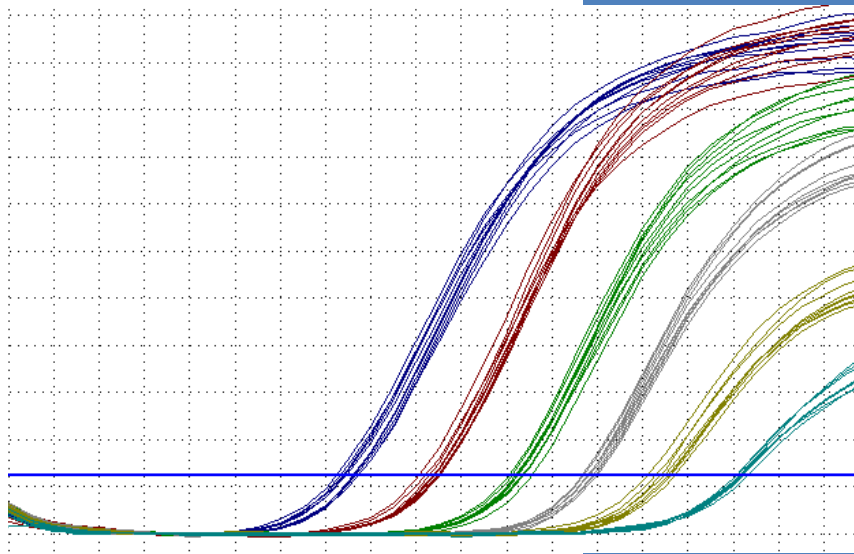


SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR PCR A TIEMPO REAL



Guía de
interpretación
de resultados

Microbial ofrece sistemas para la detección de patógenos en muestras alimentarias y ambientales basados en la PCR a tiempo real, una técnica rápida y robusta que permite obtener resultados fiables e inequívocos en menos de dos horas, permitiendo un considerable ahorro de tiempo. A pesar de la sencillez operativa de la PCR a tiempo real, la correcta interpretación de los resultados puede ser compleja si no se tiene experiencia. Estos resultados se expresan gráficamente gracias al “software” que acompaña a todos los termocicladores. Una correcta lectura de las curvas de amplificación ayudará al responsable del laboratorio a emitir un resultado fiable.

Mediante esta guía, Microbial pretende ofrecer unas pautas básicas de interpretación de los resultados de las reacciones de PCR a tiempo real para sus sistemas de detección de patógenos.

(revisado en septiembre del 2009)

CONTENIDO

1. NOCIONES BÁSICAS DE PCR A TIEMPO REAL.....	3
2. EL CONTROL INTERNO DE AMPLIFICACIÓN	5
3. SISTEMAS DE DETECCIÓN CON 2 FLUORÓFOROS.....	6
4. SISTEMAS DE DETECCIÓN CON 3 FLUORÓFOROS.....	8
5. SISTEMAS DE DETECCIÓN CON SYBRGREEN	10
6. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL	12
7. CONTAMINACIÓN DE LA PCR A TIEMPO REAL.....	13
8. CURVAS DE AMPLIFICACIÓN CON FORMAS ATÍPICAS.....	14

1. NOCIONES BÁSICAS DE PCR A TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN, utilizado como molde para generar millones de copias. La PCR a tiempo real se diferencia de la PCR convencional en que permite monitorizar en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos. Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que ésta es proporcional a la cantidad de ADN generado. Además, el sistema de PCR a tiempo real proporciona mayor sensibilidad y robustez, con la posibilidad añadida de cuantificar la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra.

El resultado de una PCR a tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es en forma exponencial en su inicio, y una tercera fase (*plateau*) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Figura 1). En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal (línea *Threshold* o Umbral).

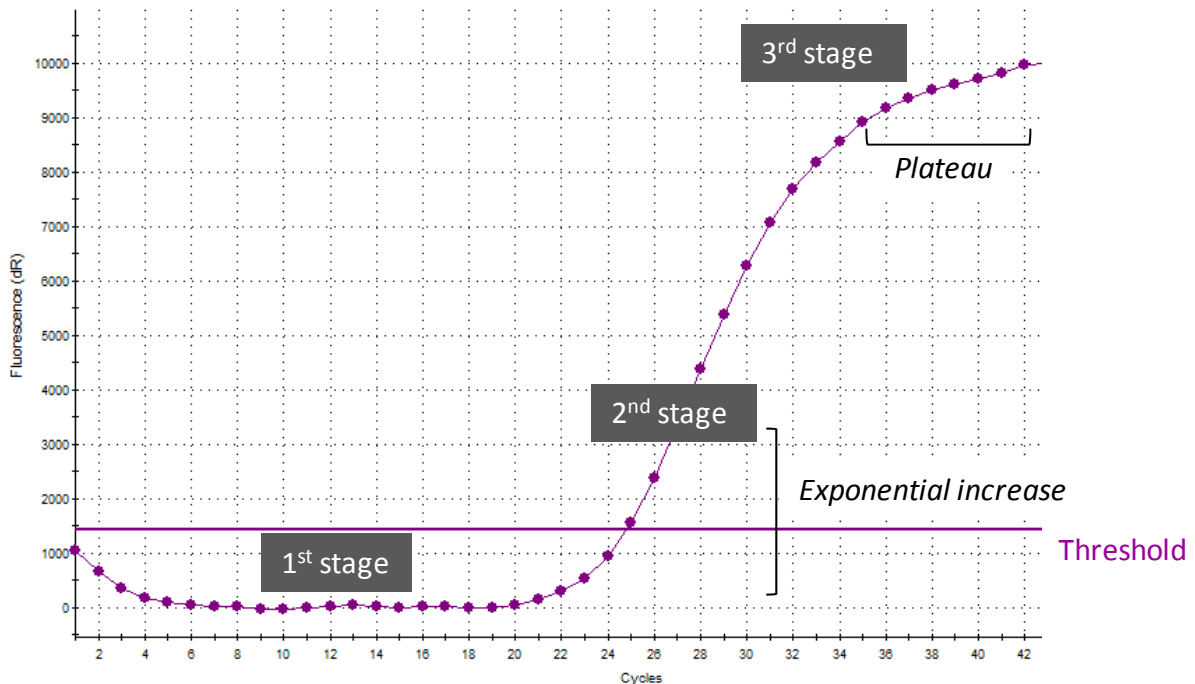


Figura 1. Gráfico de amplificación de PCR a tiempo real mostrando las tres fases de las que consta.

El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina C_t (*Threshold Cycle*). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. Cuanto más ADN inicial tenga la muestra antes se alcanza este valor, pues será menor el número de ciclos necesarios (C_t menor) para ello (Figura 2). Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de C_t aumenta aproximadamente 3,3 ciclos.

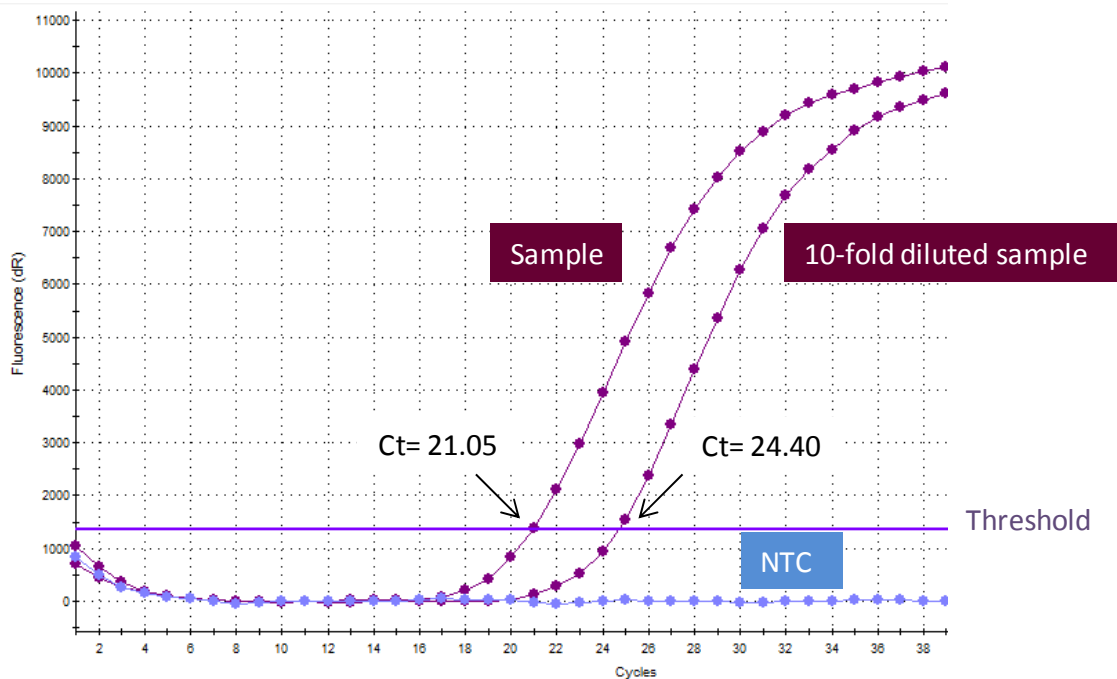


Figura 2. Gráfico de amplificación donde puede verse que la muestra diluida supera el umbral más tarde. Véase que el control blanco (NTC) no supera el valor umbral, puesto que no contiene ADN inicial para que se produzca la reacción de amplificación.

El gráfico de amplificación puede visualizarse con los dos ejes en escala lineal o con el eje de las ordenadas en escala logarítmica (Figura 3). Ambas presentaciones son válidas para interpretar los resultados. El gráfico en escala semilogarítmica puede ser útil para ajustar manualmente el valor umbral dentro de la zona exponencial de la segunda fase, pues esta aparece como una recta (Figura 3B). Existen varios métodos matemáticos para calcular la mejor posición para el umbral, pero en cualquier caso, éste debe situarse en la zona exponencial de la segunda fase. En la actualidad todos los termocicladores incluyen en su software un sistema automático de cálculo del valor umbral, aunque también es posible ajustarlo manualmente dentro de los parámetros recomendados.

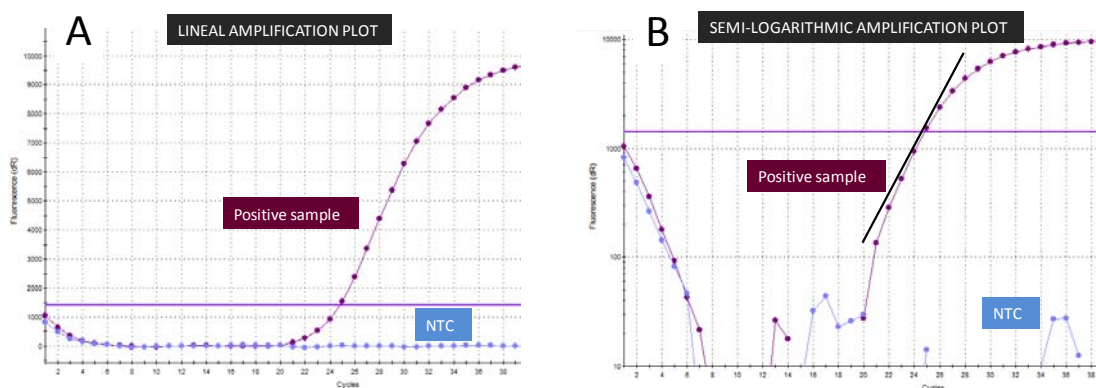


Figura 3. Gráfico de amplificación con escala lineal (3A) y con escala semi-logarítmica (3B). Nótese que las curvas de amplificación presentan una forma diferente pero que el valor umbral es el mismo en los dos gráficos.

2. EL CONTROL INTERNO DE AMPLIFICACIÓN

La fiabilidad de los kits de Microbial está garantizada gracias al control interno de amplificación (IAC) incorporado en la Mix de Reacción. El sistema IAC ha sido específicamente diseñado con el fin de validar la precisión del test, permitiendo distinguir resultados negativos verdaderos de falsos resultados negativos causados por un mal funcionamiento de la PCR (debido a inhibiciones, deterioro de los reactivos de PCR, etc.).

El sistema IAC consiste en la amplificación independiente de una secuencia de ADN artificial que es co-amplificada con el ADN diana del patógeno durante la PCR. El IAC está incorporado a la Mix de Reacción a una concentración cuidadosamente ajustada, de modo que la especificidad y sensibilidad del test no resultan afectadas por la amplificación competitiva de ambos ADNs. Así pues, la señal de amplificación del IAC puede desaparecer en muestras positivas con un alto contenido de ADN del patógeno. No obstante, la señal del IAC debe detectarse siempre en las muestras negativas (ausencia del patógeno). Si no se obtiene señal del IAC ni del patógeno, deberá aclararse la causa del mal funcionamiento de la reacción de PCR, verificando la integridad de los reactivos de PCR o aplicando soluciones alternativas para eliminar los problemas de inhibición.

La mayoría de problemas de inhibición se deben a la presencia de partículas o sustancias en las extracciones de ADN de muestras complejas. Si en una muestra se produce inhibición de la PCR, esto generalmente se soluciona repitiendo el análisis con una dilución 1/10 o 1/100 del extracto de ADN de esta muestra con agua destilada estéril y libre de ácidos nucleicos para diluir los posibles inhibidores de la PCR. No se recomienda realizar diluciones mayores, ya que podrían disminuir la concentración de ADN molde a valores inferiores al límite de amplificación. Una buena solución para aquellas muestras cuya inhibición no pueda resolverse mediante dilución podría ser el uso de métodos de extracción de ADN que incorporen pasos de purificación (por ejemplo columnas de sílica).

3. SISTEMAS DE DETECCIÓN CON 2 FLUORÓFOROS

Los kits de detección de patógenos de Microbial incluyen sistemas de detección por PCR a tiempo real mediante 2 fluoróforos para *Salmonella* spp. (Salmofast®), *Listeria monocytogenes* (Listerfast®), *Campylobacter* termófilos (Campylofast) y *Legionella pneumophila* (Legiofast® ENVIRON). Estos sistemas se basan en dos sondas, marcadas con un fluoróforo distinto cada una. La sonda marcada con el fluoróforo FAM indica la presencia del patógeno a detectar, mientras que la sonda marcada con el fluoróforo JOE indica una correcta reacción de amplificación mediante el uso de un control interno de amplificación (IAC). Gracias a la incorporación del IAC es posible detectar inhibiciones de la reacción, lo que evita falsos resultados negativos.

El resultado típico del análisis de una muestra por PCR a tiempo real con un sistema de detección de Microbial con 2 fluoróforos es un gráfico de amplificación en el que se observan dos tipos de curvas: unas para el FAM (detector del patógeno) y otras para el JOE (detector del IAC) (Figura 4). Se considerarán positivas (presencia del patógeno) las muestras en las que la curva del FAM supere su valor umbral, independientemente del comportamiento de la curva del JOE. En cambio, se consideraran negativas sólo aquellas muestras en las que la curva del FAM no supere su valor umbral pero sí lo haga la curva del JOE.

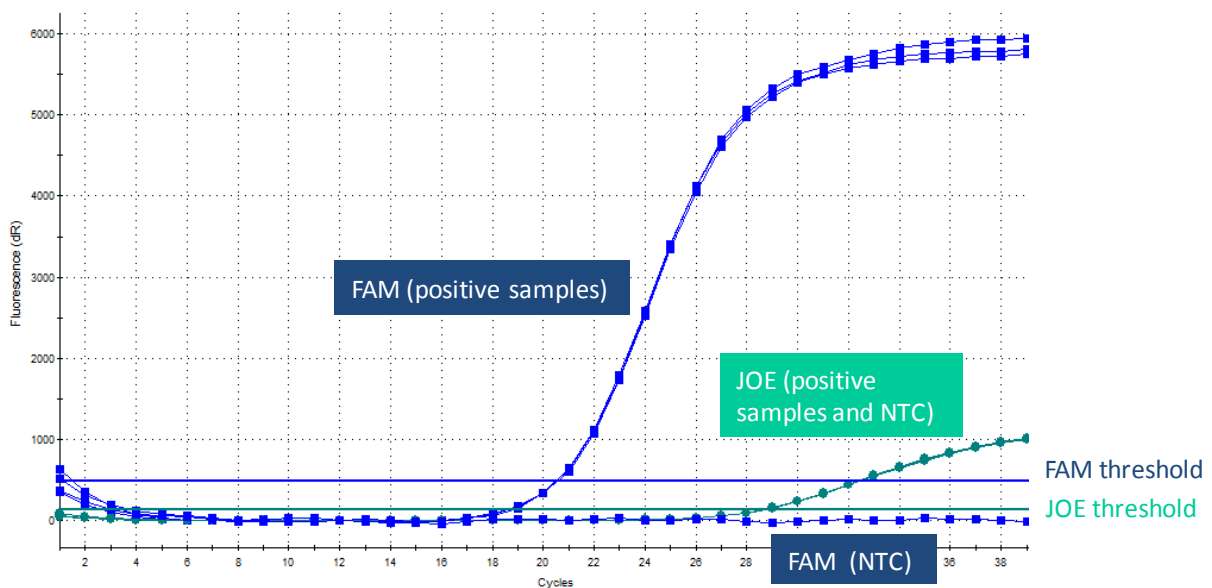


Figura 4. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con 2 fluoróforos: FAM para el patógeno y JOE para el control interno de amplificación (IAC). Nótese que la escala para ambos fluoróforos es muy distinta, pues por razones ópticas, la fluorescencia de las muestras positivas para el FAM es mucho más alta que la del JOE.

Una estrategia recomendable para el análisis de los resultados consiste en la visualización en primer lugar de la curva del FAM (detector del patógeno). Todas aquellas muestras en las que el FAM supere el valor umbral se pueden considerar positivas. Aquellas muestras en las que el FAM no supere el valor umbral no se pueden considerar negativas sin haber comprobado antes el resultado para el JOE, ya que para descartar posibles problemas de inhibición es importante que el valor de Ct de la curva del JOE de una muestra sea similar al que se obtiene en el control blanco (NTC). Cuando ninguna curva supere su valor umbral o cuando solo la curva del JOE supere su umbral pero con un Ct sensiblemente mayor al del control blanco se considerará que la PCR está inhibida (Figura 5)

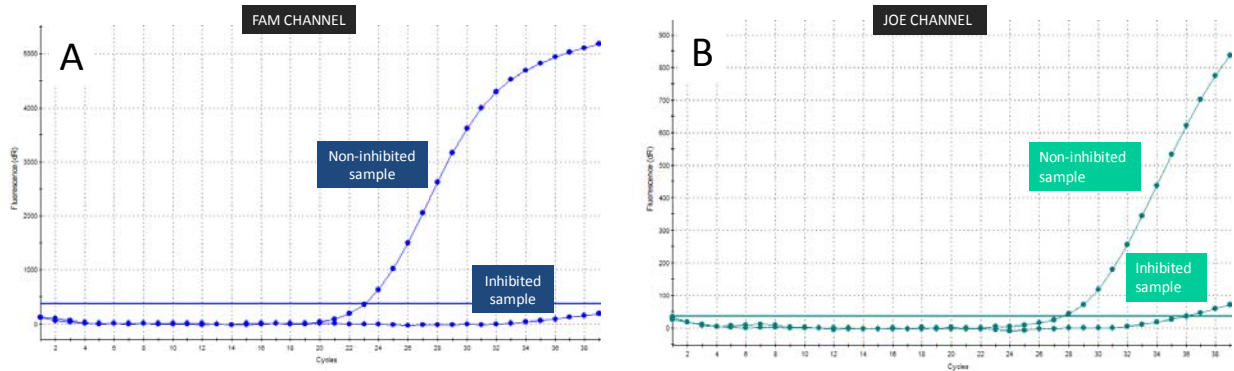


Figura 5. Inhibición de la reacción de PCR. A. Gráfico de amplificación para el FAM donde se observa una muestra positiva no inhibida (*Non-inhibited sample*) y una muestra inhibida (*Inhibited sample*) que no cruza el umbral. B. Gráfico de amplificación del JOE en el que se aprecia que la señal de la muestra inhibida aparece mucho más tarde que en la muestra no inhibida (si la inhibición fuese mayor ni siquiera cruzaría el umbral).

Debe tenerse en cuenta que un valor de Ct para el JOE muy elevado o que no supere su umbral no siempre significa que existe inhibición de la PCR, pues una gran cantidad inicial de ADN del patógeno puede provocar un desplazamiento de la reacción a favor del detector FAM (Figura 6).

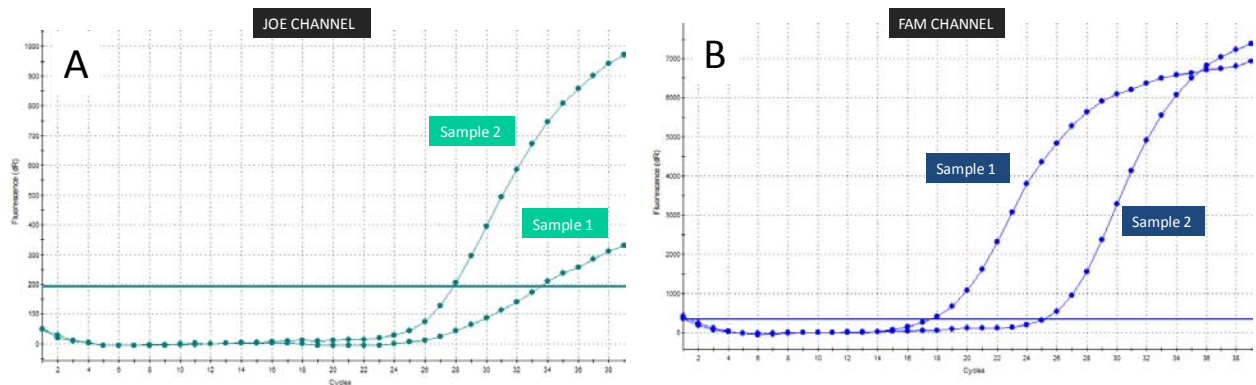


Figura 6. Desplazamiento de la amplificación del IAC por competencia con el ADN del patógeno. A. Gráfico de amplificación para el JOE, donde la señal de la muestra 1 aparece mucho más tarde que la muestra 2, similar a un caso de inhibición. B. Gráfico de amplificación del FAM, donde la señal de la muestra 1 aparece mucho antes que la muestra 2, indicando que la gran cantidad de ADN del patógeno inicial ha desplazado la reacción de PCR a su favor en detrimento del IAC (JOE).

Se puede resumir la interpretación de los resultados de la determinación de la presencia/ausencia de un patógeno en la Tabla 1.

Tabla 1. Interpretación de los resultados para los sistemas de detección de patógenos de Microbial con 2 fluoróforos.

Detector Patógeno (FAM)	Detector IAC (JOE)	Interpretación
Supera umbral	Irrelevante	Muestra positiva
No supera umbral	Supera umbral, sin retraso respecto al NTC	Muestra negativa
No supera umbral	No supera umbral / retraso respecto al NTC	Muestra inhibida

4. SISTEMAS DE DETECCIÓN CON 3 FLUORÓFOROS

El sistema de detección conjunto de *Salmonella* spp. + *Listeria monocytogenes* (Bactoplex) de Microbial se basa en el uso de tres fluoróforos: FAM para la detección de *Listeria monocytogenes*, JOE para la detección de *Salmonella* spp. y CY5 para la detección del IAC. Este sistema permite la detección diferencial y simultánea de 2 patógenos en una sola reacción, manteniendo un tercer canal para el IAC (Figura 7).

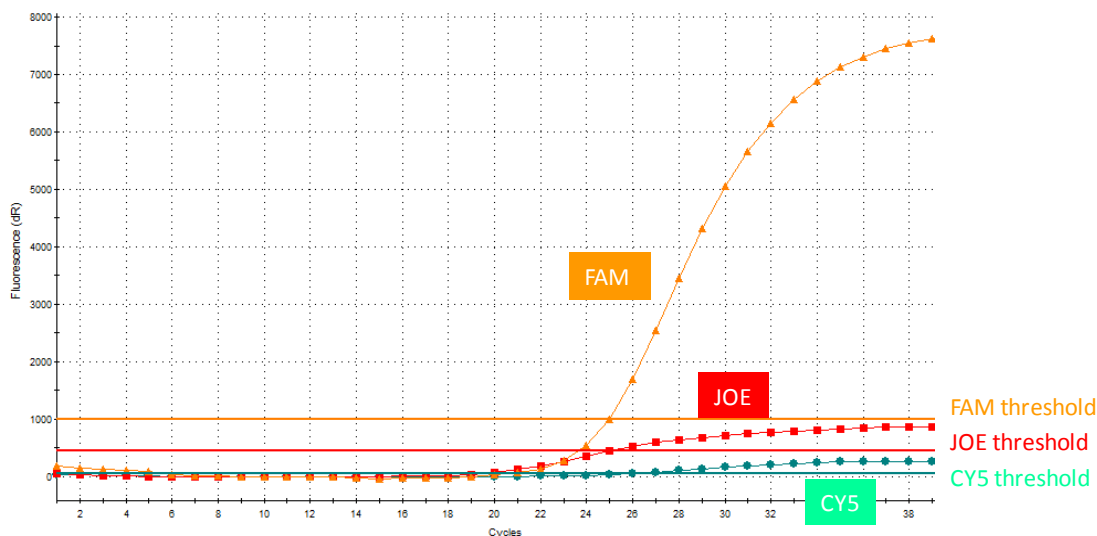


Figura 7. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con 3 fluoróforos: FAM para el patógeno 1, JOE para el patógeno 2, y CY5 para el IAC. Nótese que la escala del FAM, del JOE y del CY5 es muy distinta. En este ejemplo puede verse claramente que la muestra da señal para ambos patógenos y para el control interno.

Como en el caso anterior con dos fluoróforos, la fluorescencia del FAM puede ser mucho mayor que la del JOE, y ésta, a su vez, mayor que la del CY5. Para una mejor visualización de los resultados de cada detector se recomienda analizar los gráficos de amplificación por separado (Figura 8).

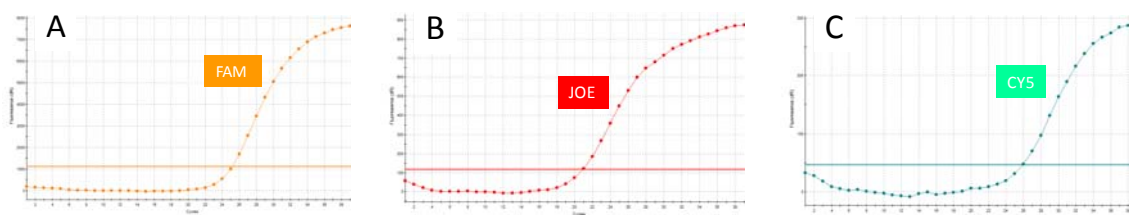


Figura 8. Gráfico de amplificación para los fluoróforos FAM (A), JOE (B) y CY5 (C).

En la Tabla 2 se resume la interpretación de los resultados para la determinación de la presencia/ausencia de los dos patógenos. Igual que en el caso anterior, una muestra positiva con una alta concentración inicial de ADN de uno o ambos patógenos puede desplazar la reacción de amplificación a favor de los patógenos y en contra del IAC. Así, sólo consideraremos negativas las muestras con amplificación del CY5 y sin amplificación del FAM ni del JOE. Las muestras sin amplificación del FAM, del JOE ni del CY5 (o con amplificación del CY5 con retraso apreciable respecto al control blanco) las consideraremos inhibidas.

Tabla 2. Interpretación de los resultados para los sistemas de detección de patógenos de Microbial con 3 fluoróforos.

Detector Patógeno 1 (FAM)	Detector Patógeno 2 (JOE)	Detector IAC (CY5)	Interpretación
Supera umbral	Supera umbral	Irrelevante	Positivo para ambos patógenos
Supera umbral	No supera umbral	Irrelevante	Positivo para el patógeno 1
No supera umbral	Supera umbral	Irrelevante	Positivo para el patógeno 2
No supera umbral	No supera umbral	Supera umbral, sin retraso respecto al NTC	Negativo para ambos patógenos
No supera umbral	No supera umbral	No supera umbral / retraso respecto al NTC	Inhibición

5. SISTEMAS DE DETECCIÓN CON SYBRGREEN

El sistema de detección de *Legionella* spp. (Legiofast® SPECIES) de Microbial se basa en el uso de SYBRGreen, un fluoróforo que solamente emite fluorescencia cuando se une a ADN doble cadena. El resultado es una única curva de amplificación que integra la detección del IAC y la del patógeno (Figura 9).

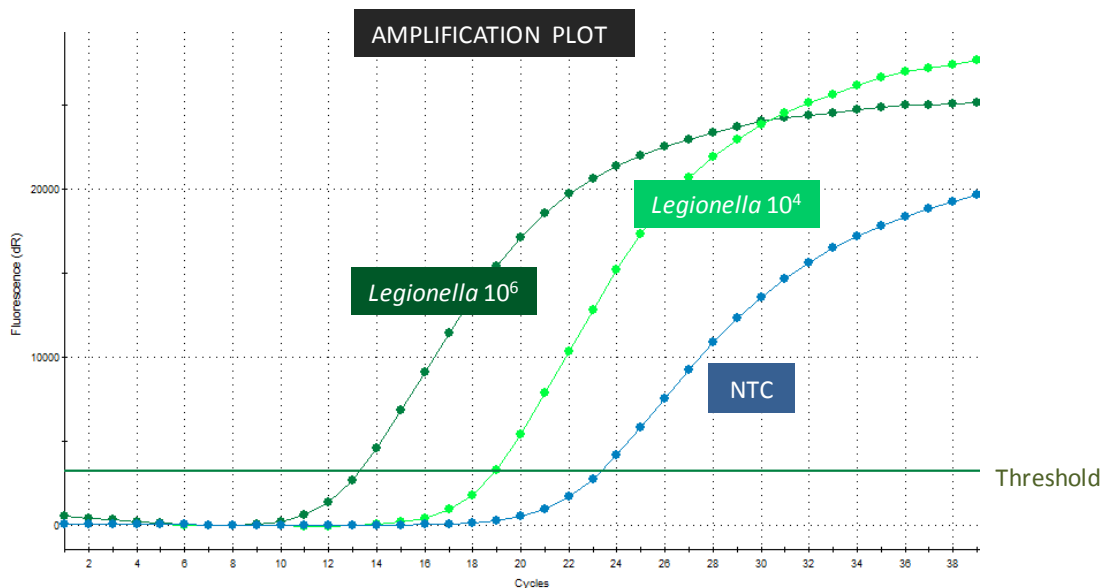


Figura 9. Gráfico de amplificación obtenido con un sistema de detección con SYBR Green, donde se aprecia la amplificación del control blanco, más tardía que la de las muestras con 10^6 y 10^4 copias del patógeno.

Para distinguir los productos de amplificación del patógeno y del IAC se realiza una curva de disociación que resulta de aumentar gradualmente la temperatura de la reacción hasta conseguir la total desnaturalización del ADN. La lectura de la fluorescencia durante el proceso permite analizar la temperatura de disociación (T_m) de los fragmentos de ADN en función de su tamaño. El resultado es un gráfico que contiene tantos picos como fragmentos distintos de ADN se han producido en la reacción. Así, en nuestros sistemas de detección, el tamaño del producto de PCR para el patógeno es mayor que el del IAC, por lo que su pico se producirá a una temperatura superior (Figura 10). El valor de T_m de referencia para el IAC se determinará a partir del control blanco, mientras que el valor de T_m para el patógeno se obtendrá a partir del control positivo.

La curva de disociación permite conocer si la señal obtenida en el gráfico de amplificación corresponde al patógeno, al control interno o a los dos. En las muestras negativas sólo aparece el pico correspondiente al IAC, mientras que en las muestras positivas se observan ambos picos. Sin embargo, igual que ocurre con los sistemas basados en 2 y 3 fluoróforos, un exceso de ADN inicial del patógeno puede desplazar la reacción resultando en una ausencia de la amplificación del IAC, de forma que solo se observe el pico correspondiente al patógeno. Se considerará que existe una inhibición de la reacción cuando la señal no supere el umbral en el gráfico de amplificación o si muestra retraso aparente respecto al control blanco.

Si no se observan los picos del IAC ni del patógeno se considerará el resultado como no concluyente aunque la muestra supere el umbral en la curva de amplificación. En caso de aparecer picos que no correspondan ni al patógeno ni al IAC, estos no se tendrán en cuenta para interpretar el resultado.

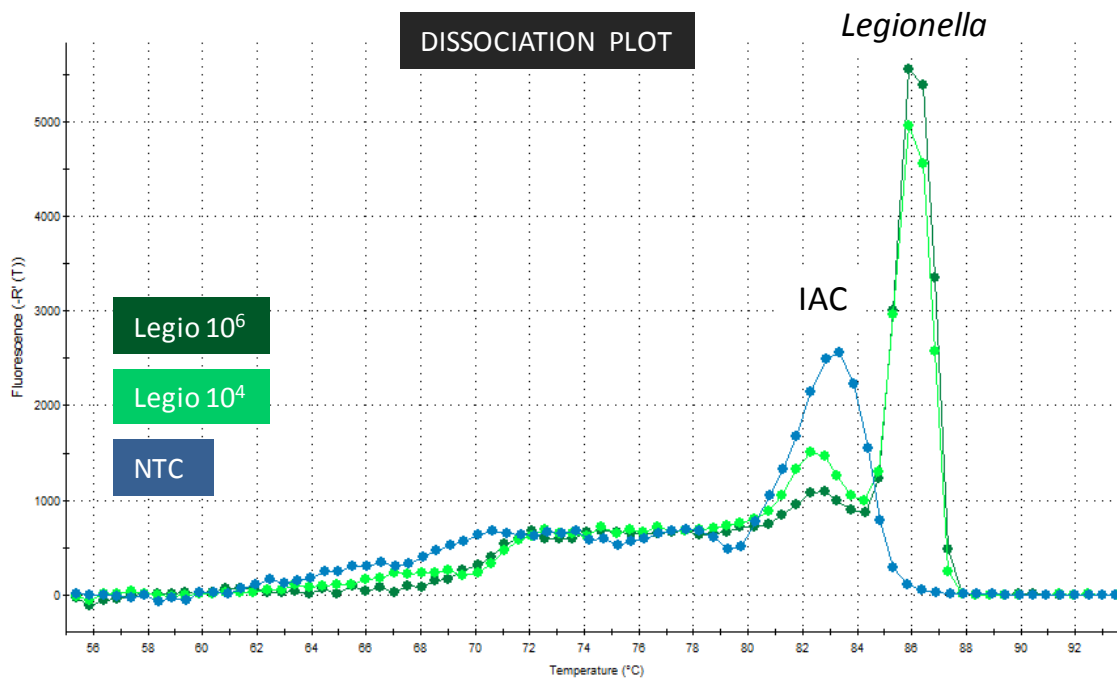


Figura 10. Curva de disociación de las muestras con 10^6 y 10^4 copias del gen diana del patógeno. Se muestran dos picos: uno, a mayor temperatura, correspondiente al patógeno, y otro, a menor temperatura, correspondiente al IAC. En cambio, el control blanco muestra un solo pico correspondiente al IAC.

Se puede resumir la interpretación de los resultados de la determinación de la presencia/ausencia del patógeno en la Tabla 3.

Tabla 3. Interpretación de los resultados para los sistemas de detección de patógenos de Microbial con SYBRGreen.

Curva de amplificación	Picos de disociación	Interpretación
Supera umbral	Patógeno + IAC	Muestra positiva
Supera umbral	Patógeno	Muestra positiva (reacción desplazada)
Supera umbral, sin retraso respecto al NTC	IAC	Muestra negativa
No supera umbral / retraso respecto al NTC	No corresponde	Muestra inhibida

6. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

En PCR a tiempo real, cuantificar es sinónimo de determinar el número de copias de un gen diana presente en una muestra. Para ello sólo es necesario utilizar una recta patrón obtenida mediante un banco de diluciones de una solución de ADN del patógeno de concentración conocida; por ejemplo, utilizando PCR Quantification Standard de Microbial o ADN genómico del patógeno previamente purificado y cuantificado. En el gráfico de amplificación de una serie de diluciones, el valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración de ADN molde inicial (Figura 11).

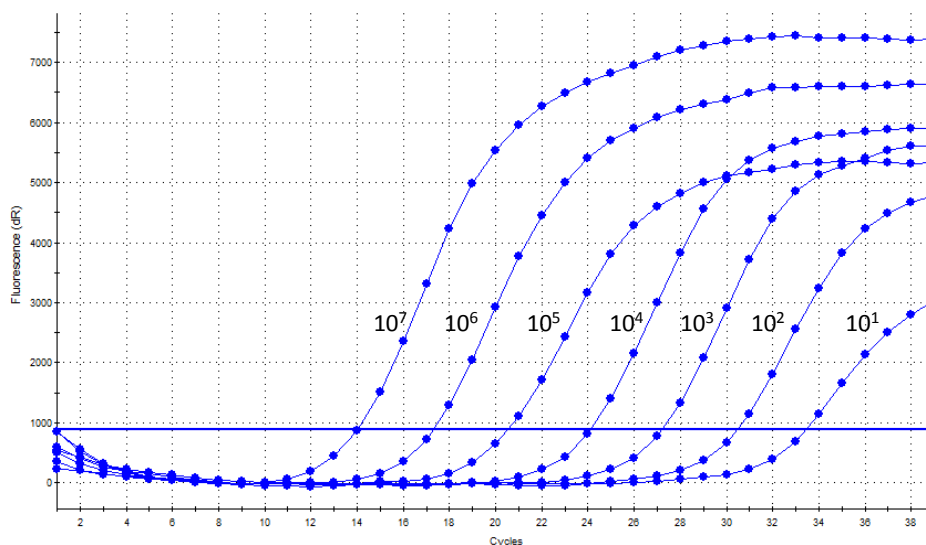


Figura 11. Gráfico de amplificación de un banco de diluciones con un rango de 10^7 a 10^1 copias del gen diana del patógeno a cuantificar. Obsérvese que la fluorescencia final no es siempre proporcional a la cantidad de ADN inicial de las muestras, en cambio, el valor de Ct es siempre inversamente proporcional.

Al finalizar la PCR se representa el valor de Ct obtenido respecto a la concentración del ADN del banco de diluciones en escala logarítmica, generalmente en forma de número de copias μl^{-1} (Figura 12). El número inicial de copias del gen diana en una muestra desconocida se determina interpolando su valor de Ct en la ecuación de la recta patrón obtenida. Hay que tener en cuenta que, de acuerdo con el sistema de cuantificación utilizado, el número de copias del gen diana de la bacteria patógena equivale al número de bacterias siempre que se usen para su detección genes de una sola copia por genoma (todos los kits de Microbial están basados en genes diana de copia única salvo Legiofast[®] SPECIES). El resultado de la cuantificación de una muestra desconocida puede depender de la eficiencia de la extracción de su ADN.

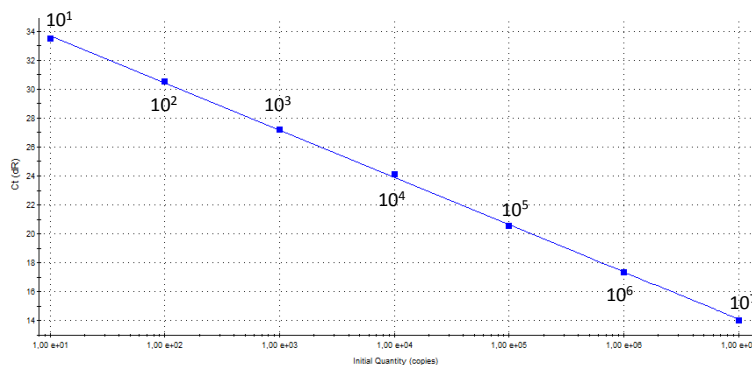


Figura 12. Recta patrón del valor de Ct respecto al número de copias del patógeno por microlitro, obtenida por dilución decimal seriada de un estándar con 10^7 copias/ μl . La interpolación en la recta patrón del valor Ct obtenido con muestras desconocidas permite conocer el número de copias del patógeno que contienen.

7. CONTAMINACIÓN DE LA PCR A TIEMPO REAL

Cuando en el control blanco el fluoróforo detector del patógeno supera el valor umbral se considera que hay contaminación en la reacción de PCR a tiempo real (en el caso de los sistemas de detección con SYBRGreen, la contaminación se descubre si aparece el pico correspondiente al patógeno en la curva de disociación del control blanco). La presencia de contaminación invalida los resultados obtenidos, pues impide distinguir un resultado positivo real de un resultado positivo debido a la contaminación. En este caso debería repetirse el análisis tomando todas las medidas posibles para evitar que se repita la contaminación.

Debido a la gran sensibilidad de la PCR, no es infrecuente que algunas muestras, junto con los controles blancos, crucen el umbral a partir del ciclo 35 (Figura 13). Esta débil señal puede ser debida a una pequeña contaminación por aerosoles de ADN diana que se puede producir al cargar la PCR o a una cantidad mínima del patógeno en la muestra. Si se considera que la señal es debida a la contaminación, al ser poco importante, el responsable del laboratorio, siempre bajo su propia responsabilidad, puede decidir despreciar esta débil contaminación al considerar que no afecta los resultados. No obstante, en caso de duda, se debe repetir el análisis mejorando si es posible la preparación de la muestra.

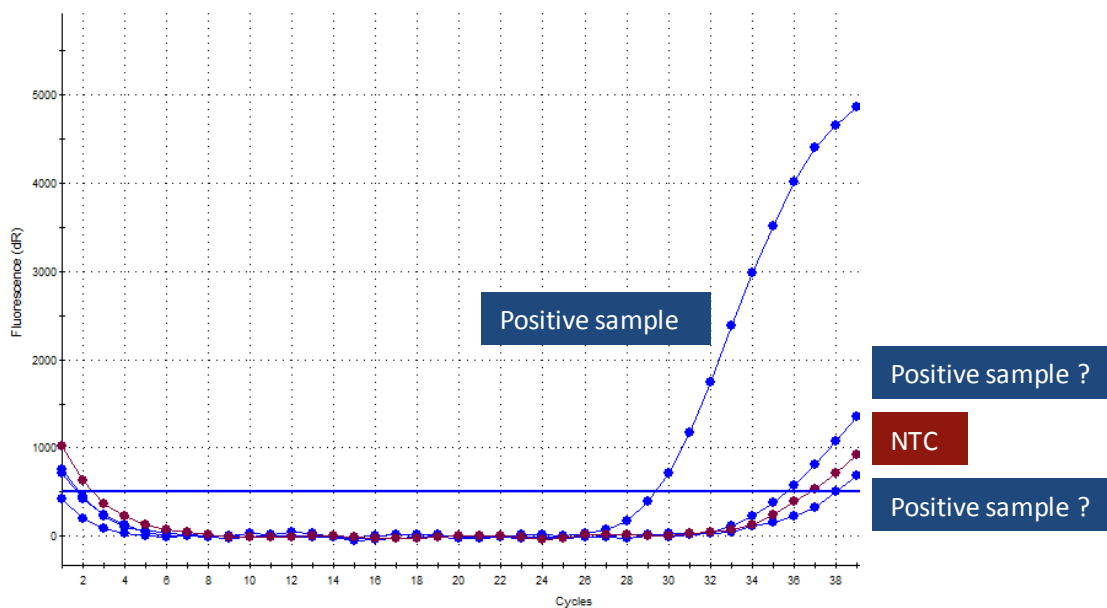


Figura 13. Gráfico de amplificación donde hay una muestra claramente positiva y dos muestras dudosas que, juntamente con el control blanco, dan señal entre los ciclos 35 y 38. No es posible saber si estas dos muestras dudosas son realmente positivas por el patógeno o si son producto de una débil contaminación por aerosoles. En el caso del NTC, es más que probable que la débil señal sí sea producto de contaminación por aerosoles, puesto que no contiene ADN del patógeno. Es importante señalar que el efecto de esta débil contaminación es despreciable en muestras claramente positivas.

8. CURVAS DE AMPLIFICACIÓN CON FORMAS ATÍPICAS

Ocasionalmente pueden obtenerse curvas de amplificación con una forma atípica. Esto puede suceder si el extracto de ADN añadido a la *mix de reacción* contiene sustancias que modifiquen la emisión de fluorescencia de los fluoróforos o su lectura por el termociclador. Algunas curvas con formas extrañas también pueden ser producto de una configuración errónea del sistema de lectura del termociclador. Cualquier curva que no presente las tres fases anteriormente descritas en la Figura 1 deberá ser descartada y la muestra deberá ser analizada de nuevo. La figura 14 muestra dos ejemplos de curvas atípicas.

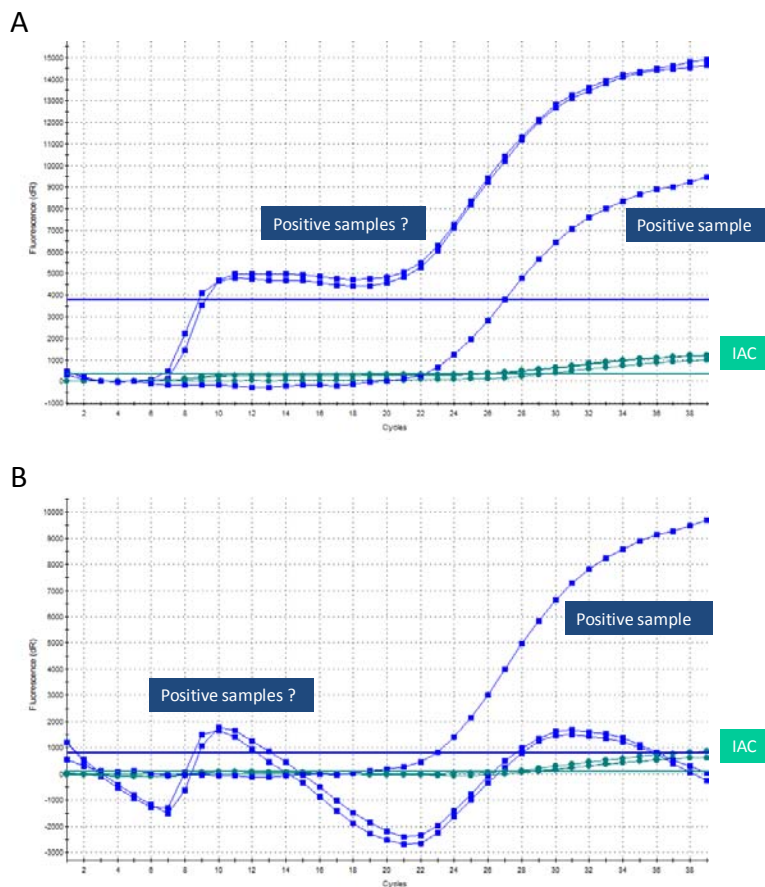


Figura 14. Gráfica de amplificación con curva en forma de doble “plateau” (A) y con curva en forma de montaña rusa que cruza el valor umbral varias veces (B). Ambas gráficas se visualizan con los dos ejes en escala lineal.

Nota legal

La presente guía está dirigida solamente a los usuarios de los productos de Microbial S.L. Microbial S.L. declina toda responsabilidad derivada de un mal uso de la misma o de su aplicación a kits y/o detectores de otros fabricantes. Las gráficas presentadas en este documento han sido obtenidas con un termociclador Mx3005P de Stratagene, por lo que pueden ser distintas a las que se obtengan con los mismos detectores en otras plataformas. Las indicaciones presentadas en este documento son únicamente para fines informativos y no tienen como propósito crear ninguna relación de obligaciones legales por parte de Microbial S.L.



© Microbial S.L.
Parc Científic de la UdG
Edifici J. Casademont, E
C/ Pic de Peguera, 15
E- 17003 Girona

Tel. 972 183236
Fax. 972 183256

<http://www.microbial-systems.com>
✉ info@microbial-systems.com