

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

Josep Costa

Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España.

Hoy en día, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza normalmente en la rutina asistencial de la mayoría de nuestros laboratorios, pero su empleo se ha limitado, con pocas excepciones, al campo de la virología y en especial a un reducido grupo de virus con gran interés económico, para los que se dispone de ensayos comerciales bien estandarizados. Por diversas razones, la PCR convencional se ha implementado poco en el diagnóstico de otras muchas enfermedades infecciosas a pesar de aportar indudables ventajas. La PCR a tiempo real combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCR a tiempo real, irá reemplazando la PCR convencional y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones microbiológicas.

Palabras clave: PCR a tiempo real. Diagnóstico molecular. Sondas fluorogénicas.

Real-time PCR

PCR based assays are currently used routinely in most microbiology laboratories. But, with few exceptions, they are restricted to the field of virology, especially to a limited number of viral targets with important economical interest for which commercially well standardized assays are available. For several reasons, it has had a poor implementation of the PCR assays into routine diagnostics for other infectious diseases despite they are advantageous. Combined with automated sample isolation of nucleic acids, real-time PCR gives an ideal platform for the development of molecular assays for a wide range of infectious agents with clinical interest. Because of its advantages, as simplicity, rapidity and minor risk of contamination, real-time PCR will go replace conventional PCR assays and its use will extend to a wide range of applications in clinical microbiology.

Key words: Real-time PCR. Molecular diagnostics. Fluorogenic probes.

Correspondencia: Dr. J. Costa.
Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial.
Villarroel, 180. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: costa@medicina.ub.es

Manuscrito recibido el 9-2-2004; aceptado el 12-2-2004.

00

La PCR convencional en el contexto de la microbiología clínica

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de la polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas. En general todo este proceso suele durar aproximadamente 24 h.

En el ámbito de la microbiología clínica, la PCR se ha aplicado en tres grandes campos:

1. *Diagnóstico etiológico.* La PCR es sobre todo útil en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos, para mejorar la eficacia diagnóstica complementando métodos convencionales o si se requiere un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico lo antes posible.
2. *Control del tratamiento con antimicrobianos.* La PCR se utiliza tanto para la selección de los pacientes que deben ser tratados como para, una vez iniciado el tratamiento, comprobar su eficacia, siendo importante para ello disponer de métodos cuantitativos.
3. *Caracterización genética de agentes infecciosos.* Genotipificación; identificación de mutaciones determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia; epidemiología molecular; etc.

En los últimos 10 años se han desarrollado innumerables aplicaciones de la PCR en microbiología clínica. No obstante, desde el punto de vista asistencial, la PCR sólo se ha consolidado como un procedimiento realmente útil en virología, al ser una buena alternativa al aislamiento por cultivo celular. Salvo algunas excepciones, la introducción de la PCR en la rutina asistencial en otros campos de la microbiología clínica ha sido muy limitada y su aplicación se ha restringido a aquellos microorganismos que no crecen o crecen mal en los medios de cultivo convencionales y aún en ese grupo, la implementación real de esta metodología ha sido muy escasa. En términos generales, puede decirse que la aplicación de la PCR en el laboratorio de microbiología asistencial se ha restringido a un pequeño grupo de agentes infecciosos con gran interés económico para las empresas de diagnóstico microbiológico, como por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de la hepatitis C (VHC), de la hepatitis B (VHB) o citomegalovirus,

para los que se han comercializado sistemas bien estandarizados y, en mayor o menor medida, automatizados. Para otros agentes infecciosos con menor interés económico, para los que no hay kits comerciales para llevarlos a cabo o, si los hay, no son de fácil aplicación, se emplean métodos no comercializados, optimizados en los propios laboratorios, aunque, en general, su uso se ha limitado a centros de referencia o a grandes hospitales. El empleo generalizado de esos métodos "caseros" no parece muy aconsejable, ya que diversos estudios efectuados hace algunos años para evaluar su calidad revelaron graves deficiencias de reproducibilidad, sensibilidad y especificidad en la mayoría de los laboratorios participantes. Las causas de estas deficiencias son múltiples. Por ejemplo, la gran heterogeneidad de las muestras que llegan al laboratorio y de los agentes infecciosos que deben ser identificados obliga a disponer de diferentes métodos de extracción, en algunos casos muy complejos y laboriosos. La aparición, hace algunos años, de métodos comerciales basados en columnas con matrices de silicatos y la reciente irrupción de robots que llevan a cabo la extracción de ácidos nucleicos de manera automatizada, en algunos tipos de muestras, representan una mejora considerable. La presencia en algunas muestras de sustancias que inhiben la PCR origina falsos negativos, siendo recomendable introducir controles internos en las reacciones de amplificación para detectarlas. Aunque los problemas más importantes de la PCR en microbiología afectan sobre todo a la especificidad. Debido a la elevada sensibilidad del método, el riesgo de contaminación cruzada entre muestras es considerable. La fuente de contaminación más común son los fragmentos de ADN amplificados previamente en el laboratorio (amplicones) que pueden contaminar reactivos, superficies y materiales y producir resultados falsos positivos. Para disminuir el riesgo de contaminación hay que tomar y respetar rigurosamente una serie de precauciones de diversa índole¹, que incluyen una distribución del laboratorio en distintas áreas de trabajo (pre y post-PCR), la adopción de tediosos hábitos de trabajo que minimizan el riesgo, el uso de material especial o el empleo de sistemas anticontaminación, como la irradiación de superficies y reactivos con luz ultravioleta o los sistemas químicos como la isopsoralina² o la uracil-N-glucosilasa (UNG)³.

Además, la cuantificación del ADN diana en la muestra por PCR resulta complicada. La dificultad principal radica en que la eficacia de amplificación de la PCR va disminuyendo con el tiempo, hasta que la reacción llega a una fase de saturación en la que ya no se produce incremento de ADN. Puesto que los fragmentos amplificados se detectan al final de la PCR cuando la mayoría de reacciones han alcanzado ya la fase de saturación, la cantidad de ADN obtenido no suele guardar mucha relación con la concentración inicial de ADN en la muestra. Además, al ser la PCR una reacción de tipo exponencial, pequeñas oscilaciones en la eficacia de amplificación para cada muestra se traducen en importantes variaciones en la cantidad de ADN obtenido al final del proceso. Para superar este escollo se han desarrollado diversas estrategias. La más común consiste en hacer que el ADN diana compita durante la amplificación con una cantidad conocida de control interno añadida antes de iniciar el proceso (PCR competitiva). Sin embargo, esos métodos son laboriosos, poco precisos y suelen tener un rango de cuantificación limitado.

La PCR a tiempo real

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación⁴.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas, como veremos más adelante, de manera especial.

Agentes intercalantes

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*hot-start PCR*) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas⁵ o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad⁶. Además, la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana.

Sondas de hibridación específicas

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas

TABLA 1. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR a tiempo real

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
TET	522	550
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET.

1. *Sondas de hidrólisis*. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En la tabla 1 se relacionan los fluorocromos más empleados y sus espectros de excitación y emisión. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador⁷. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (fig. 1).

2. *Molecular beacons*. Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan

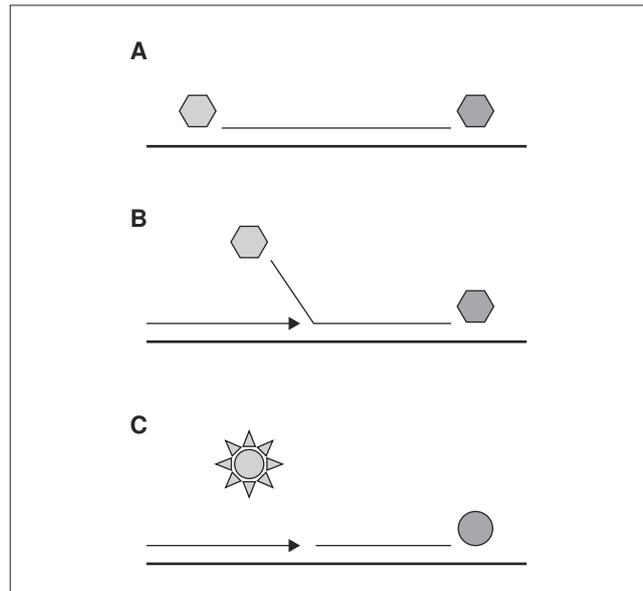


Figura 1. Mecanismo de las sondas de hidrólisis.

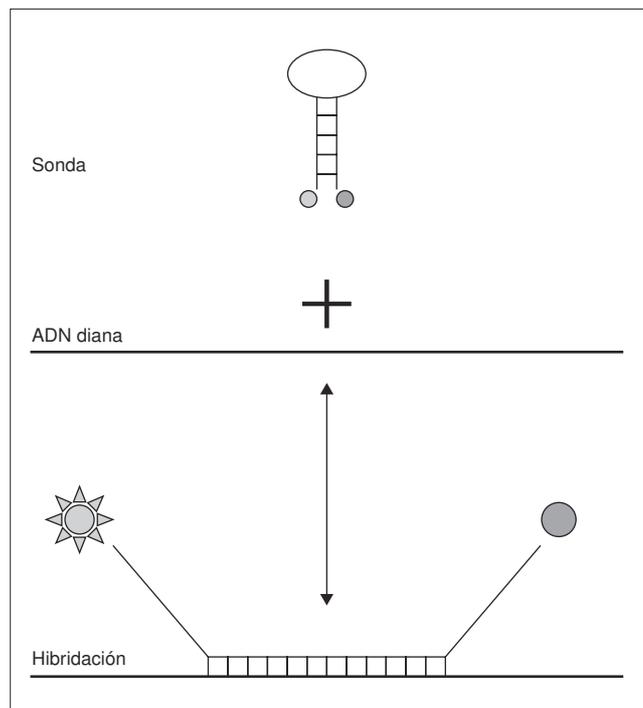


Figura 2. *Molecular beacons*.

una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero⁸ (fig. 2).

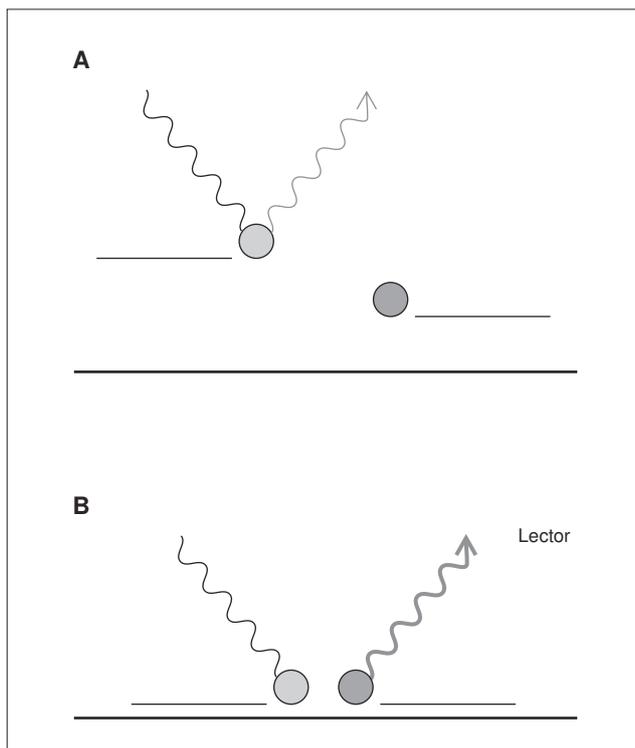


Figura 3. Sondas FRET.

3. *Sondas FRET*. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (fig. 3).

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es

TABLA 2. Equipos para PCR a tiempo real

Instrumento	Fabricante	Sistema térmico	Tiempo de reacción	Capacidad
Serie GeneAmp Serie AbiPrism	Applied Biosystems	Convencional	2 h	96
ICycler iQ	BioRad	Convencional	2 h	96-384
LightCycler	Roche Diagnostics	Aire	20-60 min	32
SmartCycler	Cepheid	Placa cerámica	40-60 min	16-96
MX4000	Stratagene	Convencional	90 min	96
Rotor Gene	Corbett Research	Aire	50 min	32

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil.

Equipos para PCR a tiempo real

En la tabla 2 se describen los equipos para llevar a cabo la PCR a tiempo real y sus fabricantes. Están compuestos por un termociclador y por un lector de fluorescencia y diseñados para poder efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. Los más utilizados son los equipos fabricados por Applied Biosystems y Roche Diagnostics, pero en general todos los modelos actuales permiten todas las aplicaciones que se detallan en el capítulo siguiente. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores.

Opciones de los equipos de PCR a tiempo real

Los programas de los equipos de PCR a tiempo real tienen diversas opciones:

1. *Amplificación y detección de ADN o ARN diana en la muestra.*
2. *PCR múltiple.*
3. *Cuantificación del ADN o ARN diana en la muestra*⁹. Se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) diana en la muestra de manera muy sencilla, añadiendo simplemente unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana (curva patrón) en la tanda de amplificación. En la PCR a tiempo real el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (fig. 4). Por lo tanto, se puede controlar la amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (Cp, de *crossing point*) o ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus Cp correspondientes se dibuja una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los Cp de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial.

4. *Análisis de curvas de disociación*. Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la Tm de los amplicones para comprobar su especificidad. También permite el análisis de mutaciones

puntuales, que se puede abordar de diferentes maneras. Un enfoque sencillo consiste en usar una sonda complementaria con el ADN diana de tipo salvaje, que abarque la posición del polimorfismo. El híbrido formado entre sonda y ADN de tipo salvaje tendrá una estabilidad mayor que el formado entre la sonda y el ADN mutado, puesto que en este caso la complementariedad no es absoluta. La mayor estabilidad de la unión entre la sonda y el ADN salvaje se reflejará en una T_m superior. Las diferencias en la temperatura de disociación de los híbridos nos permitirá discriminar perfectamente entre el ADN de tipo salvaje y el de tipo mutado, pudiéndose establecer además, de forma relativa, la cantidad de ADN de tipo salvaje y la de tipo mutado cuando ambos están presentes en la misma muestra (fig. 5).

Ventajas de la PCR a tiempo real

La primera gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Si el equipo empleado es el Light Cycler o equivalente, esta ventaja todavía es más acusada, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30-40 min. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log). Asimismo, la determinación de mutaciones puntuales que pueden estar relacionadas con resistencias a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, es mucho más fácil. Los equipos para PCR a tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

Aplicaciones de la PCR a tiempo real en la microbiología clínica

Las aplicaciones de la PCR a tiempo real en el campo de la microbiología clínica no difieren de las que ya se han comentado al principio de esta revisión para la PCR convencional. No obstante, es previsible que gracias a sus indudables ventajas y a la sencillez de su empleo, la PCR a tiempo real vaya reemplazando la PCR clásica, y que su aplicación se extienda a un número cada vez mayor de agentes infecciosos, implementándose progresivamente en la rutina asistencial. Algunas empresas de diagnóstico (Roche Diagnostics, Artus, Abbott, Celera) han hecho ya una apuesta decidida por la nueva tecnología y tienen disponibles, o los tendrán en breve, kits para el diagnóstico de los agentes infecciosos de mayor interés comercial mediante sistemas de PCR a tiempo real (VIH, VHB, VHC, citomegalovirus). Sin embargo, hay muchas enfermedades infecciosas, con menor interés comercial, en las que el uso de métodos moleculares de diagnóstico aporta indudables ventajas. La PCR a tiempo real, combinada con los nuevos sistemas automáticos para la preparación de las muestras, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una

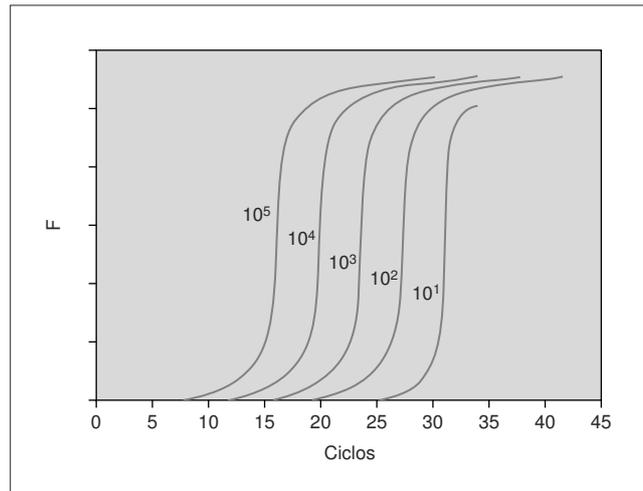


Figura 4. Curva patrón para cuantificación.

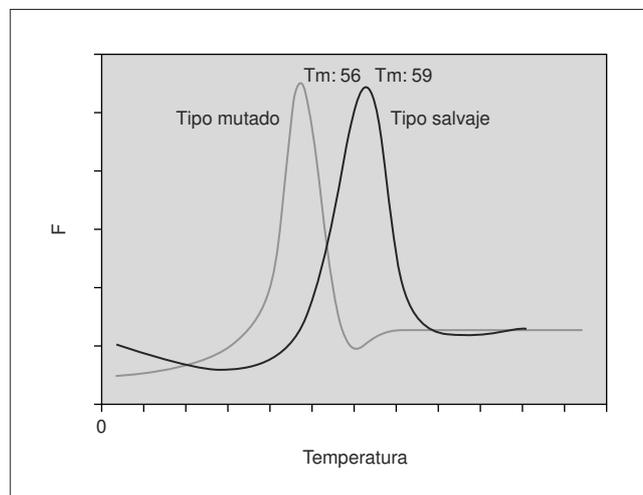


Figura 5. Determinación de mutaciones puntuales mediante análisis de curvas de disociación.

gran variedad de pruebas moleculares para la identificación o cuantificación de esos agentes infecciosos. Es el caso de muchos virus^{10,11} (familia de los Herpesvirus, virus respiratorios, enterovirus, virus JC, virus BK, etc.) o de bacterias que no crecen en medios de cultivo como *Tropheryma wippeli*¹², o que crecen mal como *Bordetella pertussis*¹³ o *Bartonella*¹⁴ o muy lentamente como *Mycobacterium tuberculosis*¹⁵. También, de micosis invasivas¹⁶, especialmente por *Aspergillus* ssp. o de infecciones parasitarias como las ocasionadas por *Toxoplasma gondii*¹⁷ en líquido amniótico o en líquido cefalorraquídeo (LCR).

Otro campo potencial de aplicación de la PCR a tiempo real es en la identificación de organismos fácilmente cultivables, cuya detección rápida sea beneficiosa por algún motivo. Por ejemplo, la identificación de *Streptococcus* del grupo B (*S. agalactiae*) en frotis vaginales¹⁸. La colonización del tracto genital de mujeres parturientas por este agente se relaciona con un mayor riesgo de infección neonatal grave. El tiempo necesario para el aislamiento de esta bacteria mediante cultivo es de 1-2 días, mientras que

por PCR a tiempo real su identificación se puede llevar a cabo en 30 min. La reducción del tiempo de diagnóstico puede mejorar la prevención de esas infecciones en recién nacidos. En otros casos, como la sepsis, la supervivencia del enfermo puede depender de un diagnóstico precoz del agente causal que permita establecer el tratamiento antibiótico específico en etapas tempranas del proceso. Probablemente en pocos años se habrán optimizado protocolos de PCR múltiple a tiempo real para la identificación de los 10 o 20 agentes más frecuentes de la sepsis en unas pocas horas. Lógicamente, la PCR a tiempo real no va a reemplazar al hemocultivo, porque la sepsis puede estar ocasionada por una variedad de microorganismos mucho más amplia, pero la demora en el tratamiento se podrá reducir en un número considerable de casos, lo que sin duda puede mejorar el pronóstico de este grave proceso.

El éxito de un tratamiento no sólo se basa en un diagnóstico etiológico precoz, sino que en muchas ocasiones la determinación rápida de la sensibilidad del agente causal a los fármacos antimicrobianos puede ser determinante. La PCR a tiempo real proporciona métodos ágiles y sencillos para la identificación de mutaciones puntuales asociadas con resistencias a fármacos antimicrobianos. Por ejemplo, en apenas una hora se puede determinar la presencia en heces de enterococos resistentes a vancomicina¹⁹, facilitando el control de la transmisión de este patógeno en los centros sanitarios. En los últimos años se han desarrollado métodos sencillos para la detección rápida de mutaciones asociadas con resistencias a meticilina²⁰ en *Staphylococcus aureus* y a rifampicina y a isoniácida en *Mycobacterium tuberculosis*²¹. También se han descrito procedimientos para la identificación de mutaciones asociadas con resistencia a agentes antiviricos, como la lamivudina²² en VHB.

Hoy día ya están disponibles kits comerciales para algunas aplicaciones comentadas en este apartado y en el futuro irán apareciendo muchos otros. Incluso para las enfermedades infecciosas menos frecuentes están, o estarán disponibles, protocolos bien optimizados, sencillos y rápidos para que puedan ser implementados en la rutina asistencial. No obstante, hay que hacer hincapié en que esta potente metodología sólo será útil si los laboratorios de microbiología clínica participan en programas de control de calidad bien definidos como el Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD; <http://www.qcmd.org>) desarrollado por The European Society for Clinical Virology y The European Society for Microbiology and Infectious Disease o el programa de control de calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Bibliografía

- Higuchi R, Kwok S. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-8.
- Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW, Hearst JE, Isaacs ST. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the PCR. *Nucleic Acids Res* 1991;19:99-107.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of Uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR. *Gene* 1990;93:125-8.
- Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993;11:1026-30.
- Moretti T, Koons B, Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 1998;25:716-22.
- Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasic T, et al. TaqStart antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1994;16:1134-7.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 1991;88:7276-80.
- Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996;14:303-8.
- Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* 2001;25:414-29.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-305.
- Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002;25:S3-S12.
- Maibach RC, Altwegg M. Cloning and sequencing an unknown gene of *Tropheryma whipplei* and development of two LightCycler PCR assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:181-7.
- Lind-Brandberg L, Welinder-Olsson C, Lagergard T, Taranger J, Trollfors B, Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol* 1998;36:679-83.
- Zeaiter Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol* 2003; 41:919-25.
- Miller N, Cleary T, Kraus G, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4143-7.
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher V, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system. *J Clin Microbiol* 2000;38:586-90.
- Delhommeau F, Forestier F. Quantification of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by rapid cycle real-time PCR. En: Reischl U, Wittwer C, Cockerill, editors. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 2002; p. 133-8.
- Ke D, Ménard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem* 2000;46:324-31.
- Ostrowsky BE, Trick WE, Sohn AH, Quirk SB, Holt S, Carson LA, et al. Control of vancomycin-resistant enterococcus in health care facilities in a region. *N Eng J Med* 2001;344:1427-34.
- Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeyer B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2429-33.
- Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3194-9.
- Whalley SA, Brown D, Teo CG, Dusheiko GM, Saunders NA. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler. *J Clin Microbiol* 2001;39:1456-9.

NOTA

Los artículos publicados en la sección "Formación Médica Continuada" forman parte de grupos temáticos específicos (antibiograma, antimicrobianos, etc.). Una vez finalizada la publicación de cada tema, se irán presentando al Sistema Español de Acreditación de la Formación Médica Continuada (SEAFORMEC) para la obtención de créditos.

Una vez concedida la acreditación, ésta se anunciará oportunamente en la revista y se abrirá un período de inscripción gratuito durante 3 meses para los socios de la SEIMC y suscriptores de la Revista, al cabo del cual se iniciará la evaluación, durante 1 mes, que se realizará a través de la web de Ediciones Doyma.

ANEXO 1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

- 1. El bromuro de etidio se utiliza habitualmente en:**
 - a) La hibridación molecular.
 - b) El proceso de amplificación de ADN.
 - c) La detección de productos de PCR.
 - d) La extracción de ácidos nucleicos.
 - e) La PCR a tiempo real.

- 2. El punto de corte (Cp) es**
 - a) La temperatura de fusión de los amplicones.
 - b) Es el ciclo en el que se alcanza la saturación de la reacción.
 - c) Es el ciclo en el que se empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo por encima de la basal.
 - d) Es la temperatura a la que se efectúa la lectura de fluorescencia en cada ciclo.
 - e) Ninguna de las anteriores respuestas es cierta.

- 3. Habitualmente la identificación por PCR a tiempo real con el sistema LightCycler suele durar aproximadamente:**
 - a) 2 h.
 - b) 4 h.
 - c) 24 h.
 - d) 30-40 min.
 - e) 10 min.

- 4. Se puede disminuir la amplificación inespecífica mediante:**
 - a) Una selección adecuada de los cebadores.
 - b) La detección de los amplicones en gel de agarosa.
 - c) La detección con sondas de hidrólisis.
 - d) "Hot start PCR".
 - e) Las respuestas a) y d) son correctas.

- 5. Se puede aumentar la especificidad de la detección de agentes infecciosos por PCR:**
 - a) Con una selección adecuada de los cebadores.
 - b) Con una temperatura de desnaturalización menor.
 - c) Con la detección de los amplicones mediante sondas moleculares.
 - d) Con "hot start PCR".
 - e) a), c) y d) son correctas.

- 6. En las sondas FRET:**
 - a) La fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor cuando están libres en la solución.
 - b) La fluorescencia que detecta el fluorímetro es emitida por el aceptor.
 - c) La fluorescencia que detecta el fluorímetro es la emitida por el donador.
 - d) La fluorescencia no se detecta cuando las sondas están hibridadas con el ADN diana.
 - e) Las sondas FRET no son fluorogénicas.

- 7. Una ventaja importante de la PCR a tiempo real con respecto a la convencional es:**
 - a) Posibilidad de usar un solo cebador para la reacción de amplificación.
 - b) Menor riesgo de contaminación.
 - c) Menor coste.
 - d) Mayor especificidad.
 - e) Ninguna de las anteriores es correcta.

- 8. El análisis de curvas de disociación permite:**
 - a) Confirmar la especificidad de los fragmentos amplificados.
 - b) Cuantificar la concentración de ADN diana en la muestra.
 - c) Aumentar la sensibilidad de la reacción.
 - d) Reducir el tiempo de amplificación.
 - e) Determinar la concentración de adenina en la muestra diana.

- 9. En la PCR a tiempo real la detección de los productos amplificados:**
 - a) Se lleva a cabo simultáneamente con la amplificación.
 - b) Se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa.
 - c) Se lleva a cabo por hibridación molecular en filtros de nitrocelulosa.
 - d) No es necesaria.
 - e) Ninguna de las anteriores respuestas es cierta.

- 10. El uso de uracil-N-glucosilasa (UNG) sirve:**
 - a) Para mejorar la sensibilidad de la PCR.
 - b) Disminuir el riesgo de contaminación.
 - c) Reducir el tiempo de reacción.
 - d) Detectar mutaciones puntuales.
 - e) Reducir la fluorescencia de base.