



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar al título de Licenciado en Bioquímica

**Análisis *in silico* e *in vitro* de un conjunto de primers
para su aplicación en PCR múltiple real time**

IGNACIO JAVIER MARTÍNEZ GAIONE

La investigación se realizó en el Laboratorio de Técnicas Especiales,
Sección Biología Molecular, de la Asociación Española.

Orientador

Pablo López Pedrozo

Médico con especialidad en Genética y Laboratorio Clínico (grado 3).

Facultad de Medicina, Udelar

Coorientador

Gonzalo Manrique

Magíster en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Udelar

Montevideo, Uruguay, 2018

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
1.1. La PCR en el ámbito del diagnóstico clínico	5
1.2. La PCR real time	6
1.2.1. Agentes intercalantes	7
1.2.2. SYBR Green I (SG)	7
1.2.3. Sondas de hibridación	8
1.2.4. Equipos de PCR real time	11
1.2.5. Aplicaciones de la PCR real time	11
1.2.6. Ventajas y limitaciones de la PCR real time	14
1.3. Diseño de primers	14
1.4. La familia herpesvirus	16
1.4.1. Generalidades	16
1.4.2. Propiedades biológicas	17
1.4.3. Estructura y organización del genoma	17
1.4.4. Patogenicidad	18
1.4.5. Epidemiología	18
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Primers y secuencias diana	20
Análisis de especificidad de los pares de primers	21
Análisis de variabilidad de los sitios donde se alinean los primers	21
Análisis de compatibilidad entre los juegos de primers	21
Cálculo de la temperatura de melting para los juegos de primers y productos de amplificación	22
Optimización de la PCR múltiple	22
Controles	23
Electroforesis	23

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Análisis de especificidad de los primers	24
Cálculo de la Tm específica de cada producto de amplificación	24
Determinación de los grupos de primers compatibles para PCR múltiple	25
Optimización de la PCR múltiple: PCR real time para cada uno de los virus por separado	28
Optimización de la PCR múltiple: PCR múltiple partiendo de la temperatura de annealing óptima que minimiza la formación de dímeros de primers	30
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	39
REFERENCIAS	40

RESUMEN

La PCR (Polymerase Chain Reaction) múltiple es una técnica molecular extremadamente sensible que se caracteriza por hacer posible la detección de más de una secuencia diana en un único ensayo; disminuye el tiempo de análisis, costos de insumos y horas de trabajo. El fundamento de la técnica consiste en la utilización de varios juegos de primers en una misma reacción de PCR, siendo posible de esta manera la amplificación de múltiples secuencias diana.

El objetivo de este trabajo se centró en el análisis *in silico* e *in vitro* de un conjunto de primers con el fin de evaluar su posible aplicación a una PCR múltiple real time, mediante el uso de SYBR Green, para la detección de los virus HSV-1 y HSV-2, CMV, EBV, HHV-6 y VZV. Los primers utilizados fueron diseñados y adquiridos por el equipo del laboratorio. Se utilizó el equipo Rotor Gene (Qiagen) y la interpretación de resultados se realizó mediante el análisis de curvas de melting.

Como primera etapa se realizó un análisis informático de los primers utilizados, en distintas bases de datos para ratificar su especificidad. Mediante programas especializados fueron calculados los distintos parámetros de los primers, como temperatura de melting, energías de interacción y los grupos óptimos para su empleo en PCR múltiple.

Posteriormente se procedió a optimizar una PCR real time para cada virus por separado; se realizaron sucesivas PCR variando la temperatura de annealing en un rango de 58 °C a 64 °C y se encontró que la temperatura óptima fue 63 °C. Partiendo de esta temperatura se procedió a optimizar una PCR múltiple en dos tubos, para lo cual se fue variando la temperatura de annealing en un rango de 63 °C a 65 °C con el fin de evaluar la especificidad de los primers.

Finalmente, a pesar de que el análisis *in silico* de los primers utilizados tuvo resultados favorables para su utilización en PCR multiplex y singleplex, los resultados *in vitro* no fueron concordantes, lo cual demostró que los pares de primers para HSV-1 y HSV-2, EBV y CMV generaban amplificaciones inespecíficas.

Palabras clave: PCR múltiple; primers; secuencias diana; SYBR Green; especificidad; temperatura de melting; temperatura de annealing; multiplex; singleplex; amplificaciones inespecíficas.

INTRODUCCIÓN

1.1. La PCR en el ámbito del diagnóstico clínico

Las diferentes metodologías de PCR complementan y se incorporan al conjunto de técnicas diagnósticas de rutina utilizadas en un laboratorio de microbiología clínica, proporcionando una gran sensibilidad y especificidad. Para ciertos tipos de diagnóstico los métodos convencionales del laboratorio resultan poco sensibles e ineficientes a la hora de brindar resultados rápidos; para algunos de estos casos las técnicas de PCR son consideradas como el método predilecto o gold-standard. En la tabla 1 se resumen algunas de las condiciones en las que resulta idóneo el empleo de técnicas moleculares en la detección de agentes infecciosos. (Venuta & Lopardo, 2005)

Tabla 1. Casos en que resulta conveniente el uso de métodos moleculares

<ul style="list-style-type: none">• Cuando el aislamiento por cultivo ofrece muy baja sensibilidad
<ul style="list-style-type: none">- Microorganismos de crecimiento dificultoso o lento (<i>Bordetella</i> spp., <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)- Microorganismos que no desarrollan en medios artificiales y requieren de líneas celulares (<i>Chlamydia trachomatis</i>, <i>Chlamydophila</i> spp., Herpes simplex virus, Citomegalovirus)- Microorganismos que no pueden cultivarse (HCV)- Microorganismos cuyo cultivo resulta peligroso (<i>Chlamydophila psittaci</i>, viruela, coronavirus relacionados al SARS)
<ul style="list-style-type: none">• Cuando la interpretación de los ensayos serológicos resulta confusa por su baja sensibilidad y/o especificidad
<ul style="list-style-type: none">• Cuando los ensayos serológicos resultan lentos por la necesidad de obtener muestras pareadas (fase aguda y convalescente)

Fuente: Venuta & Lopardo, 2005

La detección de un agente infeccioso en el ámbito del laboratorio clínico se lleva a cabo en tres etapas. En primer lugar, se realiza un procesamiento de la muestra para extraer y purificar los ácidos nucleicos; luego se amplifica un fragmento determinado del genoma mediante PCR y finalmente se analiza dicho fragmento utilizando distintas metodologías, como electroforesis en gel de agarosa, empleando bromuro de etidio, gel red o sondas específicas.

Existen tres usos esenciales para la PCR en un laboratorio clínico de microbiología. En primer lugar, la PCR permite detección del agente infeccioso, siendo útil para realizar un diagnóstico rápido y de esta manera lograr tratar al paciente lo antes posible. Se logra aumentar la eficacia diagnóstica al complementarse con los métodos convencionales de análisis y por presentar una mayor sensibilidad. En segundo lugar, los procedimientos cuantitativos de la PCR permiten el seguimiento de un tratamiento, al evaluar su efectividad mediante la cuantificación del agente infeccioso. Por último, la PCR hace posible la caracterización a nivel genético del agente infeccioso, la genotipificación y la identificación de mutaciones asociadas a factores de virulencia o resistencia farmacológica. (Costa, 2004)

La alta sensibilidad de la técnica puede acarrear el riesgo de obtener resultados falsos positivos causados por contaminación cruzada. Los productos de PCR son la causa de contaminación más frecuente; estos pueden contaminar mesadas, reactivos e instrumental de laboratorio. Se debe tomar una serie de medidas para prevenir los riesgos de contaminación, ya sea mediante la implementación de diferentes sectores de trabajo, preamplificación y posamplificación, el uso de sistemas anticontaminación como la irradiación con luz UV, el autoclavado de soluciones e instrumental (Kwok & Higuchi, 1989), y enzimas utilizadas en el control de contaminación por amplicones como la uracil-DNA glicosilasa (UNG). Es posible también obtener resultados falsos negativos y esto se debe principalmente a sustancias presentes en las muestras que puedan inhibir la PCR, por lo que es necesario el uso de controles internos. (Costa, 2004)

1.2. La PCR real time

Esta técnica permite medir la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo de amplificación. El análisis cinético hace posible el estudio cuantitativo de una secuencia diana de ADN mediante la detección de fluorescencia producida en la reacción, que aumenta de forma proporcional con la cantidad de ADN sintetizado. La amplificación se da dentro de un tubo cerrado y esto simplifica el proceso, reduciendo los riesgos de contaminación cruzada entre las diferentes muestras, así como también la contaminación mediada por amplicones. (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993)

Los equipos de PCR real time constan de un termociclador con detectores de fluorescencia integrados, que miden la intensidad de fluorescencia emitida en cada reacción de amplificación. Las dos principales metodologías de detección por fluorescencia son aquellas que utilizan agentes intercalantes y las que utilizan sondas de hibridación específicas marcadas con fluorocromos. (Costa, 2004)

1.2.1. Agentes intercalantes

Los agentes intercalantes son fluorocromos que se caracterizan por poseer la propiedad de incrementar la intensidad de fluorescencia emitida al unirse a la doble hebra de ADN. Durante el transcurso de la PCR, en cada ciclo de amplificación la cantidad de ADN sintetizado aumenta proporcionalmente a la fluorescencia emitida por el agente intercalante. Esta metodología tiene la ventaja de ser menos costosa que las sondas de hibridación específicas y las condiciones de reacción pueden ser optimizadas fácilmente.

La principal desventaja de los agentes intercalantes es la baja especificidad de unión, de modo que puede unirse a dímeros de primers, así como a cualquier producto de PCR sintetizado. En la puesta a punto de un protocolo de detección se debe optimizar las condiciones de reacción con el fin de mejorar la especificidad del sistema. Para esto existen diferentes aspectos a tener en cuenta. Por un lado, se debe evitar la formación de dímeros de primers, realizando un diseño apropiado mediante el uso de programas informáticos especializados. Es adecuado el empleo de altas temperaturas al comienzo de la síntesis de ADN, para disminuir la probabilidad de amplificaciones inespecíficas. Para esto pueden ser empleadas ADN polimerasas modificadas que se activan una vez que se alcanzan altas temperaturas (Hot Start DNA polymerase).

Por otro lado, los equipos de PCR real time permiten calcular la T_m (temperatura de melting) del producto amplificado, que es la temperatura a la cual el 50 % de una molécula de ADN en solución se encuentra en simple hebra. La T_m de un producto de amplificación queda determinada por el máximo de su curva de disociación. Cada oligonucleótido de ADN tiene una T_m característica que depende de su longitud, secuencia de nucleótidos y la composición del disolvente del medio; los elementos de la solución que más influyen son los cationes monovalentes y divalentes, así como otros componentes que se pueden agregar a la PCR como el dimetilsulfóxido (DMSO). Es mediante esta propiedad que se pueden detectar distintos productos de PCR, aunque no siempre con certeza total. (Costa, 2004)

1.2.2. SYBR Green I (SG)

Es un compuesto orgánico fluorescente que se une al surco menor del ADN doble hebra. (Schmittgen, Zakrajsek, Mills, Gorn, Singer, & Reed, 2000) Es muy utilizado para diversas aplicaciones, tanto analíticas como en diagnóstico. Algunos de los usos más destacados son: detección de ácidos nucleicos en gel, cuantificación de ADN doble hebra en solución, aplicaciones de biochip, aplicaciones de citometría de flujo y PCR real time. Su gran desempeño y variedad de aplicaciones se deben a sus propiedades

extraordinarias, entre otras, gran sensibilidad, estabilidad térmica, sus características fotofísicas y la selectividad por el ADN de doble hebra.

Cuando SG pasa desde su estado libre en solución a unirse a la doble hebra de ADN, se genera un aumento en la intensidad de fluorescencia emitida (figura 1) y esta propiedad permite su detección. El mecanismo involucrado depende de la estructura y el modo particular de unión de SG al ADN. (Zipper, Brunner, Bernhagen, & Vitzthum, 2004) Dado que SG se une de manera no específica al ADN de doble hebra, la especificidad de este agente está ligada a la especificidad intrínseca de los cebadores utilizados y la detección de un producto determinado se ve limitada por la formación de otros productos de PCR no específicos. Mediante el uso de SG se puede seguir en cada ciclo de la PCR real time el aumento en el número de copias del producto amplificado. (Wittwer, Herrmann, Moss, & Rasmussen, 1997)

En contraste con las sondas TaqMan, SG ofrece las virtudes de que sus ensayos son más simples de diseñar, se obtiene un gráfico de decaimiento más lineal y es un insumo de laboratorio de menor costo. (Abera, Thangavelu, Joy Chandran, & Raja, 2014)

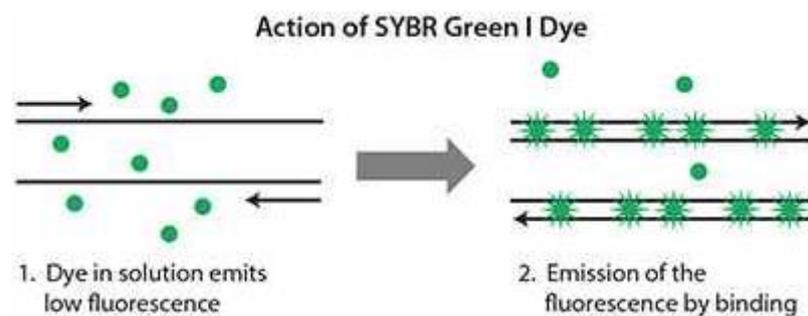


Figura 1. Acción de SYBR GREEN (Fuente: Sigma-Aldrich)

1.2.3. Sondas de hibridación

Son sondas que están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Son las sondas FRET, las sondas molecular beacons y las sondas de hidrólisis —denominadas también sondas TaqMan—, que son las más utilizadas. (Costa, 2004)

Sondas de hibridación (FRET)

Este sistema se basa en el empleo de dos sondas de hibridación, que juntas mejoran la especificidad de unión a la secuencia blanco. Una de estas sondas se encuentra unida en su extremo 3' a un fluorocromo, que será el donador de energía de otro

fluorocromo unido al extremo 5' de la segunda sonda (figura 2-A). Ambas sondas se hibridan con la secuencia blanco durante la fase de annealing de la PCR y quedando muy próximas entre sí el fluorocromo donador puede excitar al aceptor (figura 2-B). Esto es posible porque el espectro de excitación del fluorocromo aceptor se solapa con el de emisión del donador. Por lo tanto, es posible detectar el producto amplificado midiendo la intensidad de la luz emitida por el fluorocromo aceptor, que será proporcional a la cantidad de sonda unida al fragmento amplificado. (Niesters, 2001)

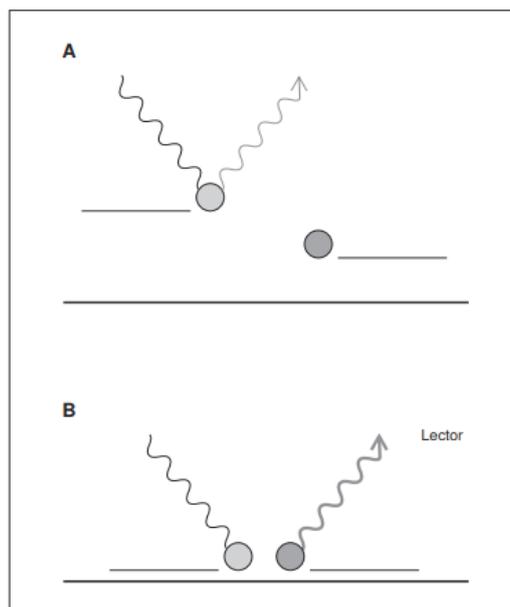


Figura 2. Sondas FRET (Fuente: Costa, 2004)

Sondas molecular beacons

Estas sondas se caracterizan por su estructura conformada por un tallo y un lazo que contiene la secuencia de hibridación al blanco de interés. Uno de los extremos del tallo se encuentra unido a un fluorocromo, mientras que el otro extremo está unido a un quencher, que es una molécula capaz de disminuir la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo. El tallo se encuentra íntegro cuando la sonda está en solución, permaneciendo el fluorocromo y el quencher muy próximos entre sí. Cuando la sonda se une a la secuencia blanco se produce un cambio de conformación que conlleva a deshacer el tallo (figura 3). Como resultado se obtiene una estructura lineal con una separación significativa entre fluorocromo y quencher; a causa de esto es posible captar la intensidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo y de esta forma detectar la sonda unida al producto amplificado. (Niesters, 2001)

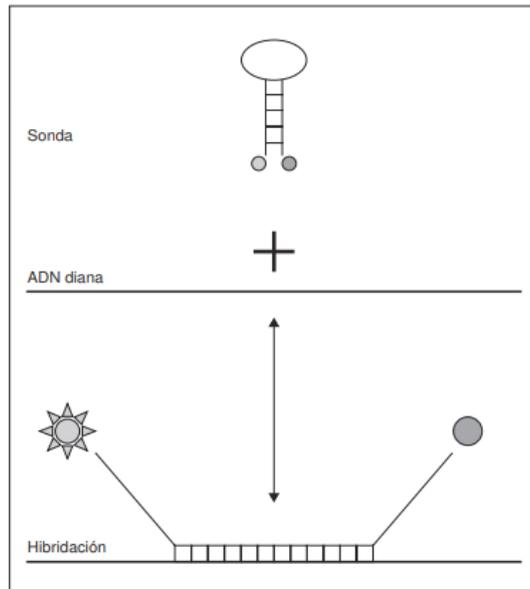


Figura 3. Sondas molecular beacons

(Fuente: Costa, 2004)

Sondas de hidrólisis (TaqMan)

Son sondas que en su extremo 5' poseen un fluorocromo donador y en el 3' una molécula quencher que absorbe la energía emitida por el donador (figura 4-A). Esto es posible solo si el espectro de absorción del quencher se solapa con el de emisión del fluorocromo y además deben estar espacialmente próximos.

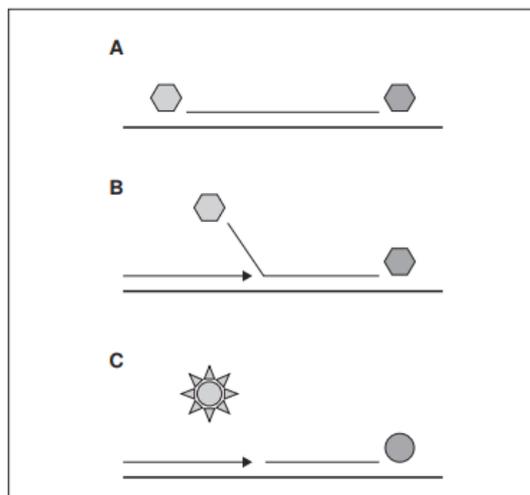


Figura 4. Mecanismo de las sondas de hidrólisis

(Fuente: Costa, 2004)

Durante la reacción de amplificación la sonda se une a la secuencia blanco y en este momento entra en juego la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (figura 4-B), que es capaz de hidrolizar la sonda unida a la secuencia blanco, liberándose el fluorocromo donador (figura 4-C). Debido a que el donador se encuentra libre y espacialmente distante del quencher, es posible captar la intensidad de fluorescencia emitida por este, que será proporcional a la cantidad de sonda unida. (Costa, 2004)

1.2.4. Equipos de PCR real time

Son equipos conformados por un termociclador y un detector de luz que capta la fluorescencia emitida en cada uno de los tubos utilizados durante el transcurso de la reacción de amplificación. Los termocicladores son dispositivos que generan los ciclos de temperatura característicos de la PCR. Estos equipos pueden diferir en el número de canales de lectura y cada canal puede detectar una longitud de onda particular. Cuando se trabaja con PCR múltiple utilizando sondas de hibridación específicas, el número de canales determina la cantidad de sondas unidas a distintos fluorocromos que pueden ser empleadas. (Costa, 2004)

1.2.5. Aplicaciones de la PCR real time

PCR múltiple

El fundamento de la técnica consiste en el empleo de varios juegos de primers en una misma reacción de PCR, siendo posible la amplificación de múltiples secuencias diana y por lo tanto la detección de varios potenciales patógenos en un mismo ensayo. Para la identificación de los productos de amplificación pueden ser utilizadas distintas metodologías, como agentes intercalantes, electroforesis en geles de agarosa y sondas de hibridación específicas para cada secuencia diana. Cada sonda puede ser marcada con diferentes fluorocromos.

Para la puesta a punto de una PCR múltiple pueden ser ajustados algunos parámetros como la cantidad y el tipo de la ADN polimerasa, así como las concentraciones de primers, sondas, dNTPs y cloruro de magnesio. Además, es necesario llevar a cabo un diseño minucioso de los primers mediante programas informáticos, que debe cumplir con algunas condiciones: 1) Los primers no deben interactuar entre sí, ya que es posible la formación de dímeros que dificulten el ensayo. 2) La temperatura de annealing de todos los primers utilizados debe ser tan similar como sea posible. 3) Cada par de primers no debe amplificar más de una única secuencia de ADN diana. 4) Los amplicones deben diferir en tamaño y/o contenido de GC, en la medida que sea

esto posible, facilitando así su identificación mediante curvas de melting. Además se debe partir de un ADN molde que no contenga sustancias inhibitoras de la PCR. Para esto existen diferentes protocolos de extracción de ADN que se ajustan al tipo de muestra de partida y mejoran la calidad de la extracción. (Méndez Álvarez & Pérez Roth, 2004)

Debido a la alta sensibilidad de la técnica pueden producirse amplificaciones inespecíficas; se pueden dar falsos positivos o dificultades en la interpretación de resultados. Por lo tanto, en el proceso de validación se busca ajustar los distintos parámetros mencionados anteriormente para reducir al mínimo la formación de productos inespecíficos. (Bolívar, Rojas, & García Lugo, 2014)

Para el empleo de esta técnica con fines cuantitativos, es necesario demostrar que la cuantificación de varios productos de PCR en un mismo tubo tenga la misma eficiencia y límite de detección que las distintas PCR real time para cada una de las secuencias dianas por separado. Más aun, debe ser esto considerado cuando en la muestra existen dianas con baja cuantía que serán amplificadas de manera simultánea con otras muy abundantes. (Bustin, *et al.*, 2009)

Cuando se desea detectar más de una secuencia diana simultáneamente las amplificaciones preferenciales son un problema a resolver. Las causas de la preferencia por determinadas dianas han sido explicadas mediante modelos teóricos y experimentales; se las conoce como deriva y selección. Deriva refiere a la fluctuación de la interacción entre los reactivos durante los ciclos, principalmente los iniciales. Este fenómeno se explica por las bajas concentraciones iniciales de ADN molde que, sumado a las variaciones de los perfiles térmicos del termociclador, da como resultado rampas de temperatura desiguales.

El concepto de selección refiere a que la reacción se ve favorecida por la amplificación de ciertas secuencias diana debido a sus características propias y secuencias adyacentes. Los parámetros que influyen en la selección pueden ser ajustados para evitar las amplificaciones preferenciales de las secuencias diana, mientras que la deriva es inevitable. Los principales parámetros de la selección son el contenido de GC, la eficiencia en el diseño y el número de pares de cebadores empleados por tubo. (Bolívar, Rojas, & García Lugo, 2014)

La principal ventaja que presenta este método es que simplifica en un único proceso sistemas de detección que antes requerían múltiples pasos y procedimientos, disminuyendo costos de insumos de laboratorio, numerosas horas de labor humana y el tiempo de análisis que es un factor crítico en el diagnóstico de un paciente que aguarda ser tratado a la brevedad. (Rubio, Tammam, & Ta-Tang, 2011)

Si bien la PCR múltiple convencional permite la detección en un único ensayo, tiene la desventaja de que se debe utilizar la electroforesis en gel como paso posamplificación

para la identificación de los productos de PCR. Asimismo, la PCR convencional no múltiple, además de requerir una gran demanda de tiempo y labor de mesada, presenta la desventaja de que puede ser susceptible de contaminación cruzada. En comparación, la PCR múltiple real time es una técnica con grandes ventajas, ya que no requiere procedimientos de posamplificación, lo cual reduce al mínimo los riesgos de contaminación y logra un mayor rendimiento al analizar muestras en menor tiempo. (Rao, *et al.*, 2014)

Cuantificación de los productos de amplificación

La PCR real time es capaz de detectar y cuantificar en minutos ácidos nucleicos provenientes de un amplio espectro de muestras. El hecho de que sea una técnica rápida, simple, extremadamente sensible y específica hace que sea la técnica cuantitativa por excelencia utilizada en diagnóstico molecular, medicina, ciencias naturales y la agricultura. (Bustin, *et al.*, 2009)

Los equipos de PCR real time permiten conocer las curvas cinéticas de cada reacción, ya que en cada ciclo se toman medidas de intensidades de fluorescencia, que son proporcionales a la cantidad de ADN formado y que serán representadas gráficamente por el software del equipo. Para poder cuantificar la concentración inicial de ADN o ARN de secuencia diana es necesario realizar una curva estándar; esta se logra realizando sucesivas PCR con concentraciones escalonadas y conocidas de un control positivo. El software del equipo determina el ciclo en el cual se detecta un aumento contrastante de fluorescencia en relación con la señal de base. Este ciclo es denominado punto de corte (C_p de *crossingpoint*) y varía de forma inversamente proporcional a la cantidad de ADN de secuencia diana presente en la muestra. Se logra entonces obtener el valor de C_p para cada una de las concentraciones conocidas de ADN control y a partir de estos valores se realiza la curva estándar. Seguidamente el software interpola el C_p de la muestra problema en la curva estándar, con el fin de calcular la concentración inicial de ADN o ARN. (Costa, 2004)

Análisis de curvas de melting

Una vez que culmina la reacción de PCR real time, se somete a los productos amplificados a un gradiente de temperaturas creciente con el fin de obtener las curvas de melting. Estas se representan en gráficas de intensidad de fluorescencia versus temperatura. La T_m característica de un producto de amplificación es el valor de temperatura que se corresponde con el máximo de su curva de melting. Las curvas de melting y la T_m de un oligonucleótido nos aportan la información necesaria para identificar los productos de interés y poder diferenciarlos de otros productos

inespecíficos como dímeros de primers. Esto es posible ya que dichas curvas son funciones específicas de la secuencia, el largo y el contenido de GC/AT de cada oligonucleótido. (Ririe, Rasmussen, & Wittwer, 1997)

Las curvas de melting pueden ser utilizadas como estrategia para el análisis de mutaciones puntuales. Mediante uso de sondas específicas se puede identificar un oligonucleótido de tipo salvaje de uno mutante, ya que el primero tendrá una mayor estabilidad de unión con la sonda y esto repercute en una T_m diferente. (Costa, 2004)

1.2.6. Ventajas y limitaciones de la PCR real time

La principal ventaja que ofrecen los equipos de PCR real time son la rapidez del ensayo y la obtención de resultados que pueden ser analizados por el software del equipo; se evita así la necesidad de realizar electroforesis en gel. Comparado con otras técnicas se logra analizar en menor tiempo un mayor número de muestras y esto es de gran importancia en un laboratorio clínico donde diariamente se realizan numerosos estudios a la espera de resultados inmediatos.

En un equipo de PCR real time se pueden llevar a cabo diversas funciones, tales como análisis cualitativos, cuantitativos, PCR múltiple e identificación de mutaciones. En cambio, con otras técnicas convencionales son necesarios varios equipos especializados y procedimientos. Es posible también cuantificar concentraciones de ADN o ARN en una muestra con un nivel de sensibilidad significativamente mayor que con técnicas convencionales, permitiendo la evaluación y el seguimiento de un tratamiento de manera más precisa. Otra virtud que presenta esta técnica es que transcurre en un sistema cerrado, lo cual minimiza los riesgos de contaminación. (Costa, 2004)

La principal desventaja de la técnica es el elevado costo del equipamiento y los reactivos necesarios, así como también la necesidad de personal entrenado.

1.3. Diseño de primers

Los primers son oligonucleótidos que flanquean a la secuencia diana que se desea amplificar y normalmente se diseñan para que sean exactamente complementarios al molde. (Bolívar, Rojas, & García Lugo, 2014) Un diseño adecuado de los primers es esencial para lograr una buena especificidad y sensibilidad en la reacción de PCR. Por lo tanto, un diseño inapropiado en conjunción con una insuficiente optimización de las condiciones de reacción puede reducir la precisión en la detección y dar lugar a resultados falsos positivos o negativos. (Bustin & Huggett, 2017)

Por lo general son de 18 a 24 nucleótidos de extensión y con una composición de 40-75 % de GC. El par de cebadores debe ser diseñado de modo que queden enfrentados entre sí a corta distancia y sus temperaturas de fusión deben ser similares. Debe evitarse en el mayor grado posible la formación de cualquier tipo de estructura secundaria. Los dímeros de primers se generan cuando hay complementariedad de bases en el extremo 3', ya que ambos cebadores se traslapan y sirven de molde en la misma reacción de PCR. A su vez la formación de estos dímeros consume reactivos y esto trae consigo el problema de la disminución en el rendimiento de amplificación de la secuencia diana.

Existen programas informáticos que facilitan el diseño de los primers: predicen estructuras secundarias y calculan las temperaturas de fusión. (Bolívar, Rojas, & García Lugo, 2014)

La temperatura de annealing (T_a) es un parámetro crucial en el desempeño de un primer. Se define como la temperatura para la cual la máxima cantidad de primer se encuentra unida a su secuencia diana. La T_a óptima de un primer se determina experimentalmente; puede variar con el uso de diferentes buffers y el cambio de una master mix a otra no implica que se llegue a resultados iguales. A pesar de trabajar a una T_a óptima pueden ocurrir amplificaciones inespecíficas, no causadas por la formación de dímeros de primers, sino por el annealing del par de primers, aunque de manera deficiente a sitios inespecíficos.

La búsqueda por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no asegura que un diseño de un primer sea específico, ya que el algoritmo utilizado por BLAST busca resultados rápidos y en el proceso puede pasar por alto eventos de hibridación termodinámicamente importantes. (Bustin & Huggett, 2017)

La elección de primers para una PCR múltiple trae aparejado el problema de las posibles interacciones que puedan ocurrir entre estos, al combinarlos en una misma reacción. Para la optimización de una PCR múltiple con pequeños grupos de primers puede ser utilizada la metodología de ensayo y error; sin embargo, esto no es lo más adecuado cuando se busca trabajar con grupos numerosos.

MultiPLX 2.1 es un software online que permite la agrupación de pares de primers para su uso en PCR múltiple, teniendo en cuenta la compatibilidad entre estos. Con este fin el software se vale de algunos parámetros como la interacción primer-primer, diferencias entre las temperaturas de melting, interacciones primer-producto de amplificación, diferencias en el largo del producto de amplificación y también evalúa las posibilidades de generar productos de amplificación inespecíficos (dímeros de primers). El modo de trabajo de MultiPLX consta de dos etapas. En la primera se calculan las puntuaciones de compatibilidad entre las secuencias ingresadas al sistema. Dichas puntuaciones se calculan para toda posible combinación de primers, sobre la

base de los distintos parámetros medibles que puedan alterar la compatibilidad entre estos. En esta etapa también se evalúa mediante alineamientos las interacciones entre primers y los variados productos de amplificación que pueden generarse en una PCR múltiple. En una segunda etapa el software crea grupos de pares de primers sobre la base del punto de corte de las puntuaciones calculadas, determinando cuáles de estos son compatibles entre sí y pueden amplificar en un mismo grupo. Al finalizar el procesamiento de datos el software despliega una lista con los grupos más óptimos. (Kaplinski, Andreson, Puurand, & Remm, 2005)

1.4. La familia herpesvirus

1.4.1. Generalidades

Los criterios para clasificar un virus dentro de la familia herpes se centran en las características estructurales del virión. Los principales componentes morfológicos del virión son: a) Una cápside icosaédrica de aproximadamente 125 nm de diámetro, compuesta por 126 capsómeros. b) El tegumento, que es una sustancia que rodea la cápside, de apariencia amorfa y que incluye diferentes glicoproteínas en su superficie. c) El ADN nuclear, que tiene un tamaño aproximado de entre 124 y 230 kb. (Knipe & Howley, 2013)

Son clasificados en tres subfamilias: *alphaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* y *gammaherpesvirinae*, según el grado de similitud, la organización del genoma, los tipos de huéspedes y otras características biológicas. (Mattera y Barrios, 2006)

En la naturaleza existen virus herpes con un amplio rango de hospederos y para la mayoría de las especies animales se ha descubierto al menos un tipo. Actualmente el número de virus herpes está en torno a los 200 y se sabe que solamente algunos pocos son capaces de infectar a más de una especie. Los virus herpes que tienen como hospedero primordial al ser humano son: herpes simple 1 (HSV-1), herpes simple 2 (HSV-2), citomegalovirus (CMV), varicela zóster (VZV), Epstein-Barr (EBV) y herpesvirus 6, 7, 8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8, respectivamente).

Los virus de esta familia pueden diferir entre sí con respecto al rango de potenciales células huéspedes, la efectividad para replicarse, la capacidad para destruir células infectadas y las enfermedades que causan. (Knipe & Howley, 2013) Cada virus herpes posee una capacidad particular para infectar diferentes tipos celulares. El virus herpes simple es capaz de crecer en células epiteliales y fibroblastos de humanos, monos, conejos y ratones. Varicela zóster se desarrolla mejor en células epiteliales y fibroblastos *in vitro*. Citomegalovirus crece únicamente en fibroblastos humanos y Epstein-Barr puede ser cultivado exclusivamente en linfocitos. Los virus herpes 6 y 7 pueden ser cultivados en linfocitos T CD4. (Mattera y Barrios, 2006)

1.4.2. Propiedades biológicas

Existen cuatro características biológicas principales de la familia herpesvirus: a) El ensamblaje de la cápside y la síntesis de ADN se da dentro del núcleo; el proceso final de encapsidación ocurre en el citoplasma. b) La lisis de la célula infectada es inevitable para que la progenie se disemine en un organismo infectado. c) Poseen un conjunto de enzimas características relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos, el procesamiento de proteínas y la síntesis de ADN. d) Son capaces de permanecer en un estado de latencia dentro de huésped susceptible. En este estado el virus es capaz de expresar solo algunos genes y mantener el potencial de replicación y reactivación de la enfermedad. (Knipe & Howley, 2013)

1.4.3. Estructura y organización del genoma

El genoma de los herpesvirus está constituido por ADN doble cadena lineal y conformado por secuencias repetidas directas o invertidas que delimitan secuencias únicas. Esto posibilita la recombinación intragenómica y la aparición de segmentos circulares. Los repetidos inversos de los virus HSV-1 y HSV-2, VZV y CMV posibilitan que el genoma pueda recombinarse para dar lugar a variados genomas isométricos. En el caso de CMV, HSV-1 y HSV-2 existen dos secciones únicas del genoma, una llama única corta (Uc) y otra única larga (Ul) que se encuentran flanqueadas por dos conjuntos de repetidos inversos. Estas secuencias Ul y Uc son capaces de invertirse de manera independiente para dar lugar a cuatro formas isométricas del genoma. VZV posee solo un conjunto de repetidos inversos y es por esto que solo puede formar dos configuraciones isométricas. En el genoma de EBV existen varias secciones únicas flanqueadas por repetidos directos, debido a lo cual solo se genera una configuración isométrica. (Murray, Rosenthal, & Pfäuer, 2007)

Los virus herpes tienen en común genes y bloques de genes conservados que codifican para proteínas características de esta familia. Existen siete bloques de genes conservados situados en una posición central del genoma. La latencia es una propiedad compartida por los miembros de la familia; sin embargo, los genes involucrados en esta propiedad no se encuentran dentro de los bloques de genes conservados. Los integrantes de esta familia difieren entre sí en cuanto al tamaño del genoma y la composición de bases; incluso entre diferentes cepas de una misma especie puede haber diferencias de hasta 10 kp debido a secuencias repetidas.

Han sido estudiados hasta el momento los genes involucrados en la replicación viral, el metabolismo de los nucleótidos, la reparación del ADN, la cápside viral y glicoproteínas que se expresan en la superficie de la célula infectada. (Bascones Martínez y Pousa Castro, 2011)

1.4.4. Patogenicidad

Existen tres procesos por los cuales un virus herpes puede causar daño a un hospedero; por un lado, puede destruir directamente tejidos o causar daño indirecto provocando respuestas inmunes dañinas y por otro, puede alterar a la célula para que se vuelva neoplásica. Ejemplo de daño directo a los tejidos son las lesiones mucocutáneas causadas por HSV-1 y VZV; un ejemplo de daño indirecto causado por una respuesta inmune patológica es la anemia hemolítica y trombocitopenia.

La infección latente se hace posible debido a que estos virus son capaces de modificar los genes de la célula infectada para evitar su eliminación, ya sea inhibiendo la apoptosis o eludiendo la respuesta inmunitaria. La ubicación privilegiada con respecto al sistema inmune también favorece el estado de latencia; tal es el caso de HSV-1 que tiene como célula huésped a la neurona. Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune es la ausencia de expresión de ciertos antígenos, como se da para EBV. (Mattera y Barrios, 2006)

1.4.5. Epidemiología

La infección y la transmisión de un virus herpes es un evento muy frecuente, con una alta distribución a nivel mundial. Las vías de transmisión son: a) Por la saliva, mediante el contacto directo o íntimo entre dos personas. b) Vía genital, a través de relaciones sexuales o durante el parto. c) Por medio de transfusiones. d) Trasplante de órganos.

Los herpesvirus son virus frágiles debido a su envoltura; sin embargo, pueden sobrevivir por algún tiempo fuera del organismo. Algunas fuentes comunes de infección son los objetos contaminados por la saliva, secreciones infectantes, manos contaminadas y lesiones.

La primoinfección se da principalmente en el lactante, ya sea acompañada de sintomatología o no. Los casos de infección son más habituales para poblaciones en situaciones socioeconómicas desfavorables. En una infección latente estos virus se diseminan por el organismo sin signos ni síntomas clínicos observables; por esta razón se transmiten y dispersan a gran escala en la población. La reactivación de la infección se puede dar ya sea por estímulos de tipo nervioso, estímulos durante el transcurso del embarazo o estímulos alogénicos en el caso de trasplantes. (Mattera y Barrios, 2006)

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar y evaluar si un conjunto de primers diseñados y adquiridos previamente por parte del equipo del laboratorio es apto para poner a punto una técnica de diagnóstico molecular PCR múltiple con SYBR Green, que permita la detección de los virus de la familia herpes: HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, HHV-6 y VZV en diferentes muestras biológicas.

Objetivos específicos

1) Evaluar mediante análisis informáticos la especificidad de los primers.

Para evaluar la especificidad de los primers se realizarán búsquedas por BLAST en las distintas bases de datos de GenBank.

Se estudiará la variabilidad de los sitios de hibridación de los primers, en las distintas secuencias publicadas en GenBank, mediante alineamientos con programas informáticos.

2) Calcular los distintos parámetros asociados a los primers y los grupos compatibles para su utilización en PCR multiplex.

Por medio de programas especializados serán calculados los distintos parámetros de los primers, energías de interacción y los grupos compatibles para amplificar en una misma reacción de PCR.

3) Evaluar *in vitro* el desempeño de la reacción de PCR para cada uno de los virus en forma individual (singleplex) y en formato multiplex.

Se realizará una sucesión de ensayos de PCR real time en los que se irá variando la temperatura de annealing de los primers, con el fin de hallar la temperatura óptima para la cual la formación de dímeros u otras estructuras secundarias sea mínima o nula.

4) Analizar *in vitro* la posibilidad de amplificación inespecífica de cada par de primers con muestras de ADN.

Se analizará la posibilidad de amplificación inespecífica de los primers utilizando muestras de ADN genómico extraído de sangre periférica y ADN extraído de líquido cefalorraquídeo, negativas para virus herpes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Primers y secuencias dianas

Los primers utilizados se listan en la tabla 2. Estos fueron diseñados y adquiridos comercialmente por el equipo de trabajo del laboratorio, previo a la planificación experimental de esta tesis.

Las secuencias genómicas virales que fueron utilizadas se obtuvieron de la base de datos nucleotide sequence de GenBank.

Tabla 2. Primers utilizados

	Primer Forward	Primer Reverse	Secuencia de Referencia	Localización	Tm
HSV-1	GCCATGGGCGACAA GATG	TGAGCAGCAG CTTGGTGAA	NC_001806	Forward: 65516..65533 Reverse: 65594..65612	Forward: 63,1 °C Reverse: 63,2 °C
HSV-2*	GCCATGGGCGACAA GATG	TGAGCAGCAG CTTGGTGAA	NC_001798. 2	Forward: 66024..66041 Reverse: 66102..66120	Forward: 63,1 °C Reverse: 63,2 °C
HHV-6	ACAATTTGACTCATA GCAACCT	GTATACCGTC TATAACATAA ATGACC	NC_001664. 2	Forward: 20914..20935 Reverse: 21035..21060	Forward: 60,6 °C Reverse: 59,4 °C
EBV	TGCAATGTTTAGTGA GTTACCTG	AGCACGTCCC AAACCATGAC	NC_007605. 1	Forward: 90901..90923 Reverse: 90970..90989	Forward: 61,2 °C Reverse: 64,9 °C
CMV	GTTCCCGGCGATGAA GATC	GAGGACAACG AAATCCTGTT GGGCA	NC_006273	Forward: 82921..83003 Reverse: 82984..83003	Forward: 62,3 °C Reverse: 62,9 °C
VZV	TGGAGATACGGATTC TGTGTTTAT	AGAGCCGTTG AAATTATATG TG	NC_001348. 1	Forward: 48067..48090 Reverse: 47992..48013	Forward: 61,8 °C Reverse: 61,6 °C

* El par de primers utilizado para la amplificación de HSV-1 y HSV-2 fue el mismo; dichos primers fueron diseñados sobre una región conservada común entre ambos virus, cuyos sitios de unión para el primer son idénticos y difieren ligeramente en la secuencia del producto amplificado.

Análisis de especificidad de los pares de primers

Para el análisis de la especificidad se siguieron los pasos sugeridos por la guía *Tips for using BLAST to locate PCR primers* de la IDT (Integrated DNA Technologies, 2016)

Se realizó una búsqueda por BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2018) con el fin de localizar cada par de cebadores simultáneamente en las distintas bases de datos de GenBank. Para esto se modificaron los siguientes parámetros: En Program Selection, se seleccionó la opción Somewhat similar sequences (blastn); en General Parameters, se fijaron los valores de Word size a 7, expect threshold a 2000 y max target sequences a 1000. Por último, en Filters and Masking se desactivó la opción low complexity regions. Para cada virus se realizaron tres alineamientos. En primer lugar, se alinearon los cebadores contra la base de datos nucleotide collection y se analizó cada secuencia encontrada con el fin de verificar que no existieran alineamientos inespecíficos que potencialmente pudieran amplificar en una especie diferente. En segundo lugar, se realizó un alineamiento dirigido a todos los virus de la familia herpes en la base de datos herpesviridae (taxid: 10292), con el fin de verificar que ningún par de cebadores se alinearía con algún otro miembro de la familia. Por último, se realizó un alineamiento contra la base de datos correspondiente a la categoría taxonómica de cada virus, con el fin de corroborar que no existieran cepas que se alinearan de manera parcial dificultando la amplificación.

Análisis de variabilidad de los sitios donde se alinean los primers

Mediante búsqueda y alineamiento por BLAST se seleccionaron las secuencias publicadas en Genbank correspondientes a los fragmentos amplificados para cada virus. El número de secuencias analizadas fue: 709 para HSV-1 y HSV-2, 136 para HHV-6, 302 para EBV, 391 para CMV y 200 para VZV. Estas secuencias de ADN se alinearon utilizando el programa comercial CLC Main Workbench versión 6.6.2 (Qiagen) con el objetivo de analizar la variabilidad de secuencia en las regiones en donde se alinean los primers.

En la búsqueda por BLAST se modificaron los siguientes parámetros: En Program Selection, se seleccionó la opción Somewhat similar sequences (blastn) y en General Parameters se configuró el valor de expect threshold a 100.

Análisis de compatibilidad entre los juegos de primers

Se utilizó el programa online MultiPLX 2.1 (University of Tartu, Department of Bioinformatics, 2018) para la formación de grupos de primers compatibles en PCR múltiple. En la ventana *viewing primer info* se estableció la concentración de sales

monovalentes a 50 mM y de Mg²⁺ a 3,0 mM. En la ventana *calculating scores* se seleccionaron las opciones primer-primer end2, primer-primer end1 y primer-primer any. En la ventana *calculating groups*, se asignaron valores para los diferentes parámetros de energías de interacción: dG of primer-primer both 3' ends -5,0 (kcal/mol), dG of primer-primer 3' end with any region -8.5 (kcal/mol), dG of primer-primer any regions -8.0 (kcal/mol), dG of Primer-product 3' end with any region -12.0 (kcal/mol) y dG of Primer-product any regions -12.0 (kcal/mol).

Para el análisis de los resultados obtenidos de las energías correspondientes a la unión más fuerte entre los extremos 3' de dos primers, fueron utilizados valores de referencia sugeridos por algunas guías de diseño de primers. En *PCR Primer Design Guidelines*, BIOSOFT (2018) plantea que la energía de la unión más fuerte entre los extremos 3' de dos primers debe encontrarse entre -3,0 Kcal/mol y -5,0 Kcal/mol. En *Designing PCR primers and probes*, IDT (agosto 2018) sugiere que es aceptable un valor de hasta -9 Kcal/mol para la energía de la unión más fuerte entre los extremos 3'.

Cálculo de la temperatura de melting para los juegos de primers y productos de amplificación

Las temperaturas de melting para cada uno de los primers se muestran en la tabla 2; para calcularlas se utilizó el software online OligoAnalyzer 3.1. (IDT, 2018) Se establecieron las condiciones por defecto para qPCR, en donde la concentración de magnesio fue de 3 mM y la concentración de dNTPs 0,8 mM.

Se utilizó el software online uMELT (University of Utah) para calcular los valores de T_m de los productos de amplificación correspondientes a cada par de primers.

Optimización de la PCR múltiple

Se realizó una sucesión de experimentos en los que se fue variando principalmente parámetros del ciclo de la PCR. Como primer paso se procedió a optimizar cada PCR real time para la detección de los virus HSV-1 y HSV-2, CMV, EBV, HHV-6 y VZV por separado. El volumen final de la PCR mix fue de 20µL, conteniendo 4 µL de master mix 5x con enzima Taq Polimerasa (LightCycler® FastStart DNA Master Plus SYBR Green 1 Version 18, Roche); 1µL de primer forward (5 pmol/µL); 1 µL de primer reverse (5 pmol/µL); 0.2 µL de Uracil DNA-Glicosilasa (Roche); 5 µL de plásmido de ADN control positivo (diluciones -9 y -6, con un número de copias aproximado de 10³ copias/µL y 10⁶ copias/µL, respectivamente) y 5 µL de H₂O dd. Como control negativo fue utilizado H₂O dd. Las reacciones de PCR se hicieron en el equipo Rotor-Gene (Qiagen) en las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización inicial 95 °C durante 10 minutos, a continuación 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y luego 58 °C por

1 minuto. Se realizaron sucesivas PCR para las siguientes temperaturas de annealing: 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, con el fin de evitar la formación de dímeros de cebadores u otras estructuras secundarias.

La PCR múltiple se realizó en dos tubos; uno para los virus HSV-1 y HSV-2, HHV-6, EVB, y el otro para VZV y CMV. Los parámetros del ciclo de la PCR múltiple fueron los mismos establecidos para la PCR de cada virus por separado y se realizaron diferentes ensayos a las temperaturas de annealing de 63 °C, 64 °C y 65 °C. Para cada uno de los seis virus fueron utilizados controles positivos comerciales (Vircell). Para la amplificación de HSV-1 y HSV-2 se utilizó el mismo par de cebadores y el control positivo comercial para HSV-1 (Vircell).

Para evaluar la especificidad de la amplificación, luego de cada PCR se realizó un análisis de curvas de disociación. Las condiciones empleadas para la mezcla fueron 1 minuto de enfriamiento a 60 °C y luego 95 °C por 15 segundos. En este proceso la fluorescencia fue medida constantemente y las curvas de disociación se obtuvieron en gráficas de derivada de fluorescencia respecto de la temperatura, en función de la temperatura (-dF/dT vs T). La T_m característica de cada amplicón fue determinada por los picos de las curvas de disociación y durante el análisis se utilizó este valor para su identificación.

Controles

Como control positivo se utilizó un plásmido de ADN sintetizado comercialmente, constituido por los amplicones correspondientes a los seis virus. Se realizaron 11 diluciones seriadas a la 1/10 partiendo de una solución madre de concentración 1.207×10^{12} copias/ μ L. También fueron utilizados cinco controles positivos comerciales (Vircell) para los virus HSV-1, CMV, HHV-6, VZV y EBV.

Como control negativo se utilizó H₂O dd.

Para evaluar la amplificación inespecífica de los primers fueron utilizados como controles muestras negativas para herpesvirus, de ADN genómico extraído de sangre periférica y ADN extraído de LCR. La concentración de ADN genómico extraído de sangre periférica en los controles fue medida por espectrofotometría (nanodrop Lite, Thermo Scientific), encontrándose en un rango de 30,8-13,1 ng/ μ L y en las diluciones al 1/10 entre 0,6 y 2,1 ng/ μ L. El objetivo de este control es descartar que los primers utilizados pudieran amplificar de manera inespecífica a partir de ADN genómico humano. Si bien el protocolo no está pensado para ser utilizado sobre ADN genómico extraído de sangre periférica, sino para ADN extraído de líquido cefalorraquídeo, fue necesario descartar esta posibilidad. Por esto se sometió al protocolo a «condiciones extremas» con concentraciones de ADN que nunca se podrían obtener de LCR.

Electroforesis

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para los productos de amplificación, correspondientes a las PCR de cada virus por separado a las temperaturas de annealing de 58 °C y 63 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR múltiple a temperatura de annealing 64 °C.

Buffer TAE 50x:

Se colocó en un frasco de vidrio 242 g de Tris base, 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de una solución 0,5 M de EDTA Ph=8. Se completó hasta la mitad del recipiente con H₂O dd y se dejó un tiempo en el agitador magnético. Una vez completamente disuelta la solución, se enrasó a 1 L con H₂O dd.

Buffer TAE 1x:

Se preparó 1 L trasvasando 20 mL de la solución de TAE 50x en un recipiente de vidrio y luego se enrasó a 1 L con H₂O dd.

Marcador de peso molecular:

Se utilizó un marcador de peso molecular (Thermo Scientific) de 100 pb y concentración 0,5 µg/µL.

Geles de agarosa:

Se utilizaron geles agarosa al 3 %. Para prepararlos se utilizó un matraz de vidrio en el cual se colocó 3,3 g de agarosa, 110 mL buffer TAE 1x y 11 µL de una solución concentrada 10.000x de gel red. El matraz con su contenido se calentó en el microondas durante aproximadamente 3 minutos; una vez disuelta toda la agarosa se vertió en el recipiente molde del gel con un solo peine.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de especificidad de los primers

Como resultado de la búsqueda mediante BLAST para cada par de cebadores en la base de datos nucleotide sequence de GenBank, no se encontró que algún par de primers se alinee de manera significativa con otro miembro de la familia herpesvirus, ni otro microorganismo o ADN del genoma humano. Esto es debido a que no se encontró que el porcentaje de bases alineadas para cada par de primer fuese lo

suficientemente alto y a su vez con adecuada cobertura (*Query cover*) sobre la secuencia, como para que *in vitro* pueda darse la amplificación.

Cálculo de la Tm específica de cada producto de amplificación

Mediante el programa online uMELT se calcularon los valores de Tm de cada producto amplificado con el fin de verificar que estos sean distintos y sus respectivas curvas de disociación lo suficientemente resueltas, de modo de poder usar esta información como método de discriminación. Los resultados se pueden ver en la figura 5 y tabla 3.

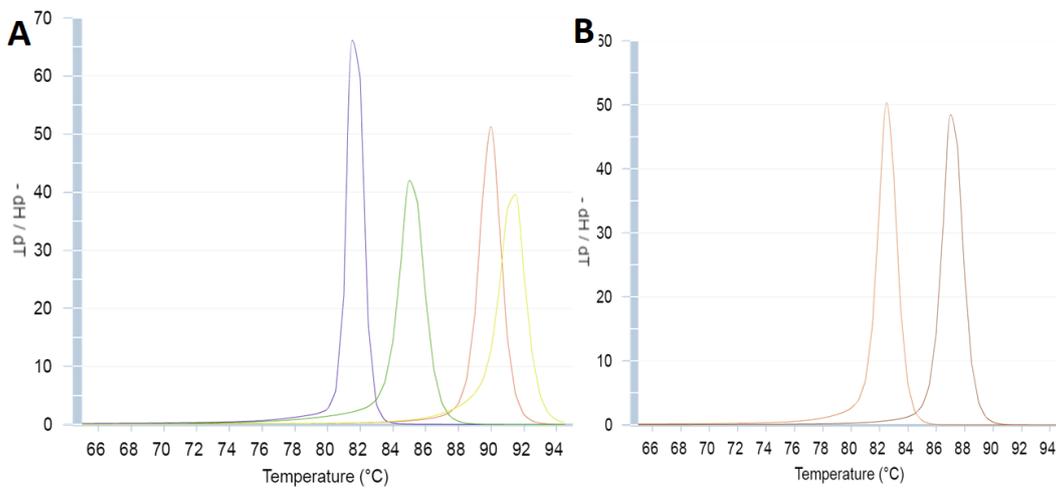


Figura 5. Curvas de disociación calculadas con el programa uMELT. A. Muestra las curvas de disociación para los virus HHV-6, EBV, HSV-1 y HSV-2, respectivamente. B. Curvas de disociación para CMV y VZV.

Tabla 3. Resultados del cálculo de Tm para cada producto amplificado mediante el programa uMELT

	Valor de Tm (°C)
HHV-6	81,5
EBV	85
HSV-1	90
HSV-2	91,5
HCMV	87
VZV	82,5

Determinación de los grupos de primers compatibles para PCR múltiple

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos mediante el software MultiPLX 2.1 para el cálculo de las temperaturas de melting y las mayores energías de alineamiento encontradas para cada par de primers. El software calculó la mayor energía de unión entre los extremos 5' y 3', extremo de un primer con cualquier región del par complementario y cualquier región de ambos primers. Diferentes guías de diseño de primers sugieren distintos valores aceptables para la energía de la unión más fuerte entre los extremos 3' de dos primer. Algunas guías como *PCR Primer Design Guidelines* (BIOSOFT, 2018) plantean que la energía de la unión más fuerte entre los extremos 3' debe encontrarse entre -3,0 Kcal/mol y -5,0 Kcal/mol, mientras que otras como *Designing PCR primers and probes* (IDT, agosto 2018) sugieren que es aceptable un valor de hasta -9 Kcal/mol. Según estas guías, la mayoría de los valores obtenidos (tabla 4) están comprendidos dentro de un rango aceptable; solamente dos de estos valores de energía son más negativos que -5,0 Kcal/mol.

Tabla 4. Temperatura de melting y energía de alineamiento (Kcal/mol) de las posibles interacciones para cada par de cebadores



MultiPLX 2.1											
Primer info file											
Name	MeltL	MeltR	LL End2	RR End2	LR End2	LL End1	RR End1	LR End1	LL Any	RR Any	LR Any
HSV	57.2	57.8	-2.96	-0.25	-2.96	-1.06	-7.18	-9.64	-7.66	-7.18	
HH6	54.2	54.0	-1.39	0.65	1.80	-1.98	-0.62	-0.70	-3.60	-5.98	-3.65
EBV	55.4	59.5	-1.18	-2.55	-1.62	-2.21	-3.08	-2.21	-5.46	-5.14	-3.68
CMV	57.1	58.0	-4.70	-1.18	-1.24	-4.70	-2.45	-1.83	-6.66	-8.07	-4.44
VZV	56.1	59.2	-2.27	2.17	1.08	-2.27	-0.96	-2.16	-5.82	-2.86	-5.80

Nota. MeltL: Temperatura de melting para el primer forward. MeltR: Temperatura de melting para el primer reverse. LL End2: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 5' de dos primers forward. RR End2: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 5' de dos primers reverse. LR End2: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 5' de un primer forward y un primer reverse. LL End1: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 3' de dos primers forward. RR End1: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 3' de dos primers reverse. LR End1: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 3' de un primer forward y un primer reverse. LL Any: Energía de la unión más fuerte entre cualquier región de dos primers forward. RR Any: Energía de la unión más fuerte entre cualquier región de dos primers reverse. LR Any: Energía de la unión más fuerte entre cualquier región de un primer forward y un primer reverse.

La tabla 5 muestra los resultados para el cálculo de las energías más fuertes de alineamiento entre dos primers de diferente par. Dichas energías fueron calculadas, por un lado, para la unión entre los extremos de ambos primers y por otro, para cualquier región de ambos primers.

Tabla 5. Energías de los alineamientos más fuertes (Kcal/mol) entre dos primers de diferente par



MultiPLX 2.1

Scorefile				
Name	Name	PrimPrimEnd2	PrimPrimEnd1	PrimPrimAny
HSV	HH6	-1.08	-3.44	-4.01
HSV	EBV	-1.59	-4.49	-6.05
HSV	CMV	-2.86	-2.86	-6.36
HSV	VZV	-1.04	-2.90	-4.66
HH6	EBV	-1.08	-2.53	-5.45
HH6	CMV	-1.08	-3.68	-5.24
HH6	VZV	-1.08	-2.42	-5.46
EBV	CMV	-1.59	-2.62	-4.55
EBV	VZV	-1.59	-2.04	-4.14
CMV	VZV	-1.21	-2.74	-6.31

Nota. PrimPrimEnd2: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 3'. PrimPrimEnd1: Energía de la unión más fuerte entre los extremos 5'. PrimPrimAny: Energía de la unión más fuerte entre cualquier región de ambos primers.

El software se vale de los resultados obtenidos de las energías más fuertes de alineamiento calculadas en los pasos anteriores para la formación de los grupos de primers compatibles en PCR múltiple. Los resultados se muestran en la tabla 6, donde se puede ver que todos los primers son compatibles y pueden amplificar dentro de un mismo grupo.

Tabla 6. Grupos de primers más óptimos y compatibles para PCR múltiple



MultiPLX 2.1

Groupfile					
Name	1	2	3	4	5
Group 1	HSV	HH6	EBV	CMV	VZV

Optimización de la PCR múltiple: PCR real time para cada uno de los virus por separado

Como primer paso se procedió a realizar sucesivas PCR real time para cada uno de los virus estudiados por separado, con el fin de encontrar una temperatura óptima de annealing para la cual no exista formación de dímeros de primers y otras estructuras secundarias, o estas no interfieran con los productos de amplificación esperados dificultando el análisis de las curvas de melting. Se partió a una temperatura annealing de 59 °C por ser la temperatura de melting más baja del conjunto de primers (tabla 2) y en sucesivas reacciones de PCR se fue aumentando en 1 °C, hasta los 64 °C. Se encontró que a 63 °C la formación de dímeros de primers y otras estructuras fue mínima, de modo que no habría interferencia en el análisis de las curvas. En la figura 6 están representadas las curvas de melting para los productos de amplificación de cada uno de los virus y es posible apreciar que están bien resueltas, no interfiriendo entre sí. No hubo amplificación en los controles negativos utilizados de H₂O dd, a excepción del control negativo para EBV; en este caso se observó una curva que se corresponde posiblemente con un dímero de primer. Si bien el máximo para dicha curva es cercano al máximo del amplificación para HHV-6, esta tuvo una amplitud muy baja, por lo cual no interferiría en el análisis.

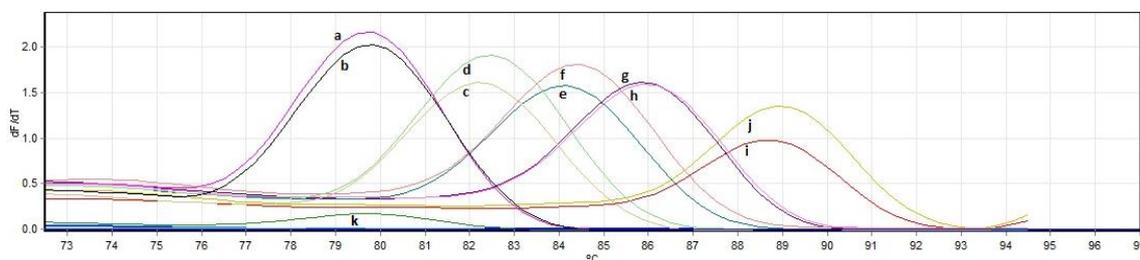


Figura 6. Curvas de disociación de PCR real time para cada virus por separado; temperatura de annealing 63 °C. Se indica con letras cada una de las curvas de disociación para dos diluciones del plásmido control. a) HHV-6 dilución -9; b) HHV-6 dilución -6; c) VZV dilución -9; d) VZV dilución -6; e) EBV dilución -9; f) EBV dilución -6; g) CMV dilución -9; h) CMV dilución -6; i) HSV-1 y HSV-2 dilución -9; j) HSV-1 y HSV-2 dilución -6; k) Control negativo para EBV.

La figura 7 muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para la PCR a la temperatura annealing de 59 °C. En los carriles de los controles positivos se observan bandas claras e intensas, con un PM aproximado al producto esperado (≈ 100 pb). En los controles negativos para los casos de HSV-1 y HSV-2, CMV y EBV, se observan bandas tenues que podrían corresponder a la formación de dímeros

de primers y otras estructuras secundarias. No se observa la formación de dímeros de primers u otras estructuras secundarias para los controles negativos de HHV-6 y VZV.

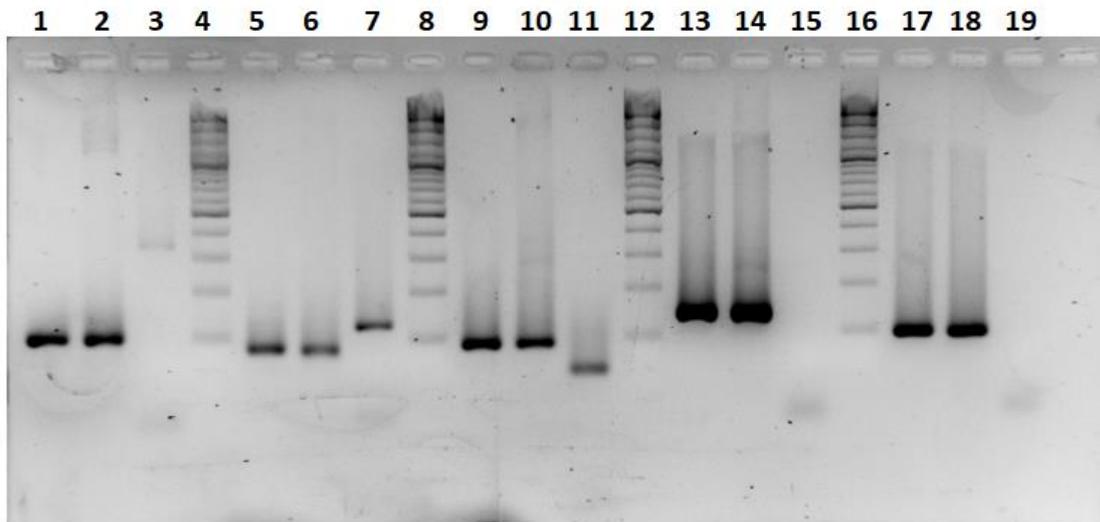


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación para cada uno de los virus por separado, a la temperatura de annealing 59 °C. Carril 1: Primers HSV-1 y HSV-2, plásmido control dil -6. Carril 2: Primers HSV-1 y HSV-2, plásmido control dil -3. Carril 3: Primers HSV-1 y HSV-2, H₂O dd. Carril 4: MPM. Carril 5: Primers CMV, plásmido control dil -6. Carril 6: Primers CMV, plásmido control dil -3. Carril 7: Primers CMV, H₂O dd. Carril 8: MPM. Carril 9: Primers EVB, plásmido control dil -6. Carril 10: Primers EVB, plásmido control dil -3. Carril 11: Primers EVB, H₂O dd. Carril 12: MPM. Carril 13: Primers HHV-6, plásmido control dil -6. Carril 14: Primers HHV-6, plásmido control dil -3. Carril 15: Primers HHV-6, H₂O dd. Carril 16: MPM. Carril 17: Primers VZV, plásmido control dil -6. Carril 18: Primers VZV, plásmido control dil -3. Carril 19: Primers VZV, H₂O dd.

La figura 8 corresponde a la electroforesis en gel de agarosa para la PCR a la temperatura de annealing óptima de 63 °C. En los controles negativos se puede ver que no hay formación de dímeros de primers u otras estructuras secundarias. En el carril 1 se observa una banda muy tenue y en el carril 5 no se observa producto amplificado; esto puede deberse a que el plásmido control estaba en una concentración muy baja (dilución -9, con un número de copias aproximado de 10^3 copias/ μ L).

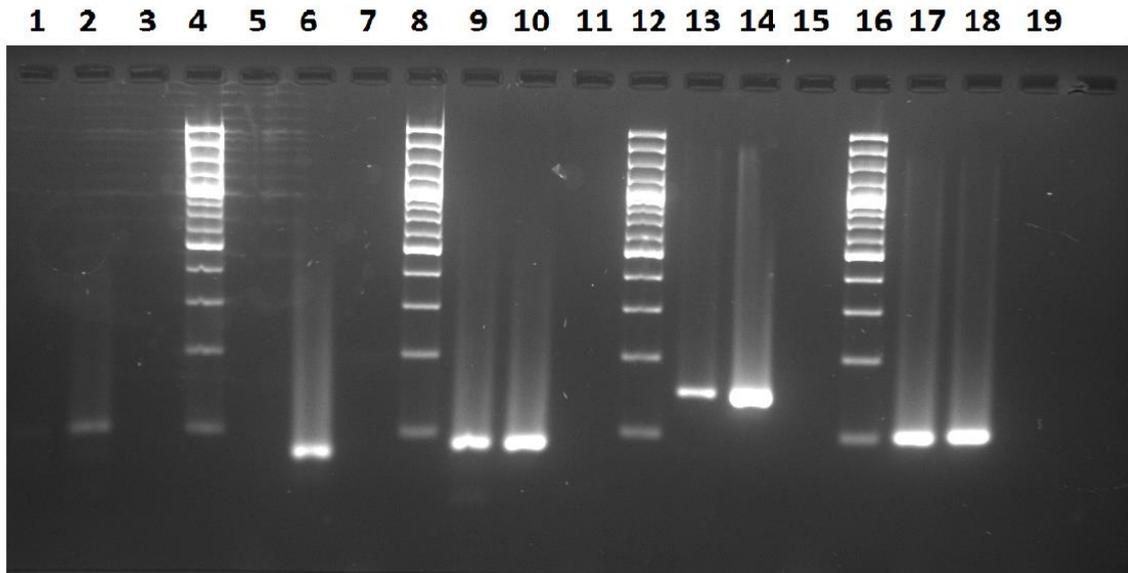


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación para cada uno de los virus por separado, a la temperatura de annealing 63 °C. Carril 1: Primers HSV-1 y HSV-2, plásmido control dil -9. Carril 2: Primers HSV-1 y HSV-2, plásmido control dil -7. Carril 3: Primers HSV-1 y HSV-2, H₂O dd. Carril 4: MPM. Carril 5: Primers CMV, plásmido control dil -9. Carril 6: Primers CMV, plásmido control dil -7. Carril 7: Primers CMV, H₂O dd. Carril 8: MPM. Carril 9: Primers EVB, plásmido control dil -9. Carril 10: Primers EVB, plásmido control dil -7. Carril 11: Primers EVB, H₂O dd. Carril 12: MPM. Carril 13: Primers HHV-6, plásmido control dil -9. Carril 14: Primers HHV-6, plásmido control dil -7. Carril 15: Primers HHV-6, H₂O dd. Carril 16: MPM. Carril 17: Primers VZV, plásmido control dil -9. Carril 18: Primers VZV, plásmido control dil -7. Carril 19: Primers VZV, H₂O dd.

Optimización de la PCR múltiple: PCR múltiple partiendo de la temperatura de annealing óptima que minimiza la formación de dímeros de primers

Una vez hallada la temperatura óptima que minimiza la formación de dímeros de cebadores, se procedió a realizar una PCR múltiple en dos tubos a 63 °C, según el resultado obtenido del software MultiPLX 2.1 (tabla 6) y las temperaturas de melting de los productos amplificados calculadas con el software uMELT (tabla 3). En el primer tubo se incluyeron los primers para la detección de los virus HSV-1 y HSV-2, EBV, HHV-6 y los controles positivos para dichos virus; para analizar la posibilidad de amplificación inespecífica a partir de ADN humano, se utilizó ADN genómico extraído de sangre periférica y como control negativo o blanco de reacción, H₂O dd. En el segundo tubo se incluyeron los primers para la amplificación de VZV, CMV y los respectivos controles positivos para cada virus; se utilizaron también los mismos ADN genómicos humanos para analizar la posibilidad de amplificación inespecífica y H₂O dd como control negativo.

En la figura 9 se representan las curvas de melting para la PCR múltiple correspondiente al primer tubo. Se puede apreciar que las curvas para los controles positivos HHV-6 (curva a), EBV (curva b) y HSV-1 (curva c) están bien resueltas y con máximos distantes. Próximo a la curva de HHV-6 (curva a) se puede apreciar la curva del control negativo para H₂O dd (curva g) que posiblemente corresponda a la formación de dímeros de primers u otras estructuras secundarias. Dicha curva no dificulta el análisis por ser de muy baja amplitud y con un máximo que no coincide con la T_m esperada para el amplicón de HHV-6. Las curvas obtenidas para los controles de ADN genómico (curvas d-f) corresponden con amplificaciones inespecíficas y estas claramente interfieren en el análisis por solaparse con las curvas de los controles positivos para EBV (curva b) y HSV-1 (curva c).

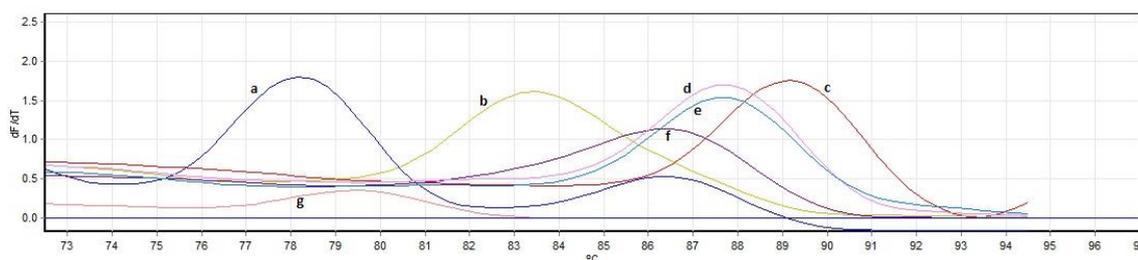


Figura 9. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus HSV-1, EBV y HHV-6; temperatura de annealing 63 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo HHV-6; b) control positivo EBV; c) control positivo HSV-1; d) control ADN genómico; e) control ADN genómico; f) control ADN genómico; g) control negativo H₂O dd.

La figura 10 muestra las curvas de melting para la PCR múltiple del segundo tubo. Se aprecia que las curvas para los controles positivos de VZV (curva a) y CMV (curva b) están bien resueltas. Las curvas de los controles de ADN genómico (curvas c-e) corresponden a amplificaciones inespecíficas. La curva c podría interferir con el análisis, ya que su máximo está próximo al máximo del control positivo para VZV (curva a). Para el control negativo de H₂O dd, se observa una curva de baja amplitud que no ocasiona problemas en el análisis.

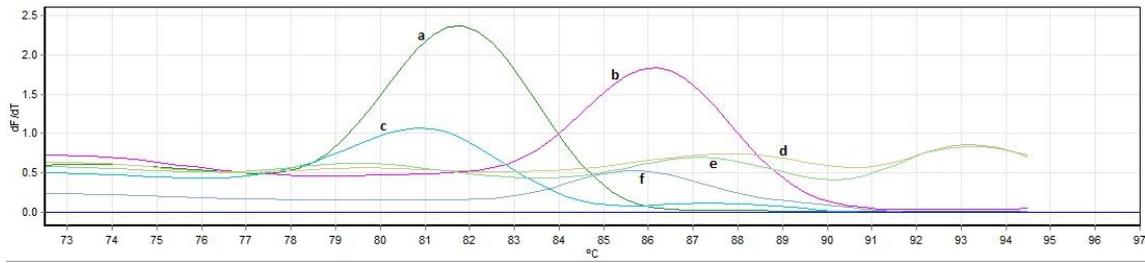


Figura 10. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus VZV y CMV; temperatura de annealing 63 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo VZV; b) control positivo CMV; c) control ADN genómico; d) control ADN genómico; e) control ADN genómico; f) control negativo H2O dd.

A causa de la interferencia de productos de amplificación inespecíficos en los controles genómicos, se procedió a realizar una nueva PCR múltiple en las mismas condiciones, a excepción de la temperatura de annealing que se aumentó a 64 °C. La finalidad de este aumento en la temperatura es mejorar la especificidad de unión de cada primer para evitar la formación de productos no específicos que puedan interferir en el ensayo. La figura 11 muestra las curvas de melting para el primer tubo. Se puede apreciar que las curvas para los controles positivos HHV-6 (curva a), EBV (curva b) y HSV-1 (curva c) están bien resueltas. Hubo una mejoría significativa con respecto a la formación de productos de amplificación inespecíficos en los controles genómicos (curvas c-e). La curva d corresponde a un producto inespecífico, presenta una baja amplitud y su máximo está lejos de coincidir con la Tm característica de los controles positivos; debido a esto no interfiere con el análisis. La curva e presenta una baja amplitud y no interfiere con el análisis al igual que las curvas que se observan para el resto de los controles.

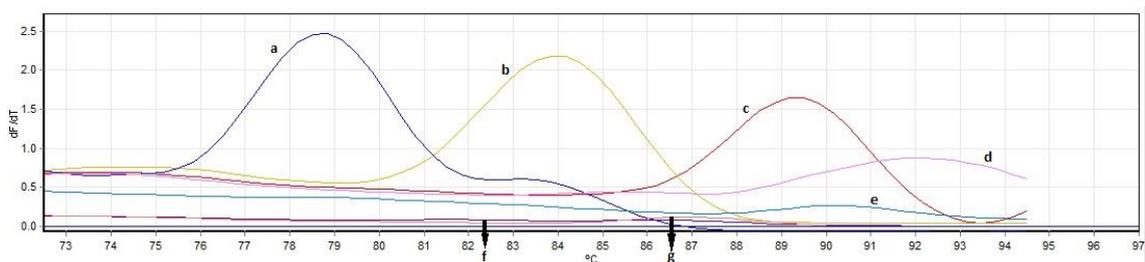


Figura 11. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus HSV-1, EBV y HHV-6; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo HHV-6; b) control positivo EBV; c) control positivo HSV-1; d) control ADN genómico; e) control ADN genómico; f) control ADN genómico; g) control negativo H2O dd.

En la figura 12 se representan las curvas para el segundo tubo. Se puede ver que las curvas de los controles positivos VZV (curva a) y CMV (curva b) se resuelven bien. Al igual que para el primer tubo se da una disminución en la formación de productos de amplificación para los controles genómicos (curvas c-e). La curva c presenta un máximo próximo al máximo de la curva del control positivo para VZV (curva a); sin embargo, esta no interfiere con el análisis pues presenta una baja amplitud.

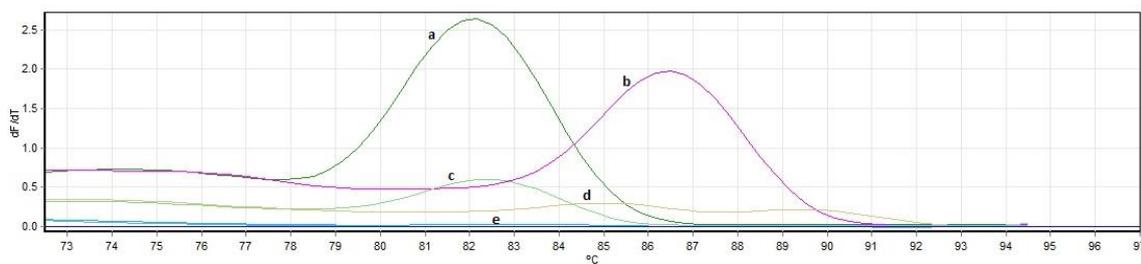


Figura 12. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus VZV y CMV; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo VZV; b) control positivo CMV; c) control ADN genómico; d) control ADN genómico; e) control ADN genómico. El control negativo para el H2O dd aparece indetectable.

Como siguiente paso, se realizó nuevamente una PCR múltiple en las mismas condiciones, pero con nuevos controles de ADN genómico diluidos al décimo. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos para el primer tubo. Se puede apreciar que las curvas para los controles positivos HHV-6 (curva a), EBV (curva b) y HSV-1 (curva c) están bien resueltas. Sin embargo, en los controles de ADN genómico se observan amplificaciones inespecíficas, opacando la aparente mejoría obtenida en la PCR anterior.

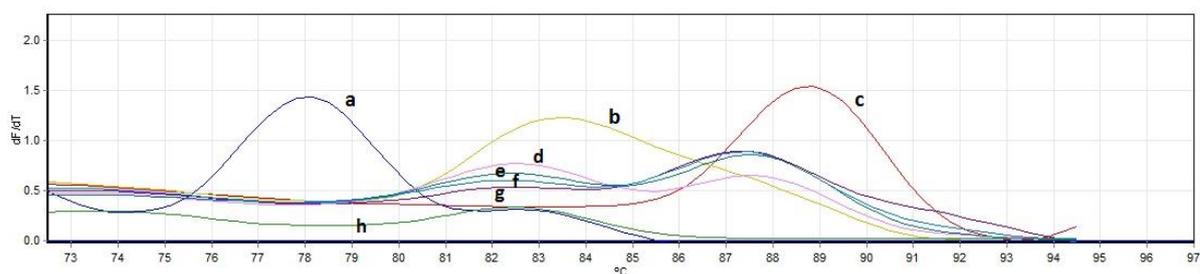


Figura 13. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus HSV-1, EBV y HHV-6; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo HHV-6; b) control positivo EBV; c) control positivo HSV-1; d) control ADN genómico; e) control ADN genómico; f) control ADN genómico; g) control ADN genómico; h) control negativo H2O dd.

La figura 14 corresponde a las curvas para el segundo tubo. Se puede apreciar que las curvas de los controles positivos VZV (curva a) y CMV (curva b) se resuelven bien. Al igual que para el primer tubo, se observan amplificaciones inespecíficas en los controles de ADN genómico.

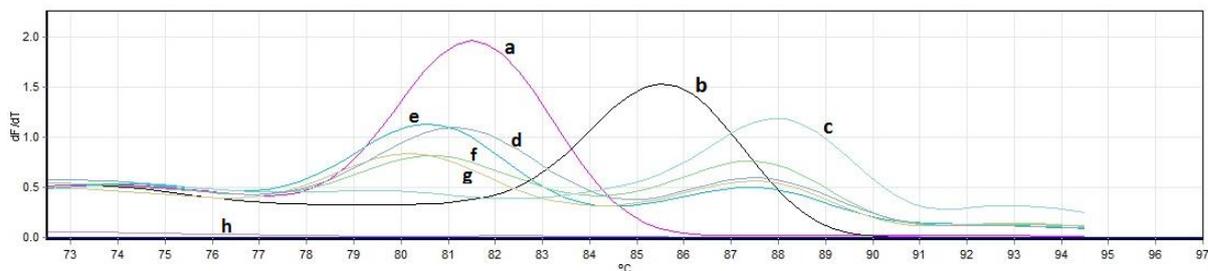


Figura 14. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus VZV y CMV; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo VZV; b) control positivo CMV; c) control ADN genómico; d) control ADN genómico; e) control ADN genómico; f) control ADN genómico; g) control ADN genómico; h) control negativo H2O dd.

La figura 15 muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa para los productos de amplificación. Los carriles 1-8 corresponden al primer tubo; en los controles de ADN genómico (carriles 4-7) se observan numerosas bandas confirmando la presencia de productos de amplificación inespecíficos. En los carriles 10-17 se muestran los productos de amplificación del segundo tubo y en los controles de ADN genómico (carriles 12-16) se observan numerosas bandas al igual que para el primer tubo, confirmando la presencia de productos inespecíficos. La PCR descrita se realizó una segunda vez y se obtuvo resultados similares.

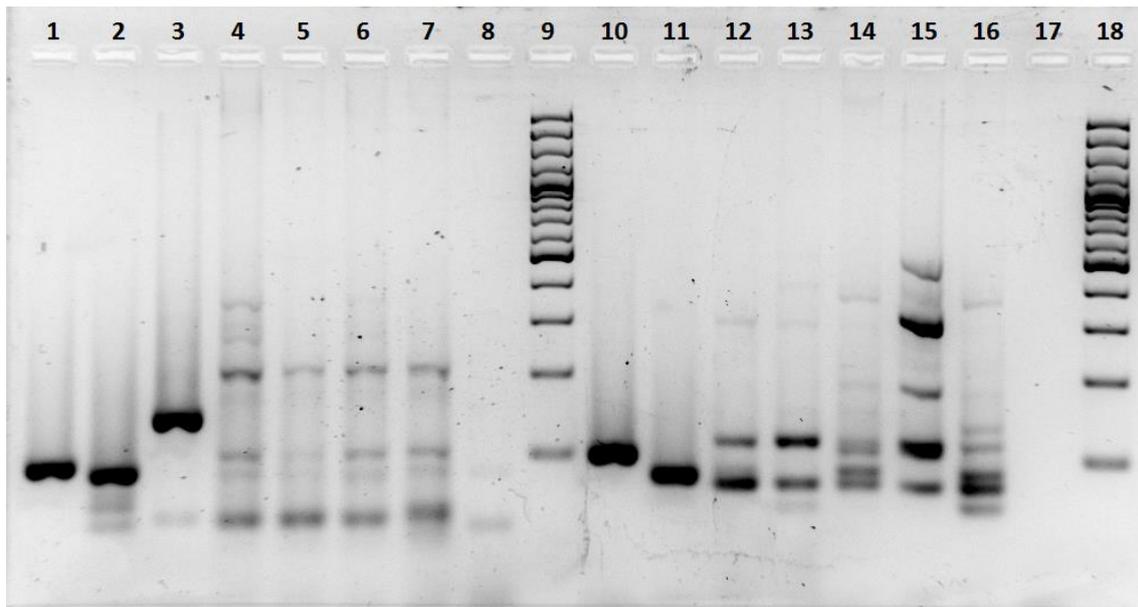


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR múltiple a temperatura de annealing 64 °C. Los carriles 1-8 corresponden a la PCR múltiple para los virus HSV-1, EBV y HHV-6; los carriles 10-17 corresponden a la PCR múltiple para los virus VZV y CMV. Carril 1: Control positivo HSV-1. Carril 2: Control positivo EBV. Carril 3: Control positivo HHV-6. Carril 4: Control ADN genómico. Carril 5: Control ADN genómico. Carril 6: Control ADN genómico. Carril 7: Control ADN genómico. Carril 8: H2O dd. Carril 9: MPM. Carril 10: Control positivo VZV. Carril 11: Control positivo CMV. Carril 12: Control ADN genómico. Carril 13: Control ADN genómico. Carril 14: Control ADN genómico. Carril 15: Control ADN genómico. Carril 16: Control ADN genómico. Carril 17: H2O dd. Carril 18: MPM.

Posteriormente se realizó una nueva PCR múltiple en las mismas condiciones, a excepción de la temperatura de annealing que se aumentó a 65 °C, obteniendo resultados similares que para la temperatura de annealing de 64 °C.

Seguidamente se procedió a evaluar si los primers por separado (singleplex) generan amplificaciones inespecíficas, frente a las mismas diluciones de los controles de ADN genómico que en la PCR múltiple anterior, a una temperatura de annealing de 64 °C. Las figuras 16 a 18 muestran los resultados obtenidos para HSV-1 y HSV-2, EBV y CMV, respectivamente. Para estos casos se puede apreciar curvas en los controles de ADN genómico, evidenciando que los juegos de primers por separado generan amplificaciones inespecíficas frente a concentraciones altas de ADN.

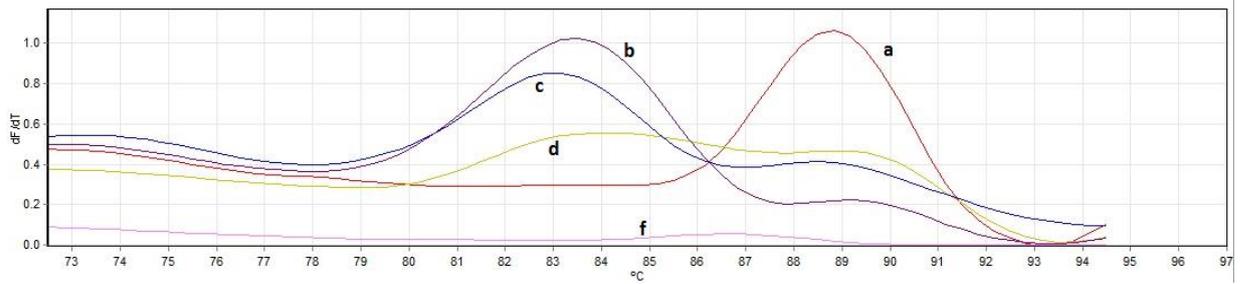


Figura 16. Curvas de disociación de PCR real time para HSV-1 y HSV-2; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo HSV-1 y HSV-2; b) control ADN genómico; c) control ADN genómico; d) control ADN genómico; e) control negativo H2O dd.

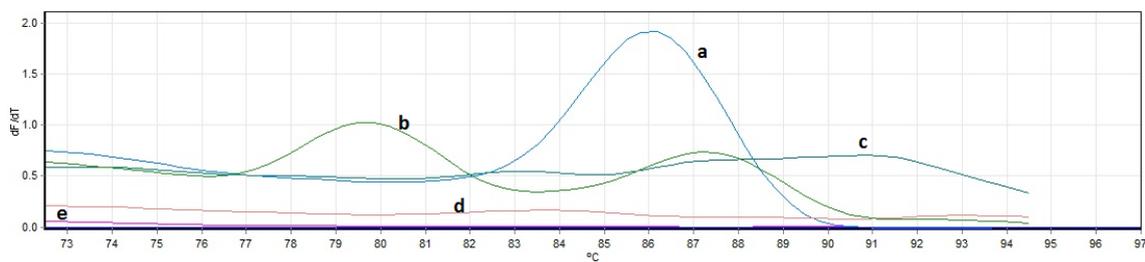


Figura 17. Curvas de disociación de PCR real time para CMV; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo CMV; b) control ADN genómico; c) control ADN genómico; d) control ADN genómico; e) control negativo H2O dd.

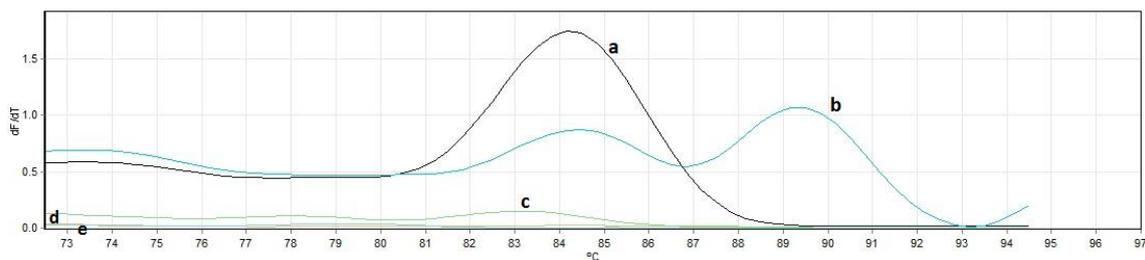


Figura 18. Curvas de disociación de PCR real time para EBV; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo EBV; b) control ADN genómico; c) control ADN genómico; d) control ADN genómico; e) control negativo H2O dd.

Las figuras 19 y 20 muestran los resultados para HHV-6 y VZV, respectivamente. Para estos casos no se observaron amplificaciones inespecíficas significativas en los controles de ADN genómico.

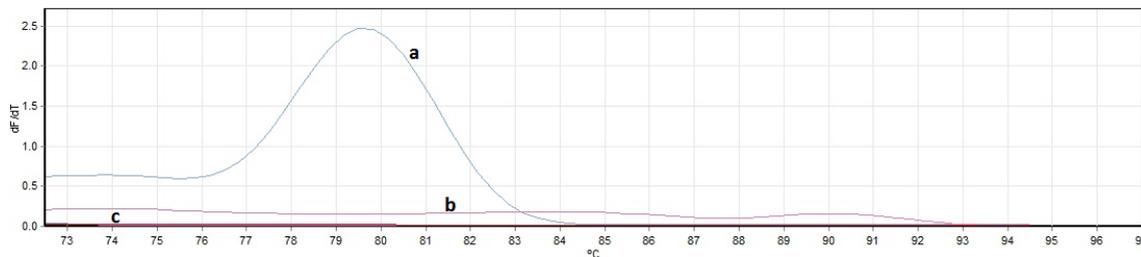


Figura 19. Curvas de disociación de PCR real time para HHV-6; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo HHV-6; b) control ADN genómico; c) control negativo H2O dd.

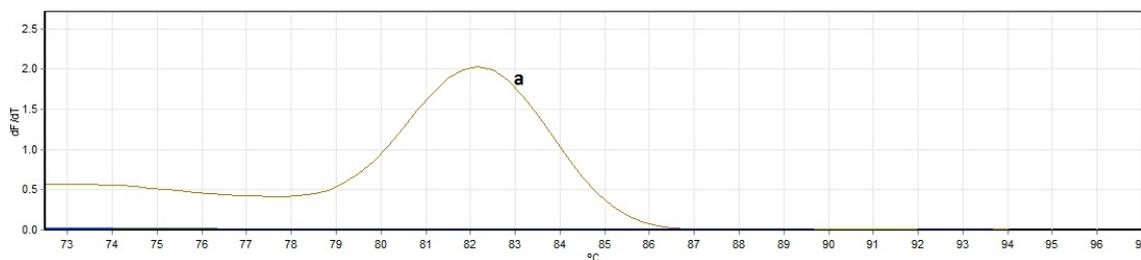


Figura 20. Curvas de disociación de PCR real time para VZV; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo VZV. No se observan curvas para los controles de ADN genómico y H2O dd.

Finalmente se realizó una PCR múltiple en las mismas condiciones que la PCR anterior. Como control de especificidad se utilizó ADN extraído de LCR negativo para herpesvirus. La finalidad de este paso es evaluar los primers en PCR múltiple frente a controles de ADN en muy baja concentración. En la figura 21 se representan los resultados para el primer tubo. En los controles de ADN extraído de LCR se observan amplificaciones inespecíficas.

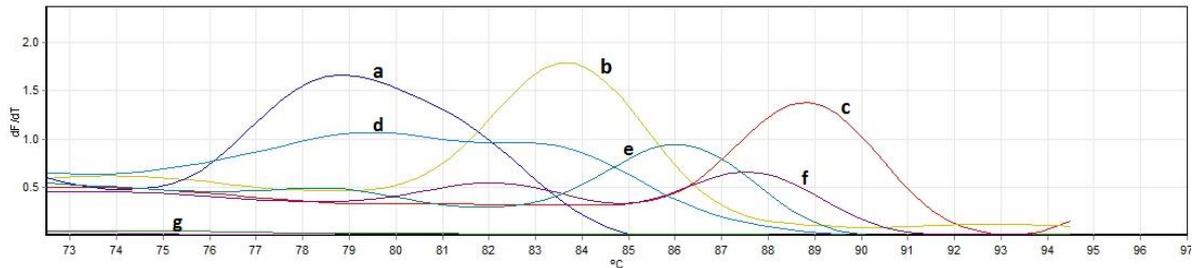


Figura 21. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus HSV-1, EBV y HHV-6; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo HHV-6; b) Control positivo EBV; c) Control positivo HSV-1; d) Control ADN extraído de LCR; e) Control ADN extraído de LCR; f) Control ADN extraído de LCR; g) Control negativo H2O dd.

La figura 22 corresponde a las curvas para el segundo tubo; al igual que para el primer tubo se observan amplificaciones inespecíficas en los controles de ADN extraído de LCR. Comparando con los resultados obtenidos para la PCR homóloga a la misma temperatura de annealing, pero con controles de ADN genómicos (figuras 13 y 14), se puede afirmar que los resultados para estos controles de especificidad son similares a pesar de que el ADN extraído de LCR tuviese una concentración de ADN significativamente inferior que el ADN genómico extraído de muestras de sangre.

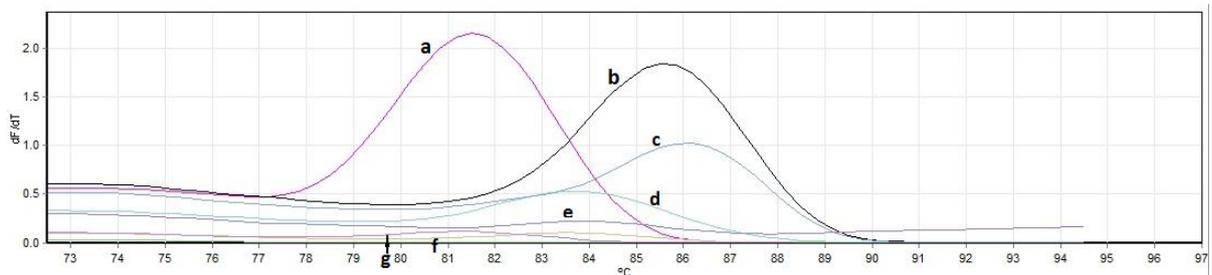


Figura 22. Curvas de disociación de PCR múltiple para los virus VZV y CMV; temperatura de annealing 64 °C. Se indica con letras las curvas de disociación para cada uno de los controles. a) Control positivo VZV; b) control positivo CMV; c) control ADN extraído de LCR; d) control ADN extraído de LCR; e) control ADN extraído de LCR; f) control ADN extraído de LCR; g) control negativo H2O dd.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se probó que el conjunto de primers utilizado en las condiciones descritas no puede ser aplicado a una PCR múltiple. Los resultados obtenidos en el análisis *in silico* muestran que dichos primers son óptimos para su empleo en PCR multiplex y singleplex. El análisis *in vitro* demostró que se puede reducir al mínimo la formación de dímeros de primers y otras estructuras secundarias. Sin embargo, a pesar de haber realizado reacciones de PCR cubriendo un amplio espectro de posibles temperaturas de annealing, no se pudo evitar completamente la formación de productos de amplificación inespecíficos en los controles de ADN genómico extraídos de sangre periférica y en los controles de ADN extraído de LCR. Finalmente se logró identificar que los primers para HSV-1 y HSV-2, EBV y CMV, aun trabajando en PCR singleplex, generan productos de amplificación inespecíficos.

Como perspectivas para el desarrollo de este trabajo, se pueden señalar algunos aspectos que contribuirían a aumentar la especificidad del sistema. Por un lado, se podría realizar un nuevo diseño más riguroso de los primers para HSV-1 y HSV-2, EBV y CMV. Por otro lado, el kit comercial de SG utilizado no revela toda la información acerca de sus componentes. Utilizar una master mix de PCR con SG no comercial permitiría poder variar otros parámetros como las concentraciones de magnesio y dNTPs, ampliando así el espectro de trabajo para optimizar la reacción. Otra alternativa sería poner a prueba el mismo conjunto de primers utilizando diferentes kits de master mix con SYBR Green en otras marcas.

El diseño de una PCR múltiple con SYBR Green para la detección de agentes virales conlleva una serie de dificultades que deben ser sorteadas con el fin de desarrollar un diseño eficiente. La dificultad se debe a diferentes restricciones implícitas en el diseño. Una de las restricciones más importantes radica en que el diseño de los oligonucleótidos para cada virus está restringido a ciertas regiones del genoma viral que deben ser conservadas en las diferentes cepas virales de cada especie. Además, estas regiones deberán ser diferentes entre los distintos virus a estudiar. Otra limitación relativa al diseño es la compatibilidad entre los diferentes juegos de primers. Para esto existen softwares comerciales y de uso gratuito que facilitan el diseño en formato multiplex. Por último, se debe tener en cuenta en el diseño que los productos amplificados puedan ser identificados por su temperatura de melting.

REFERENCIAS

- Abera, T., Thangavelu, A., Joy Chandran, N. N., & Raja, A. (2014). A SYBR Green I based real time RT-PCR assay for specific detection and quantitation of *Peste des petits ruminants virus*. *BMC Veterinary Research*, 10. DOI: 10.1186/1746-6148-10-22
- Bascones Martínez, A. y Pousa Castro, X. (2011). Herpesvirus. *Avances en Odontostomatología*, 27(1), 11-24. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de scielo.isciii.es/pdf/odonto/v27n1/original1.pdf
- BIOSOFT (2018). PREMIER Biosoft. Recuperado el 22 de agosto de 2018 de premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- Bolivar, A. M., Rojas, A., y Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de redalyc.org/pdf/3313/331330398005.pdf
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Huggett J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19-28. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.11.001
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305. doi: 10.1016/S0213-005X(04)73092-X
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, 11(9):1026-1030. doi: 10.1038/nbt0993-1026
- Integrated DNA Technologies (2018). OligoAnalyzer. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de idtdna.com/calc/analyzer
- (1 de junio de 2016). Consejos para usar BLAST para localizar cebadores de PCR. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de idtdna.com/pages/education/decoded/article/tips-for-using-blast-to-locate-pcr-primers

- (20 de agosto de 2018). Recuperado el 22 de agosto de 2018 de idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes
- Kaplinski, L., Andreson, R., Puurand, T., & Remm, M. (2005). MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. *Bioinformatics*, *21*(8), 1701-1702. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti219
- Knipe, D. M., and Howley, P. M. (eds) (2013). *Fields Virology* (6.^a ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kwok, S., and Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, *339*(6221), 237-238. DOI: 10.1038/339237a0
- Mattera, A. y Barrios, P. (2006). Herpesvirus. En Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene. *Temas de bacteriología y virología médica*, 2.^a ed. corregida (pp. 535-566). Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de higiene.edu.uy/cefa/2008/herpesvirus.pdf
- Méndez Álvarez, S. y Pérez Roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *22*(3), 183-192. DOI: 10.1016/S0213-005X(04)73059-1
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaüer, M. A. (2007). *Microbiología médica*. Madrid: Elsevier. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de parabolasdocotidiano.files.wordpress.com/2011/10/microbiologia_murray.pdf
- National Center for Biotechnology Information (julio de 2018). Recuperado el 16 de agosto de 2018 de blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
- Niesters, H. G. (2001). Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*, *25*(4), 419-429. DOI: 10.1006/meth.2001.1264
- Rao, P., Wu, H., Jiang, Y., Opriessnig, T., Zheng, X., Mo, Y., *et al.* (2014). Development of an EvaGreen-based multiplex real-time PCR assay with melting curve analysis for simultaneous detection and differentiation of six viral pathogens of porcine reproductive and respiratory disorder. *Journal of Virological Methods*, *208*, 56-62. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.027
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., and Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, *245*(2), 154-60. DOI: 10.1006/abio.1996.9916

- Rubio, J. M., Tammam, M. A., and Ta-Tang, T. H. (2011). Uso de PCR múltiple en el diagnóstico simultáneo de parasitosis. *Biomédica*, 31(sup. 3), 253-256. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/562/692
- Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J., and Reed, M. W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, 285(2), 194-204. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de DOI: 10.1006/abio.2000.4753
- Sigma-Aldrich. Quantitative PCR and digital PCR detection methods: a technical guide to PCR technologies. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection-methods.html
- University of Tartu, Department of Bioinformatics (2018). Recuperado el 16 de agosto de 2018 de bioinfo.ut.ee/multiplx/
- University of Utah. (s.f.). *uMELT Melting Curve Predictions Software*. Recuperado el 4 de octubre de 2018 de <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>
- Venuta, M. E., and Lopardo, H. A. (2005). Aplicación de métodos moleculares en el diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas. *Medicina Infantil*, 12(4), 301-311. Recuperado el 16 de agosto de 2018 de medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2005/xii_4_301.pdf
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22(1), 130-138. (Reimpresión en *BioTechniques* 2013, 54(6), 314-320)
DOI: 10.2144/000114043
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103.
DOI: 10.1093/nar/gnh101

Agradecimientos

A las autoridades de la Asociación Española por concederme la oportunidad de realizar la investigación para mi tesina de graduación en el Laboratorio de Técnicas Especiales, Sección Biología Molecular, de esa Institución.

A la Dra. María Noel Zubillaga, jefa del sector.

A mis tutores, Dr. Pablo López y magíster Gonzalo Manrique.