

PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol)

Ana María Bolívar^{1,2}✉, Agustina Rojas^{1,3}, Pablo García-Lugo¹

¹Postgrado Biotecnología de Microorganismos. Facultad de Ciencias-ULA. ²Investigaciones Parasitológicas "Jesús Moreno Rangel". Facultad de Farmacia y Bioanálisis-ULA. ³Investigaciones Parasitológicas "José Francisco Torrealba" Facultad de Ciencias-ULA

[REVISION]

Recibido: 23 Marzo de 2013. Aceptado: 1 Noviembre de 2013.

Resumen

Conceptualmente la reacción en cadena de la polimerasa -PCR- incluye un conjunto de técnicas en apariencia simples, de tal modo que algunas de sus variantes como la detección múltiple lucen atractivas para el campo de la microbiología asistencial. Sin embargo, su aplicación de manera rutinaria se ve restringida por la necesidad de numerosos y necesarios protocolos de estandarización y optimización para determinaciones particulares. En la presente revisión son abordadas las limitancias que presentan la PCR y en particular la mPCR con miras a una mayor comprensión del proceso y de las restricciones que presentan para este campo asistencial.

Palabras clave

PCR, PCR múltiple, parámetros críticos, estandarización.

Abstract

Conceptually the polymerase chain reaction -PCR- include a set of techniques seemingly simple, so that some of its variants like multiple detection looks attractive to the field of microbiology care. However, its routine application is limited by the need for numerous and necessary protocols of standardization and optimization for individual determinations. In this review are approached the constrict that present the PCR and particularly mPCR with a view to a better understanding of the process and limitations that they represent to the welfare field.

Keywords

PCR, multiplex-PCR, critical parameters, standarization.

"La PCR es un método muy versátil, pero engañosamente simple" (1)

Introducción

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, la microbiología clínica necesita optimizar a nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez, las mejores técnicas diagnósticas tendientes a ejecutar los programas más adecuados en materia de prevención, control y tratamiento. Entre las alternativas diagnósticas propuestas a estos retos, se señalan las técnicas basadas en los principios de la biología molecular cuya introducción en los laboratorios asistenciales (humano y animal), busca brindar apoyo en la obtención de resultados altamente confiables,

acortando además, los tiempos de entrega de los mismos. Importante es comprender que a pesar de estas ventajas, dichos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos de diagnóstico tradicional. (1,2)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad (3). Los inicios de la PCR se remontan a 1971, cuando un artículo publicado por Kleppe y colaboradores en el *Journal of Molecular Biology*

describió por vez primera un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro*. Sin embargo, este ensayo no recibió mucha atención y la autoría de la PCR fue atribuida 12 años después a Kary Mullis perteneciente a la *Cetus Corporation*, California SA. La puesta en escena de la PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces su uso se ha extendido a distintos laboratorios. De tal modo que al presente la PCR ha sido ensayada con buenos resultados en una amplia gama de campos que abarcan desde la detección de agentes etiológicos, pasando por genotipificación, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, amplificación y modificación de fragmentos de ADN, análisis de especímenes ambientales y de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad, mapeo de rasgos hereditarios hasta estudios de expresión del gen. La PCR continúa siendo un método revolucionario, constituyéndose en la mejor técnica desarrollada por biólogos moleculares cuyo impacto aún continúa haciéndose notar (1,4-7).

El hecho de estandarizar y optimizar aplicaciones individuales de la PCR ha permitido desarrollar variantes del método. En este aspecto, toma gran interés, el desarrollo de las denominadas PCR múltiples (multiplex-PCR o mPCR), reacciones que consiguen amplificar simultáneamente en un único tubo (y por ende una única reacción), diferentes secuencias diana. En microbiología humana y veterinaria la mPCR ha sido aplicada con cierto éxito al diagnóstico rutinario de algunos agentes patógenos (8). A su vez, se han desarrollado protocolos de mPCR muy prometedores mediante la utilización de PCR en tiempo real (RT-PCR) de forma que se puede monitorizar la cinética de reacción, conocer la cantidad de ADN molde y/o detectar la presencia de variaciones genéticas (1,9).

Diversos estudios han demostrado que la especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentra directamente influenciada por los diversos componentes que integran la técnica: 1. mezcla de reacción, 2. régimen de ciclaje y 3. ADN polimerasa (12,13). Resulta necesario planificar en cada caso una metodología en la que pueda existir un equilibrio entre estos parámetros, ya que desafortunadamente al ajustar algunas condiciones de la reacción para lograr la mayor especificidad no siempre es compatible con un alto rendimiento, y tratar de optimizar la fidelidad pudiera reducir la eficiencia. Tal es el caso, que muchas veces el investigador debe decidir cuál de estos parámetros prefiere sobre otro, viéndose a veces en la necesidad de sacrificar uno por otro según sea el caso

(14). En virtud de esta realidad y por el amplio uso de la técnica en el campo microbiológico, urge la necesidad de concienciar sobre la importancia de revisar y optimizar los protocolos de procedimiento para cada determinación que se desee, estudiando en detalle los posibles factores que influyen negativamente (2,10,11). Adicional, debe tenerse en cuenta que la efectividad de una PCR es también resultado del trabajo con soluciones puras de ácidos nucleicos, de tal modo que es factible deducir que la sensibilidad de la técnica puede verse dramáticamente reducida cuando se aplica directamente a muestras biológicas. En base a estos supuestos, debe presumirse que una PCR aun altamente específica puede producir errores.

Parámetros que influyen en la PCR

1. Mezcla de reacción

1.1. Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs)

Los cuatro dNTPs son los ladrillos para construir las nuevas cadenas de ADN. Variaciones en su concentración afectan especificidad y fidelidad. Concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la enzima e incluso pueden llegar a inhibirla. El uso de concentraciones desbalanceadas también afecta la fidelidad, siendo las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos entre 0,2 a 1Mm (13). Los dNTPs pueden captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar siempre la misma relación.

1.2. Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes actúan como cofactores de la enzima por tanto tienen una función crítica en la reacción. Se suele usar Mg^{2+} , agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), requiriéndose que sea usado a una concentración que oscila regularmente entre 0,5 y 2,5mM. En muchos casos la concentración debe optimizarse para cada ensayo. En general, concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento mientras que el exceso tiende a producir amplificaciones inespecíficas (2). Entre los iones monovalentes el más empleado es el potasio (K), generalmente unido a otros iones como el cloro (KCl) en una solución tampón (13).

1.3. Solución tampón (buffer)

Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Por lo general incluye Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), KCl,

gelatina y MgCl₂. Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes los cuales en la práctica aumentarían especificidad y fidelidad (en ningún caso son imprescindibles). Entre los adyuvantes más empleados se señalan dimetilsulfóxido (DMSO), añadido para disminuir las estructuras secundarias del ADN, detergentes como el Tween 20 o el Tritón X-100 que ayudan a estabilizar la enzima y finalmente polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida y seroalbúmina bovina (13). Se ha determinado que otros solventes como la betaína pueden actuar como agentes desestabilizadores (solutos compatibles que ayudan a sobrevivir al estrés osmótico), reduciendo la temperatura de fusión de secuencias ricas en GC y aumentando la resistencia de la polimerasa a la desnaturalización (14). En la práctica, no hemos encontrado variaciones significativas con el empleo de adyuvantes como DMSO y seroalbúmina bovina.

1.4. *Primers (cebadores, oligonucleótidos)*

Delimitan la zona de ADN a amplificar. Al ser reconocidos por la enzima permiten iniciar la reacción. Son secuencias cortas, normalmente de 18 a 22 nucleótidos (aunque pueden llegar hasta 40 según el caso) y contenido en GC entre 40-75%. Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión (T_m) similar. Deben estar situados enfrentados y no a mucha distancia. Son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo. Normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN y la concentración a la que suelen emplearse está en el intervalo de 0,1-0,5 μM. Los *primers* ideales deben carecer (en lo posible) de estructuras secundarias así como de complementariedad entre sí. Si existe complementariedad en el extremo 3' se induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores para que la polimerasa los extienda generando así pequeños amplicones referidos como dímeros de *primers*, reduciendo la cantidad de oligos disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (13,14). Existen diferentes programas computacionales (como ADNsis, *Primer3* y *Oligo*) que ayudan en el diseño, cálculo de T_ms, estructuras secundarias y posibles interacciones. Dichos programas requieren considerar diversos parámetros muchos de naturaleza termodinámica a fin de mantener la eficiencia y especificidad, resultando limitativo para quien adolezca de bases sólidas en el área ya que de lo contrario pudiera crear confusión y serios problemas en el diseño, constituyéndose en fuente para ideas erróneas. Concluimos que el

conocimiento en termodinámica es crucial para el uso eficaz de los paquetes de software disponibles para el diseño de primers.

1.5. *ADN molde*

Contiene la región de ADN que se va a amplificar. La cantidad de este molde puede ser de tan sólo 1ng en caso de material genético clonado o de un mínimo de 20ng cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. El molde puede ser también ARN previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR. Al presente existen variados protocolos de extracción en función del tipo de muestra clínica de partida (1,13). No es necesario purificarlo, sin embargo se debe cuidar la intervención de inhibidores enzimáticos, sobre todo a partir de muestras clínicas como sangre y heces (8). Con miras a disminuir la acción de inhibidores en sangre, recomendamos para la amplificación de microorganismos, identificar la diana habitual, empleando por separado en procesos de extracción con el método clásico con fenol, los distintos componentes sanguíneos.

1.6. *Agua*

Usada como solvente. Se requiere al menos que sea desionizada (18m-chms) o milli-Q grado molecular. Si se busca un mejor rendimiento se aconseja además, que sea libre de DNasas y RNasas, purificada por luz ultravioleta, ozono o 0,1% de dietilpirocarbonato (este último inactiva las RNasa) (13). Una buena opción práctica resulta el uso de agua dispensada para la preparación de soluciones inyectables.

Régimen de ciclaje

Tres son los pasos necesarios a seguir y repetir por cada ciclo de la PCR. Comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión. Regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización (generalmente a 94°C) para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos (12,15).

2.1. *Desnaturalización*

Es una etapa crítica. Es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente y así pueda iniciar la síntesis de su nueva cadena complementaria, proceso que se consigue a temperaturas de 94°C por lo menos durante 1 min.

Hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media aproximada: 92,5°C=2h, 95°C=40 min. y 97,5°C=5 min.) (13, 15). En la práctica se suele empezar con un período de desnaturalización prolongado (94°C por 5 min.) para asegurar que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula de ADN.

2.2. Alineamiento

La enzima utilizada en la reacción necesita del grupo OH- libre en el extremo 3' a partir de donde iniciar la síntesis, punto que constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria. El alineamiento específico de ambos *primers* se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 70°C (recomendamos emplear temperaturas de alineamiento entre 50 y 65°C). Un aumento favorece la especificidad, ya que disminuye uniones incorrectas de los *primers* con sitios apócrifos del ADN molde (12,15).

2.3. Extensión

Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, coincidente con la máxima actividad de la enzima para evitar alineamientos inespecíficos. El tiempo depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min. a 72°C para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan exactamente la misma longitud (13, 15).

ADN polimerasa

Las ADN polimerasa utilizadas en PCR incluyen un grupo de enzimas termoestables aisladas de organismos termófilos, de calidad suficiente que evitan pérdidas en especificidad, eficiencia, fidelidad y rendimiento (16). Su temperatura óptima de catálisis oscila alrededor de 70-72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo. En la actualidad la mayoría son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética (13).

PCR múltiple

Ventajas y dificultades

Desde su descripción en 1988 por Chamberlain y colaboradores con la finalidad de

amplificar loci múltiples para el gen de la distrofia muscular en humanos, la mPCR ha sido aplicada en muchas áreas para el análisis simultáneo de marcadores múltiples incluyendo delecciones, mutaciones, polimorfismo, análisis cuantitativos por transcriptasa reversa y por RT-PCR (16). Con óptimos resultados ha sido empleada en análisis microsatelital, detección de organismos genéticamente modificados, detección de patógenos y tipificación de diferentes cepas (17,18). En el campo epidemiológico, su importancia crece por la factibilidad de aumentar en una sola reacción la detección simultánea de varios microorganismos aprovechando entre otros parámetros la similitud de cuadros clínicos (1,19-23).

A pesar de este éxito, la inversión de tiempo para los procedimientos de optimización pudiera constituirse en factor de negatividad para la técnica, opacando sus bondades. De tal modo que generalmente, una reacción de mPCR eficiente requiere de estrategias de planificación y múltiples intentos (18,24-26). Importantes en este proceso, son las mismas consideraciones discutidas para la PCR individual, las cuales el investigador debe adaptar a sus necesidades. Esencial resulta una óptima combinación entre temperatura de alineamiento y componentes de reacción con miras a obtener una alta especificidad en la amplificación de los productos (3,27). Como en cualquier variante del método base, es necesario el uso de ácidos nucleicos puros para validar especificidad, así como controles internos y externos para mantener la calidad. Todo este listado de factores tiene influencia importante en los resultados ya que previene la aparición de problemas que pudieran comprometer la eficiencia del método (28). Por su alta sensibilidad pueden presentarse contaminaciones producto de amplificaciones inespecíficas generando reacciones falsas positivas. En este sentido, son válidas y siempre vigentes medidas de control como la realización de cada fase de reacción en ambientes separados, utilización de tubos, pipetas y guantes estériles propios para cada área y limpieza y exposición a cada ambiente a radiaciones ultravioletas, alcohol y/o soluciones libres de RNasa (15). Asimismo, es conveniente recordar que por la susceptibilidad a errores de ejecución y de contaminaciones, es necesaria una formación especializada del personal que ejecutará el análisis. Es también importante tener en cuenta que el procedimiento necesita en la medida que sea posible, realizarse en conjunción con otros métodos (directos, bioquímicos y/o inmunológicos por ejemplo), situación que no pretende menospreciar la gran utilidad que puede tener una detección precoz de información genética -como la ejecución de medidas

preventivas de tratamiento y control- sino que busca corroborar los resultados con miras a ampliar su confiabilidad (1,20,21,29). En este orden de ideas, hemos cotejado -según naturaleza del microorganismo de interés y de la muestra biológica de partida- resultados mPCR con examen al fresco, frotis teñidos, cultivos, histopatología, ELISA, IFI y Western blot, no siempre presentándose la complementariedad deseada, escenario que amerita revisiones particulares y hacen limitativo su uso de rutina.

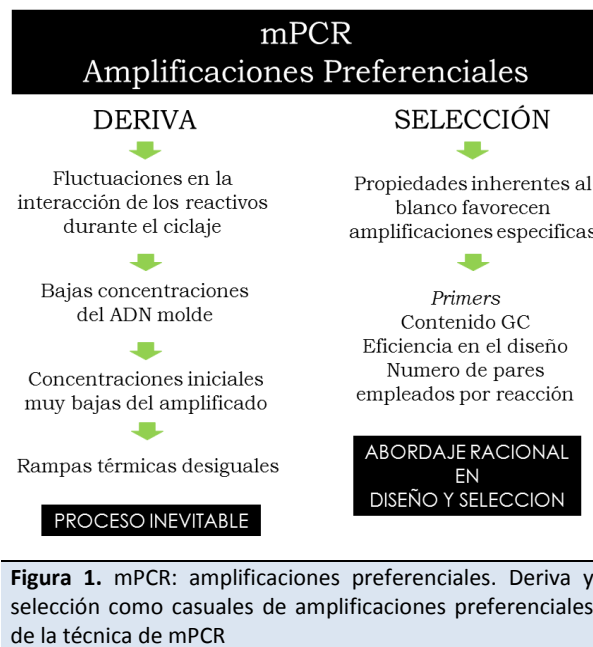
Situaciones como las expuestas pudieran calificar a la mPCR como una técnica de “doble cara”. De allí que optimizar un protocolo mPCR requiere un delicado balance para la amplificación de productos específicos y la reducción al mínimo de productos inespecíficos, evitando amplificaciones preferenciales y promoviendo productos esperados de calidad (24,26). En este sentido ha sido demostrado que el aumento en el número de pares de *primers* por reacción incrementa los productos inespecíficos “secuestrando” componentes esenciales, limitando la eficiencia. En la mPCR cada parámetro debe ajustarse experimentalmente (adaptabilidad del protocolo base a cada determinación). Cada paso del proceso necesita una consideración muy cuidadosa (25,30). Numerosos han sido los trabajos en los últimos años que describen nuevos protocolos de mPCR tendientes a mejorar los procesos de extracción de ADN a partir de una gran variedad de material biológico y permitir amplificaciones cada vez más sensibles y específicas (mayor y mejor nivel de detección), hecho que resulta en última instancia, la opción más deseable aunque también la más difícil de alcanzar (1,20,31,32). Bajo estas concepciones, la mPCR se proyectaría como una herramienta muy útil y atrayente al permitir ahorro de tiempo y esfuerzo sin comprometer la efectividad de la prueba (15,33)

Un problema común en mPCR es la amplificación preferencial de un blanco sobre otro. Mediante modelos teóricos y estudios experimentales han sido detectados los causales de dichas amplificaciones en los planetamientos conocidos como deriva y selección (ver figura 1). La deriva (o direccionalidad) asume la existencia de variaciones o fluctuaciones en la interacción de los reactivos durante el ciclaje particularmente en ciclos iniciales, situación que encontraría su justificación en las bajas concentraciones en la que se encuentra el templado de ADN originando concentraciones iniciales muy bajas del blanco a amplificar que en conjunto a las variaciones en los perfiles térmicos del equipo, dan lugar a rampas de temperaturas desiguales (error experimental simple). El planetamiento por selección

define a un mecanismo que por sí mismo favorece la amplificación de ciertos blancos debido a propiedades inherentes del blanco y de las secuencias que lo flanquean. En este sentido se menciona el contenido de GC como principal responsable de una mayor eficacia vinculante entre los *primers*. En principio la deriva es inevitable en cualquier reacción, mientras que la selección puede ser modulada a fin de fomentar la igualdad de amplificación de dianas (31).

Primers

Idealmente, todos los juegos de *primers* permitirían amplificaciones eficientes para su respectivo marcador (34). Sin embargo, la presencia en metodologías múltiples de más de un par puede también incrementar la posibilidad de obtener productos inespecíficos que pudieran llegar a ser mejor amplificados que los dirigidos a la secuencia blanco. Algunos *primers* poseen un porcentaje de amplificación muy alto (eficiencia) y como resultado las plantillas pueden saturarse en fase de meseta, consumiendo componentes de reacción y distorsionando los tiempos de alineamiento y



extensión (2,15). Como consecuencia, el desarrollo de *primers* y número de los mismos a emplear por reacción, debe ser abordado de manera racional (2,21,31). Hemos detectado en nuestra práctica que el ideal de juegos de *primers* a emplear en mPCR es tres, situación que garantiza confiabilidad técnica pero restringe la amplitud de diagnóstico.

Otros componentes de la reacción

Alteraciones en las concentraciones de MgCl₂, dNTPs y enzima usualmente influyen poco en la mejoría de sensibilidad o especificidad de la prueba múltiple. Algunas publicaciones -basadas en los procesos de deriva y selección- avalan incrementos excesivos en la concentración de estos componentes (3,15), adiciones que deben ser manejadas con prudencia y acorde a lo que se desea investigar.

Ciclaje

Se debe tener en consideración que la mayoría de las modificaciones que afectan la reacción están directamente relacionadas con los factores que afectan alineamiento y extensión (2). La temperatura de alineamiento resulta más dependiente de un correcto balance entre *primers*. Por su parte, la temperatura de extensión lo es de la actividad enzimática y dNTPs.

Consideraciones generales para la aplicación de mPCR

El desarrollo y aplicación de mPCR en microbiología clínica humana y veterinaria debe seguir un enfoque racional criterios de inclusión o exclusión de dianas (35). Selección que puede hacerse en base a órganos, sistemas, sintomatología o características epidemiológicas (23,36,37). Avalamos la selección en base a sintomatología. Antes de la aplicación en un entorno clínico, debe ser evaluada utilizando diluciones seriadas de controles y muestras clínicas (36), así como descartar potenciales factores desencadenantes de resultados falsos tomando en cuenta precauciones y metodologías pertinentes en el material biológico de partida (15,37).

Optimizar una mPCR en clínica puede resultar un proceso complejo. No solo necesita seguirse un enfoque gradual en la combinación de juegos de *primers* (35). Es pertinente -en la medida de lo posible- hacer uso de controles externos de calidad, así como una aplicación rigurosa de los controles internos que deberán incluir muestras de control negativo y para cada blanco, un control positivo que a su vez servirán de señalización en casos de bandeos dudosos (26). En clínica el número de patógenos a detectar resulta atrayente. Antes de adaptar un protocolo de mPCR para estos fines, se deberá estudiar junto a las características clínicas y epidemiológicas, las características biológicas de los patógenos de interés (38).

La mPCR ha abierto un mundo de posibilidades diagnósticas. En muchos campos resulta de gran valor para incrementar la capacidad del número de detecciones por reacción (ver figura 2) conservando efectividad y disminuyendo costos (34). Para seguir contando con estos beneficios es crucial la vigilancia intra e inter laboratorios (31, 34).

Conclusiones y perspectivas

En el campo de la microbiología humana variados ensayos de mPCR han revelado confiabilidad técnica y acertado su uso como alternativa de solución diagnóstica para algunos de los principales agentes causales de problemas en salud pública (18,20,23). La mPCR ha sido crucial en la reemergencia de algunas enfermedades como la malaria, hecho que hace imperativo el diseño de estrategias de diagnóstico rápido, sensible y específicas (39). Los resultados bajo este enfoque resultan satisfactorios para considerar válido su empleo a partir de muestras clínicas (2,40), pudiendo extender su rentabilidad a situaciones como la detección de microorganismos independientes de

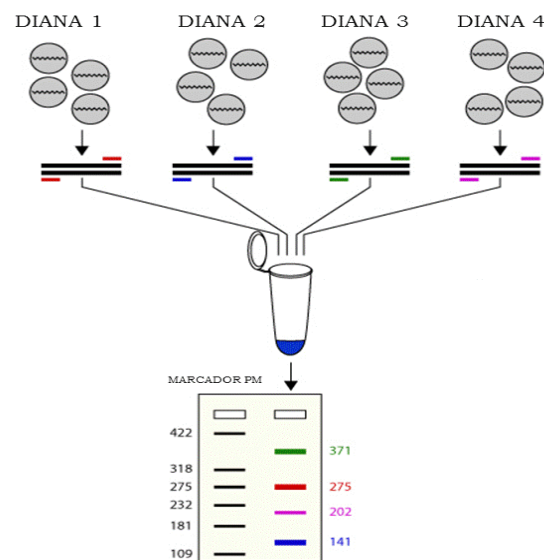


Figura 2. mPCR: Esquematación del proceso técnico y visualización final de los productos obtenidos

cultivo (36), sospecha de carga parasitaria muy baja (23,24,39), procesos de control de calidad para microscopía, pruebas diagnósticas rápidas y de detección de parasitemias sincrónicas mixtas (39,41), tipificación de cepas virulentas (42) o para la corrección de subestimaciones en algunas enfermedades (43,44) . En este orden de ideas,

nuestros enfoques en el empleo de la mPCR a partir de muestras humanas se dirigen hacia la diferenciación de parásitos del género *Leishmania* con fines similares a los señalados.

Un criterio epidemiológico que justificaría trabajos de detección múltiples de ADN es la edad. En este sentido, se cita la factibilidad de la herramienta mPCR para el establecimiento de un diagnóstico rápido y oportuno de enfermedades en las que se encuentran involucrados patógenos pediátricos como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Streptococcus pneumoniae*, favoreciendo la toma de decisiones en el tratamiento, lo cual redundaría en la evolución favorable del paciente (42).

Es conocido que en algunos casos, son necesarias modificaciones a la metodología mPCR a fin de incrementar la rentabilidad (24,45). Dentro de este esquema se señala el uso de sistemas que ayudan a prevenir la contaminación, facilitando la amplificación y detectando amplificaciones internas. Tal es el caso de los sistemas dUTP-uracil-N-glicosidasa (actúa eliminando residuos de uracilo de la cadena de ADN al reemplazar dUTP por dTTP), AmpliTaqGold polimerasa (activada solo a altas temperaturas) y ligasas LDR (detectan posibles mutaciones) (38).

En el campo de la microbiología veterinaria, la mPCR ha evidenciado un comportamiento similar al campo de microbiología humana, al posibilitar no solo el diagnóstico de patógenos de interés clínico sino también económico (46) (campo hacia el cual van dirigidos nuestros esfuerzos). La detección múltiple en esta área también se justifica para el diagnóstico por edad, concediéndole ventaja adicional en comparación a una prueba serológica. De igual modo, ha sido una ventaja el uso de mPCR para detectar infecciones o transmisiones congénitas por hemoparásitos, ampliar el conocimiento y entendimiento sobre la dinámica de infecciones mixtas (*Babesia sp.* y *Anaplasma marginale* por ejemplo) lo que se traduce en un abordaje más seguro en materia de control y profilaxia. No menos importante resulta su actuación en el campo de las enfermedades zoonóticas, brindando ventaja sobre las técnicas convencionales para la detección de patógenos como *Brucella sp* y *Leptospira sp* debiendo ser desarrollados diferentes procedimientos de extracción y técnicas de detección a fin de extender estos procesos para muestras humanas (47), adicional del poder discriminatorio entre especies patógenas y saprofitas (48).

La utilización de técnicas tradicionales de investigación epidemiológica en asociación con una PCR individual o su variante múltiple, produciría resultados que se contraponen a conceptos y expectativas establecidos respecto a la epidemiología de las infecciones microbianas, posibilitando la detección de infecciones incipientes así como la identificación de infecciones asintomáticas. Estos conocimientos epidemiológicos y técnicos a su vez, permitirían optimizar los parámetros del método y la escogencia idónea del material biológico de partida para el procedimiento que en suma, permitirán gozar de todas las ventajas de la técnica minimizando los efectos negativos (37,46).

Si bien al presente los estudios de mPCR abarcan en alto porcentaje la detección de microorganismos, no se puede olvidar que las primeras aplicaciones de éxito fueron en el campo de la fisiopatología para la detección de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedad determinada genéticamente con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. Las manifestaciones clínicas se observan entre los tres y cinco años de edad y usualmente la muerte ocurre en la segunda década de vida por complicaciones cardiorrespiratorias. Chamberlain y colaboradores (1988) aplicaron la PCR como un método rápido y eficiente para la detección de deleciones, analizando seis exones en una reacción de amplificación múltiple y adicionando luego, tres exones dentro de la reacción con lo cual incrementaron la detección hasta un 80%. Un nuevo grupo de investigadores desarrollaron una amplificación para otros nueve exones -reacción complementaria-. Al presente, la mPCR puede detectar cerca del 98% de las deleciones en la distrofia muscular de forma rápida y confiable, permitiendo el asesoramiento apropiado a los pacientes (49).

En suma, con la mPCR pueden ser salvados esfuerzos y tiempos considerables. La metodología presenta rapidez, parámetro que demanda su uso en laboratorios clínicos. Una mPCR eficiente requiere estrategias de planificación, múltiples intentos y optimización de las condiciones de reacción a fin de prevenir la aparición de problemas. En clínica la importancia de la detección por mPCR crece en virtud del aumento de agentes microbianos factibles de detectar (26,28).

Referencias

1. Méndez-Alvarez S, Pérez-Roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:183-92. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
2. Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer

- eficiencias and improving detection success. *Methods Ecol Evol.* 2012; 3:898-905. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of *primers* and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63:106-14. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 4. Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today.* 1989; 10: 351-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 5. Xu LZ, Larzul D. The polymerase chain reaction: basic methodology and applications. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1991; 14:209-21. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 6. Lenstra JA. The applications of the polymerase chain reaction in the life sciences. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1995; 41:603-14. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 7. Das B, Swain S, Patra A, Das M, Tripathy HK, Mohapatra N, Kar SK, Hazra RK. Development and evaluation of a single-step multiplex PCR to differentiate the aquatic stages of morphologically similar *Aedes* (subgenus: *Stegomyia*) species. *Trop Med Int Health.* 2012; 17:235-43. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 8. Lamoth F, Jatón K, Prod'hom G, Senn L, Bille J, Calandra T, Marchetti, O. Multiplex Blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clinical Microbiol.* 2010; 48: 3510-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 9. Vinuesa-Burgos, C. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular REDVET. 2009; 10: 1-14. [[Google Scholar](#)]
 10. Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem.* 1990 ; 62:1202-14. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 11. Lantz PG, Abu al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol Annu Rev.* 2000; 5:87-130. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 12. Guevara P. Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. En: *Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio.* Red de Innovación Tecnológica IDMM editores. Venezuela; 2004; p1-102.
 13. Rodríguez I, Barrera H. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL.* 2004; 7:323-35.
 14. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.* 1993; 3:S18-29 [[PubMed](#)]
 15. Espinosa, L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X editores. *Ecología molecular.* México: INE, CONABIO y UNAM, 2007; p.520-36. [[Google Scholar](#)]
 16. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000 ;13:559-70. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 17. Fernández AL, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González-Juanatey J, Regueiro B. Evaluación de una PCR multiplex en tiempo real para la detección de patógenos en el tejido valvular de pacientes con endocarditis. *Rev Esp Cardiol.* 2010; 63:1205-8. [[Google Scholar](#)]
 18. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementería A, Garaizar J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1734-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 19. Shemis MA, El-Abd DM, Ramadan DI, El-Sayed MI, Guirgis BS, Saber MA, Azzazy HM. Evaluation of multiplex nested polymerase chain reaction for routine hepatitis C virus genotyping in egyptian patients. *Hepat Mon.* 2012; 12: 265-70. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 20. Römpler H, Dear PH, Krause J, Meyer M, Rohland N, Schöneberg T, Spriggs H, Stiller M, Hofreiter M. Multiplex amplification of ancient DNA. *Nat Protoc.* 2006; 1: 720-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 21. McKechnie ML, Hillman R, Couldwell D, Kong F, Freedman E, Wang H, Gilbert GL. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1871-7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 22. Shum J, Paul N. Chemically modified primers for improved multiplex PCR. *Anal Biochem.* 2009; 388:266-72. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 23. Lee SH, Joung M, Yoon S, Choi K, Park WY, Yu JR. Multiplex PCR detection of waterborne intestinal protozoa: microsporidia, Cyclospora, and *Cryptosporidium*. *Korean J Parasitol* 2010; 48:297-301. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 24. Li W, Zhang N, Gong P, Cao L, Li J, Su L, Li S, Diao Y, Wu K, Li H, Zhang X. A novel multiplex PCR coupled with luminex assay for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol.* 2010 ; 173:11-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 25. Wicht B, Yanagida T, Scholz T, Ito A, Jimenez J, Brabec J. Multiplex PCR for differential identification of broad tapeworms (Cestoda: *Diphyllobothrium*) infecting humans. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:3111-116. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 26. Martínez-Ballesteros I, Paglietti B, Rementería A, Laorden L, García-Ricobaraza M, Bikandi J, Rubino S, Garaizar J. Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of *Salmonella*. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6: 443-51. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 27. Yin S, Yang S, Shang Y, Cai X, Liu X. Development and optimization of multiplex-PCR for simultaneous detection of porcine pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *Intern J Appl Res Vet Med.* 2012; 10:169-75. [[Google scholar](#)]
 28. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002; 16:47-51. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 29. Stralin K, Bäckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcén P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS.* 2005; 113:99-111. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 30. Harris S, Jones DB. Optimization of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci.* 1997; 54:166-73 [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

31. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:11147-56. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
32. Yamada H, Nishikawa A, Yamamoto T, Mizue Y, Yamada T, Morizane M, Tairaku S, Nishihira J. Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:2552-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
33. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JL, Stanley K, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis JT. Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 257-62. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
34. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout Lv, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84:332-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
35. Rodríguez-Preval N, Fernández-Molina C, Rodríguez-G I, Berdasquera-C D, Rivera-Tapia J. PCR-múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2007; 24:152-56. [\[Google Scholar\]](#)
36. Prieto JR. Estudio prospectivo sobre la eficacia de una PCR múltiple en el diagnóstico de las infecciones causadas por los herpesvirus. *Medicina Balear.* 2011; 26:20-6. [\[Google Scholar\]](#)
37. Cavalcante G. Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo. Tese (doutorado) [citado 27 marzo 2012]. Disponible en: [http://www.ufpi.br/subsiteFiles/cienci/animal/arquivos/files/Temas_Prova_Escrita_Edital_01_2012\(1\).pdf](http://www.ufpi.br/subsiteFiles/cienci/animal/arquivos/files/Temas_Prova_Escrita_Edital_01_2012(1).pdf)
38. Hendolin PH, Paulin L, Ylikoski J. Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 125-32. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
39. Lim YA, Mahmud R, Chew CH, T T, Chua KH. Plasmodium ovale infection in Malaysia: first imported case. *Malar J.* 2010; 8:9: 272. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
40. Arraiz N, Bermudez V, Romay Z, Faria N, Mujica D. Evaluacion de un ensayo de PCR duplex para la identificacion de micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y no tuberculosis. *Rev Cs FCV-LUZ.* 2005;15:568-75. [\[Google Scholar\]](#)
41. Carvalho KS, Silvestre Ede A, Maciel Sda S, Lira HI, Galvão RA, Soares MJ, Costa CH, Malaquias LC, Coelho LF. PCR detection of multiple human herpesvirus DNA in saliva from HIV-infected individuals in Teresina, State of Piauí, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; 43:620-3. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
42. García C, Lozano P, Rivera J, Giono S, Martínez Y, Rocha-Gracia R. Identificación y tipificación de *Haemophilus influenzae* mediante PCR múltiple. *Univ Méd Bogotá (Colombia)* 2008; 49:436-52. [\[Google Scholar\]](#)
43. Mehlotra RK, Gray LR, Blood-Zikursh MJ, Kloos Z, Henry-Halldin CN, Tisch DJ, Thomsen E, Reimer L, Kastens W, Baea M, Baea K, Baisor M, Tarongka N, Kazura JW, Zimmerman PA. Molecular-based assay for simultaneous detection of four *Plasmodium* spp. and *Wuchereria bancrofti* infections. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 1030-3. [\[PubMed\]](#)
44. Da Costa ARF, De Sousa C, Batista C, Brito E. Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010; 1:77-84. [\[Google Scholar\]](#)
45. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N, Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiplex and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55: 495-501 [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
46. Cho YI, Kim WI, Liu S, Kinyon JM, Yoon KJ. Development of a panel of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of major agents causing calf diarrhea in feces. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22:509-17. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#).
47. Baddour MM, Alkhalifa DH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol.* 2008; 54: 352-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
48. Moreno N, Agudelo-Flórez P. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010; 27:548-56. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
49. González-Huerta NC, Hernández-Zamora E, Arenas-Sordo M de L, Escobar-Cedillo RE, Miranda-Duarte A, Leyva-García N. Deleciones del gen DMD en distrofia muscular de Duchenne/Becker. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2004; 67:196-202. [\[Google Scholar\]](#)

Como citar este artículo: Bolivar AM, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed* 2014; 3: 25-33