutics.** *Microbial Biotechnology.* 2017, **10**(1):76-90.
93. Maaß S., Otto A., Albrecht D., Riedel K., Trautwein-Schult A., Becher D. **Proteomic Signatures of Clostridium difficile Stressed with Metronidazole, Vancomycin, or Fidaxomicin.** *Cells.* 2018, **7**(11):213.
94. Surawicz C.M., Brandt L.J., Binion D.G., Ananthakrishnan A.N., Curry S.R., Gilligan P.H., McFarland L.V., Mellow M., Zuckerbraun B.S. **Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections.** *American Journal of Gastroenterology.* 2013, **108**(4):478-498.
95. Leffler D.A., Longo D.L., Lamont J.T. **Clostridium difficile Infection.** *New England Journal of Medicine.* 2015, **372**(16):1539-1548.
96. Berry C.E., Davies K.A., Owens D.W., Wilcox M.H. **Is there a relationship between the presence of the binary toxin genes in Clostridium difficile strains and the severity of C. difficile infection (CDI)?** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2017, **36**(12):2405-2415.
97. Gomes T.A.T., Elias W.P., Scaletsky I.C.A., Guth B.E.C., Rodrigues J.F., Piazza R.M.F., Ferreira L.C.S., Martinez M.B. **Diarrheogenic Escherichia coli.** *Brazilian Journal of Microbiology.* 2016, **47**:3-30.
98. Gómez-Duarte O.G. **Enfermedad diarreica aguda por Escherichia coli enteropatógenas en Colombia.** *Revista chilena de infectología.* 2014, **31**(5):577-586.
99. Weiler N., Orrego M., Alvarez M., Huber C. **Molecular detection of diarrheogenic Escherichia coli in pediatric patients with acute diarrheal syndrome in Paraguay.** *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.* 2017, **15**(1):16-21.
100. **Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales** on Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2008 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>.
101. Crump J.A., Sjölund-Karlsson M., Gordon M.A., Parry C.M. **Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2015, **28**(4):901-937.
102. Ryan M.P., O'Dwyer J., Adley C.C. **Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella.** *BioMed Research International.* 2017, **2017**:1-6.
103. Bennish M.L., Ahmed S. **Shigellosis.** In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases.* Tenth edition. Elsevier; 2020: 492-499.
104. Muthuirulandi Sethuvel D.P., Devanga Ragupathi N.K., Anandan S., Veeraraghavan B. **Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance.** *Letters in Applied Microbiology.* 2017, **64**(1):8-18.
105. Baker-Austin C., Oliver J.D., Alam M., Ali A., Waldor M.K., Qadri F., Martinez-Urtaza J. **Vibrio spp. infections.** *Nature Reviews Disease Primers.* 2018, **4**(1):8.

106. Wong K.K., Griffin P.M. **Other Vibrio Species**. In: *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Fifth edition. Elsevier; 2018: 879-881.
107. Osunla C., Okoh A. **Vibrio Pathogens: A Public Health Concern in Rural Water Resources in Sub-Saharan Africa**. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017, **14**(10):1188.
108. Johnson C., Saraka D., Savin C., Kouassi S., Cissé B., Koffi E., Cabanel N., Brémont S., Faye-Kette H., Dosso M. *et al.* **Yersinia enterocolitica, a Neglected Cause of Human Enteric Infections in Côte d'Ivoire**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017, **11**(1):e0005216.
109. Watson G.T., Huaman M.A., Semler M.W., Manners J., Woron A.M., Carpenter L.R., Christman B.W. **When Nature Meets Nurture: Persistent Yersinia Infection**. *The American Journal of Medicine*. 2013, **126**(7):578-580.
110. McNally A., Thomson N.R., Reuter S., Wren B.W. **'Add, stir and reduce': Yersinia spp. as model bacteria for pathogen evolution**. *Nature Reviews Microbiology*. 2016, **14**(3):177-190.
111. Gravina A.G., Zagari R.M., Musis C.D., Romano L., Loguercio C., Romano M. **Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review**. *World Journal of Gastroenterology*. 2018, **24**(29):3204-3221.
112. Ansari S., Yamaoka Y. **Current understanding and management of Helicobacter pylori infection: an updated appraisal**. *F1000Research*. 2018, **7**(F1000 Faculty Rev):721.
113. Kusters J.G., van Vliet A.H.M., Kuipers E.J. **Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection**. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, **19**(3):449-490.
114. Gupta V., Gulati P., Bhagat N., Dhar M.S., Virdi J.S. **Detection of Yersinia enterocolitica in food: an overview**. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014, **34**(4):641-650.
115. McDonald L.C., Gerding D.N., Johnson S., Bakken J.S., Carroll K.C., Coffin S.E., Dubberke E.R., Garey K.W., Gould C.V., Kelly C. *et al.* **Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)**. *Clinical Infectious Diseases*. 2018, **66**(7):e1-e48.
116. Ryan U., Papparini A., Oskam C. **New Technologies for Detection of Enteric Parasites**. *Trends in Parasitology*. 2017, **33**(7):532-546.
117. Garcia L.S. **Protozoa: Intestinal and Urogenital Amebae, Flagellates and Ciliates**. In: *Infectious Diseases*. Fourth edition. Elsevier; 2017: 1725-1733.
118. Lepczyńska M., Białkowska J., Dzika E., Piskorz-Ogórek K., Korycińska J. **Blastocystis: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity?** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017, **36**(9):1531-1540.
119. del Coco V.F., Molina N.B., Basualdo J.A., Córdoba M.A. **Blastocystis spp.: avances, controversias y desafíos futuros**. *Revista Argentina de Microbiología*. 2017, **49**(1):110-118.
120. Xiao L., Cama V.A. **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. In: *Foodborne Parasites*. Second edition. Springer International Publishing; 2018: 73-117.
121. Rossle N.F., Latif B. **Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review**. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013, **3**(11):916-924.
122. Ortega Y.R., Sanchez R. **Update on Cyclospora cayetanensis, a Food-Borne and Waterborne Parasite**. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010, **23**(1):218-234.
123. Giangaspero A., Gasser R.B. **Human cyclosporiasis**. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019, **19**(7):e226-e236.
124. Stark D., Barratt J., Chan D., Ellis J.T. **Dientamoeba fragilis, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel**. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016, **29**(3):553-580.
125. Cacciò S.M. **Molecular epidemiology of Dientamoeba fragilis**. *Acta Tropica*. 2018, **184**:73-77.

126. Caliari M., Gomes M., Neumann E., Oliveira F.S. **Entamoeba dispar: Could it be pathogenic.** *Tropical Parasitology*. 2015, **5**(1):9-14.
127. Hooshyar H., Rostamkhani P., Rezaeian M. **An Annotated checklist of the human and animal entamoeba (Amoebida: Endamoebidae) species-A review article.** *Iranian journal of parasitology*. 2015, **10**(2):146-156.
128. Menchaca Arredondo J.L., Barron Gonzalez M., Leon-Coria A., Ortega E., Vargas Villarreal J., Hernandez-Piñero J., Morales Vallarta M.R. **Entamoeba histolytica: trophozoite, precyst and cyst studied by atomic force microscopy.** In: *Microscopy: advances in scientific research and education*. First edition. Formatex; 2014: 153-160.
129. Shirley D.-A.T., Farr L., Watanabe K., Moonah S. **A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis.** *Open Forum Infectious Diseases*. 2018, **5**(7):ofy161.
130. Minetti C., Chalmers R.M., Beeching N.J., Probert C., Lamden K. **Giardiasis.** *Bmj*. 2016, **355**:i5369.
131. Gutiérrez A.M.Q. **Giardiasis Epidemiology.** In: *Current Topics in Giardiasis*. First edition. InTech; 2017: 13-24.
132. Soriano M.J.A. **Giardia y giardiosis.** *Control calidad SEIMC*. 2002:1-9.
133. Garcia L.S., Arrowood M., Kokoskin E., Paltridge G.P., Pillai D.R., Procop G.W., Ryan N., Shimizu R.Y., Visvesvara G. **Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract.** *Clinical Microbiology Reviews*. 2017, **31**(1):e00025-17.
134. Sidoti F., Rittà M., Costa C., Cavallo R. **Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures.** *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2015, **9**(06):551-561.
135. Khanal S., Ghimire P., Dhamoon A. **The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly.** *Biomedicines*. 2018, **6**(1):30.
136. Qiu F.-z., Shen X.-x., Li G.-x., Zhao L., Chen C., Duan S.-x., Guo J.-y., Zhao M.-c., Yan T.-f., Qi J.-J. *et al.* **Adenovirus associated with acute diarrhea: a case-control study.** *BMC Infectious Diseases*. 2018, **18**(1):450.
137. Johnson C., Hargest V., Cortez V., Meliopoulos V., Schultz-Cherry S. **Astrovirus Pathogenesis.** *Viruses*. 2017, **9**(1):22.
138. Bosch A., Pintó R.M., Guix S. **Human Astroviruses.** *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, **27**(4):1048-1074.
139. Robilotti E., Deresinski S., Pinsky B.A. **Norovirus.** *Clinical Microbiology Reviews*. 2015, **28**(1):134-164.
140. Vinjé J., Doern G.V. **Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2015, **53**(2):373-381.
141. Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., Franco M.A., Greenberg H.B., O'Ryan M., Kang G. *et al.* **Rotavirus infection.** *Nature Reviews Disease Primers*. 2017, **3**(1):17083.
142. Lin C.-L., Chen S.-C., Liu S.-Y., Chen K.-T. **Disease Caused by Rotavirus Infection.** *The Open Virology Journal*. 2014, **8**(1):14-19.
143. Oka T., Wang Q., Katayama K., Saif L.J. **Comprehensive Review of Human Sapoviruses.** *Clinical Microbiology Reviews*. 2015, **28**(1):32-53.
144. Magwalivha M., Kabue J.-P., Traore A.N., Potgieter N. **Prevalence of Human Sapovirus in Low and Middle Income Countries.** *Advances in Virology*. 2018, **2018**:1-12.
145. Wolffs P.F.G., Bruggeman C.A., van Well G.T.J., van Loo I.H.M. **Replacing Traditional Diagnostics of Fecal Viral Pathogens by a Comprehensive Panel of Real-Time PCRs.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, **49**(5):1926-1931.
146. **Boletín del Sistema de Información Microbiológica de Aragón (SIM). Año 2018 on** Gobierno de Aragón. Departamento de Sanidad. 2018 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from:

https://www.aragon.es/documents/20127/674325/Boletin_Micro_33_2018.pdf/9f29509b-4617-df75-e164-4987711364fb.

147. Balsalobre-Arenas L., Alarcón-Cavero T. **Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2017, **35**(6):367-376.
148. Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. *Modern food microbiology.* Seventh edition. Springer; 2005.
149. Setu M., Moue A., Sultana R., Uddin M.S., Rahman M.T. **Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review.** *Anwer Khan Modern Medical College Journal.* 2013, **4**(1):30-36.
150. Ali N., Rampazzo R.d.C.P., Costa A.D.T., Krieger M.A. **Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics.** *BioMed Research International.* 2017, **2017**:1-13.
151. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. *et al.* **Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2006, **19**(1):165-256.
152. Meselson M., Stahl F.W. **The replication of DNA in Escherichia coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1958, **44**(7):671-682.
153. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. **Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.** *Biochemistry.* 1979, **18**(24):5294-5299.
154. Chomczynski P. **A Reagent for the Single-step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples.** *BioTechniques.* 1993, **15**(3):532-534, 536-537.
155. Chomczynski P., Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical Biochemistry.* 1987, **162**(1):156-159.
156. Kirby K.S. **Isolation of nucleic acids with phenolic solvents.** In: *Nucleic Acids, Part B, Methods in Enzymology. Volume 12B.* First edition. Academic Press; 1968: 87-99.
157. Kurland C.G. **Molecular characterization of ribonucleic acid from Escherichia coli ribosomes.** *Journal of Molecular Biology.* 1960, **2**(2):83-91.
158. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W., Goodman H. **Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences.** *Science.* 1977, **196**(4296):1313-1319.
159. Volkin E., Carter C.E. **The Preparation and Properties of Mammalian Ribonucleic Acids.** *Journal of the American Chemical Society.* 1951, **73**(4):1516-1519.
160. Thatcher S.A. **DNA/RNA preparation for molecular detection.** *Clinical Chemistry.* 2015, **61**(1):89-99.
161. Thatcher S.A. **Nucleic Acid Isolation.** In: *Principles and Applications of Molecular Diagnostics.* First edition. Elsevier; 2018: 35-46.
162. Chacon-Cortes D., Griffiths L.R. **Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives.** *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine.* 2014, **2014**(2):1-9.
163. Vomelová I., Vanickova Z., Sedo A. **Methods of RNA purification. All ways (Should) Lead to Rome.** *Folia Biologica (Krakow).* 2009, **55**(6):243-251.
164. Baar C., d'Abbadie M., Vaisman A., Arana M.E., Hofreiter M., Woodgate R., Kunkel T.A., Holliger P. **Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors.** *Nucleic Acids Research.* 2011, **39**(8):e51.
165. Erfan A.M., Kilany W.H., Hassan M.K. **Assessing the enhancing effect of some PCR additives in the diagnosis of Avian Influenza (H5) and Marek's disease viruses.** *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences.* 2016, **7**(6):450-458.

166. El-Ashram S., Al Nasr I., Suo X. **Nucleic acid protocols: Extraction and optimization.** *Biotechnology Reports.* 2016, **12**:33-39.
167. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Research.* 1988, **16**(3):1215.
168. Bimboim H.C., Doly J. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Research.* 1979, **7**(6):1513-1523.
169. Tan S.C., Yiap B.C. **DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2009, **2009**:1-10.
170. Vogelstein B., Gillespie D. **Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1979, **76**(2):615-619.
171. Christel L.A., Petersen K., McMillan W., Northrup M.A. **Rapid, Automated Nucleic Acid Probe Assays Using Silicon Microstructures for Nucleic Acid Concentration.** *Journal of Biomechanical Engineering.* 1999, **121**(1):22-27.
172. Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C., Wertheim-van Dillen P., Van der Noordaa J. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1990, **28**(3):495-503.
173. Bush A.L. **Construction Materials: Lightweight Aggregates.** In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology.* First edition. Elsevier; 2001: 1550-1558.
174. Seligson D.B., Shrawder E.J. **Method of isolating and purifying nucleic acids from biological samples.** In.: Google Patents; 1990.
175. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. **Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material.** *BioTechniques.* 2013, **54**(3):134-139.
176. Hawkins T.L., O'Connor-Morin T., Roy A., Santillan C. **DNA purification and isolation using a solid-phase.** *Nucleic Acids Research.* 1994, **22**(21):4543-4544.
177. Berensmeier S. **Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids.** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006, **73**(3):495-504.
178. Li Y., Yoshida H., Wang L., Tao Z., Wang H., Lin X., Xu A. **An optimized method for elution of enteroviral RNA from a cellulose-based substrate.** *Journal of Virological Methods.* 2012, **186**(1-2):62-67.
179. Hawker C., Genzen J.R., Wittwer C. **Automation in the Clinical Laboratory.** In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* Sixth edition. Saunders; 2017: 370.e1-370.e24.
180. Mauk M.G., Liu C., Sadik M., Bau H.H. **Microfluidic Devices for Nucleic Acid (NA) Isolation, Isothermal NA Amplification, and Real-Time Detection.** In: *Mobile Health Technologies.* First edition. Humana Press; 2015: 15-40.
181. Lim G.S., Chang J.S., Lei Z., Wu R., Wang Z., Cui K., Wong S. **A lab-on-a-chip system integrating tissue sample preparation and multiplex RT-qPCR for gene expression analysis in point-of-care hepatotoxicity assessment.** *Lab on a Chip.* 2015, **15**(20):4032-4043.
182. Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R.H. **Basic principles of real-time quantitative PCR.** *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2014, **5**(2):209-219.
183. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L. *et al.* **The real-time polymerase chain reaction.** *Molecular Aspects of Medicine.* 2006, **27**(2-3):95-125.
184. Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. **Quantitative real-time RT-PCR – a perspective.** *Journal of Molecular Endocrinology.* 2005, **34**(3):597-601.
185. Rodríguez-Lázaro D., Hernández M. **Real-time PCR in food science: introduction.** *Current Issues in Molecular Biology.* 2013, **15**:25-38.
186. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J. **Real-time PCR detection chemistry.** *Clinica Chimica Acta.* 2015, **439**:231-250.

187. Botes M., de Kwaadsteniet M., Cloete T.E. **Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **405**(1):91-108.
188. Marras S.A.E. **Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes.** In: *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*. First edition. Humana Press; 2006: 3-16.
189. **7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems Support - Getting Started** on ThermoFisher-Scientific. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/technical-reference-library/real-time-digital-PCR-instruments-support-center/7500-real-time-pcr-systems-support/7500-real-time-pcr-systems-support-getting-started.html>.
190. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L. *et al.* **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.** *Clinical Chemistry*. 2009, **55**(4):611-622.
191. **VIASURE Real Time PCR Detection Kits** on Certest Biotec S.L. 2019 [cited 2019 Mon 16 September]. Available from: <https://www.certest.es/es/viasure/>.
192. Beck E.T., Buchan B.W., Riebe K.M., Alkins B.R., Pancholi P., Granato P.A., Ledebor N.A. **Multicenter Evaluation of the Quidel Lyra Direct C. difficile Nucleic Acid Amplification Assay.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, **52**(6):1998-2002.
193. Soejima T., Xiao J.-z., Abe F. **A novel mechanism for direct real-time polymerase chain reaction that does not require DNA isolation from prokaryotic cells.** *Scientific Reports*. 2016, **6**(1):28000.
194. Zhang Z., Kermekchiev M.B., Barnes W.M. **Direct DNA Amplification from Crude Clinical Samples Using a PCR Enhancer Cocktail and Novel Mutants of Taq.** *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2010, **12**(2):152-161.
195. Jansson L., Koliana M., Sidstedt M., Hedman J. **Blending DNA binding dyes to improve detection in real-time PCR.** *Biotechnology Reports*. 2017, **14**:34-37.
196. Bar T., Kubista M., Tichopad A. **Validation of kinetics similarity in qPCR.** *Nucleic Acids Research*. 2012, **40**(4):1395-1406.
197. Sovová T., Křížová B., Hodek J., Ovesná J. **Identifying inhibitors/enhancers of quantitative real-time PCR in food samples using a newly developed synthetic plasmid.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016, **96**(3):997-1001.
198. Garcia A.B., Kamara J.N., Vigre H., Hoorfar J., Josefsen M.H. **Direct Quantification of Campylobacter jejuni in Chicken Fecal Samples Using Real-Time PCR: Evaluation of Six Rapid DNA Extraction Methods.** *Food Analytical Methods*. 2013, **6**(6):1728-1738.
199. Radstrom P., Knutsson R., Wolffs P., Lovenklev M., Lofstrom C. **Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples.** *Molecular Biotechnology*. 2004, **26**(2):133-146.
200. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., John R. **PCR inhibitors - occurrence, properties and removal.** *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **113**(5):1014-1026.
201. Alaeddini R. **Forensic implications of PCR inhibition--A review.** *Forensic Science International: Genetics*. 2012, **6**(3):297-305.
202. Al-Soud W.A., Radstrom P. **Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, **39**(2):485-493.
203. Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J., Megraud F. **Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, **35**(4):995-998.
204. Trombley Hall A., McKay Zovanyi A., Christensen D.R., Koehler J.W., Devins Minogue T. **Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples.** *PLoS ONE*. 2013, **8**(9):e73845.

205. Wilson I.G. **Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1997, **63**(10):3741-3751.
206. Roeber F., Jex A.R., Gasser R.B. **Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants: a turning point?** *Advances in Parasitology.* 2013, **83**:267-333.
207. Huggett J.F., Novak T., Garson J.A., Green C., Morris-Jones S.D., Miller R.F., Zumla A. **Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon.** *BMC Research Notes.* 2008, **1**:70.
208. Oikarinen S., Tauriainen S., Viskari H., Simell O., Knip M., Virtanen S., Hyoty H. **PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants.** *Journal of Clinical Virology.* 2009, **44**(3):211-214.
209. Niu F., Wen J., Fu X., Li C., Zhao R., Wu S., Yu H., Liu X., Zhao X., Liu S. *et al.* **Stool DNA Test of Methylated Syndecan-2 for the Early Detection of Colorectal Neoplasia.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2017, **26**(9):1411-1419.
210. Willson R.C., Shulman L.M., Hindiyeh M., Muhsen K., Cohen D., Mendelson E., Sofer D. **Evaluation of Four Different Systems for Extraction of RNA from Stool Suspensions Using MS-2 Coliphage as an Exogenous Control for RT-PCR Inhibition.** *PLoS ONE.* 2012, **7**(7):e39455.
211. Ruijter J.M., Lorenz P., Tuomi J.M., Hecker M., van den Hoff M.J. **Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency.** *Microchimica Acta.* 2014, **181**(13-14):1689-1696.
212. Tuomi J.M., Voorbraak F., Jones D.L., Ruijter J.M. **Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value.** *Methods.* 2010, **50**(4):313-322.
213. Kirschneck C., Batschkus S., Proff P., Köstler J., Spanier G., Schröder A. **Valid gene expression normalization by RT-qPCR in studies on hPDL fibroblasts with focus on orthodontic tooth movement and periodontitis.** *Scientific Reports.* 2017, **7**(1):14751.
214. Zhang T., Fang H.H.P. **Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples.** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006, **70**(3):281-289.
215. Rossen L., Norskov P., Holmstrom K., Rasmussen O.F. **Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.** *International Journal of Food Microbiology.* 1992, **17**(1):37-45.
216. Loftsson T. **Degradation Pathways.** In: *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists.* First edition. Academic Press; 2014: 63-104.
217. Kim Y., Lee W.-N., Yoo H.J., Baek C., Min J. **Direct buffer composition of blood pre-process for nucleic acid based diagnostics.** *BioChip Journal.* 2017, **11**(4):255-261.
218. Cai D., Behrmann O., Hufert F., Dame G., Urban G. **Capacity of rTth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors.** *PLoS ONE.* 2018, **13**(1):e0190041.
219. Satsangi J., Jewell D.P., Welsh K., Bunce M., Bell J.I. **Effect of heparin on polymerase chain reaction.** *The Lancet.* 1994, **343**(8911):1509-1510.
220. Prieto R., Martinez-Tobed A., Fábregas J.L., Beneyto J.E. **In vitro comparison of the antacid potencies of almagate in tablets and suspension with those of other commercially available antacid preparations.** *Arzneimittel & Forschung.* 1984, **34**(10A):1360-1364.
221. Combs L.G., Warren J.E., Huynh V., Castaneda J., Golden T.D., Roby R.K. **The effects of metal ion PCR inhibitors on results obtained with the Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit.** *Forensic Science International: Genetics.* 2015, **19**:180-189.
222. Hedman J., Rådström P. **Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR.** In: *PCR Detection of Microbial Pathogens.* Second edition. Humana Press; 2013: 17-48.

223. Simon M.C., Gray D.I., Cook N. **DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Salmon.** *Applied and Environmental Microbiology.* 1996, **62**(3):822-824.
224. Spiess A.N. **Trehalose Is a Potent PCR Enhancer: Lowering of DNA Melting Temperature and Thermal Stabilization of Taq Polymerase by the Disaccharide Trehalose.** *Clinical Chemistry.* 2004, **50**(7):1256-1259.
225. Panaccio M., French M., Lew A. **Formamide low-temperature PCR: Applications for direct PCR from clinical material.** In: *PCR in Neuroscience. Volume 26.* First edition. Academic Press; 1995: 3-14.
226. Abu Al-Soud W., Radstrom P. **Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2000, **38**(12):4463-4470.
227. Gerard G.F., Fox D.K., Nathan M., D'Alessio J.M. **Reverse Transcriptase.** *Molecular Biotechnology.* 1997, **8**(1):61-77.
228. Arezi B., McCarthy M., Hogrefe H. **Mutant of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase exhibits higher resistance to common RT-qPCR inhibitors.** *Analytical Biochemistry.* 2010, **400**(2):301-303.
229. Simeonov A., Davis M.I. **Interference with fluorescence and absorbance.** In: *Assay Guidance Manual.* First edition. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2018.
230. Sidstedt M., Jansson L., Nilsson E., Noppa L., Forsman M., Rådström P., Hedman J. **Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction.** *Analytical Biochemistry.* 2015, **487**:30-37.
231. El Fallah R., Rouillon R., Vouvé F. **Spectral characterization of the fluorescent components present in humic substances, fulvic acid and humic acid mixed with pure benzo(a)pyrene solution.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2018, **199**:71-79.
232. Finkel J.M., Pittillo R.F., Mellett L.B. **Fluorometric and Microbiological Assays for Rifampicin and the Determination of Serum Levels in the Dog.** *Chemotherapy.* 1971, **16**(6):380-388.
233. Ettinger A., Wittmann T. **Fluorescence live cell imaging.** In: *Quantitative Imaging in Cell Biology, Methods in Cell Biology. Volume 123.* First edition. Academic Press; 2014: 77-94.
234. Khare R., Espy M.J., Cebelinski E., Boxrud D., Sloan L.M., Cunningham S.A., Pritt B.S., Patel R., Binnicker M.J. **Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2014, **52**(10):3667-3673.
235. Kralik P., Ricchi M. **A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything.** *Frontiers in Microbiology.* 2017, **8**:108.
236. Fock-Chow-Tho D., Topp E., Ibeagha-Awemu E.A., Bissonnette N. **Comparison of commercial DNA extraction kits and quantitative PCR systems for better sensitivity in detecting the causative agent of paratuberculosis in dairy cow fecal samples.** *Journal of Dairy Science.* 2017, **100**(1):572-581.
237. Hu Q., Liu Y., Yi S., Huang D. **A comparison of four methods for PCR inhibitor removal.** *Forensic Science International: Genetics.* 2015, **16**:94-97.
238. Lou Q., Chong S.K., Fitzgerald J.F., Siders J.A., Allen S.D., Lee C.H. **Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1997, **35**(1):281-283.
239. He H., Li R., Chen Y., Pan P., Tong W., Dong X., Chen Y., Yu D. **Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections.** *Scientific Reports.* 2017, **7**:45199.

240. Song S.J., Amir A., Metcalf J.L., Amato K.R., Xu Z.Z., Humphrey G., Knight R. **Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies.** *mSystems*. 2016, **1**(3):e00021-16.
241. Salih B.A. **Helicobacter pylori infection in developing countries: the burden for how long?** *Saudi Journal of Gastroenterology*. 2009, **15**(3):201-207.
242. Sangare I., Bamba S., Cisse M., Zida A., Bamogo R., Sirima C., Yameogo B.K., Sanou R., Drabo F., Dabire R.K. *et al.* **Prevalence of intestinal opportunistic parasites infections in the University hospital of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.** *Infectious Diseases of Poverty*. 2015, **4**:32.
243. Dolan B., Burkitt-Gray L., Shovelin S., Bourke B., Drumm B., Rowland M., Clyne M. **The use of stool specimens reveals Helicobacter pylori strain diversity in a cohort of adolescents and their family members in a developed country.** *International Journal of Medical Microbiology*. 2018, **308**(2):247-255.
244. Enroth H., Engstrand L. **Immunomagnetic separation and PCR for detection of Helicobacter pylori in water and stool specimens.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, **33**(8):2162-2165.
245. Verweij J.J., Stensvold C.R. **Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections.** *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, **27**(2):371-418.
246. Leggett H.C., Cornwallis C.K., West S.A. **Mechanisms of pathogenesis, infective dose and virulence in human parasites.** *PLoS Pathogens*. 2012, **8**(2):e1002512.
247. Jazmati N., Hellmich M., Licanin B., Plum G., Kaasch A.J. **PCR cycle threshold value predicts the course of Clostridium difficile infection.** *Clinical Microbiology and Infection*. 2016, **22**(2):e7-e8.
248. Shioda K., Barclay L., Becker-Dreps S., Bucardo-Rivera F., Cooper P.J., Payne D.C., Vinjé J., Lopman B.A. **Can Use of Viral Load Improve Norovirus Clinical Diagnosis and Disease Attribution?** *Open Forum Infectious Diseases*. 2017, **4**(3):ofx131.
249. Dong Y., Peng C.-Y.J. **Principled missing data methods for researchers.** *SpringerPlus*. 2013, **2**(1):222.
250. Lindsay B., Ramamurthy T., Sen Gupta S., Takeda Y., Rajendran K., Nair G.B., Stine O.C. **Diarrheagenic pathogens in polymicrobial infections.** *Emerging Infectious Diseases*. 2011, **17**(4):606-611.
251. Halstead F.D., Lee A.V., Couto-Parada X., Polley S.D., Ling C., Jenkins C., Chalmers R.M., Elwin K., Gray J.J., Iturriza-Gomara M. *et al.* **Universal extraction method for gastrointestinal pathogens.** *Journal of Medical Microbiology*. 2013, **62**(10):1535-1539.
252. Opel K.L., Chung D., McCord B.R. **A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR.** *Journal of Forensic Sciences*. 2010, **55**(1):25-33.
253. Singh R.S., Kumar S. **A protocol to remove colored metabolites and other inhibitors from plant tissues to facilitate RNA isolation suitable for downstream applications.** *Biotechnology Progress*. 2012, **28**(5):1303-1307.
254. Lees E.A., Miyajima F., Pirmohamed M., Carrol E.D. **The role of Clostridium difficile in the paediatric and neonatal gut - a narrative review.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016, **35**(7):1047-1057.
255. Tracey L., Kirke A., Armstrong P., Riley T.V. **From the hospital to the home--the rise and rise of Clostridium difficile infection.** *Australian Family Physician*. 2015, **44**(10):712-717.
256. Chen S., Gu H., Sun C., Wang H., Wang J. **Rapid detection of Clostridium difficile toxins and laboratory diagnosis of Clostridium difficile infections.** *Infection*. 2016, **45**(3):255-262.
257. Rodriguez-Pardo D., Mirelis B., Navarro F. **Infections caused by Clostridium difficile.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013, **31**(4):254-263.

258. Taori S.K., Wroe A., Hardie A., Gibb A.P., Poxton I.R. **A prospective study of community-associated Clostridium difficile infections: the role of antibiotics and co-infections.** *Journal of Infection.* 2014, **69**(2):134-144.
259. Truong C., Schroeder L.F., Gaur R., Anikst V.E., Komo I., Watters C., McCalley E., Kulik C., Pickham D., Lee N.J. *et al.* **Clostridium difficile rates in asymptomatic and symptomatic hospitalized patients using nucleic acid testing.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2017, **87**(4):365-370.
260. Clare-Pascoe N., Lee M.G., Murphy T., Nicholson A., Ferguson T.S. **A Review of Clostridium difficile Infection at the University Hospital of the West Indies, Jamaica.** *West Indian Medical Journal.* 2015, **64**(4):413-418.
261. Kwon J.H., Olsen M.A., Dubberke E.R. **The morbidity, mortality, and costs associated with Clostridium difficile infection.** *Infectious Disease Clinics of North America.* 2015, **29**(1):123-134.
262. Lessa F.C., Mu Y., Bamberg W.M., Beldavs Z.G., Dumyati G.K., Dunn J.R., Farley M.M., Holzbauer S.M., Meek J.I., Phipps E.C. *et al.* **Burden of Clostridium difficile infection in the United States.** *The New England Journal of Medicine.* 2015, **372**(9):825-834.
263. Razavi B., Apisarnthanarak A., Mundy L.M. **Clostridium difficile: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance.** *Infection.* 2007, **35**(5):300-307.
264. Bouza E., Alcalá L., Reigadas E. **Optimizing the diagnostic testing of Clostridium difficile infection.** *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2016, **14**(9):801-808.
265. Crobach M.J.T., Planche T., Eckert C., Barbut F., Terveer E.M., Dekkers O.M., Wilcox M.H., Kuijper E.J. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection.** *Clinical Microbiology and Infection.* 2016, **22** Suppl 4:S63-S81.
266. Kociolek L.K. **Strategies for Optimizing the Diagnostic Predictive Value of Clostridium difficile Molecular Diagnostics.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2017, **55**(5):1244-1248.
267. Senchyna F., Gaur R.L., Gombar S., Truong C.Y., Schroeder L.F., Banaei N. **Clostridium difficile PCR Cycle Threshold Predicts Free Toxin.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2017, **55**(9):2651-2660.
268. Prendini L., Hanner R., DeSalle R. **Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies.** In: *Techniques in molecular systematics and evolution.* First edition. Springer Science & Business Media; 2002: 176-248.
269. Dashti A.A., Jadaon M.M., Abdulsamad A.M., Dashti H.M. **Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques.** *Kuwait Medical Journal.* 2009, **41**(2):117-122.

Abreviaturas

A.C.: Antes de Cristo

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

C. difficile: *Clostridium difficile*

CCNA: *C. difficile* cytotoxin neutralization assay

CDC: Centers for Disease Control and Prevention / Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

CDI: *Clostridium difficile* infection

cDNA: Complementary DNA / DNA complementario

CI: Confidence interval

CM: Copan MSwab™

Cq o Ct: Quantification cycle / ciclo de cuantificación

D.C.: Después de Cristo

DEAE: Dietilaminoetil

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico

dsDNA: Double-stranded DNA / DNA de doble cadena

dsRNA: Double-stranded RNA / RNA de doble cadena

DTT: Dithiothreitol / ditiotreitól

E: Mean individual E_A of duplicate

E. coli: *Escherichia coli*

E_A : Individual amplification efficiency / eficiencia de la amplificación individual

EAEC: Enteraggative *Escherichia coli* / *Escherichia coli* Enteroagregativa

ECD: *Escherichia coli* diarreogénica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHEC: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* / *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EIA: Enzyme Immunoassay / Ensayo inmunoenzimático

EIEC: Enteroinvasive *Escherichia coli* / *Escherichia coli* Enteroinvasiva

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / Ensayo por inmovilización ligada a enzimas

EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli* / *Escherichia coli* Enteropatógena

ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli* / *Escherichia coli* Enterotoxigénica

EU: European Union / Unión Europea

F o FI: End-point fluorescence intensity / fluorescencia final alcanzada

FISH: Fluorescence in situ hybridization / hibridación fluorescente in situ

FN: False negative

FP: False positive

g: Gramo

GDH: Glutamate dehydrogenase / glutamato deshidrogenasa

IAHA: Immune adherence hemagglutination assay / ensayo de inmunoadherencia-hemoaglutinación

IC: Internal nucleic acid control

IDSA: Infectious Diseases Society of America

INE: Instituto Nacional de Estadística

L o l: Litro

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification / amplificación isotérmica mediada por bucle

LB: VIASURE Lysis & NA Stabilization Buffer

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

MCNI: Maximum concentration of no interference

MERS-CoV: *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* / Síndrome respiratorio por coronavirus de Oriente Medio

mg: Miligramo

ml: Mililitro

MMLV RT: *Moloney murine leukemia virus retrotranscriptase*

NA: *Nucleic acid* / ácido nucleico

NAATs: *Nucleic acid amplification tests*

NASBA: *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

NFW: *Nuclease free water*

NGS: *Next-Generation Sequencing* / Secuenciación

nm: Nanómetro

NPA: *Negative predictive value*

OPA: *Overall percent agreement*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* / Reacción en cadena de la polimerasa

PPA: *Positive predictive value*

qPCR: *Real-time PCR* / PCR en tiempo real

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RFU: *Relative Fluorescence Unit* / Unidad de fluorescencia relativa

RIA: *Radioimmunoassay* / Radioinmunoensayo

RM: *VIASURE RNA-DNA Extraction Kit*

RNA: *Ribonucleic acid* / ácido ribonucleico

rRNA: *Ribosomal ribonucleic acid* / ácido ribonucleico ribosómico

RSV: *Respiratory syncytial virus* / virus respiratorio sincitial

RT: *Reverse transcription* / retrotranscripción

RT-qPCR: *Reverse transcriptase real-time PCR* / PCR con transcripción reversa en tiempo real

SARS: *Severe Acute Respiratory Syndrome* / Síndrome respiratorio agudo severo

SD: *Standard deviation* / desviación estándar

SDS: Dodecilsulfato sódico

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIM: Sistema de Información Microbiológica de Aragón

spp o **sp:** *Several species*

ssRNA: *Single-stranded RNA* / RNA monocatenario

STEC: *Shiga toxin-producing Escherichia coli* / *Escherichia coli* productora de toxina shiga

Subesp: Subespecie

TC: *Toxigenic culture*

TE: Tris-EDTA

Th: *Threshold* / umbral

TN: *True negative*

TP: *True positive*

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

v/v: *volume by volume* / volumen a volumen

WHO: *World Health Organization* / Organización Mundial de la Salud

w/v: *weight by volume* / peso a volumen

λ: Longitud de onda

μl: Microlitro

μm: Micrómetro