|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | 2023-2S |
| **ASIGNATURA** | Biología Molecular | **SEMESTRE:** 6to | **PARALELO: “A”** |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | Mgs. Félix Atair Falconi  |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | **10** | **FECHA:** | **HORA:** 17:00-20:00 | **DURACIÓN: 3** |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **NÓMINA** |
| 1. Acosta Cáceres Melany Sarahi
 | 1. Pomagualli Pucha Jomayra Vanesa
 |
| 1. Acosta Tenelema Marcela Carolina
 | 1. Quezada Vega Karen Vanessa
 |
| 1. Amores Garzón Jonathan Israel
 | 1. Quilligana Urrutia Lorena Estefanía
 |
| 1. Ashqui Agualsaca Kerly Graciela
 | 1. Raza Aulla Doménica Salome
 |
| 1. Balladares Hidalgo Micaela Alexandra
 | 1. Reyes Bayas Angie Viviana
 |
| 1. Barragán Lara Patricio Xavier
 | 1. Ríos Palma Heidi Lissette
 |
| 1. Borja Coba Malena Salome
 | 1. Saltos Michilena Anahely Arai
 |
| 1. Caiza Moya Sulay Maricela
 | 1. Samaniego Álvarez Angie Nicole
 |
| 1. Carrasco Chiluisa Escarlet Nicole
 | 1. Silva Villa Cinthya Dayana
 |
| 1. Carvajal Inca Grace Dayana
 | 1. Silva Hidalgo Lizbeth Estefanía
 |
| 1. Castillo Jiménez María Belén
 | 1. Tapia Jacome Priscila Mikaela
 |
| 1. Cedeño Jiménez José Andrés
 | 1. Tarco Tarco Mónica Esperanza
 |
| 1. Espinoza Espinoza Tanya Aracelly
 | 1. Tirado Martínez Wendy Anahi
 |
| 1. Guamán Roldan Tamia Jamilexs
 | 1. Tuapanta Yupa Johanna Estefanía
 |
| 1. Hernández Grijalva Jessica Ana
 | 1. Vaquilema Anilema María Alicia
 |
| 1. Iglesias Vera Axel Alexander
 | 1. Vargas Mites Helens Mailyn
 |
| 1. Inguillay Guagcha Elvis Estiven
 | 1. Vélez Arévalo Talitacum Yolanda
 |
| 1. Noboa Ríos Jessica Lisbed
 | 1. Vizuete Parra Oliver Daniel
 |
| 1. Osorio Quinatoa Allison Nayeli
 | 1. Yucta Concha Erick Joel
 |
| 1. Parra Parra Alisson Melina
 | 1. Zambrano Cáceres Laura Estefanía
 |
| 1. Pinduisaca Pinta Sandra Verónica
 |  |
| **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | Lab E301 Laboratorio de Química, Toxicología y Forense |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA BACTERIAS Y HONGOS |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | Diagnóstico molecular de micosis de interés clínicoProtocolo de diagnostico |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE.** |
| Aplica los principios de las técnicas de la biología molecular mediante el uso apropiado de protocolos probados, con la finalidad de ser útil en el diagnóstico de enfermedades microbianas. |
| **OBJETIVO GENERAL** | Aplicar una técnica de diagnóstico molecular en enfermedades micóticas |
| **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:** |
| Desarrollar la técnica PCR para el diagnóstico molecular |
| **MARCO TEÓRICO** |
|  |
| El género Cándida está constituido por diversas especies potencialmente causantes de candidiasis, una micosis de expresión clínica variable (infección superficial, mucocutánea e invasiva) cuya frecuencia ha aumentado en las tres últimas décadas debido al incremento de los factores de riesgo en los pacientes inmunocomprometidos.La candidiasis invasiva es la infección nosocomial de origen fúngico más importante por su frecuencia y gravedad, con índices de letalidad ≥ 40%. Los principales factores de oportunismo ligados a esta infección incluyen la diabetes mellitus, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-sida, la fiebre asociada a neutropenia, las neoplasias, la instalación prolongada de catéteres venosos o urinarios, las válvulas cardíacas, el uso prolongado de esteroides, de antibióticos de amplio espectro y de inmunosupresores, la cirugía y el trasplante de órganos sólidos.Entre las más de 150 especies de Candida descritas, solo alrededor de 15 han sido aisladas de pacientes como agentes de infección. *Candida albicans* permanece como el agente más común de infecciones nosocomiales, seguido de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*. La importancia de identificar las especies fúngicas involucradas en la infección radica en que algunas de ellas presentan resistencia innata a algunos antifúngicos.El diagnóstico de la candidiasis invasiva es difícil debido a que los signos y síntomas son inespecíficos, así como al hecho de que estas levaduras oportunistas son comensales principalmente de las mucosas en el humano |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** |
| **Equipos** | **Materiales** | **Reactivos** |
| TermocicladorVortexMicropipetas de 2, 20, 100 y 200 µl,MicrocentrífugaFotodocumentador | Guantes desechables de látex, vinil o nitriloTubos para PCRPuntas para micropipetasBaño de hieloGradilla | Muestra de ADN que contenga la región(es) que se desea amplificarBuffer o solución amortiguadoraCloruro de Magnesio (MgCl2)Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)IniciadoresTaq polimerasaAgua ultrapura |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** |
| Extraer el ADN con el reactivo DNAzol usando 1ml para cada muestra, el procedimiento según practica previamente aplicadaPreparar el master mix para la PCR.Utilizar como cebadores para *Cándidas* spp. F 5’-TCGCATCGATGAAGAACGCAGC-3’ y R: 5’-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3’Agua milliQ estéril 14,9ulBuffer 10x (libre de MgCl2) 2,5 ulMgCl2 25 mM 2 uldNTPs 2.5 Mm 2 ulCebador F 10 pmol/uL 0,5 ulCebador R 10 pmol/uL 0,5 ulTaq 5U/uL 0,1 ulADN 2,5 ulEl programa de 30ciclos del termociclador es el siguiente:Desnaturalización inicial 94°C x 5 minutosDesnaturalización 94°C x 30 segundosHibridación 60°C x 30 segundos Extensión 72°C x 45 segundosExtensión final 72°C x 5 minutosColocar 22,5 µL de la mezcla de reacción en cada tubo.Agregar 2.5 µL del ADN problema a cada tubo.Una vez preparadas las mezclas, centrifugar los tubos para eliminar burbujasPreparar el equipo y colocar los tubos de reacción.Ejecutar el programa.Ver y analizar el resultado en un gel de electroforesis. |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** |
| Bandas muy tenues por la calidad de la imagen, pero que se consideran positivas  |
| **OBSERVACIONES** |
| La detección por PCR se requiere de una prolija estrictez en la preparación de los reactivos con instrumentos bien calibrados para evitar variaciones en cada prueba. Además, las concentraciones deben estar bien precisadas que lograr buenos resultados repetitivos.  |
| **CONCLUSIONES** |
| Entre los principales retos en el diagnóstico de *Cándida* se encuentran: La oportunidad diagnostica, la Identificación correcta de especies no *albicans* la identificación de *Cándida auris* y la detección de resistencias de forma confiable, esto mediante pruebas convencionales o la implementación de pruebas moleculares que en muchos casos han mostrado ser bastante apropiadas para cumplir con los retos del diagnóstico de esta levadura de importancia clínica |
| **RECOMENDACIONES** |
| Para realizar el ensayo de la PCR en es muy importante contar con ADN de buena calidad y eliminar la presencia de inhibidores de la PCR que pudieran interferir en ella y producir resultados erróneos.Es muy importante trabajar con pipetas calibradas.Preparar alícuotas de los reactivos para no descongelarlos repetidamente. Las alícuotas de sondas e iniciadores pueden estar en el refrigerador por varias semanas.Preparar una mezcla de reacción para cada punto de la curva de calibración y adicionar el ADN a toda la mezcla, posteriormente dividirla según corresponda. |
| **BIBLIOGRAFÍA/WEBGRAFÍA** |
| Biología molecular Salazar Montes Adriana Mc Graw Hill Interamericana EditoresBiología molecular Gómez Marín Jorge Enrique Corporación para Investigaciones BiológicasBiología molecular y celular Chandart Nalini Wolters Kluwer HealthBiología Molecular y Herencia. Wallace Robert A. Editorial TrillasBioquímica, biología molecular y genética Lieberman Michael Wolters Kluwer |
| **Mgs. Ximena Robalino F.****DIRECTORA DE CARRERA** | **Ing. Félix Falconí O., Mgs****DOCENTE** |