

PCR multiplex: práctica y aplicaciones clínicas

>>> En el siguiente artículo se aborda la utilidad de la PCR multiplex como una herramienta clínica para la ampliación de múltiples secuencias de ADN.

>>> AUTORES

González Amarfil, Cecilia Belen^{1,2}; Gómez, Nidia Noemí y Varas, Silvia Mabel²

1. Alumna avanzada de la carrera Licenciatura en Bioquímica, FQByF. Universidad Nacional de San Luis (UNSL). E-mail: CBGA:

ceciliabelen1234gonzalez@gmail.com

2. Área de Química Biológica. Curso: Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico bioquímico. Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis (UNSL). E-mail: silvia.varas@gmail.com

3. Laboratorio de Morfofisiología, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis (UNSL). IMIBIO-SL (CONICET). E-mail: gomez.nidia@gmail.com

>>> RESUMEN

Introducción: La **PCR multiplex** utiliza los mismos mecanismos que la PCR convencional, solo que en la **PCR multiplex** se amplifican dos o más locus, de forma que se puede ahorrar tiempo a la hora de la amplificación de diferentes secuencias de DNA. La **PCR multiplex** tiene múltiples funciones entre ellas, una muy útil para la detección de múltiples agentes infecciosos virales, bacterianos y fúngicos. Es muy importante su uso para la detección de mutaciones o polimorfismos en distintas presentaciones como ARMS-PCR, GAP PCR, entre otras. Su aplicación de manera rutinaria se ve restringida por la necesidad de numerosos protocolos de estandarización y optimación para determinaciones particulares. El objetivo de esta revisión es definir una serie de normas a seguir cuando el

laboratorio clínico necesita estandarizar una PCR multiplex.

Metodología: La revisión de la literatura se realizó a través de búsquedas en la Base de Datos Cochrane y PubMed-MEDLINE, **LitCovid, google académico y las bases de distintas empresas que comercializan tests diagnósticos de este tipo.**

Resultados: se analizaron distintos protocolos de PCR multiplex usados en investigación experimental, en clínica y en kits comerciales.

Conclusión: Se diseñó un protocolo básico para optimizar las reacciones y sumado a ello se detallan distintas herramientas que se pueden usar.

Palabras claves: reacción PCR, multiplex, Alelo específica, estandarización, diseño *primers: software*

>>> INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para amplificar secuencias específicas de moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y para la posterior detección de los amplicones. La PCR revolucionó la genética, el diagnóstico molecular y la ciencia forense, lo que la convirtió en una técnica estándar en biología molecular. La reacción de PCR es sencilla de configurar, económica y poco exigente, y el único requisito es tener conocimiento de las secuencias de nucle-

ótidos en la secuencia target. Además de su simplicidad, la PCR es robusta, rápida, flexible, económica y sensible.

Desde su desarrollo inicial a principios de la década de 1980^(1,2,3) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) básica se ha adaptado a múltiples variantes; una de estas variantes es la PCR multiplex.

En la PCR multiplex se amplifican n secuencias target, en donde $n > 1$. Cuando mayor es el número de amplicones menor es el rendimiento de los productos amplificados. Se pueden usar hasta 8 pares de cebadores simultáneamente antes de que el rendimiento de los productos amplificados. La formación de productos espurios (dímeros de cebadores) pueden evitarse mediante el diseño de cebadores y ajustando la relación cebador/ADN genómico. Esta técnica se desarrolló inicialmente para el diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne y actualmente se usa para detectar patógenos bacterianos y virales, mutaciones y polimorfismos clínicamente significativos. Además, se la utiliza como control de calidad para comparar la temperatura y determinar el rendimiento de las reacciones en distintos termocicladores^(4,5,6,7).

El objetivo de esta revisión es analizar todos los parámetros que afectan la reacción en la PCR multiplex. Así mismo proponemos un algoritmo que podría ser útil cuando el laboratorio

MEG@NALIZAR
Tecnología y Calidad al servicio de la Salud

● Serología

- Endocrinología ● Química Clínica ● Marcadores Tumorales ● Marcadores Virales
- Hematología ● Inmunología ● Drogas Anticonvulsionantes ● Inmunosupresores

El Megalaboratorio de los Bioquímicos de Cuyo ●
Rigurosos Controles Internos y Externos de Calidad ●

Más de 220 laboratorios de toda la Provincia de Mendoza, ●
confían en Meganalizar por Tecnología, Calidad y resultados en el día

Sede Laboratorio | Montecaseros 2478 Mendoza | Tel. 0261 4373241/42 | mega@analizar-lab.com.ar
Administración | Belgrano 925 Mendoza | Tel. 0261 4412355/65 | gerencia@analizar-lab.com.ar



clínico se propone estandarizar una PCR multiplex de utilidad en el laboratorio clínico.

A-OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE UNA REACCIÓN MULTIPLEX

1-Polimerasa termoestable

Las enzimas ADN polimerasa tienen importantes actividades que le permiten cumplir distintas funciones. Las más importantes son (Tabla 1):

-Actividad polimerasa 5'3': la adición de un nuevo nucleótido en el extremo 3' de una hebra, determinara principalmente la velocidad de una enzima.

-Actividad de exonucleasa 5'3': la polimerasa es capaz de escindir nucleótidos en la dirección de la polimerización (extremo 5'), lo que le permite realizar la reparación del ADN. Esta actividad también se usa para eliminar las sondas unidas cuando

se sintetiza la cadena complementaria.

-Actividad de exonucleasa 3'5': la polimerasa es capaz de escindir nucleótidos que se acaban de introducir y corregir errores en el extremo 3' de una molécula, lo que determinaría la precisión (o actividad correctora) de una enzima.

-Desplazamiento de cadena: la polimerasa es capaz de desplazar el ADN corriente abajo que se encuentra durante la síntesis. Si la polimerasa también tiene actividad de exonucleasa 5'→3', el ADN desplazado se destruye; si no se mantiene intacto.

-Tolerancia dU: la polimerasa puede usar plantillas que contienen uracilo o puede usar dUTP durante la polimerización. La adición de uracilo es una técnica común para prevenir la contaminación cruzada.

-Extremos resultantes: la polimerasa puede generar extremos romos o salientes de adenina. Esto es

TABLA Nº1: Características de las distintas ADN polimerasas

| DNA Polimerasa | Origen | Actividad exonucleasa | Actividad TT Producto final | E | Frecuencia errores (Fidelidad) | Procesividad | Velocidad de extensión | Uso |
|------------------|---|-----------------------|-----------------------------|-----|--|--------------|------------------------|---|
| Taq pol estándar | <i>Thermus aquaticus</i> | 5'→3' | (+) 3'A | 88% | 1error/2x10 ⁴ pb incorporadas | 2Kb/min | 75 nt/seg | ^(a) No se pueden usar para amplificar fragmentos para clonación y expresión, o para estudios de mutagénesis. |
| Taq pol HOT-STAR | <i>Thermus aquaticus</i> +(modificación química o Ac) | 5'→3' | (+) 3'A | 88% | 1error/2x10 ⁴ pb incorporadas | 2Kb/min | 75 nt/seg | Usar para cantidad escasa de ADN o en la PCR multiplex. Idem ^(a) |
| Tli Pol | <i>Thermococcus litoralis</i> | 3'→5' correctora | (-) Romos | 70% | 1error/4x10 ⁵ pb incorporadas | 1Kb/min | 67 nt/seg | |
| Pfu Pol | <i>Pyrococcus furiosus</i> | 3'→5' correctora | (-) Romos | 60% | 1error/7x10 ⁷ pb incorporadas | 0.5Kb/min | ND | |
| HOT-STAR+ HI FI | Platinum II Taq Hot-Start | 5'→3' | (+) 3'A | | | 15 seg/Kb | | |

E: eficiencia; ND: no determinado; TT: transferasa terminal;

bioars



Estrategias modernas en el diagnóstico

Estomba 961 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires Argentina | Tel: +5411 4555 4601 | Mail: pl@bioars.com.ar | Web: www.bioars.com.ar



relevante para aplicaciones posteriores como la clonación.

En las PCR las ADN polimerasas deben tolerar ciclos de alta temperatura sin comprometer su actividad. Las 4 propiedades más importantes para elegir una ADN polimerasas son: especificidad, termoestabilidad, fidelidad, procesividad, velocidad o tasa de extensión y eficiencia⁽⁸⁾. La especificidad de la enzima garantiza que los productos de PCR deseados se obtengan con altos rendimientos y así minimizan los productos no deseados (de fondo). La termoestabilidad es el tiempo que la ADN polimerasa puede tolerar las altas temperaturas requeridas para condiciones específicas de ciclo de PCR y seguir funcionando de la mejor manera y la fidelidad está asociada a la presencia de la actividad correctora. La procesividad indica cuántos nucleótidos puede incorporar la ADN polimerasa durante la síntesis de la nueva hebra, antes de disociarse lo cual está ligado a la velocidad de síntesis de ADN o tasa de extensión de la nueva hebra. La eficiencia es la capacidad de la polimerasa de trabajar con muestras difíciles o con elevado porcentaje de GC. Así, por ejemplo, las polimerasas con elevada procesividad pueden amplificar secuencias con alto contenido de GC (sin potenciadores), muestras comunes con inhibidores de PCR (heparina) y secuencias de distintos tamaños y las de alta fidelidad proporcionan precisión en la replicación de secuencias y son adecuadas para secuenciar y clonar, Tabla 1. La combinación de sus propiedades con sus actividades ha producido distintos grupos de ADN polimerasas, que por su importancia en la aplicación clínica se resumen en: termoestables estándar, Hot-Star, de alta fidelidad (Hi-Fi) y polimerasa para amplificación de amplicones grandes.

La ADN polimerasa HotStarTaq se proporciona en un estado inactivo, sin actividad polimerasa a temperatura ambiente. Esto evita la formación de productos inespecíficos y dímeros de cebadores durante la configuración de la reacción y el primer paso de desnaturalización, lo que conduce a una especificidad de PCR excepcionalmente alta.

La ADN polimerasa HotStarTaq se activa

fácilmente mediante un paso de incubación de 15 minutos a 95 °C, que es fácil de incorporar a los programas de ciclado existentes. El inicio en caliente permite que las reacciones se configuren a temperatura ambiente, lo que hace que la configuración sea rápida y conveniente.

2-Primers

Concentración. La concentración de *primers* en una mezcla de reacción que debe ser ajustada para cada par de primers, ya que pueden tener eficiencias de amplificación variables⁽⁹⁾. Debido a esto, en muchas ocasiones, un producto de amplificación puede observarse bien definido mientras que otros apenas pueden visualizarse e incluso en algunos casos no se observa el amplificación. Además, algunos primers poseen un porcentaje de amplificación muy alto (eficiencia) y como resultado las plantillas pueden saturarse en fase de meseta, consumiendo componentes de reacción y distorsionando los tiempos de alineamiento y extensión⁽¹⁰⁾.

En una reacción de PCR multiplex se ponen inicialmente concentraciones equimolares de cada par de primers (0,1 a 0,5 mM). Si se obtienen productos de amplificación variable (amplicones apenas visibles y otros marcados) se recomienda que la concentración de cebador debe ser de 0,3 a 0,5 mM para un ADN con bajo número de copias o alta complejidad de ADN y para un target con alto número de copias o ADN de baja complejidad, la concentración de cebadores debe ser de 0,04 a 0,4 mM⁽¹¹⁾.

Para cada reacción de PCR multiplex se deben buscar los mejores ajustes en las concentraciones de *primers*, que permitan obtener productos de amplificación nítidos, sin perder la especificidad y sin causar alguna interferencia en el resto de la reacción^(12,13).

Calidad. La calidad de los *primers* es un factor crucial para el éxito de la PCR multiplex. Los problemas encontrados en la PCR multiplex se deben con frecuencia al uso de concentraciones de cebador incorrectas o cebadores de baja calidad. Se recomienda utilizar cebadores desalinizados o

purificados, por ejemplo, mediante HPLC, y disueltos en buffer TE (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) para obtener una solución madre de 50 o 100 μM (Tabla 2).

Tabla 2

| Tabla 2 : Preparación de Mix de Primers 10X* | | |
|--|---|---|
| Preparación stock de primers | 50 μM (50pM/ μl) | 100 μM (100pM/ μl) |
| Volumen de cada Primer | 20 μl | 10 μl |
| Buffer TE csp | 500 μl | 500 μl |

*: Contienen una concentración de cada primer de 2 μM . Alicuotar y congelar

-La cantidad y/o concentración dada después de la disolución de los cebadores suministrados comercialmente es a menudo una aproximación. Se recomienda cuantificarlos. La conversión espectrofotométrica para primers: 1 unidad A_{260} (1 OD) = 20–30 $\mu\text{g}/\text{ml}$

La concentración se puede obtener del

coeficiente de extinción molar (ϵ_{260}) y A_{260} (OD)

A_{260} (DO) = ϵ_{260} x concentración molar del cebador.

Si el valor de ϵ_{260} no se proporciona en la hoja de datos de solicitud de los primers, se puede calcular a partir de la secuencia del cebador utilizando la siguiente fórmula:

$\epsilon_{260} = 0.89 \times [(nA \times 15,480) + (nC \times 7340) + (nG \times 11,760) + (nT \times 8850)]$ donde n = número de bases respectivas.

3-Diseño de cebadores para PCR multiplex: Un requisito previo para el éxito de la PCR múltiplex es el diseño de pares de cebadores óptimos.

-Los cebadores para la PCR multiplex deben tener una longitud de 21 a 30 nucleótidos.



GLYMS[®]
Información en tiempo real

Nuestro servicio

- ➔ Licencia GLYMS instalada en el laboratorio.
- ➔ Soporte técnico
- ➔ Actualizaciones permanentes

Con un único costo mensual.

SOFTWARE PARA LABORATORIOS

Más de 20 años trabajando en salud

www.glyms.com   

Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Bariloche - Tel.: +54 011 2153-4460

administracion@glyms.com

-Los cebadores para la PCR multiplex deben tener un contenido de GC del 40 al 60 %.

La probabilidad de que un cebador tenga más de un sitio de unión específico dentro de un genoma es significativamente menor para los cebadores más largos. Además, los cebadores más largos permiten la hibridación a temperaturas ligeramente más altas donde la actividad de la ADN polimerasa Taq es mayor.

-La temperatura de fusión o de *melting* (T_m) de los cebadores utilizados para la PCR multiplex debe ser de al menos 60°C. Para obtener resultados óptimos se recomienda utilizar pares de cebadores con una T_m de ≥ 68 °C. Por encima de 68 °C, las diferencias en los valores de T_m de diferentes pares de cebadores no suelen afectar al rendimiento. La T_m se puede calcular utilizando la siguiente fórmula: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{número de [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{número de [G+C]})$.

-Siempre que sea posible, se debe diseñar pares de cebadores con valores de T_m similares. La funcionalidad y la especificidad de todos los pares de cebadores deben comprobarse en reacciones individuales antes de combinarlos en un ensayo de PCR multiplex.

4-Temperatura de *annealing* (T_a) es crítica. Si la temperatura de hibridación es demasiado alta, los cebadores de oligonucleótidos hibridan mal, si es que lo hacen, con la plantilla y el rendimiento de ADN amplificado es muy bajo. Si la temperatura de hibridación es demasiado baja, puede ocurrir la hibridación no específica de los cebadores, lo que resulta en la amplificación de segmentos de ADN no deseados. La hibridación generalmente se realiza entre 3 °C y 5 °C por debajo de la temperatura de fusión calculada a la que los cebadores de oligonucleótidos se disocian de su ADN molde. Existen muchas fórmulas para determinar la temperatura de fusión teórica. Por ello, es recomendable usar el gradiente de temperatura del termociclador para determinar la temperatura de hibridación óptima.

Posteriormente, para determinar las condiciones óptimas de T° de *annealing*, se preparan 3

reacciones idénticas y se colocan en las posiciones del bloque que corresponden a las temperaturas de 57, 60 y 63°C, Tabla 3.

Tabla 3

| Tabla N° 3: Utilización del gradiente de temperatura para obtener la T° de <i>annealing</i> óptima para PCR multiplex | |
|--|--|
| T_m más baja de todos los primers usados en la multiplex | Rango de T° para el gradiente del termociclador |
| <60°C | 48-60°C |
| 60-66°C | 57-60°C |
| 68°C | 60-63°C |

5- T_m . La temperatura de fusión (T_m , *temperature melting*) es la temperatura a la que el 50% del cebador y su secuencia complementaria forman un dúplex, y se puede calcular de varias maneras. El método más simple para estimar la T_m del cebador es por el número de nucleótidos presentes en el oligo de ADN, usando la fórmula: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$. Depende directamente de la longitud y composición de la molécula de ADN. Una hebra más larga y un mayor contenido de guanina-citosina (GC) son favorables para una temperatura de fusión más alta.

La temperatura de fusión es un factor extremadamente importante en PCR, porque con un valor alejado de la temperatura ideal se pueden generar resultados indeseables, como la baja tasa de replicación. Es importante que las T_m de los primers sean lo más parecidas entre sí.

6-Programas para diseño en PCR multiplex

MultiPLX: Existen en la web numerosos programas para el diseño de primers para PCR multiplex. Estos programas ayudan a evaluar diferentes características de los pares de primers (composición de bases, longitud, estructuras complementarias, alineación y elegir el par más apropiado para utilizar en la reacción. Algunos de estos programas son gratuitos, mientras que otros son pagos. Con el programa de diseño de primers se verifican los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) para ⁽¹⁾ los dúplex entre los cebadores y sus sitios de unión en los targets y ⁽²⁾ las estructuras secundarias prevista para cada oligonucleótido.

Para el uso de PCR multiplex se aconseja el uso de MultiPLX.

MultiPLX, es un nuevo programa para la agrupación automática de cebadores de PCR. Puede utilizar muchos parámetros diferentes para estimar la compatibilidad de los cebadores, como las interacciones de cebadores entre sí y las interacciones entre cebadores y productos, la diferencia en las temperaturas de fusión, la diferencia en la longitud del producto y el riesgo de generar productos alternativos a partir de la plantilla. Además, tiene la capacidad de realizar una agrupación automática de un gran número (miles) de pares de cebadores^(14,15,16).

a-Secuencia. Al diseñar cebadores para PCR multiplex, se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

-Evitar la complementariedad de 2 o 3 bases en los extremos 3' de los pares de cebadores para reducir formación de primer-dímero.

-Evitar los mal-alineamientos del extremo 3' del cebador y la secuencia de la plantilla target.

-Evitar tramos de tres o más G y/o C en el extremo 3'.

-Evitar secuencias complementarias dentro de los cebadores y entre pares de cebadores.

b- Composición de bases: El porcentaje de GC que deben tener los *primers* debe asegurar la unión estable entre el primer y el ADN templado. El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60/40. Se recomienda que en los extremos las últimas bases sean G o C⁽¹⁷⁾. Lo ideal es que el extremo 5' se estabilice con 1 o 2 bases G/C y el extremo 3' con no más de una base G/C; ya que esta composición asegura la unión correcta del primer al molde en el extremo 3', lo que aumenta la

DENGUE

Dengue Ag NS1

OnSite® Dengue Ag Rapid Test kit x 30 det.

Controles Ag NS1

Positiva Dengue Ag External Control Negativo y Positivo x 5 ml

Dengue IgG

OnSite® Dengue IgG Rapid Test kit x 10/30 det.

Dengue IgG/IgM

OnSite® Dengue IgG/IgM Combo Rapid Test kit x 10/30 det.

Dengue Ag NS1-IgG/IgM

OnSite® Dengue Duo Ag-IgG/IgM Rapid Test kit x 10/30 det.



CROMOION
ABASTECIMIENTO INTEGRAL HOSPITALARIO
División Diagnóstico - Biología Molecular

Central: Oporto 6125 - Ciudad de Buenos Aires - Argentina
Planta Elaboradora Punta Alta, Prov. de Buenos Aires
mail: reporte@cromoion.com
www.cromoion.com

eficiencia de la reacción. Sin embargo, cuando en el extremo 3' hay 3 o más G/C se puede unir establemente a casi cualquier secuencia con tres G/C. Además, se deben evitar los tramos de polipurinas o polipirimidinas ya que producen uniones débiles o fuertes, que pueden separar el complejo primer-templado en esa zona o producir una hibridación no específica, respectivamente.

c- Longitud: es una característica fundamental para la unión al templado con especificidad. La longitud ideal es de 18 a 24 nt⁽¹⁾. Longitudes muy largas aumentan la temperatura de *melting* de los *primers* y por lo tanto influyen en la temperatura de *annealing*. Cuando esta última es muy baja hay inespecificidad, y si es muy alta hay bajo rendimiento o no amplificación. Por lo anteriormente expuesto, la longitud del primer es un parámetro importante que debe analizarse con detenimiento para lograr un buen apareamiento con el templado y obtener una óptima especificidad.

d- Estructuras complementarias: *hairpin*, *self-dimer*, *dimer* (Secuencias complementarias dentro del mismo primer y entre primer)

Secuencias complementarias entre *primers*. Cuando existe una complementariedad *intra-primer* con más de 3 pb, el primer se pliega sobre sí mismo en una estructura doble cadena interfiriendo con el *annealing* al ADN templado. Otra de las estructuras que se pueden formar son los dímeros, por complementariedad inter-primer; esto disminuye la formación de producto por competencia.

Para analizar las posibles interacciones primer-primer, se pueden utilizar programas informáticos tal como “*Oligo Analyzer*”, en el cual se puede observar cuantas estructuras de este tipo se forman, cual es la temperatura a la cual se forman, etc.

7-dNTPs

La concentración de dNTP debe variar según el tamaño de la secuencia target a amplificar. En una PCR multiplex las concentraciones de dNTP pueden incrementarse en forma gradual de

50 a 1200 mM cada uno. Los mejores resultados fueron a 200 y 400 mM de cada dNTP, valores por encima de los cuales la amplificación se inhibe rápidamente. Se permite una concentración más baja de dNTP (50 mM) pero se obtiene menor cantidad de productos. En contraste, un aumento de las concentraciones de dNTP puede inhibir rápidamente la PCR, ya que estos unen magnesio^(12,13).

A pesar de lo anteriormente mencionado, recientemente se ha propuesto el uso de dNTPs de inicio en caliente, que contienen un grupo protector 3'-tetrahidrofurano (THF) termolábil que se libera a altas temperaturas de PCR. Su uso bloquea la extensión del cebador a las temperaturas iniciales de trabajo más bajas, lo que reduce la acumulación de artefactos fuera del objetivo durante la PCR. A temperaturas de inicio en caliente (~95 °C), se libera el grupo protector 3'-THF, lo que produce un sustrato de dNTP estándar adecuado para la incorporación de la polimerasa de ADN. La aplicación de estos dNTP mejora la eficiencia, la sensibilidad y la especificidad en la PCR multiplex⁽¹³⁾.

Varios fabricantes (Roche, QIAGEN, GE Healthcare Life Sciences) venden dNTP que han sido purificados mediante HPLC de alta resolución (HR-HPLC) y están hechos específicamente para su uso como sustratos en PCR. Estos dNTP están libres de tetrafosfatos y pirofosfatos que pueden inhibir las PCR. Las soluciones madre de dNTP son sensibles a la congelación y descongelación. Después de algunos ciclos de congelación y descongelación, la eficiencia de las PCR comienza a disminuir. Para evitar problemas, las existencias de dNTP (100–200 mM), ya sean caseros o comprados, deben almacenarse a -20 °C en alícuotas pequeñas (2–5 µL) en recipientes de 10 mM Tris (pH 8,0) que debe desecharse tras el segundo ciclo de congelación-descongelación. El almacenamiento en H₂O no tamponada puede promover la hidrólisis ácida de los dNTPs. Durante el almacenamiento a largo plazo a -20°C, pequeñas cantidades de agua se evaporan y luego se congelan en las paredes del vial. Para minimizar los cambios en la concentración, los viales que contienen soluciones de dNTP deben centrifugarse durante unos



¡NUEVO LANZAMIENTO! STANDARD F H. pylori Ag FIA

INTRODUCCIÓN

STANDARD F H. pylori Ag FIA se basa en tecnología de inmunofluorescencia junto al analizador STANDARD F, para medir el antígeno H. pylori en muestras de heces humanas.



CARACTERÍSTICAS

- ✓ Tecnología FIA: sistema POC (Point of care) con lectura automatizada por fluorescencia y obtención de valor de índice como resultado.
- ✓ Automatización: F2400 (70 test/h) para instituciones con alta demanda y F200 (portátil) para procesar de a una muestra.
- ✓ El kit contiene todo lo necesario para la toma de muestra y el procesamiento.
- ✓ Sensibilidad 100% (5/5) - Especificidad 100% (150/150)
- ✓ Tiempo de prueba: 10 minutos
- ✓ Almacenamiento: 2-30°C

INTERPRETACIÓN DE RESULTADO

| Resultado | Valor límite COI (del inglés Cutoff index) | Interpretación |
|-----------|--|--|
| Positivo | COI \geq 1,0 | Positivo para H. Pylori Ag |
| Negativo | COI < 1,0 | Negativo para H. Pylori Ag |
| Inválido | No se muestra el valor COI | Se debe repetir la prueba con un nuevo dispositivo de prueba |

PRESENTACIÓN

| Cat. No. | Producto | Temperatura de almacenamiento | Kit de prueba |
|----------|-----------------------------|-------------------------------|---------------|
| 10HPY10D | STANDARD F H. pylori Ag FIA | 20-30° C / 36-86° F | 25 T/equipo |

segundos en una microcentrífuga después de descongelarlos.

8-Cationes divalente: Concentración de $MgCl_2$

Algunas empresas (p. ej., *Life Technologies*, *Sigma-Aldrich*, *Roche* y *Alliance Bio*) venden kits de optimización de tampones para PCR que contienen varias formulaciones de tampones que permiten a los investigadores determinar las condiciones de reacción óptimas para combinaciones particulares de cebador-plantilla. Una vez que se han identificado estas condiciones, el mejor tampón se puede comprar en volumen o ensamblar en el laboratorio. Alternativamente, la optimización se puede lograr comparando el rendimiento obtenido de una serie de 10 PCR que contienen concentraciones de Mg^{2+} que oscilan entre 0,5 y 5,0 mM, en incrementos de 0,5 mM.

Balance dNTP/ $MgCl_2$: los dNTP se unen a Mg^{2+} , la concentración de ambos está estrechamente relacionada. Un aumento en la concentración de los dNTP puede inhibir rápidamente la PCR, ya que no queda magnesio libre para que la enzima funcione. Por otra parte, la concentración excesiva de magnesio estabiliza la doble cadena de ADN y evita la desnaturalización completa del mismo, lo que reduce el rendimiento. Además, puede estabilizar la unión de los *primers* en sitios incorrectos, con lo cual disminuye la especificidad. Se ha visto que combinando varias cantidades de dNTP y $MgCl_2$, se encontró que 200 mM de cada dNTP funcionan bien en 1,5–2 mM de $MgCl_2$. El umbral para la reacción fue aproximadamente de 0,5 a 1 mM de $MgCl_2$ sobre la concentración total de dNTP, con amplificación por PCR reducida por debajo de esta concentración de $MgCl_2$ ⁽⁶⁾.

9-Concentración de Buffer

Los buffers para ser usados en PCR Multiplex facilitan la amplificación de múltiples productos de PCR y presentan una equilibrada concentración de sales y aditivos para garantizar eficiencias comparables para la hibridación y extensión de todos los cebadores en la reacción ⁽¹⁸⁾.

10-Templado (ADN genómico)

El genoma haploide humano tiene $3,3 \times 10^9 nt = 4,7 \times 10^7 pM/g = 2,8 \times 10^5$ moléculas/g. Tanto la calidad como la cantidad de la plantilla inicial de ácido nucleico afectan la PCR, en particular, la sensibilidad y la eficiencia de las amplificaciones. La eficiencia de hibridación de los cebadores con la plantilla es un factor importante en la PCR. Debido a la naturaleza termodinámica de la reacción, la relación cebador: plantilla influye fuertemente en la especificidad y eficiencia de la PCR y debe optimizarse empíricamente. Si se usa muy poca ADN genómico, es posible que los cebadores no puedan encontrar sus secuencias complementarias. Por el contrario, si es demasiada cantidad puede conducir a un aumento de los eventos de cebador incorrecto.

11-Uso de Aditivos

Son muy usados en las PCR multiplex y afectan distintos parámetros ⁽¹⁹⁻²⁶⁾. Se clasifican en:

Aditivos que afectan la T_m y la estabilidad

-Sulfato de amonio

Se ha demostrado que el sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ aumenta la eficiencia y la especificidad de la PCR en concentraciones de entre 15 y 30 mM, cuando se usa en lugar de KCl, o cuando se usa a una concentración de 10 mM junto con una concentración reducida de KCl de 10 mM. Parece funcionar al desestabilizar los enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos, reduciendo efectivamente la T_m de una manera que pueda favorecer la hibridación específica sobre la inespecífica.

-CTMA o cloruro de tetrametilamonio a una concentración de 60 mM, aumenta tanto el rendimiento como la especificidad al aumentar la estabilidad de la unión AT, aparentemente al acercar la energía de unión a la de los enlaces GC.

Aditivos para resolver las estructuras secundarias

-Formamida: la formamida en una concentración de 1-5 % aumenta la especificidad cuando se amplifica en regiones ricas en GC lo cual interfiere con la formación de enlaces de hidrógeno entre las

dos hebras de ADN.

-**Betaína:** fue descubierta en la remolacha y es un análogo de aminoácido con cargas positivas y negativas cercanas al pH neutro. Reduce la formación de estructuras secundarias al disminuir la T_m de las regiones ricas en GC. Se utiliza a una concentración de 0,5 M a 1,0 M.

-**Dimetilsulfóxido (DMSO)** en una concentración de 1-10 % actúa interrumpiendo el *re-annealing* inter e intrahebra en regiones ricas en GC. El cual se une a los surcos mayor y menor del ADN y desestabiliza la doble hélice; también proporciona estabilidad térmica contra la depuración.

-**EcoSSB:** es una proteína de unión monocatenaria derivada de *E. coli*. Esta proteína debe ser agregada en cantidades de 0,7 a 1,5 ug por reacción, se cree que aumenta la procesividad de Taq polime-

rasa y/o la fusión de estructura secundaria, aumentando la eficiencia al amplificar secuencias difíciles.

-Proteína del gen 32 del fago T4 es una proteína de unión monocatenaria, pero esta se deriva del bacteriófago T4. Esta proteína puede aumentar la eficiencia en reacciones difíciles de RT-PCR cuando se agrega a una concentración de 150 ng/ μ L.

-**7-deaza-2'-desoxiguanosina (deaza-dGTP):** es un recurso que se usa cuando se amplifica ADN de baja calidad. Se reemplaza dGTP con 7-deaza-2'-desoxiguanosina en la misma concentración. Así se puede aumentar el rendimiento cuando se amplifica en regiones ricas en GC.

Estabilizadores Taq polimerasa

-**BSA:** el uso de BSA en concentraciones de 10 a 100 ug/ml una péptidos y sacáridos que puedan inhibir

EL SEGUIMIENTO DE TUS PACIENTES EN UNA ÚNICA PLATAFORMA

Resultados de calidad en tu laboratorio



Avalos 3651 | (1605) | Munro | Buenos Aires | Argentina.

Tel/Fax (54 11) 4512 5666 | ventas@gematec.com.ar | www.gematec.com.ar



la polimerasa y puede reducir su adsorción en el tubo de reacción.

-Detergentes: Tween-20, Tritón X-100 o NP-40 pueden ser seguros en concentraciones de hasta el 0,5%.

-Glicerol: El glicerol adicional a una concentración entre el 5 y el 20 % puede aumentar los rendimientos y permitir la amplificación de amplicones más largos, posiblemente aumentando la estabilidad térmica de la polimerasa y reduciendo la T_m de los primers.

Agente(s) de aglomeramiento

-El Polietilenglicol (PEG) ocupa un volumen en la mezcla de reacción, aumentando la concentración efectiva de todos los demás reactivos. El aumento efectivo de oligos en particular aumentará, a su vez su T_m y promoverá la interacción. Se utiliza PEG-6000 a una concentración del 5 al 15%.

B-PROTOCOLOS PARA PCR MULTIPLEX

Inicialmente tenemos dos opciones: PCR multiplex estándar y multiplex con secuencias ricas en GC ($\geq 65\%$ de contenido de GC).

Protocolo 1: PCR multiplex estándar

Este protocolo está optimizado para todas las aplicaciones de PCR multiplex estándar, tabla 4.

Tabla IV

| Tabla N°4 : Protocolo Universal de ciclado para PCR multiplex | | | |
|---|------------|-------------|---|
| Paso | Tiempo | Temperatura | |
| Paso Inicial | 15 minutos | 95°C | Activación Taq Hot-Star |
| Ciclado | | | |
| Desnaturalización | 30s | 94°C | |
| Annealing | 90s | 57-63°C | Si no puede hacerse el gradiente, comenzar con 60°C |
| Extensión | 90s | 72°C | Depende de la procesividad de la enzima |
| Ciclos | 30-35 | | |

-Al utilizar un sistema de PCR multiplex ya establecido, se debe utilizar la temperatura de hibridación previamente establecida, en combinación con las condiciones de ciclo especificadas en este protocolo.

-El tiempo de *annealing* debe ser de 90 segundos.

-Utilizar concentraciones iguales (0,2 μM) de todos los cebadores.

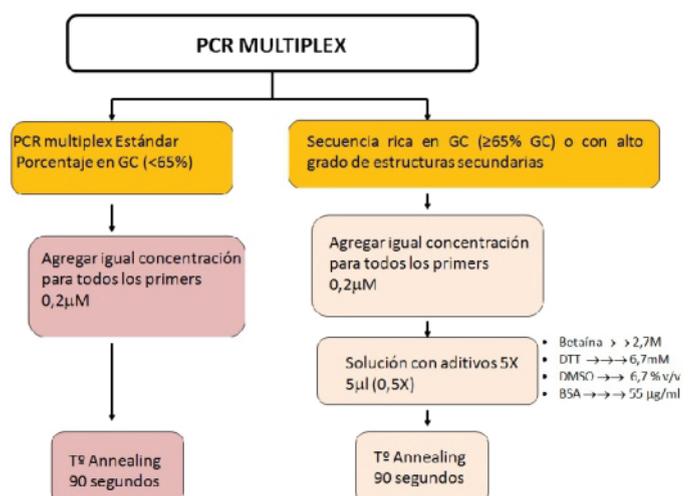
-La PCR debe comenzar con un paso de activación de 15 minutos a 95 °C para activar Polimerasa de ADN HotStar.

-Comenzar con una concentración inicial de Mg^{2+} de 3 mM.

Protocolo 2: PCR multiplex para secuencias complicadas

Se utiliza este protocolo para los sistemas de PCR ricos en GC ($\geq 65\%$ de contenido de GC) o que tengan un alto grado de estructura secundaria. El uso de aditivos cambia el comportamiento de fusión del ADN. En la Figura 1, podemos observar los pasos a seguir en una PCR multiplex. La elección de uno u otro camino va a depender de las características de la secuencia a amplificar. Si tiene un porcentaje de GC menor de 65% o si la secuencia tiene una concentración de GC igual o mayor del 65%. En este caso se utilizan distintos aditivos en la concentración indicada.

Figura 1





URS-10H: Tiras para la medición de glucosa, proteína, pH, sangre, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno, nitrito, densidad específica y leucocitos

Los resultados de la prueba son dados por comparación del color de la tira, con el mapa de colores o reconociendo el cambio de color con los analizadores de orina BW-200, BW-300 y BW-500.

Envase x 100 tiras

Conservar en un lugar fresco, seco y al abrigo de la luz, a temperaturas entre 2 - 30 °C.

Venta exclusiva a laboratorios de análisis clínicos. Uso Profesional Exclusivo



CROMOION
 ABASTECIMIENTO INTEGRAL HOSPITALARIO
 División Diagnóstico - Biología Molecular

Central: Oporto 6125 - Ciudad de Buenos Aires - Argentina
 Planta Elaboradora Punta Alta, Prov. de Buenos Aires
 mail: reporte@cromoion.com
www.cromoion.com
 Tel: +54 11 4644-3205/06

APLICACIONES CLÍNICAS

Algunas de las actuales aplicaciones en bioquímica clínica incluyen su uso como diagnóstico microbiológico y en enfermedades genéticas. En las últimas décadas, los métodos moleculares, entre los cuales se encuentra la PCR multiplex han brindado ayuda adicional para reconocer los patógenos etiológicos de la meningitis. Se ha demostrado que las herramientas moleculares son rápidas, baratas y eficientes para identificar diferentes microorganismos, como bacterias, virus u hongos. Con respecto a la meningitis bacteriana, se ha informado que los métodos de diagnóstico molecular pueden ser sensibles y específicos para diferentes organismos y pueden ser aplicados para detectar patógenos en muestras de sangre o LCR de pacientes en los que los cultivos permanecen negativos o que fueron pretratados con antimicrobianos⁽²⁷⁻³⁰⁾. En adultos se ha usado para la diferenciación rápida de micobacterias no tuberculosas de *M.tuberculosis*⁽³¹⁾. Además, una de las grandes ventajas de la PCR multiplex es el uso de un pequeño volumen de muestra clínica para el ensayo molecular de varios patógenos simultáneamente. Se la utiliza para el diagnóstico de infecciones respiratorias virales⁽³²⁾, para el diagnóstico de protozoos intestinales⁽³³⁾, para vaginosis⁽³⁴⁾; en otitis por microorganismos⁽³⁵⁾, para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*⁽³⁶⁾ y diagnóstico prenatal⁽³⁷⁾. Liu y col (2020) desarrolló una multiplex para detectar los genes *mcr* para detectar la resistencia a la colistina mediada por plásmidos⁽³⁸⁾ y Wang y col. (2015) una multiplex gap-PCR para detectar delecciones en el gen de globina causantes de -talasemia⁽³⁹⁾.

>>> AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte de Ciencia y Técnica Universidad Nacional de San Luis (UNSL)(PROICO 2-2318).

CBGA tiene una beca EVC-CIN (Resolución CE N° 1612/21).

>>> REFERENCIAS

1-Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

2-Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

3-Mullis KB, Faloona FA. 1987. Síntesis específica de ADN in vitro a través de una reacción en cadena catalizada por polimerasa. *Métodos Enzymol* 155: 335–350

4-Yang I, Kim YH, Byun JY, Park SR. Use of multiplex polymerase chain reactions to indicate the accuracy of the annealing temperature of thermal cycling. *Anal Biochem*. 2005;338(2):192-200. doi:10.1016/j.ab.2004.09.035

5-Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(26):6471-6483. doi:10.1007/s00216-014-7857-x

6-Kim YH, Yang I, Bae YS, Park SR. Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition. *Biotechniques*. 2008;44(4):. doi:10.2144/000112705

7-Nasser, G.A., Abdel-Mawgood, A.L., Abouelsoud, A.A. et al. New cost effective design of PCR heating cyclers system using Peltier plate without the conventional heating block. *J Mech Sci Technol* 35, 3259–3268 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12206-021-0646-5>.

8- Nikoomanzar A, Chim N, Yik EJ, Chapat JC. Engineering polymerases for applications in synthetic biology. *Q Rev Biophys*. 2020;53:e8. Published 2020 Jul 27. doi:10.1017/S0033583520000050

9- Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol*. 2012;3(5):898-905. doi:10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x

10-Bolivar, A. M., Rojas, A., & Lugo, P. G. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, 3(1), 25-33.

11-Markoulatos P, Sifakos N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47-51. doi:10.1002/jcla.2058

12-Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-511. doi:10.2144/97233rr01

13-Le, T., Ashrafi, E. H., Paul, N. (2009). Enhancing multiplex PCR efficiency using Hot Start dNTPs. *BioTechniques*, 47(5), 972-973.

14-Guo J, Starr D, Guo H. Classification and review of free PCR primer design software. *Bioinformatics*. 2021;36(22-23):5263-5268. doi:10.1093/bioinformatics/btaa910

15-Kaplinski L, Remm M. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Methods Mol Biol*. 2015;1275:127-142. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6_9

16- Kaplinski L, Andreson R, Puurand T, Remm M. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics*. 2005;21(8):1701-1702. doi:10.1093/bioinformatics/bti219

17-Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, 139-258.

18- Engel, H., Kupperts, C., & Loffert, D. (2003). Highly efficient multiplex PCR using novel reaction chemistry. *Qiagen News*, 2, 41-43.

19-Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113(5):1014-1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

20-Jung A, Ruckert S, Frank P, Brabletz T, Kirchner T. 7-Deaza-2'-deoxyguanosine allows PCR and sequencing reactions from CpG islands. *Mol Pathol*. 2002;55(1):55-57. doi:10.1136/mp.55.1.55

21-Frey UH, Bachmann HS, Peters J, Siffert W. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nat Protoc*. 2008;3(8):1312-1317. doi:10.1038/nprot.2008.112

22-Karunanathie H, Kee PS, Ng SF, Kennedy MA, Chua EW. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*. 2022;197:130-143. doi:10.1016/j.biochi.2022.02.009

23-Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(2):10.1101/pdb.prot095141. Published 2019 Feb 1. doi:10.1101/pdb.prot095141

24-Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neuzil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020;69(4):317-325. doi:10.2144/btn-2020-0057

25-Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*. 2010;5(6):e11024. Published 2010 Jun 11. doi:10.1371/journal.pone.0011024

26-Chou Q. Minimizing deletion mutagenesis artifact during Taq DNA

polymerase PCR by *E. coli* SSB. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(16):4371. doi:10.1093/nar/20.16.4371

27-Kasper DC, Altiok I, Mechtler TP, et al. Molecular detection of late-onset neonatal sepsis in premature infants using small blood volumes: proof-of-concept. *Neonatology.* 2013;103(4):268-273. doi:10.1159/000346365

28-Molloy, E.J., Wynn, J.L., Bliss, J. et al. Neonatal sepsis: need for consensus definition, collaboration and core outcomes. *Pediatr Res* 88, 2-4 (2020). doi:10.1038/s41390-020-0850-5

29-Albuquerque RC, Moreno ACR, Dos Santos SR, Ragazzi SLB, Martinez MB. Multiplex-PCR for diagnosis of bacterial meningitis. *Braz J Microbiol.* 2019;50(2):435-443. doi:10.1007/s42770-019-00055-9

30-Poplin V, Boulware DR, Bahr NC. Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. *Biomark Med.* 2020;14(6):459-479. doi:10.2217/bmm-2019-0333

31-Ahmad S, Mokaddas E. Diversity of Nontuberculous Mycobacteria in Kuwait: Rapid Identification and Differentiation of Mycobacterium Species by Multiplex PCR, INNO-LiPA Mycobacteria v2 Assay and PCR Sequencing of rDNA. *Med Princ Pract.* 2019;28(3):208-215. doi:10.1159/000498910.

32-Huang HS, Tsai CL, Chang J, Hsu TC, Lin S, Lee CC. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(10):1055-1063. doi:10.1016/j.cmi.2017.11.018

33-Autier B, Belaz S, Razakandrainibe R, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the diagnosis of intestinal protozoa. Comparaison de trois kits commerciaux de PCR multiplex pour la mise en évidence de protozoaires intestinaux. *Parasite.* 2018;25:48. doi:10.1051/parasite/2018049

34-van der Veer C, van Houdt R, van Dam A, de Vries H, Bruisten S. Accuracy of a commercial multiplex PCR for the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2018;67(9):1265-1270. doi:10.1099/jmm.0.000792

35-Aboutalebian S, Ahmadikia K, Fakhim H, et al. Direct Detection and Identification of the Most Common Bacteria and Fungi Causing Otitis Externa by a Stepwise Multiplex PCR. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:644060. Published 2021 Mar 25. doi:10.3389/fcimb.2021.644060

36-Trung TT, Minh TA, Anh NT. Value of CIM, CLO Test and Multiplex PCR for the Diagnosis of Helicobacter Pylori Infection Status in Patients with Gastritis and Gastric Ulcer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(11):3497-3503. Published 2019 Nov 1. doi:10.31557/APJCP.2019.20.11.3497

37-Yang X, Ye Y, Fan D, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of thalassemia through multiplex PCR, target capture and next-generation sequencing. *Mol Med Rep.* 2020;22(2):1547-1557. doi:10.3892/mmr.2020.11234

38-Liu J, Zhang Z, Feng Y, et al. Molecular Detection of the *mcr* Genes by Multiplex PCR. *Infect Drug Resist.* 2020;13:3463-3468. Published 2020 Oct 12. doi:10.2147/IDR.S256320

39- Wang S, Zhang R, Xiang G, et al. Mutation screening for thalassaemia in the Jino ethnic minority population of Yunnan Province, Southwest China. *BMJ Open.* 2015;5(12):e010047. Published 2015 Dec 29. doi:10.1136/bmjopen-2015-010047

LINKS EN LA WEB:

Perfect Match PCR Enhancer (Agilent): <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/600129.pdf>

G C - M e l t (Clontech): https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/PT3316/PT3316-1_112211.pdf

Aditivos: https://openwetware.org/wiki/Berglund:PCR_Additives

AVAN
Tecnologías IVD



H-900 ANALIZADOR DE ELECTROLITOS AUTOMÁTICO

De diseño simple pero confiable. Descarte directo por lo que reduce el riesgo de las obstrucciones y la contaminación cruzada. Procesa grandes volúmenes de trabajo en forma automatizada.

GASTAT 700SERIES SISTEMAS DE GASES EN SANGRE MULTIPARÁMETROS

Fácil de usar, fácil de mantener. La evolución en el análisis de gases en sangre con una nueva propuesta innovadora de Techno Medica Co.Ltd.



Analizadores de GASES EN SANGRE

Padre M. Ashkar N°688 - (CP1672) Gral. San Martin, Bs. As. Argentina
(54 11) 4754-2168 rot. - Whatsapp +54 9 11 6228-4796
info@avan.com.ar - www.avan.com.ar