

Genetic Engineering News

Uso de la PCR en tiempo real para la detección de patógenos

Nota técnica: Bioinformática aplicada al diseño de ensayos basados en la TaqMan

Martin Johnson, Pius Brzoska, Olga Petrauskene y Chris Melancon

Las pruebas que científicos y médicos han venido utilizando desde hace décadas para detectar los microorganismos patógenos presentes en las muestras están basadas en el uso de cultivos de crecimiento. En la actualidad tales métodos de detección de patógenos en cultivo están siendo reemplazados a marchas forzadas por los análisis mediante PCR en tiempo real que identifican los microorganismos gracias a secuencias específicas de ácidos nucleicos y están dotados de mayor rapidez y especificidad.

Applied Biosystems (Parte de la empresa **Life Technologies**, California, EE.UU.) ha desarrollado un programa para el diseño de ensayos destinados a detectar secuencias pertenecientes a microbios patógenos. Este tipo de ensayos se pueden diseñar con la misma tecnología utilizada para la fabricación de las pruebas de expresión génica comercializadas por la compañía, entre las que cabe citar los ensayos de expresión prediseñados para genes humanos, de ratón, rata, o de *Arabidopsis* y *Drosophila*.

Las páginas siguientes describen el programa bioinformático de diseño de ensayos que Applied Biosystems emplea para la producción de ensayos por PCR en tiempo real con TaqMan[®] destinados a la detección de patógenos, así como las aplicaciones de dichos ensayos en los programas de bioseguridad.

En colaboración con **Tetracore**, una empresa de biotecnología con sede en Gaithersburg, MD, EE.UU., Applied Biosystems ha utilizado esta herramienta de software para fabricar ensayos de PCR en tiempo real destinados a aplicaciones de defensa biológica del Ministerio de Defensa de los Estados Unidos.

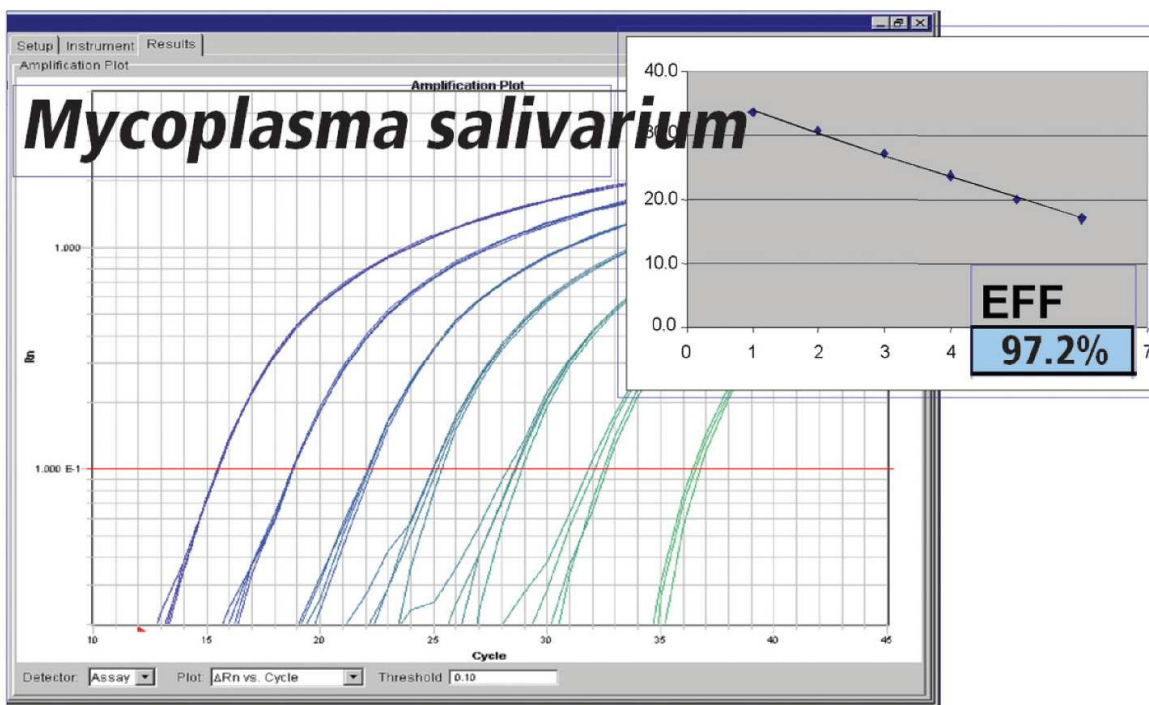


Figura 1. La gráfica muestra una prueba de eficiencia para *Mycoplasma salivarium*. La eficiencia se aproxima al 100%.

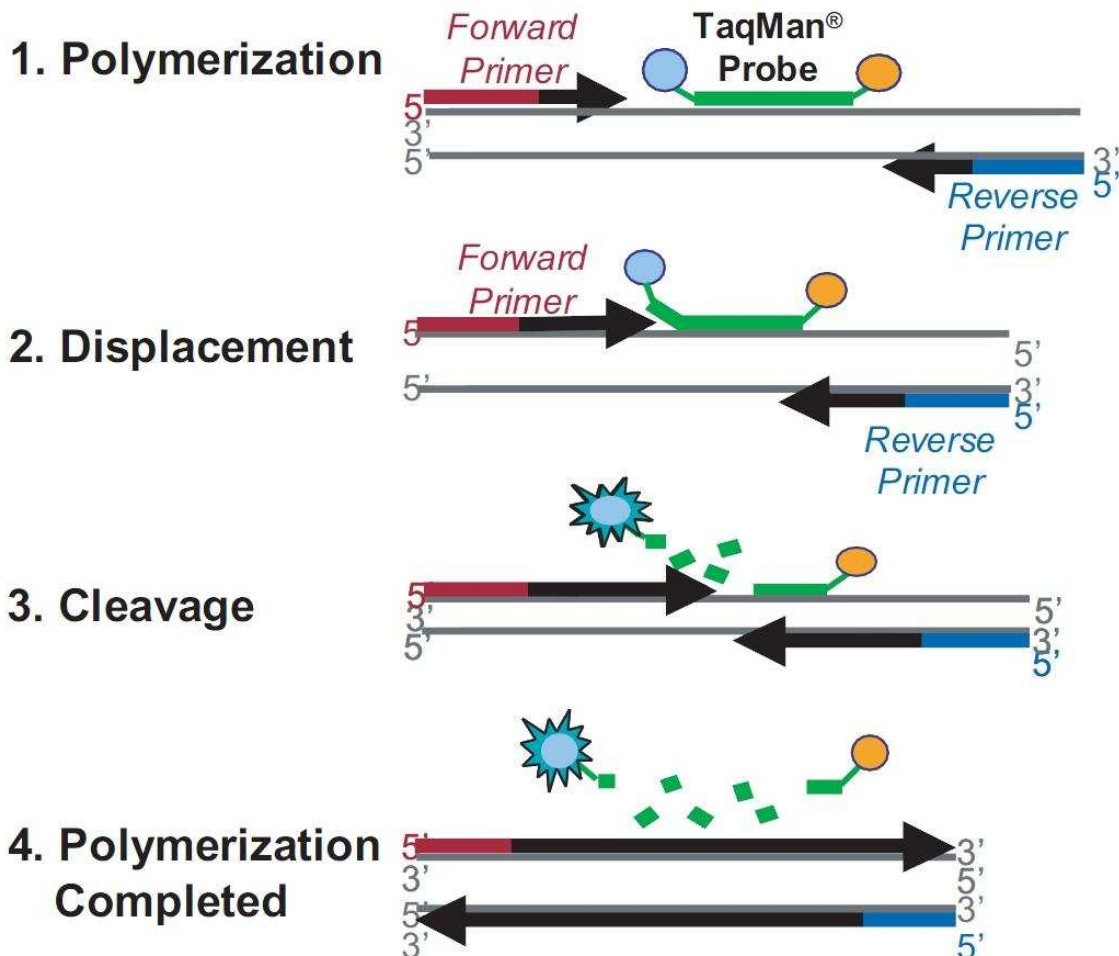


Figura 2. Bioquímica del ensayo con sonda TaqMan[®]. [1] La sonda del ensayo contiene un colorante fluorógeno indicador en el extremo 5' y un inhibidor de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'. Éste último absorbe la fluorescencia emitida por el colorante mientras ambos permanecen unidos a la sonda próximos entre sí. [2] y [3] Durante los sucesivos ciclos de la PCR, la sonda se hibrida con los productos de la PCR específicos para ella, y el colorante indicador del extremo 5' se desprende por la acción de la actividad nucleasa 5'-3' de la ADN-polimerasa Taq a medida que ésta copia la cadena complementaria. [4] La separación del indicador y del *quencher* provoca un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de productos de amplificación que se genera en la mezcla de reacción. Como la actividad nucleasa-5' de la ADN-polimerasa Taq depende específicamente de la doble cadena, toda la sonda libre permanece intacta. Por consiguiente, si durante la reacción se amplifica un producto de PCR inespecífico, la sonda TaqMan libre permanece sin escindir y no se observa la fluorescencia del indicador.²

(LEYENDA RECUADRO)

1. Polimerización
2. Desplazamiento
3. Escisión
4. Conclusión de la polimerización

Forward Primer: Cebador directo
Reverse Primer: Cebador inverso

Applied Biosystems también ha desarrollado y fabricado reactivos para ensayos de PCR en tiempo real destinados a detectar la presencia de patógenos potencialmente dañinos en centros de clasificación de correos.

Programa informático para el diseño de ensayos

Applied Biosystems ha elaborado un programa informático para ayudar a los científicos a diseñar las combinaciones de cebadores y sondas destinadas a los ensayos de detección de patógenos mediante PCR en tiempo real. Un algoritmo patentado aplica una serie de reglas para el diseño del ensayo y recomienda las secuencias para el cebador y la sonda que reconocen una secuencia de ácidos nucleicos característica del microbio de interés.

El algoritmo evalúa una serie de ensayos óptimos con los criterios de temperatura de fusión y composición de nucleótidos de las combinaciones de cebador-sonda, y a continuación selecciona el ensayo más específico comparando la secuencia de ácidos nucleicos de los cebadores y las sondas del ensayo con las secuencias genómicas de otras especies bacterianas estrechamente emparentadas.

A partir de esta comparación de secuencias, un algoritmo patentado de evaluación del ensayo de TaqMan selecciona el ensayo que presenta el mayor número de emparejamientos erróneos (*mismatch score*) con otras bacterias, reduciendo así la probabilidad de escoger un ensayo que genere falsos positivos. El algoritmo de diseño produce ensayos con una eficiencia cercana al 100%.¹

El programa informático de diseño de ensayos de Applied Biosystems busca cebadores para todas las secuencias diana microbianas conocidas y optimiza la selección de las parejas de cebadores basándose en los patrones de hibridación de ambos cebadores con la secuencia diana prevista.

A diferencia de muchos otros programas informáticos de diseño de ensayos que generan una larga lista de candidatos, el programa de Applied Biosystems elimina muchas de las posibles combinaciones de cebador-sonda y reduce el número de posibles cebadores y sondas cuya eficacia es necesario evaluar.

A modo de ejemplo, mostramos el diseño de ensayos de PCR en tiempo real altamente sensibles y específicos para las siguientes especies estrechamente emparentadas: *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *M. orale* y *M. salivarium* (véase Figura 1).¹

Ensayos de detección de patógenos mediante PCR en tiempo real con TaqMan

Los ensayos de detección de patógenos mediante PCR en tiempo real con TaqMan amplifican las secuencias diana de ácidos nucleicos de determinados microbios presentes en muestras recogidas en ambientes biológicos complejos. La amplificación específica de las secuencias diana está dirigida por cebadores y sondas de diseño personalizado.

El primer grado de especificidad se consigue combinando las secuencias de los cebadores de amplificación, y ésta se refina todavía más por medio de una sonda que hibrida con una región de la secuencia de ácidos nucleicos que identifica al microbio de interés (Figura 2).

Los ensayos de detección de patógenos mediante PCR en tiempo real están automatizados gracias a la familia de sistemas de PCR en tiempo real de Applied Biosystems, cuyos integrantes son capaces de analizar simultáneamente desde 96 hasta 384 muestras selladas.

A medida que la amplificación por PCR avanza, un láser o un haz de luz halógena estimulan la fluorescencia que detecta una cámara CCD. Como la sonda no inhibe la reacción de PCR, estos sistemas ofrecen una respuesta lineal respecto a la concentración de molde que supera como mínimo los cinco órdenes de magnitud.

Especificidad y sensibilidad

Las secuencias diana que confieren la especificidad para cada uno de los microorganismos patógenos se encuentran localizadas en la fracción del genoma microbiano que codifica sus agentes virulentos. Los genes o la porción de los mismos que provoca el fenotipo morboso del patógeno diferencian al microbio de interés de sus parientes más cercanos.

Por ejemplo, en el caso de *Bacillus anthracis*, los componentes genéticos responsables del fenotipo causante del carbunco diferencian su genoma del de otras especies de *Bacillus* muy cercanas.

Además de la especificidad, el límite de detección (LOD) del ensayo influye notablemente en su capacidad para detectar la secuencia diana del microbio de interés, y es que en muchos casos la muestra sólo contiene una pequeña cantidad de dicha secuencia.

Los microbiólogos han utilizado tradicionalmente las unidades formadoras de colonias (UFC) expresadas como UFC por mililitro para cuantificar la sensibilidad de los ensayos de detección de patógenos en cultivo. En los ensayos basados en la PCR en tiempo real la sensibilidad se define como el número de copias de la secuencia diana que debe contener una muestra para que el ensayo detecte la presencia del microbio patógeno.

Los ensayos de PCR en tiempo real con TaqMan son capaces de detectar tan solo 10 copias de la secuencia diana en una muestra y, en algunos casos, se ha confirmado que pueden llegar a detectar una sola copia.

Los ensayos de PCR en tiempo real ofrecen resultados en un tiempo mucho más breve que los ensayos de cultivo. Los resultados de los métodos de detección basados en el cultivo se demoran con frecuencia durante días, mientras que los ensayos con PCR en tiempo real basados en TaqMan ofrecen resultados precisos en cuestión de horas.

Aunque los ensayos de PCR en tiempo real con TaqMan son más específicos y más sensibles que los basados en cultivos, no se pueden utilizar para determinar la viabilidad del microorganismo patógeno: si un microbio es detectado en los ensayos en cultivo, es viable.

En cambio, los ensayos basados en la TaqMan sólo permiten averiguar si un microbio patógeno está presente en la muestra. El ensayo determina la presencia del microbio detectando una secuencia específica de ácidos nucleicos del mismo, pero el hecho de que dicha secuencia permanezca intacta no significa que su portador siga vivo.

Así pues, los ensayos de detección de patógenos se utilizan de ordinario para averiguar si un microorganismo patógeno está presente en una muestra y, por su parte, las técnicas de cultivo siguen siendo el método más adecuado para evaluar la viabilidad del mismo.

Aplicaciones de bioseguridad

Los ensayos de detección de patógenos mediante PCR en tiempo real con TaqMan se emplean actualmente en diversas aplicaciones de bioseguridad. Entre otros usos, se han diseñado ensayos a fin de hallar sustitutos inocuos para los análisis de dispersión de microorganismos peligrosos.

En los análisis de dispersión los investigadores liberan sustitutos de los microbios peligrosos o microorganismos benignos y analizan el modo en que el ambiente influye en la distribución de los agentes biológicos liberados: dispositivos de recogida situados estratégicamente permiten analizar el patrón de dispersión de una nube llena de microbios sobre una zona concreta.

La clave para obtener buenos resultados en el análisis de dispersión consiste en detectar con fiabilidad los microorganismos sustitutos no patógenos. Estos microorganismos son especies inocuas que han sido seleccionadas porque comparten ciertas características en común con los microbios patógenos.

Por ejemplo, *B. atrophaeus* es un bacilo esporulado grampositivo que actúa en el medio ambiente de un modo muy similar a *B. anthracis* y constituye un modelo de comportamiento de este microbio virulento, responsable del carbunco.

La correcta modelización de un episodio de liberación real requiere el uso de ensayos muy sensibles capaces de cuantificar con precisión, y al tiempo muy específicos para la diana de interés.

Applied Biosystems ha desarrollado ensayos de PCR en tiempo real altamente específicos para detectar microorganismos indicadores inocuos: *B. atrophaeus* (var. *globigii*), *Pantoea agglomerans* (antes *Erwinia herbicola*) y el bacteriófago de ARN MS2 se utilizan como sustitutos indicadores no patógenos de *B. anthracis* (carbunco), *Yersinia pestis* (peste) y *Variola major* (viruela), respectivamente.

Los ensayos de detección de patógenos mediante PCR en tiempo real también se están aplicando en el campo de la microbiología forense, en el que los patógenos detectados en un lugar, como la escena de un delito, se pueden rastrear hasta su origen, el lugar donde se liberó por primera vez el microbio.

Detección de microbios patógenos en ambientes complejos

En lo que respecta a las aplicaciones para la detección de patógenos, como las utilizadas en los programas de bioseguridad, los científicos a menudo necesitan detectar una única especie microbiana en muestras recogidas en entornos biológicos complejos como el aire, el suelo o el agua.

A diferencia de los ensayos que detectan secuencias específicas de ADN humano presentes en las muestras, en las que el molde disponible para la reacción de PCR es de ADN humano, los ensayos de detección de patógenos con PCR en tiempo real deben tener en cuenta la presencia simultánea de material genético perteneciente a múltiples especies microbianas en una misma muestra.

Identificar un microbio entre el espectro de especies microbianas presente en la muestra requiere que el ensayo sea capaz de discriminar entre las secuencias de ácidos nucleicos de la especie de interés y de las especies más cercanas evolutivamente a ella.

La clave para detectar un determinado microbio patógeno entre otras especies muy cercanas al mismo estriba en seleccionar la secuencia diana más adecuada del patógeno en cuestión. Esta secuencia diana será el molde con el que se diseñarán los cebadores y la sonda de secuencia complementaria.

Los científicos suelen escoger secuencias diana que forman parte de genes ampliamente representados en todos los microorganismos, pero tomar esta decisión resulta difícil porque la mayoría de las secuencias microbianas se desconocen o no han sido descifradas todavía. A la hora de seleccionar las dianas, los diseñadores del ensayo necesitan encontrar una secuencia diana muy específica en un gen o en una fracción del mismo que sea exclusiva de la especie de interés.

En el diseño de cebadores y sondas, la especificidad se puede definir como la capacidad del ensayo para diferenciar una especie determinada de sus parientes más cercanos.

En esta definición, la especificidad implica dos propiedades: la inclusión, que implica que el ensayo detectará todas las cepas de la especie de interés; y la exclusión, que supone que el ensayo no detectará las especies más próximas.

Resumen

Applied Biosystems ha elaborado un programa de diseño bioinformático para producir ensayos de PCR en tiempo real con TaqMan de alta eficiencia y especificidad. Estos ensayos permiten detectar con rapidez y precisión los microorganismos potencialmente patógenos. El programa incluye una herramienta de software que permite diseñar las combinaciones de cebador-sonda más adecuadas para reconocer aquellas secuencias de ácidos nucleicos que son exclusivas del microbio de interés.

Los ensayos de detección de patógenos basados en la PCR en tiempo real se están utilizando en aplicaciones de bioseguridad que incluyen el análisis de la dispersión de sustitutos de patógenos y la detección de patógenos potencialmente nocivos en entornos de alto riesgo.

Martin Johnson es científico senior, Pius Brzoska es director senior de personal científico, Olga Petrauskene es científico senior en plantilla, y Chris Melancon es director senior de marketing, en Applied Biosystems (Part of Life Technologies CA, EE.UU.). Página web: www.lifetech.com. Sólo para uso en investigación. No destinado al uso diagnóstico. El proceso de PCR y de nucleasa-5' están protegidos por patentes propiedad de Roche Molecular Systems y F. Hoffmann-La Roche. Applied Biosystems y ABI PRISM son marcas registradas de Applied o de sus filiales en Estados Unidos u otros países. Taq-Man es una marca registrada de Roche Molecular Systems. Todas las demás marcas registradas son propiedad exclusiva de sus respectivos propietarios.

Referencias bibliográficas

1. Furtado M. R., Petrauskene O.V. and Kenneth J. Livak. Horizon Bioscience. DNA Amplification: Current Technologies and Applications. Chapter 2.5. Application of Real-Time Quantitative PCR in the Analysis of Gene Expression. P.131-145 (2004).

2. Livak et al. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization Genome Research 4: 357-362 (junio de 1995).