

DESARROLLO DE REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE CANDIDA Y BARTONELLA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

(DEVELOPMENT OF REACTIVES FOR IN VITRO DIAGNOSTIC TO DETECT CANDIDA AND BARTONELLA BASED ON REAL TIME PCR)

(DESEÑO DE REACTIVOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE CANDIDA E BARTONELLA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL)

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

Alumno: Lorena Coto Ferreira

Director de proyecto: Juan Diego Arroyo Andújar

Director académico: Manuel Becerra Fernández

Empresa: Progenie Molecular S.L.

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN

1. Género *Bartonella*
2. Género *Candida*
3. Reacción en cadena de la polimerasa
 - 3.1. PCR a tiempo real

OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras biológicas
2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos
 - 2.1. Extracción de ADN a partir de muestras biológicas
 - 2.2. Purificación de productos de amplificación a partir de gel de agarosa
 - 2.3. Purificación de productos de amplificación por columna
3. Cuantificación de ácidos nucleicos
4. Amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR y PCR a tiempo real
 - 4.1. Diseño de oligonucleótidos
 - 4.2. Regiones utilizadas para el diseño de oligonucleótidos y sondas para la detección de *Bartonella* y *Candida*
 - 4.3. PCR convencional
 - 4.4. PCR a tiempo real
5. Secuenciación
 - 5.1. Reacción de secuenciación utilizando dideoxi-nucleótidos fluorescentes
 - 5.2. Purificación de los productos de la reacción de secuencia
 - 5.3. Análisis informático de las secuencias de ADN
6. Cálculo de sensibilidades

RESULTADOS

1. Sistema de detección de *Bartonella*
 - 1.1. Optimización de *Bartonella sp.*

- 1.2. Optimización de *Bartonella henselae*
- 1.3. Optimización conjunta de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*
- 1.4. Ensayos de reproducibilidad y congelación.
- 1.5. Cálculos de sensibilidad
- 2. Sistema de detección de *Candida*
 - 2.1. Mezcla de amplificación de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*.
 - 2.1.1. Optimización de *Candida albicans*
 - 2.1.2. Optimización de *Candida parapsilosis*
 - 2.1.3. Optimización de *Candida glabrata*
 - 2.1.4. Optimización conjunta de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*
 - 2.1.5. Ensayos de reproducibilidad y congelación
 - 2.1.6. Cálculos de sensibilidad
 - 2.2. Mezcla de amplificación de *Candida sp*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*
 - 2.2.1. Optimización de *Candida sp*
 - 2.2.2. Optimización de *Candida krusei*
 - 2.2.3. Optimización de *Candida tropicalis*
 - 2.2.4. Optimización conjunta de *Candida sp*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

1. Género *Bartonella*.

El género *Bartonella* está formado por bacterias gramnegativas, aerobias, no móviles, que se comportan como intracelulares facultativas y difíciles de cultivar. Son bacterias transmitidas por vectores hematófagos y que tienen como células diana a los eritrocitos y células endoteliales. Son causantes de un amplio número de enfermedades y, aunque pueden afectar a individuos sanos, suelen afectar principalmente a individuos inmunodeprimidos. Las especies de *Bartonella* relacionadas con mayor número de enfermedades en nuestro entorno son *Bartonella quintana* y *Bartonella henselae*, aunque existen otras especies que causan infección en humanos (Tabla 1) (Yuan *et al*, 2011).

Bartonella henselae produce la Enfermedad por arañazo de gato (principal causa de adenopatía juvenil), endocarditis, angiomas bacilar, peliosis bacteriana (proliferación vascular y dilatación de los sinusoides hepáticos) y neuroretinitis. Al inicio se presenta con fiebre, aumento de los nódulos linfáticos y pápulas en la zona de inoculación. Posteriormente darán lugar a la enfermedad sistémica. Además del hombre *Bartonella henselae* tiene como reservorio al gato y su vector de transmisión es la pulga de los gatos *Ctenocephalides felis*.

Las especies de *Bartonella* presentan tropismo por las células endoteliales y los hematíes. En las primeras 72 horas tras la infección, la bacteria es indetectable en sangre. Durante este tiempo pasan a las células endoteliales dónde se multiplican antes de infectar los eritrocitos, en los que penetran mediante la secreción de demorfina que producen deformaciones de la membrana de los hematíes. Una parte de la población bacteriana permanece en el torrente sanguíneo mientras que la otra lo hace en las células endoteliales. En estas últimas sobreviven gracias a producción de factores tumorales y sustancias antiapoptóticas que retrasan la muerte celular y favorecen la vaso proliferación del endotelio vascular. (Forbes, 2009).

Tabla 1.

Especie	Reservorio	Patología
<i>Bartonella quintana</i>	Hombre	Causa fiebre de las trincheras, angiomas bacteriana y endocarditis.
<i>Bartonella henselae</i>	Hombre, gato	Enfermedad por arañazo de gato, angiomas bacteriana, endocarditis, neuroretinitis, endocarditis, peliosis bacteriana
<i>Bartonella bacilliformis</i>	Hombre	Bartonellosis (Fiebre de Oroya, Verruga Peruana)
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	Gato	Enfermedad por arañazo de gato
<i>Bartonella elizabethae</i>	Rata	Endocarditis
<i>Bartonella rochalimae</i>	Desconocido	Enfermedad similar a fiebre tifoidea y malaria
<i>Bartonella grahamii</i>	Ratones	Endocarditis, neuroretinitis
<i>Bartonella washoensis</i>	Ardillas, ratas	Miocarditis

2. Género *Candida*.

La candidiasis es una micosis oportunista causada por levaduras del género *Candida*, perteneciente a la familia *Cryptococcaceae*. Se trata de un organismo diploide, asexual, saprofítico presente en la cavidad bucal, tracto gastrointestinal, tracto urinario y mucosa genital humana. En individuos inmunodeprimidos o que han sufrido un desequilibrio en su flora bacteriana normal pueden convertirse en patógenos.

El género *Candida* es ubicuo y cosmopolita y afecta por igual a ambos sexos. El género *Candida* abarca unas 196 especies la mayoría de las cuales no afectan al ser humano.

Últimamente han aumentado los casos de infección debido al aumento de resistencias a antifúngicos como consecuencia del uso abusivo de fluconazol.

La principal especie causante de enfermedad en humanos es *Candida albicans* (White *et al*, 2004). El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de esta especie. Una disminución de *Lactobacillus* y bacterias anaerobias así como un

aumento de ingesta de azúcares pueden dar lugar a una proliferación descontrolada de *Candida albicans*. Las formas clínicas más comunes causadas por *Candida albicans* son de origen oral y se presentan como una capa blanquecina o *muguet* en lengua y cavidad oral. Otra de las principales enfermedades causadas por este patógeno son las candidiasis vaginales (Rodríguez *et al*, 2003) (Aguirre, 2002) (Akpan *et al*, 2002) y la candidiasis sistémica en el caso de que atraviese la barrera gastrointestinal. Suele relacionarse con casos de malnutrición.

Candida glabrata es la segunda especie más importante clínicamente. Es una de las principales causas de sepsis de origen nosocomial. Se encuentra con frecuencia en pacientes asintomáticos y en la piel del personal sanitario. Su principal patogenicidad se relaciona con cepas que presentan resistencia a fluconazol.

Candida krusei es principalmente un patógeno nosocomial que afecta a individuos inmunosuprimidos o con neoplasias hematológicas. Presenta resistencia natural al fluconazol. La infección por *Candida krusei* presenta especial importancia por la dificultad de su tratamiento.

Candida tropicalis tiene como hábitat el tracto respiratorio y gastrointestinal pero puede colonizar el sistema nervioso. Tiene especial relevancia en pacientes neutropénicos con alteraciones hematológicas.

El complejo formado por *Candida parapsilosis*, *Candida ortosilopsis* y *Candida metasilopsis* es especialmente patogénico en individuos hospitalizados debido a su capacidad para formar biofilms.

Otras especies de *Candida* que también pueden afectar a humanos son: *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida lusitaniae* y *Candida kefyr*. Todas estas especies son patógenos nosocomiales emergentes de difícil tratamiento debido a su resistencia a antifúngicos. (Procop *et al*, 2004)

3. Reacción en cadena de la polimerasa

El diagnóstico rápido y específico de patógenos a nivel molecular hace necesario el desarrollo de sistemas de detección eficaces y sensibles. La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) permite la obtención de cantidades detectables de un fragmento de ADN. Los sistemas basados en la PCR permiten la detección de los patógenos mediante la amplificación del ADN de éstos presente en las muestras clínicas.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa fue descrita por Kary Mullis en 1986 y se basa en la “multiplicación” o amplificación *in vitro* de una secuencia diana de ADN delimitada entre dos oligonucleótidos iniciadores o cebadores.

La PCR consta de las siguientes etapas:

- a) Desnaturalización: en este paso se separan las dos cadenas de ADN, haciéndolas accesibles para la polimerasa y los cebadores. La temperatura de desnaturalización suele estar en torno a 95 °C.
- b) Hibridación de los cebadores (*annealing*): en este paso se produce la unión (o hibridación) de los oligonucleótidos con el ADN diana. Este proceso tiene lugar a temperaturas comprendidas entre los 40-68°C.
- c) Extensión: en este paso la ADN polimerasa añade nucleótidos complementarios a la cadena molde a partir del extremo 3' del cebador. La unión se realiza entre el grupo 3'-OH final de la hebra y el 5'-fosfato del dNTP. Como resultado se obtiene una hebra complementaria a la hebra molde. Este proceso tiene lugar a 72 °C.

Los componentes necesarios para que tenga lugar el proceso de amplificación son:

- a) Cadena molde.
- b) Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPS).

- c) Cebadores o primers, que son oligonucleótidos de unas 30 pb complementarios a los extremos del fragmento amplificado
- d) Cofactores de la polimerasa en forma de iones divalentes. El más utilizado es el Mg^{+2} .
- e) Solución tampón o buffer, encargada de mantener el pH de la reacción.
- f) ADN polimerasa termoresistente (*Taq* Polimerasa).

3.1 PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real es una variante de la PCR convencional que mediante la adición de una sonda fluorescente permite monitorizar la síntesis de producto de amplificación ciclo a ciclo. El termociclador usado para PCR a tiempo real consta de un dispositivo emisor de luz y un detector de fluorescencia.

En el presente trabajo se utilizaron sondas Taqman®. Estas sondas consisten en un oligonucleótido complementario a la secuencia del amplicón, con modificaciones en sus extremos. En el extremo 5' tiene unido un fluoróforo emisor de luz (*reporter*) y en el extremo 3' uno que absorbe la luz emitida (*quencher*). Cuando la sonda se encuentra libre en la mezcla de reacción, la luz emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher*. A medida que va generándose producto de amplificación, la sonda hibrida con éste, lo que provoca su hidrólisis debido a la acción 5' exonucleasa de la *Taq* polimerasa. Cuando ambos fluoróforos se liberan, el *quencher* ya no puede absorber la fluorescencia emitida por el *reporter* y el equipo puede detectar una emisión neta de fluorescencia.

El ciclo en el que la fluorescencia supera el nivel umbral se define como “ciclo umbral” o Ct (*cycle threshold*). El Ct es un parámetro muy importante, ya que es proporcional a la cantidad de ADN molde, de forma que cuánto más ADN de partida, menor es el Ct obtenido. Asimismo, permite valorar la eficiencia de una reacción, ya que cuánto más eficiente es una reacción de PCR a tiempo real menor será el valor de Ct para una cantidad de ADN molde fija.

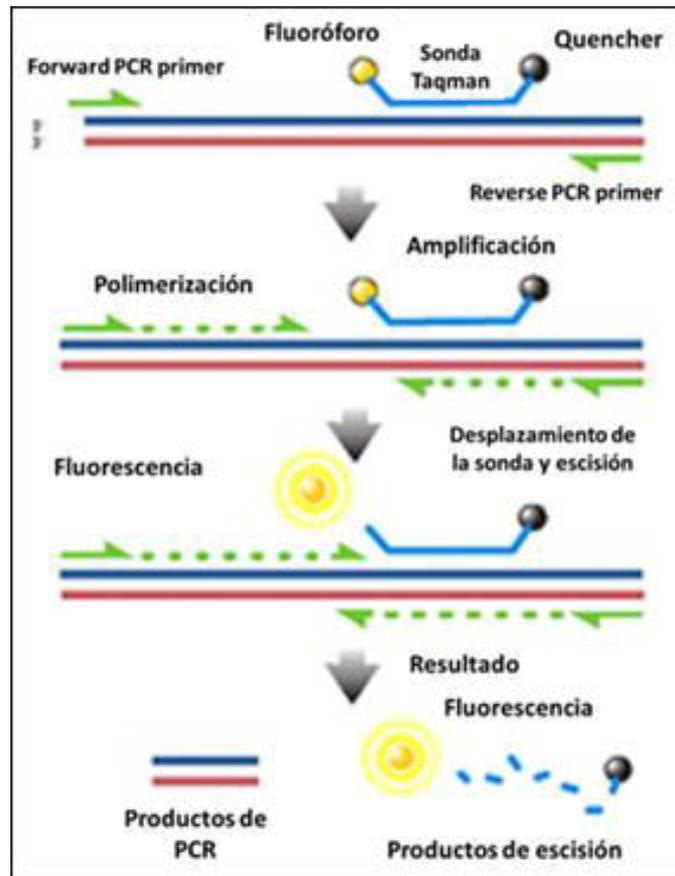


Figura 1. Esquema del funcionamiento de la reacción de PCR a tiempo real utilizando sondas Taqman.

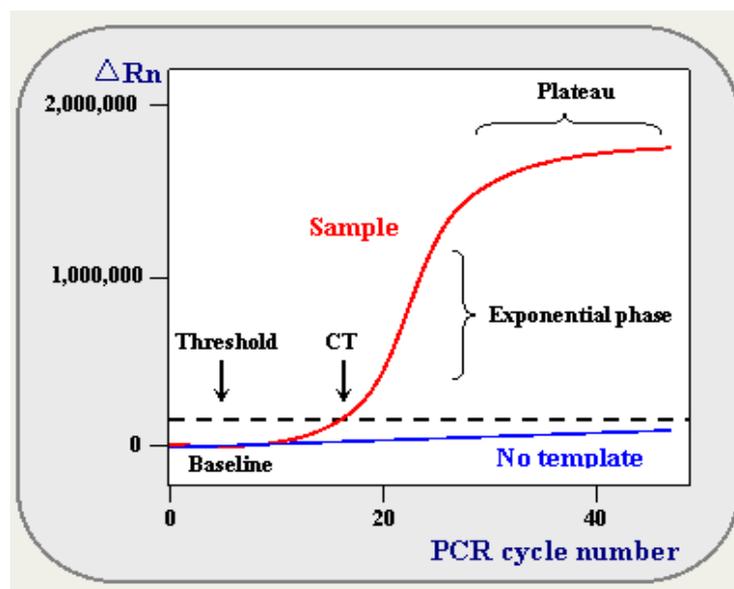


Figura 2. Representación esquemática del resultado obtenido en una PCR a tiempo real.

OBJETIVOS

1. Diseño y puesta a punto de un kit de detección de *Bartonella henselae* y *Bartonella sp.* mediante PCR a tiempo real.
2. Diseño y puesta a punto de un kit de detección de *Candida sp.*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* mediante PCR a tiempo real.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras biológicas

Se utilizaron muestras biológicas portadoras de *Bartonella henselae* (desarrollo del reactivo de detección de *Bartonella sp* y *Bartonella henselae*) y de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. Todas las muestras se resuspendieron en 500 μ L de NaCl 0.9 μ M.

2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

2.1 Extracción de ADN a partir de muestras biológicas

Los ácidos nucleicos de los patógenos fueron extraídos mediante el kit QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN[®]).

Procedimiento:

- a) Reconstitución de reactivos según protocolo del fabricante en caso de que no estén reconstituidos.
- b) Rotular tantos tubos y columnas como muestras vayan a extraerse.
- c) Mezclar en un tubo de 1.5 mL: 100 μ L de muestra + 10 μ L de Qiagen Proteasa (15mg/mL) + 100 μ L de Buffer AL.
- d) Vortear.
- e) Incubar a 56°C (\pm 3) durante 10 min.
- f) Centrifugar levemente para quitar las gotas del tapón del tubo.
- g) Pipetear la mezcla anterior en la columna de purificación.
- h) Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo de elución.
- i) Añadir 250 μ L de Buffer AW1 a la columna.
- j) Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo de elución.
 - k) Añadir 250 μ L de Buffer AW2 a la columna.
 - l) Centrifugar a 13000 rpm durante 3 min. Descartar el eluido y colocar la columna en un tubo de elución.

- m) Centrifugar a 13000 rpm durante 1 min. Descartar el eluido y cololar la columna en un tubo de 1.5 mL sin tapón.
- n) Añadir 100 µL de Elution Buffer (EA).
- o) Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- p) Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. y recoger el eluido con el ADN.
- q) Etiquetar el tubo antes de descartar la columna.

2.2. Purificación de productos de amplificación a partir de gel de agarosa

Se utilizó el kit comercial QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN[®]). Este kit permite la purificación de ácidos nucleicos de doble cadena mediante un sistema de unión, lavado y elución a través de una membrana de sílice. Eliminando así los restos de oligonucleótido, bromuro de etidio, agarosa, enzimas, proteínas y sales.

Procedimiento:

- a) Cortar un “dado” de gel de agarosa que contiene la banda a purificar utilizando un bisturí limpio.
- b) Añadir 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel y mezclar (p.e. añadir 300 µL de buffer QG a 100 mg de muestra).
- c) Incubar a 50 °C durante 10 min. (o hasta que el gel esté completamente disuelto).
- d) Añadir 1 volumen de isopropanol a la muestra y mezclar (100 mg de gel, 100 µL de isopropanol).
- e) Colocar la columna de centrifuga en el tubo de 2 mL proporcionado ~~previsto~~ en el kit.
- f) Dispensar la mezcla en la columna
- g) Centrifugar 1 min a 13000 rpm. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo.
- h) Añadir 700 µL de Buffer PE a la columna
- i) Centrifugar 1 min a 13000 rpm. Descartar el eluido y colocar la columna en el tubo.
- j) Centrifugar 1 min a 13000 rpm. Descartar el eluido.
- k) Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL nuevo sin tapón.
- l) Añadir 50 µL de agua destilada e incubar durante 1 min a temperatura ambiente.

- m) Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto. El eluido obtenido contiene el producto purificado de la PCR.

2.3. Purificación de productos de amplificación por columna

La purificación se realizó usando el UltraClean[®] PCR Clean-Up kit (MOBIO Laboratories, Inc). El fundamento del mismo es igual al descrito en el apartado anterior. Procedimiento:

- a) Añadir 5 volúmenes de SpinBind Buffer a un volumen de la muestra de PCR y mezclar.
- b) Dispensar la muestra en la columna.
- c) Centrifugar 30 seg a 13000 rpm. Descartar eluido y colocar la columna de nuevo en el tubo.
- d) Añadir 300 μ L de SpinClean Buffer a la columna
- e) Centrifugar 30 seg a 13000 rpm. Descartar el eluido y colocar la columna de nuevo en el tubo.
- f) Centrifugar 60 seg a 13000 rpm.
- g) Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 2 mL nuevo.
- h) Añadir 50 μ L de agua destilada a la columna.
- i) Incubar 1 min a temperatura ambiente.

Centrifugar la columna durante 60 seg a 13000 rpm. . El eluido obtenido contiene el producto purificado.

3. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de los ácido nucleicos fue realizada mediante dos métodos:

- a) Cuantificación mediante espectofotómetro Nano Drop 2000 (ThermoScientific)
- b) Cuantificación en gel por comparación de intensidad de banda de las muestras y un marcador de peso molecular (Marker VIII, Roche).

4. Amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR y PCR a tiempo real

4.1. Diseño de oligonucleótidos

Para la detección de varias especies dentro de un determinado género, se alinearon las especies de interés y se seleccionaron secuencias conservadas dentro del género. Para

detectar una especie concreta se seleccionaron secuencias específicas de la especie de interés, que permitía discriminarla entre el resto de especies del género.

El diseño de oligonucleótidos y sondas para PCR a tiempo real se realizó siguiendo los siguientes criterios:

- a) T_m (temperatura de unión o *melting*): aproximadamente 55 °C para los oligonucleótidos y unos 5-10 °C superior para las sondas. Además la T_m de ambos oligonucleótidos debe estar equilibrada.
- b) Longitud de secuencia: debe estar comprendida entre 18-24 pb para los cebadores y 20-30 pb para las sondas. De esta forma se evitan hibridaciones inespecíficas.
- c) Contenido GC: debe estar en torno al 30-60% de la totalidad de la secuencia.
- d) Nucleótido terminal: evitar una G en el extremo 5' de las sondas, puesto que este nucleótido tiene un cierto efecto *quencher*. Se recomienda que esta posición esté ocupada por una C o T.

4.2. Regiones utilizadas para el diseño de oligonucleótidos y sondas para la detección de *Bartonella* y *Candida*

Bartonella henselae: espaciador intergénico *alr-gcvP* (comprendido entre los genes de la alanina racemasa y la glicin deshidrogenasa). Los espaciadores intergénicos son secuencias altamente variables.

Bartonella sp: gen *groEL*. Este gen codifica una chaperonina altamente conservada dentro del género (Robinson et al, 2010)

Candida sp: secuencias comprendidas entre los ITS3 e ITS4. Los ITS flaquean regiones altamente conservadas y con escasa variabilidad entre especies.

Candida glabrata y *Candida krusei*: dominios D1/D2 de la subunidad ribosómica (28S).

Candida albicans, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*: ITS1 e ITS2. En este caso queremos amplificar los propios ITS pues se trata de regiones muy polimórficas dentro de especies del mismo género. (Brinkman et al, 2003) (Guiver et al, 2001)

4.3. PCR convencional

La mezcla de amplificación para la PCR convencional estuvo formada por:

- Buffer de PCR (PCR Buffer w $MgCl_2$,Roche®)
- dNTPs (0.2 mM, PCR Nucleotide Mix, Roche®)
- Oligonucleótidos directo y reverso
- Taq DNA Polimerasa GMP Graduate (Roche®)
- H_2O esteril (Braun)
- ADN molde

4.4. PCR a tiempo real

Equipo utilizado: SmartCyclerII (Cepheid®)



Figura 3. Equipo de PCR a tiempo real Smart Cycler II (Cepheid®).

Sondas Taqman utilizadas en el presente proyecto

Microorganismo	Fluoróforo	Canal de visualización
<i>Bartonella género</i>	FAM(6-carboxyfluorescein)	FAM
<i>Bartonella henselae</i>	TxRed (sulforhodamine 101 acidchloride)	TxR
Control interno	HEX (6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein)	Alx532

Tabla 2. Marcaje de sondas en el sistema de detección de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*

Microorganismo	Fluoróforo	Canal de visualización
Mezcla amplificación 1	<i>Candida albicans</i>	FAM(6-carboxyfluorescein)
	<i>Candida parapsilosis</i>	TxRed (sulforhodamine 101 acidchloride)
	<i>Candida glabrata</i>	ATTO
Mezcla amplificación 2	<i>Candida sp.</i>	FAM(6-carboxyfluorescein)
	<i>Candida krusei</i>	TxRed (sulforhodamine 101 acidchloride)
	<i>Candida tropicalis</i>	ATTO
Control interno	HEX (6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' – hexachlorofluorescein)	Alx532

Tabla 3. Marcaje de sondas para las dos mezclas de reacción para detección de *Candidas*.

Por motivos de secreto industrial no se indican la composición de las mezclas de reacción ni las secuencias de cebadores y sondas.

5. Secuenciación

5.1. Reacción de secuenciación utilizando dideoxi-nucleótidos fluorescentes

Se utilizó la secuenciación automática de ADN para verificar la especificidad de las reacciones de amplificación.

La secuenciación es una técnica de biología molecular que permite determinar la secuencia de nucleótidos presentes en una molécula. La reacción de secuenciación consiste en la extensión de cadenas de ADN utilizando como molde una sola cadena del producto de amplificación y disponiendo en la reacción una mezcla de dNTPs y ddNTPs (dideoxi-nucleótidos terminadores marcados fluorescentemente). Éstos últimos carecen del extremo

3'-OH terminal, impidiendo la continuación de la hebra tras su incorporación. Cada uno de los cuatro dideoxi-nucleótidos está marcado con un fluoróforo diferente que posteriormente permitirá identificarlo mediante una electroforesis capilar.

En la realización de este proyecto se ha utilizado un secuenciador automático ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se trata de un analizador de ADN mediante electroforesis capilar que consta de un emisor y un receptor de luz. El producto purificado (ver punto 5.2) es sometido a una electroforesis capilar de forma que migra por el capilar del secuenciador. Al pasar delante de un haz de luz, cada uno de los 4 fluoróforos unidos a cada uno de los 4 nucleótidos es excitado, y emitirá a su vez en otra longitud específica, que permitirá reconocerlo como un nucleótido y registrarlo en un gráfico denominado electroferograma. Así el primer pico se corresponde con la cadena más pequeña que a su vez identifica el primer nucleótido de la secuencia.

5.2. Purificación de los productos de la reacción de secuencia

Se trata de un método de purificación que tiene como fin la eliminación de nucleótidos, enzimas, buffer, etc. de la PCR de secuencia. El método de precipitación de secuencia utilizado fue mediante columna con el reactivo ZR DNA Sequencing Clean-Up (Zymo Research) según el siguiente protocolo:

- a) Añadir 240 µL de Sequencing Binding Buffer a la columna, posteriormente se añaden los 10 µL de la reacción de secuencia y se mezclan bien.
- b) Centrifugar 30 s a 13000 rpm.
- c) Añadir 300 µL de Sequencing Wash Buffer a la columna y centrifugar 30 s a 13000 rpm.
- d) Colocar la columna en un tubo de micro centrífuga de 1.5 mL nuevo.
- e) Añadir 20 µL de formamida a la columna y centrifugar 15 s a 13000 rpm.
- f) El eluido que aparece en el tubo es la reacción de secuencia purificada que podrá ser secuenciada.

5.3. Análisis informático de las secuencias de ADN

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas utilizando las aplicaciones bioinformáticas Chromas Pro y la utilidad on-line BLAST.

6. Cálculos de sensibilidad

El cálculo de sensibilidad se hizo mediante el método de dilución límite. Para ello se realizaron diluciones seriadas desde 10^{10} copias/ μL hasta 1 copia/ μL , partiendo de un producto de amplificación de concentración de ADN conocida. Para ello se utilizó la aplicación informática *Oligo Calculator* para calcular el peso molecular del amplicón.

Conocidos estos datos se calcula la cantidad de ADN que habría que añadir para obtener 10^{10} copias/ μL en un volumen final de 100 μL . Se añadirá el volumen de ADN que corresponda y se completará hasta 100 μL con TE pH=8, 1x. Posteriormente se harán diluciones seriadas en un volumen final de 1 mL y se testarán con las condiciones finales de reacción.

RESULTADOS

La estrategia seguida para la optimización de cada uno de los sistemas de detección individualmente fue el mismo:

1. Diseño teórico de las reacciones de amplificación
2. Evaluación de la idoneidad de los oligonucleótidos (PCR convencional reacciones individuales)
3. Ensayos de optimización de la PCR a tiempo real (reacciones individuales)
4. Ensayos de optimización de las reacciones multiplex (incluyendo CI amplificación)
5. Ensayos validación: cálculo de sensibilidad, linealidad, reacciones cruzadas, reproducibilidad y estabilidad

1. Desarrollo de un sistema para la detección de *Bartonella*

1.1. Optimización de la reacción de PCR a tiempo real

Se realizó un alineamiento del gen *groEL* de todas las especies patogénicas para el ser humano del género *Bartonella* y se diseñaron sobre él diferentes oligonucleótidos. En los pies de figura se explican los resultados obtenidos con diferentes combinaciones de oligonucleótidos mediante PCR convencional y PCR a tiempo real.

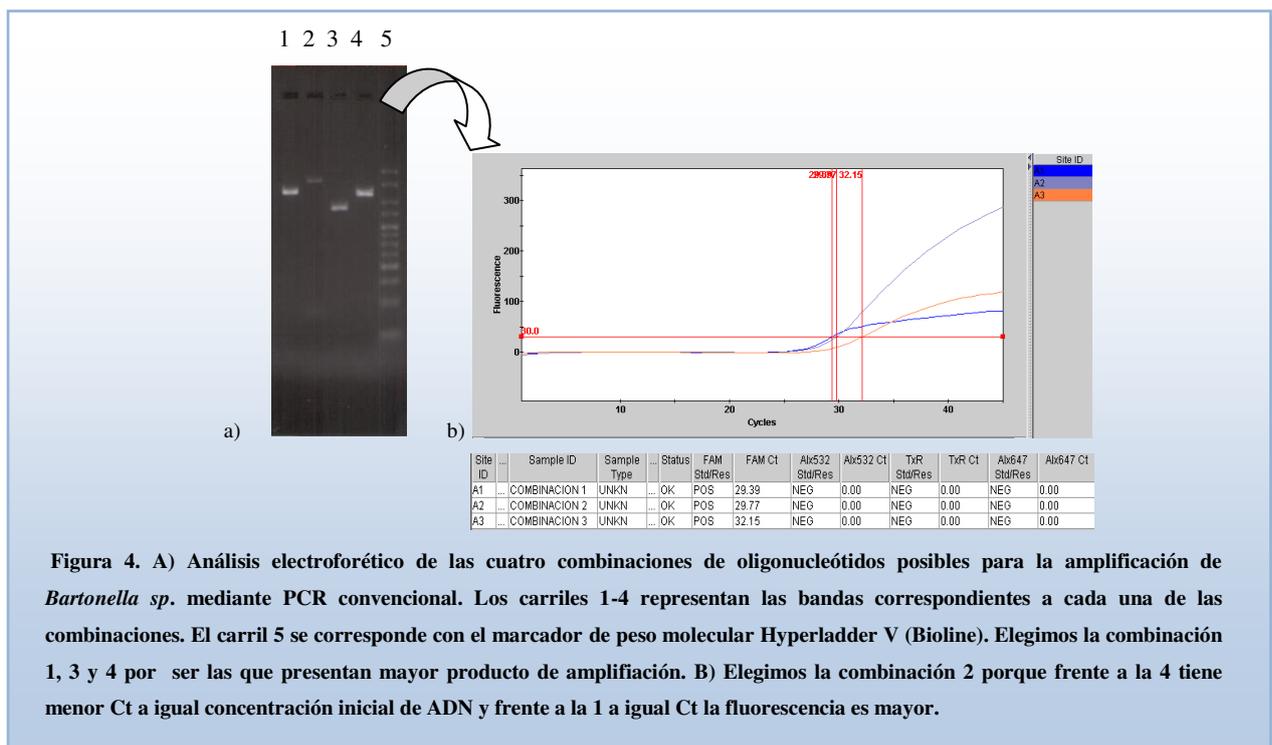
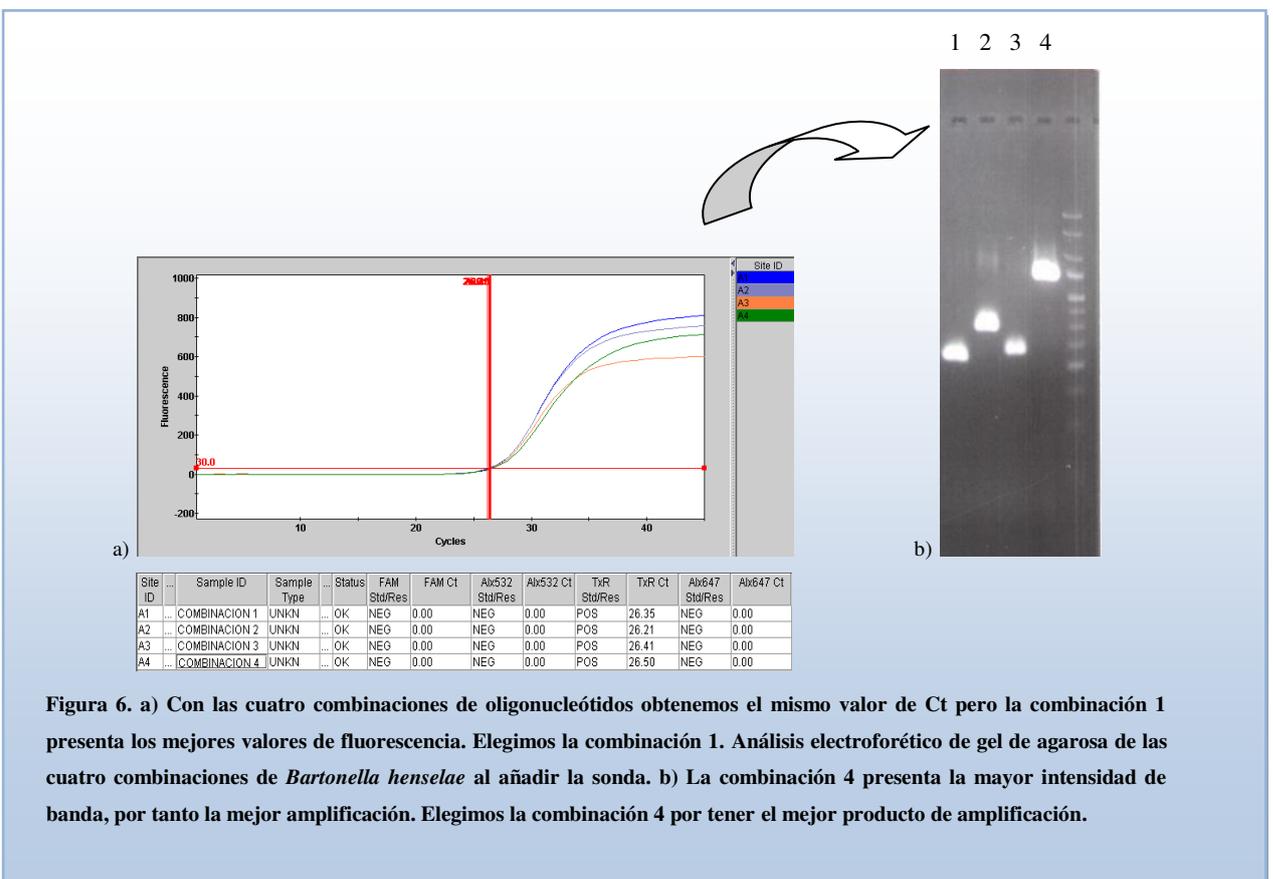
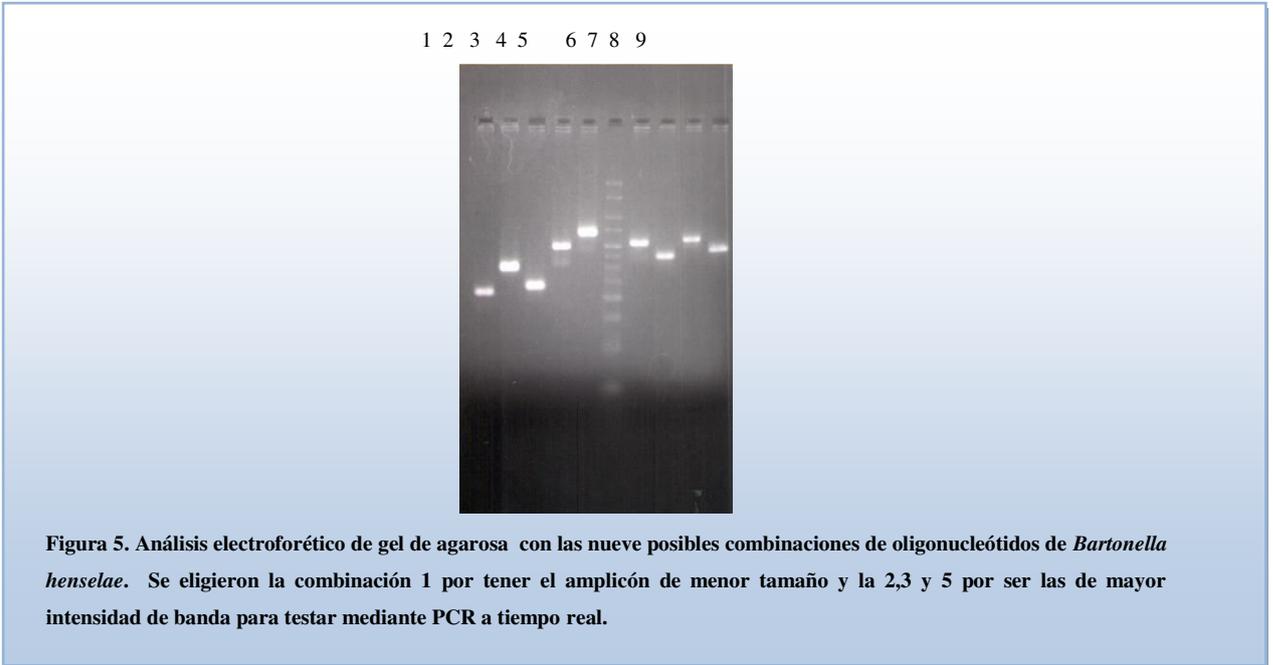


Figura 4. A) Análisis electroforético de las cuatro combinaciones de oligonucleótidos posibles para la amplificación de *Bartonella sp.* mediante PCR convencional. Los carriles 1-4 representan las bandas correspondientes a cada una de las combinaciones. El carril 5 se corresponde con el marcador de peso molecular Hyperladder V (Biolone). Elegimos la combinación 1, 3 y 4 por ser las que presentan mayor producto de amplificación. B) Elegimos la combinación 2 porque frente a la 4 tiene menor Ct a igual concentración inicial de ADN y frente a la 1 a igual Ct la fluorescencia es mayor.

1.2. Optimización de *Bartonella henselae*

Se diseñaron diferentes oligonucleótidos sobre la región intergénica *alr-gcvP* del genoma de *Bartonella henselae*.



En este caso, se obtuvo el mismo Ct para las cuatro combinaciones pero una de ellas presentaba mejores resultados de fluorescencia y otra presenta mayor producto de amplificación cuando se observa la banda al cargarlo en un gel de agarosa. Estas dos combinaciones se testaron a muy baja concentración de ADN y se observó lo siguiente:

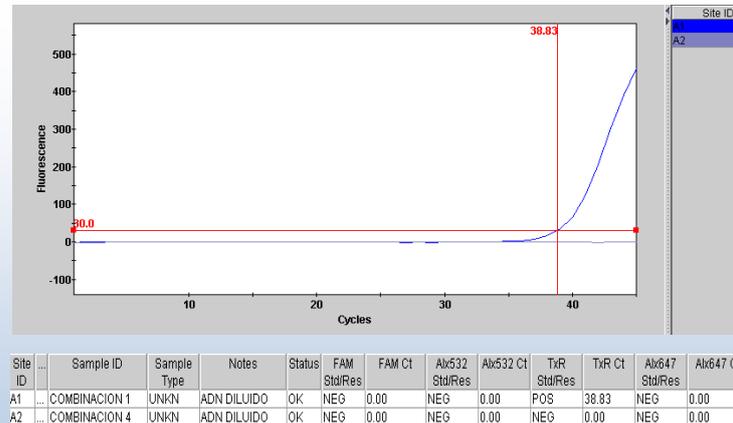


Figura 7. A bajas concentraciones de ADN solamente la combinación 1 presenta señal positiva en el canal esperado. Se elige la combinación 1 para la amplificación de *Bartonella henselae*.

En estas condiciones la combinación que presentaba mejor intensidad de banda no es detectada a bajas concentraciones de ADN, por lo que podemos concluir que la sonda se une más eficazmente sobre el amplicón de la primera combinación de cebadores.

Ensayos posteriores variando las condiciones de la reacción no mejoraron los valores de Ct y fluorescencia obtenidos inicialmente. Se elige la combinación 1 con las condiciones iniciales de reacción.

1.3. Optimización conjunta de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae* e inclusión de un sistema de control interno para la detección de inhibiciones

Site ID	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A1	C- AGUA	UNKN	OK	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00
A2	C+BARTONELLA	UNKN	OK	POS	31.35	NEG	0.00	POS	26.40	NEG	0.00

Figura 8. Resultados luego de testar conjuntamente *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*. Mientras *Bartonella henselae* mantiene el Ct respecto a los ensayos individuales (ver figura 4), *Bartonella sp.* pasa de un Ct de 29.77 a 31.35. Por ello se diseñan nuevos oligos para *Bartonella sp.* y se prueban con diferentes condiciones de reacción hasta que los valores obtenidos para *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae* son similares.

Una vez optimizada la mezcla de reacción para la detección de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*, se realizaron tareas para la inclusión de un sistema de control interno de amplificación. El control interno es un sistema que permite discriminar falsos negativos mediante la realización de una reacción “paralela” dentro del mismo tubo que genera un producto de amplificación distinguible de los generados por el patógeno. En el presente proyecto se ha utilizado un sistema basado en la amplificación de una construcción artificial de ADN heterólogo utilizando oligonucleótidos específicos, que es detectada en el segundo canal en la reacción de PCR a tiempo real (HEX).

1.4. Ensayos de reproducibilidad y de estabilidad a los ciclos de congelación y descongelación

Definidas y testadas las condiciones finales de la mezcla de reacción se realizan los ensayos de reproducibilidad (verificar que los valores de Ct y fluorescencia se mantienen entre los diferentes ensayos) y congelación-descongelación (analizar como afecta la congelación a los valores de Ct y fluorescencia), constanding cada uno de ellos de:

Tubo	Contenido
Control negativo 1	Agua
Control negativo 2	ADN distinto a <i>Bartonella</i>
Control positivo	ADN de <i>Bartonella henselae</i>
Control de inhibición	Citología

Sample ID	Sample Type	...	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
C-AGUA	UNKN	-	OK	NEG	0.00	POS	31.10	NEG	0.00	NEG	0.00
C-ADN	UNKN	...	OK	NEG	0.00	POS	30.24	NEG	0.00	NEG	0.00
C+BARTONELLA	UNKN	...	OK	POS	27.87	POS	30.45	POS	26.50	NEG	0.00
CITOLOGIA	UNKN	...	OK	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00

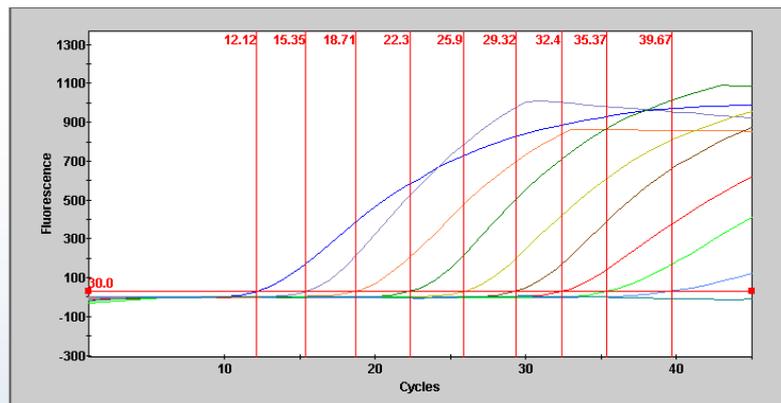
Figura 9. Resultados de reproducibilidad de *Bartonella*.

Tanto los resultados de reproducibilidad como los de congelación se mantienen respecto a ensayo final de optimización conjunta de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae* (no mostrado), por lo que se consideran establecidas las condiciones finales para la detección conjunta de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*.

1.4. Cálculo de sensibilidades

La sensibilidad de la mezcla de reacción de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae* para cada patógeno es de:

- *Bartonella sp.*: 10 copias/ μ L.
- *Bartonella henselae*: 10 copias/ μ L.



Site ID	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A1	BARTO_SPP 10 ⁹	UNKN	OK	POS	12.12	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00
A2	BARTO_SPP 10 ⁸	UNKN	War...	POS	15.35	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00
A3	BARTO_SPP 10 ⁷	UNKN	War...	POS	18.71	POS	36.14	NEG	0.00	NEG	0.00
A4	BARTO_SPP 10 ⁶	UNKN	War...	POS	22.30	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00
A5	BARTO_SPP 10 ⁵	UNKN	OK	POS	25.90	POS	31.55	NEG	0.00	NEG	0.00
A6	BARTO_SPP 10 ⁴	UNKN	OK	POS	29.32	POS	30.92	NEG	0.00	NEG	0.00
A7	BARTO_SPP 10 ³	UNKN	OK	POS	32.40	POS	30.20	NEG	0.00	NEG	0.00
A8	BARTO_SPP 10 ²	UNKN	OK	POS	35.37	POS	30.72	NEG	0.00	NEG	0.00
A9	BARTO_SPP 10 ¹	UNKN	OK	POS	39.67	POS	30.99	NEG	0.00	NEG	0.00
A10	BARTO_SPP 1COPIA	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	29.92	NEG	0.00	NEG	0.00

Figura 10. Curva de sensibilidad de *Bartonella sp.*. La última dilución detectada corresponde con la de 10¹copias/ μ L. A mayor concentración de ADN (10⁹copias/ μ L) menor es el valor de Ct (12.12). A mayor número de copias/ μ L se consume los recursos de la reacción y no permite amplificación del control interno. Esta figura servirá de ejemplo para los demás ensayos de sensibilidad.

2. Sistema de detección de candidas

2.1. Mezcla de amplificación de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*.

2.1.1. Optimización de *Candida albicans*

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos sobre la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Se testaron las 9 combinaciones posibles de oligonucleótidos mediante PCR convencional.

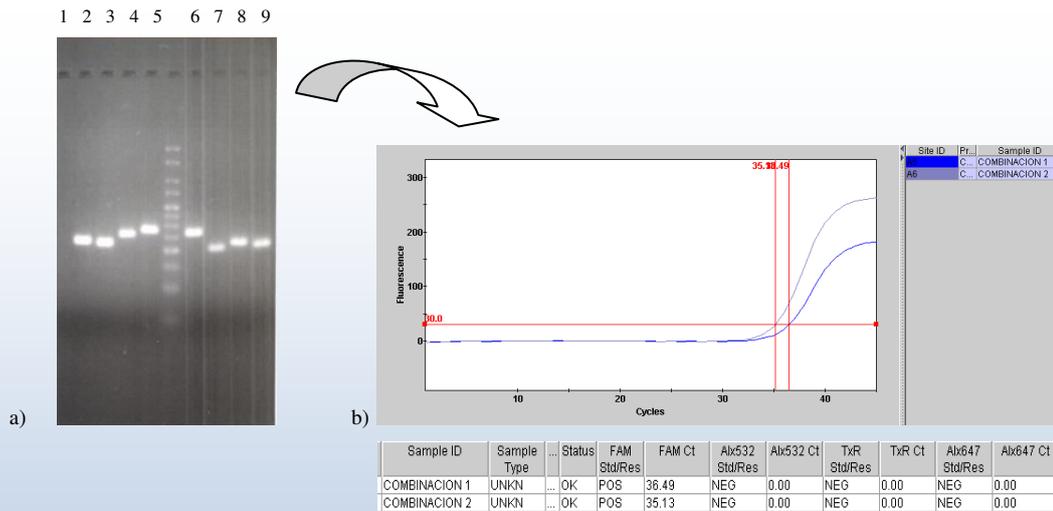


Figura 11. a) Análisis electroforético de gel de agarosa con las nueve combinaciones de oligonucleótidos de *Candida albicans*. Se eligen las combinaciones 1, 2 y 3. Testadas con una concentración de ADN más diluido solo se observa amplificación en la segunda y tercera combinaciones. b) PCR a tiempo real. Elegimos la combinación 2 porque a igual concentración de ADN inicial alcanza la fluorescencia umbral un ciclo antes y la fluorescencia final es 100 unidades superior.

La combinación elegida se testa a diferentes condiciones y concentraciones de cebadores y sonda para comprobar si existe una mejora de los resultados respecto a los obtenidos en el primer ensayo.

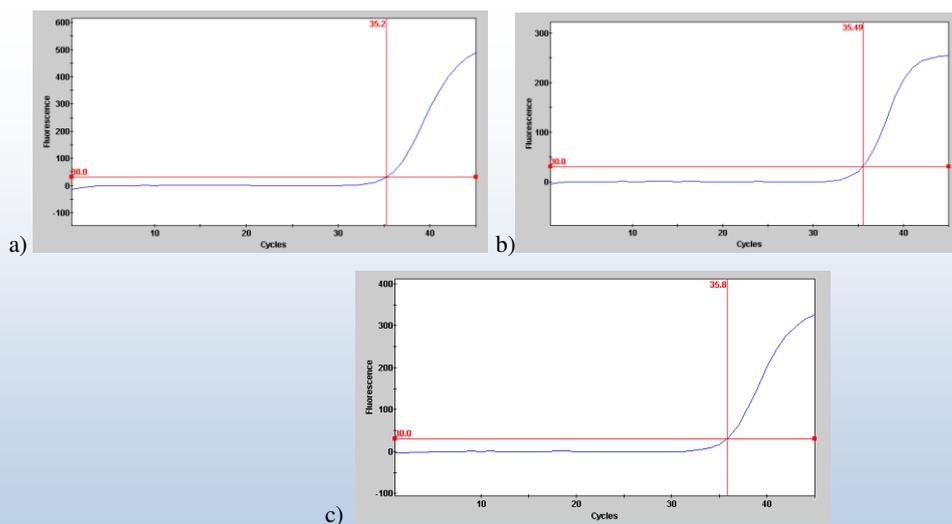


Figura 12. La imagen A muestra un aumento de la fluorescencia de más del doble manteniendo el Ct. Elegimos condiciones de imagen A.

2.1.2. Optimización de *Candida parapsilosis*

Se testaron mediante PCR convencional las combinaciones de cebadores diseñados sobre la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

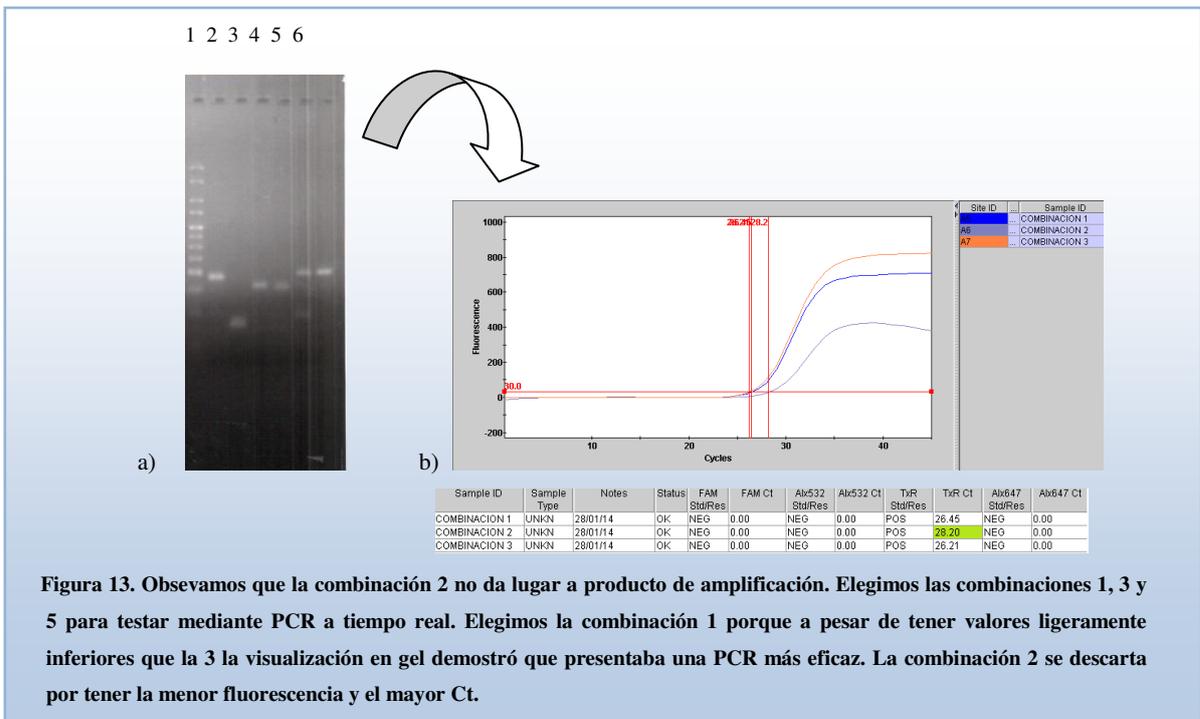


Figura 13. Obsevamos que la combinación 2 no da lugar a producto de amplificación. Elegimos las combinaciones 1, 3 y 5 para testar mediante PCR a tiempo real. Elegimos la combinación 1 porque a pesar de tener valores ligeramente inferiores que la 3 la visualización en gel demostró que presentaba una PCR más eficaz. La combinación 2 se descarta por tener la menor fluorescencia y el mayor Ct.

Se eligió la combinación 1 puesto que presentaba la mejor relación de Ct, fluorescencia y producto de amplificación observado en gel. La combinación elegida se testa a diferentes condiciones y concentraciones de cebadores y sondas para comprobar si existe una mejora de los resultados respecto a los obtenidos en el primer ensayo.

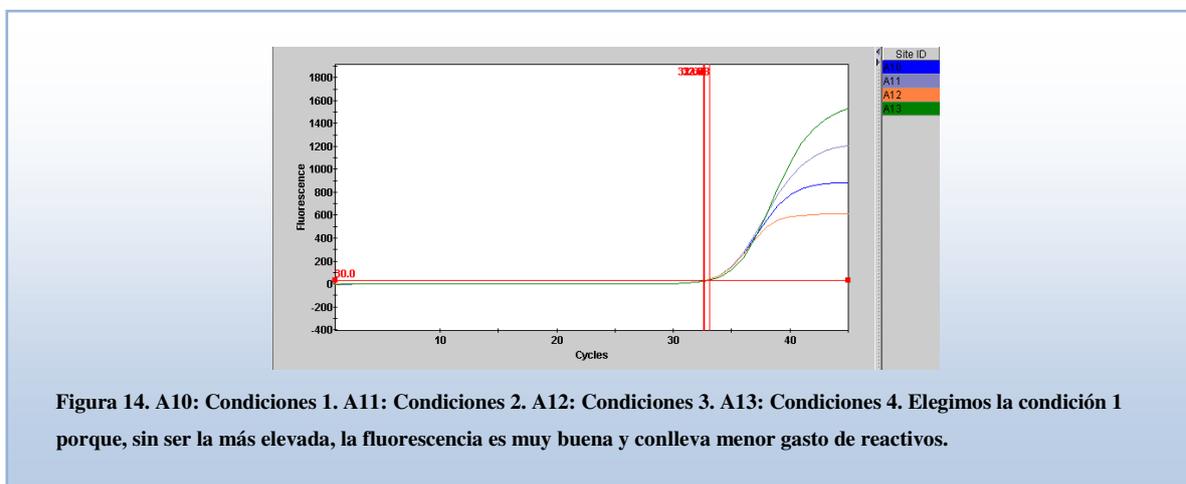


Figura 14. A10: Condiciones 1. A11: Condiciones 2. A12: Condiciones 3. A13: Condiciones 4. Elegimos la condición 1 porque, sin ser la más elevada, la fluorescencia es muy buena y conlleva menor gasto de reactivos.

2.1.3. Optimización de *Candida glabrata*

Se diseñaron sobre la región 28S rRNA (dominios D1/D2) del genoma de *Candida glabrata* oligonucleótidos. Todas las posibles combinaciones se testaron mediante PCR convencional.

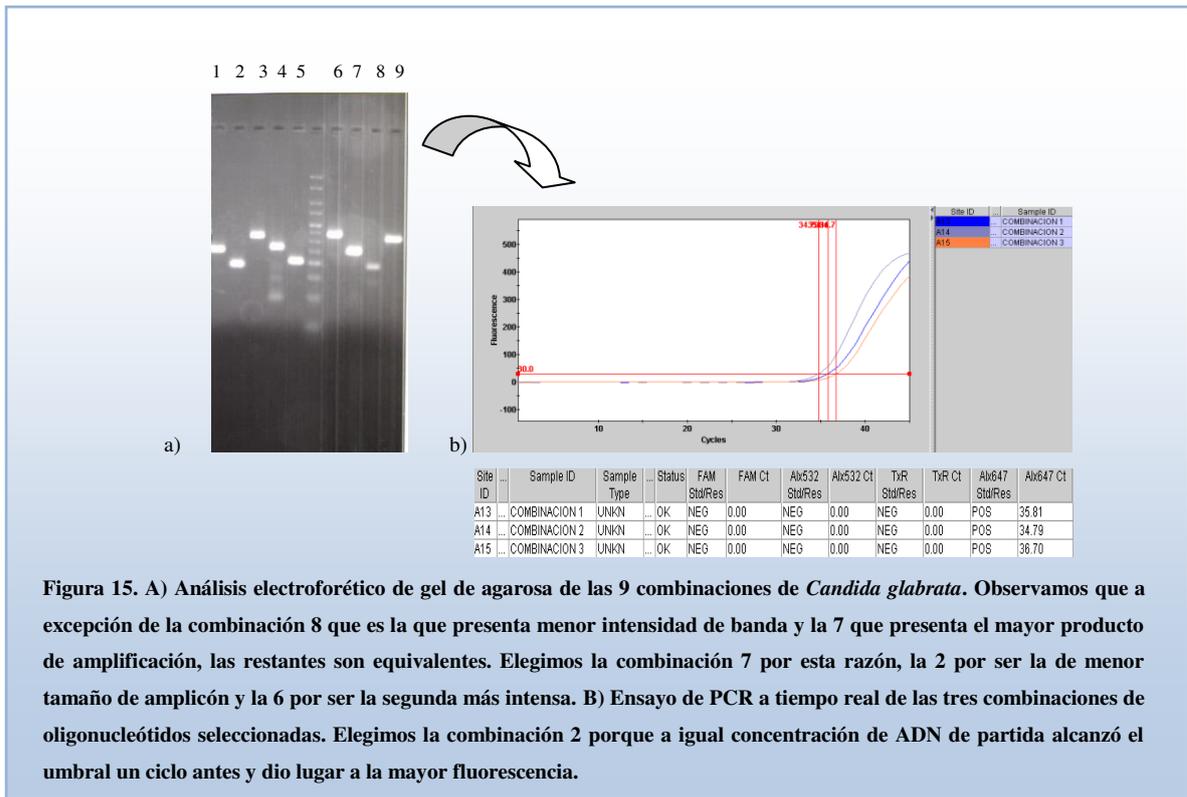


Figura 15. A) Análisis electroforético de gel de agarosa de las 9 combinaciones de *Candida glabrata*. Observamos que a excepción de la combinación 8 que es la que presenta menor intensidad de banda y la 7 que presenta el mayor producto de amplificación, las restantes son equivalentes. Elegimos la combinación 7 por esta razón, la 2 por ser la de menor tamaño de amplicón y la 6 por ser la segunda más intensa. B) Ensayo de PCR a tiempo real de las tres combinaciones de oligonucleótidos seleccionadas. Elegimos la combinación 2 porque a igual concentración de ADN de partida alcanzó el umbral un ciclo antes y dio lugar a la mayor fluorescencia.

2.1.4. Optimización conjunta de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*.

Una vez definidas las condiciones finales de cada uno de los patógenos de forma individual y teniendo en cuenta que la temperatura de *melting* y protocolo de ciclos de amplificación deben ser los mismos para las dos mezclas de reacción que componen el kit se testó conjuntamente *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*. Los ensayos de los tres patógenos de manera conjunta en la misma mezcla de reacción no afectan a los que se obtuvieron en la optimización de cada patógeno de manera individual.

Seguidamente se añadió a la mezcla de reacción un control interno que se utilizará para comprobar que la reacción no se ha inhibido ni ha sufrido ningún tipo de incidencia. El control interno se usa para descartar falsos negativos.

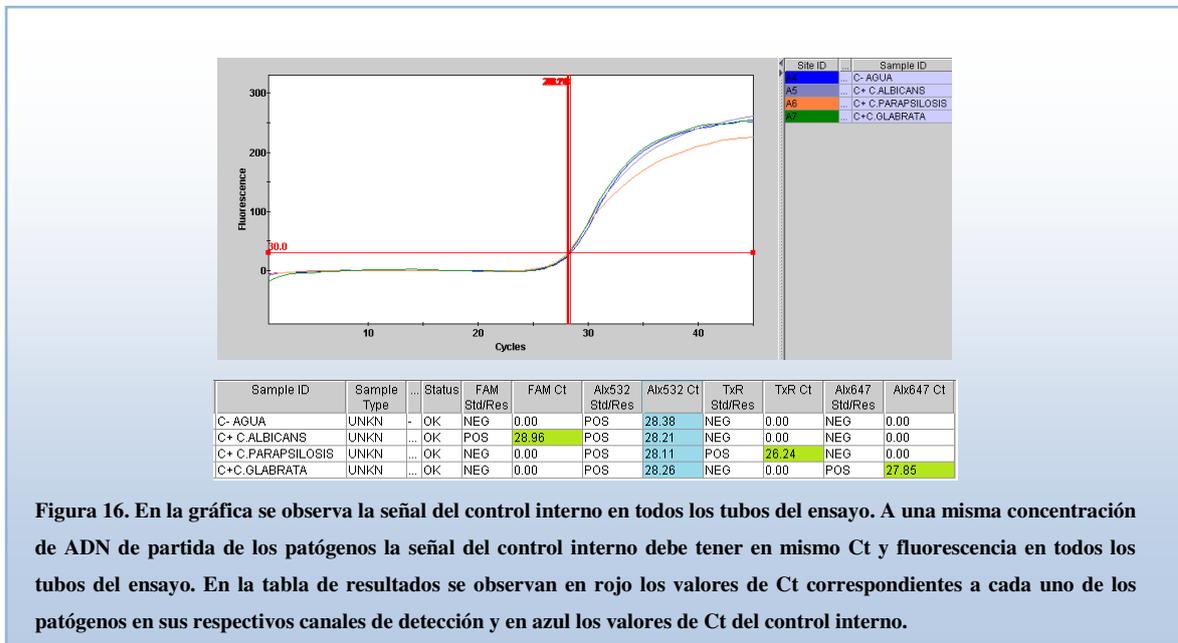


Figura 16. En la gráfica se observa la señal del control interno en todos los tubos del ensayo. A una misma concentración de ADN de partida de los patógenos la señal del control interno debe tener en mismo Ct y fluorescencia en todos los tubos del ensayo. En la tabla de resultados se observan en rojo los valores de Ct correspondientes a cada uno de los patógenos en sus respectivos canales de detección y en azul los valores de Ct del control interno.

2.1.5. Ensayos de reproducibilidad y congelación.

Para los ensayos de reproducibilidad y congelación se testaron:

Tabla 5

Tubo	Contenido
Control negativo 1	Agua
Control negativo 2	ADN distinto a <i>Candida</i>
Control positivo	ADN de <i>Candida albicans</i>
Control positivo	ADN de <i>Candida parapsilosis</i>
Control positivo	ADN de <i>Candida glabrata</i>
Control de inhibición	Citología

Los resultados obtenidos fueron iguales a los observados en la figura 15.

2.1.6. Cálculo de sensibilidades

La sensibilidad de cada uno de los patógenos para la mezcla de amplificación de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* es de:

•*Candida albicans*: 100 copias/ μ L.

•*Candida parapsilosis*: 10 copias/ μ L.

•*Candida glabrata*: 10 copias/ μ L.

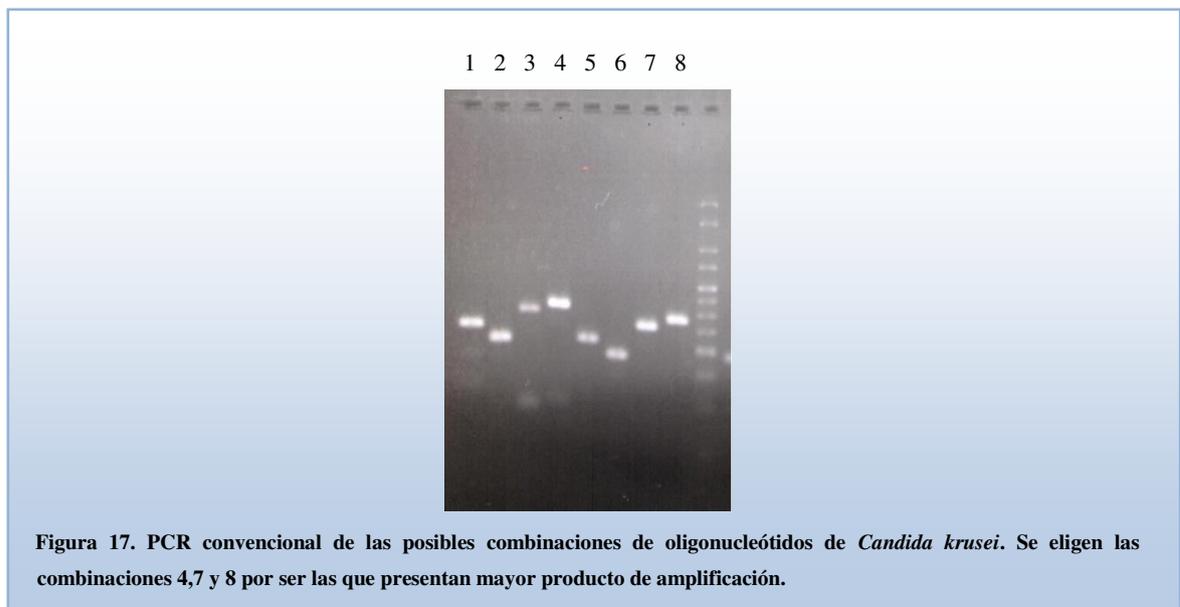
2.2. Mezcla de amplificación para la detección de *Candida sp*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*

2.2.1. Optimización de *Candida sp*.

Para la amplificación de las especies patógenas humanas del género *Candida* se utilizaron oligonucleótidos y sondas diseñados y testados previamente a la realización de este proyecto. La diana de amplificación comprende la región ITS3-ITS4. El ADN utilizado como control positivo se corresponde con un producto de extracción de una muestra de *Candida albicans*.

2.2.2. Optimización de *Candida krusei*

Se diseñaron oligonucleótidos sobre la región 28S rRNA del genoma de *Candida krusei*



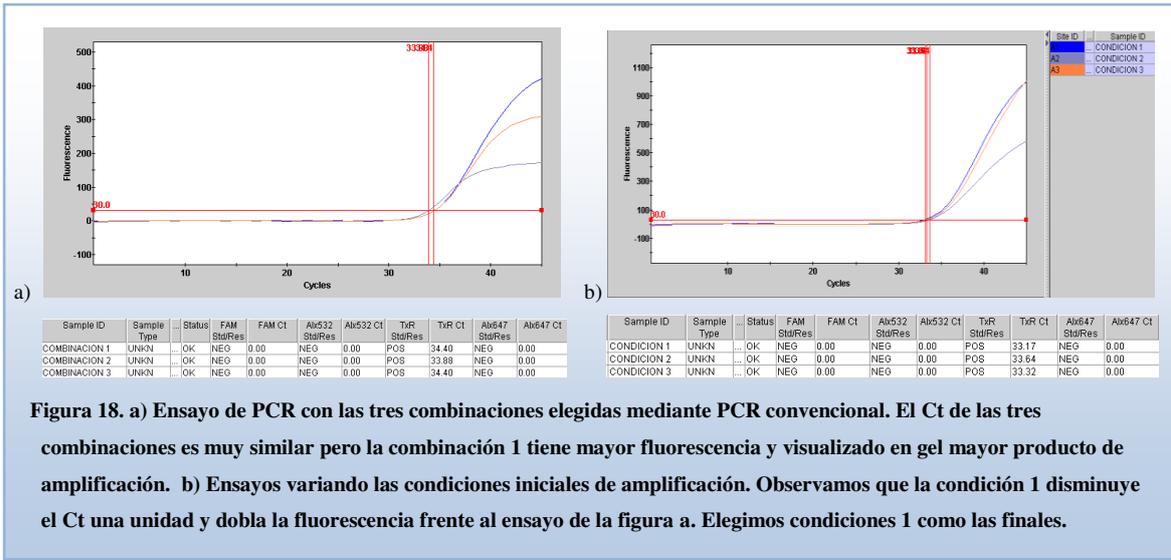


Figura 18. a) Ensayo de PCR con las tres combinaciones elegidas mediante PCR convencional. El Ct de las tres combinaciones es muy similar pero la combinación 1 tiene mayor fluorescencia y visualizado en gel mayor producto de amplificación. **b)** Ensayos variando las condiciones iniciales de amplificación. Observamos que la condición 1 disminuye el Ct una unidad y dobla la fluorescencia frente al ensayo de la figura a. Elegimos condiciones 1 como las finales.

2.1.1. *Candida tropicalis*

Debido a la elevada complejidad del diseño de oligonucleótidos específicos para la detección de *Candida tropicalis* solo se pudieron testar dos combinaciones de cebadores.

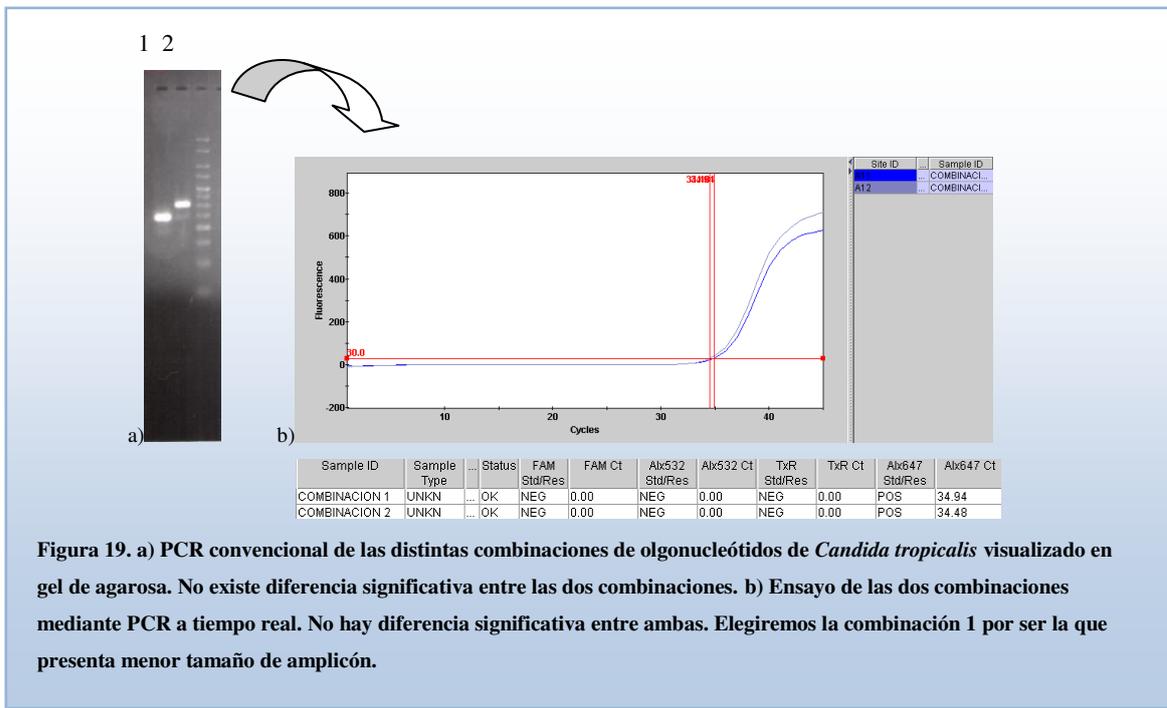
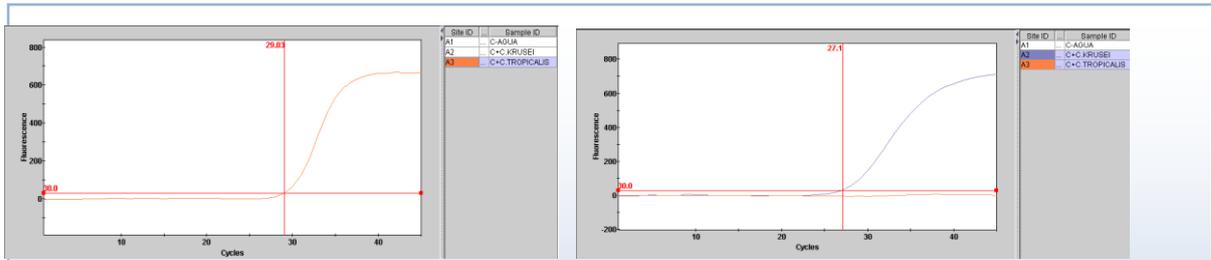


Figura 19. a) PCR convencional de las distintas combinaciones de oligonucleótidos de *Candida tropicalis* visualizado en gel de agarosa. No existe diferencia significativa entre las dos combinaciones. **b)** Ensayo de las dos combinaciones mediante PCR a tiempo real. No hay diferencia significativa entre ambas. Elegiremos la combinación 1 por ser la que presenta menor tamaño de amplicón.

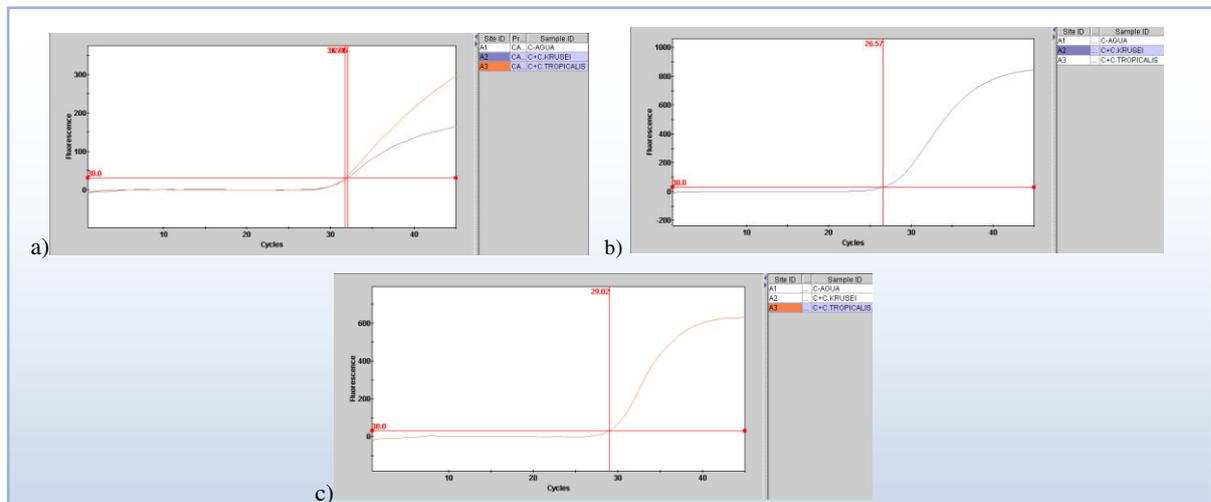
2.1.2. Optimización conjunta de *Candida sp.*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*

Determinadas las mejores condiciones de detección de cada patógeno de manera individual se pasó a detectarlos conjuntamente.



Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
C-AGUA	UNKN	OK	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00
C+C.KRUSEI	UNKN	OK	NEG	0.00	NEG	0.00	POS	27.10	NEG	0.00
C+C.TROPICALIS	UNKN	OK	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00	POS	29.03

Figura 20. A) *Candida tropicalis*. B) *Candida krusei*. Ensayo de *Candida krusei* y *Candida tropicalis* de forma conjunta. Los resultados obtenidos al juntar *Candida krusei* y *Candida tropicalis* son iguales que los obtenidos para la optimización de cada patógeno de manera individual.



C-AGUA	UNKN		OK	POS	39.60	NEG	0.00	NEG	0.00	NEG	0.00
C+C.KRUS...	UNKN	22/05/14	OK	POS	32.05	NEG	0.00	POS	26.57	NEG	0.00
C+C.TROP...	UNKN	26/05/14	OK	POS	31.71	NEG	0.00	NEG	0.00	POS	29.02

Figura 21. A) canal FAM (*Candida sp.* usando como ADN *Candida tropicalis* y *Candida krusei*). B) *Candida krusei*. C) *Candida tropicalis*. Ensayo conjunto con oligonucleótidos y sondas de *Candida sp.*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*. Podemos observar que los valores de Ct de *Candida sp.* son superiores a los otros dos y la fluorescencia mucho menor.

Como se puede observar en la figura 20, los resultados obtenidos al añadir *Candida sp.* a la mezcla de reacción de *Candida krusei* y *Candida tropicalis* varían mucho entre los patógenos. Ensayos posteriores modificando las concentraciones y condiciones de temperatura de *annealing* de la reacción no consiguieron que el Ct obtenido en el canal correspondiente a *Candida sp.* y la fluorescencia fuese más parecida a la de *Candida krusei* y *Candida tropicalis* por lo que no se pudo continuar con la optimización conjunta de la reacción. Es, por tanto necesario un nuevo diseño para la detección conjunta de *Candida sp.*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los sistemas de detección de patógenos basados en PCR a tiempo real constituyen una herramienta sensible, rápida y específica frente a los métodos tradicionales. El objetivo de este trabajo consistía en diseñar un sistema de detección por PCR a tiempo real para *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*, y otro sistema de detección para *Candida sp.*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*. Ambos géneros están estrechamente relacionados con individuos inmunodeprimidos, por lo que la detección temprana de los mismos, puede suponer en muchos casos la diferencia entre la supervivencia y la muerte.

La técnica de la PCR a tiempo real permite obtener un resultado a partir del ADN de una muestra clínica en aproximadamente 2 horas. A diferencia de las técnicas basadas en PCR convencional, no es necesaria la visualización en gel, por lo que se reduce el tiempo necesario a la mitad. Y este tiempo es sustancialmente menor si lo comparamos con métodos de cultivo. Por otra parte, se trata de una técnica muy específica, puesto que es necesaria la hibridación de los oligonucleótidos y de la sonda fluorescente. Una ventaja adicional es que el resultado de la amplificación se detecta mediante la emisión de fluorescencia a través de un tubo óptico, evitándose abrir los tubos para analizar los resultados. De esta forma se evita la contaminación debida a los amplicones previamente amplificados. Esto convierte a la PCR a tiempo real en la técnica de referencia en los laboratorios de microbiología molecular.

El presente trabajo se ha enfocado a la obtención de resultados prácticos, materializados en unos reactivos comerciales para diagnóstico *in vitro*. Esta circunstancia supone una diferencia de planteamiento muy importante respecto a las tareas de desarrollo científico que podríamos denominar de ciencia “básica”. En primer lugar, el trabajo está condicionado por la utilización de materias primas, tales como mezclas de reacción comerciales, ya optimizadas no siendo posibles variaciones más allá de la concentración de algún oligonucleótido. Por otro lado, en este tipo de trabajos se prioriza la obtención de resultados mediante el sistema de prueba y ensayo, teniendo en cuenta que en ocasiones lo importante es disponer de una primera versión de un producto que puede ser posteriormente mejorada a nivel de sensibilidad, especificidad o robustez. Por último,

algunas de los procedimientos y de las soluciones técnicas utilizadas, tales como el sistema de control interno de amplificación o algunas reacciones previamente desarrolladas en la empresa no pueden ser descritas con detalle debido al necesario mantenimiento de la confidencialidad.

Para iniciar el trabajo, se diseñaron y testaron varias combinaciones de oligonucleótidos y sondas ya que se considera que son los reactivos críticos de la PCR. En una primera etapa, se verificó el funcionamiento de los cebadores mediante PCR convencional. Los criterios que se tuvieron en cuenta para valorar la eficacia de los cebadores fueron, en primer lugar, la cantidad de producto de amplificación obtenido a tiempo final, es decir la intensidad de la banda observada en gel de agarosa. En segundo lugar fue el tamaño del amplicón resultante de cada combinación, debido a que para PCR a tiempo real el tamaño de producto de amplificación puede condicionar el rendimiento de la misma.

En este sentido en la figura 5 podemos ver que se elige la combinación 1 a pesar de no presentar una intensidad de banda muy elevada porque es la que da lugar al amplicón de menor tamaño. Con esa misma combinación, testada posteriormente mediante PCR a tiempo real, se obtienen los valores de fluorescencia más elevados. Observando estos resultados podemos concluir que, a pesar de que los cebadores de esa combinación no son los que tiene la mayor eficacia en la PCR, en cambio sí permiten obtener resultados excelentes en la PCR a tiempo real, posiblemente debido a que la sonda se une de manera más eficaz a este amplicón. El caso contrario podemos observarlo en las figuras 6 y 7. El producto de amplificación obtenido con la combinación 4 es el que presenta más intensidad en el gel de agarosa, y por tanto el que a partir de una misma cantidad de ADN ha dado lugar a más cantidad de producto final. Esta misma combinación testada mediante PCR a tiempo real con un ADN de partida de concentración muy baja no ha dado señal en el canal esperado. Esto es debido a que la sonda no se une muy eficazmente a este amplicón.

Por todo esto, podemos concluir que lo ideal sería obtener una combinación que diese lugar a un producto de amplificación abundante y cuyo amplicón resultante sea una buena diana de unión para la sonda, pero esto no siempre ha sido posible

Una vez optimizadas las mejores condiciones de detección de los patógenos de manera individual se pasó a testarlos de manera conjunta. Durante los ensayos de optimización de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae* de manera conjunta, se observó que al mezclarlos, los valores de *Bartonella sp.* variaban respecto a los obtenidos previamente. Además, se obtenía un valor de Ct de 26.40 para *B.henselae* y de 31.35 para *Bartonella sp.* (ver figura 8). Estos datos significarían que partiendo de una muestra positiva de *Bartonella henselae* con una concentración de ADN baja correspondiente, por ejemplo, con un Ct en el canal de *Bartonella henselae* de 37, el valor de *Bartonella sp.* podría ser negativo. Esta circunstancia podría implicar un resultado aparentemente incongruente y difícil de entender por el usuario final de los productos, si bien desde el punto de vista técnico es correcto. Por esta razón se decidió realizar un nuevo diseño para *Bartonella sp.*, consiguiendo finalmente unos valores de Ct y fluorescencia similares para los dos sistemas de detección.

Esta misma situación la volvemos a encontrar en el sistema de detección de *Candida sp.*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*. La optimización de *Candida sp.* se había realizado en un diseño previo a este trabajo, por lo que fue necesaria únicamente la optimización de *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. Una vez optimizados de manera individual se pasó a optimizarlos de manera conjunta. Los resultados obtenidos para *Candida krusei* fueron de Ct= 26,57, *Candida tropicalis* Ct=29,02 , *Candida sp* con ADN de *Candida krusei* Ct= 32,05 y *Candida sp* con ADN de *Candida tropicalis* Ct= 31,71 (ver figura 21). En primer lugar podemos ver que el mismo par de cebadores de *Candida sp.*, amplificando ADN de dos especies diferentes da distintos resultados. Esto puede ser debido, por un lado, a la diferencia de tamaño del amplicón resultante para cada una de las especies, a la posible formación de estructuras secundarias de la cadena de ADN impidiendo la buena unión de los cebadores o la sonda o al diferente porcentaje de G+C de ambas cadenas. A pesar de no formar parte de la misma mezcla de amplificación, *Candida sp.* se analizaría conjuntamente con *Candida albican*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*. Analizando los valores de Ct y fluorescencia obtenidos en los ensayos de optimización conjunta de estas tres especies, podríamos deducir que un valor positivo, pero de una muestra con baja concentración de ADN, daría lugar a un resultado positivo en los canales de las especies problema, pero negativo para *Candida* género. Es, decir, la cantidad mínima

que se detectaría con los cebadores y sonda de *Candida sp.* sería mayor que la que se detectarían con los sistemas para cada una de las especies de manera individual.

Estudiando los ensayos que se habían realizado previamente para la optimización de *Candida sp.*, se llegó a la conclusión de que no era posible mejorar las condiciones de amplificación con esos cebadores y esa sonda, por lo que es necesario un nuevo desarrollo para la detección de *Candida sp.*

En los sistemas de detección mediante PCR a tiempo real, un valor positivo es debido a la amplificación específica del patógeno a detectar, pero un valor negativo, deber ser verificado mediante un control interno de amplificación. El control interno está formado por un sistema de amplificación independiente del patógeno a detectar. La concentración del mismo debe ser lo suficientemente alta como para detectarlo pero no tanta como para que consuma durante la amplificación todos los reactivos. La falta de señal en el canal correspondiente al control interno puede deberse a la inhibición de la reacción o a un problema en los reactivos. En este caso el resultado en los canales de los patógenos no son valorables y debería repetirse el ensayo. Como podemos observar en la figura 10, a mayor cantidad de ADN del patógeno, menor Ct en el canal correspondiente. Los recursos de la reacción son consumidos por el sistema de amplificación del patógeno, no quedando disponibles en suficiente cantidad para amplificar el control interno. El control interno debe amplificarse siempre en muestras negativas de ADN, pero es innecesario e incluso inconveniente que se amplifique en las muestras positivas.

La figura 10 representa la curva de sensibilidad de *Bartonella henselae*. En ella podemos ver que el valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial. Esta disminución es de aproximadamente unas 3 unidades de Ct, entre una muestra y su dilución 1/10. El cálculo de la cantidad mínima detectada por cada uno de los sistemas de amplificación de manera individual. Así, en una misma mezcla de amplificación podemos observar valores de sensibilidad diferentes. La sensibilidad para la detección de *Candida albicans* es de 100 copias/ μ L, mientras que las de *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* son de 10 copias/ μ L. Estos resultados pueden ser debidos a la diana elegida, a la eficacia de amplificación de los cebadores o a la mejor unión de la sonda.

Como conclusión podemos decir que:

- Se ha diseñado y optimizado un sistema de detección de manera conjunta de *Bartonella sp.* y *Bartonella henselae*. La sensibilidad de cada uno de los patógenos es de 10 copias/ μ L.
- Se ha diseñado y optimizado un sistema de detección de manera conjunta de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*. La sensibilidad de *Candida albicans* en la mezcla de reacción es de 100 copias/ μ L. La sensibilidad de *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata* en la mezcla de reacción es de 10 copias/ μ L.
- Se ha diseñado un sistema de detección conjunta de *Candida sp.*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*. Los resultados obtenidos durante la optimización de dicho sistema no fueron los esperados para *Candida sp.*, siendo necesario un nuevo desarrollo del mismo.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Aguirre JM. *Candidiasis Orales*. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 17-21.
2. Akpan; Morgan, R. *Oral candidiasis*. 2002. Postgraduate Medical Journal; 78 (922): pp. 455–459
3. E.Brinkman, A.Haugland, L.Wymer, M. Byappanahalli, R. Whitman, S.Vesper. 2003. *Evaluation of a rapid, quantitative Real-Time PCR method for enumeration of pathogenic Candida cells in Water*. Applied and Environmental Microbiology; 69:1775-1782.
4. Josep Costa. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;22(5):299-305
5. M. Guiver, K. Levi, B.A. Oppenheim. 2001. *Rapid identification of candida species by Taqman PCR*. J Clin Pathol; 54:362-366.
6. M.T. Robinson, E.R. Morgan, D. Woods, S.E. Shaw. 2010. *Real-time and multiplex real-time polymerase chain reactions for the detection of Bartonella henselae within cat flea, Ctenocephalides felis, samples*. Medical and Veterinary Entomology; 24:449-455.
7. Rodríguez J, Almagro M, Fonseca E. *Aspectos Clínicos y Terapéuticos de las Candidosis Mucocutáneas*. Salud Rural 2003; 20(4).
8. Procop GW, Roberts GD. *Emerging Fungal Diseases: The Importance of the Host*. Clin Lab Med 2004; 24: 691-719.
9. L.White, D.Williams, T.Kuriyama, S. Samad, M. A. O. Lewis, R. Barnes. 2004. *Detection of Candida in concentrated oral rinse cultures by Real-Time PCR*. Journal of Clinical Microbiology; 42:2101-2107.
10. Yuan C, Zhu C, Wu Y, Pan X, Hua X (2011) *Bacteriological and Molecular Identification of Bartonella Species in Cats from Different Regions of China*. PLoS Negl Trop Dis 5(9): e1301. doi:10.1371/journal.pntd.0001301
12. Forbes, Betty A. Bailey and Scott 's Diagnostico Microbiologico. Ed. Médica Panamericana, 30/6/2009 12ª edición
13. Romero, Raúl. Microbiología y parasitología humana: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Ed. Médica Panamericana, 30/6/2007 3ª edición.

Programas informáticos:

1. Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
2. ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
3. Oligo Cal (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>)
4. GC Calculator (http://www.genomicsplace.com/gc_calc.html)
5. Chromas Pro