
7. ANEXOS

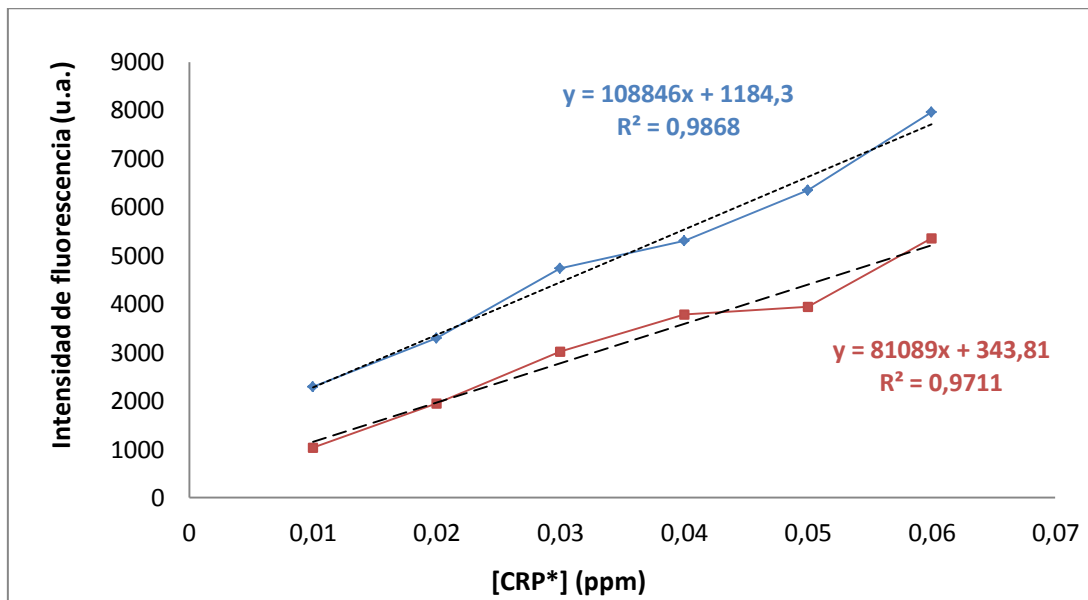


Figura Anexo 1. Representación de los dos ajustes lineales realizados para las distintas concentraciones de MPC empleadas. Además, se recogen ambas ecuaciones que representan dichas rectas en el color escogido para cada concentración.

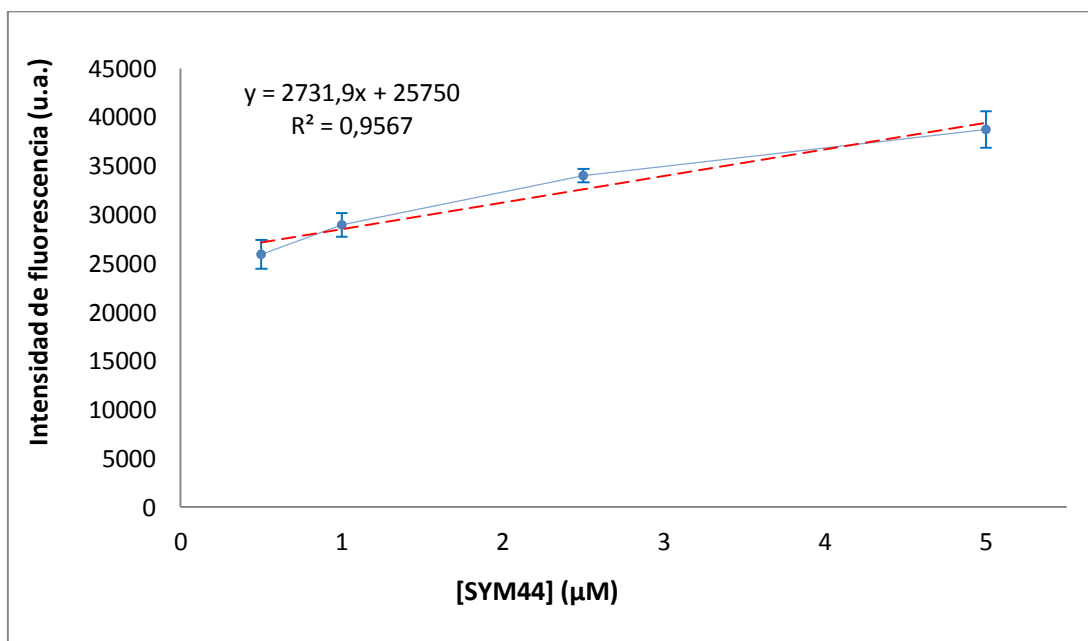


Figura Anexo 2. Valores promedio de los diferentes spots y de las distintas réplicas frente a las concentraciones de SYM44 empleadas. La línea roja con puntos representa el ajuste lineal realizado y en la parte superior izquierda se observa la ecuación de éste.

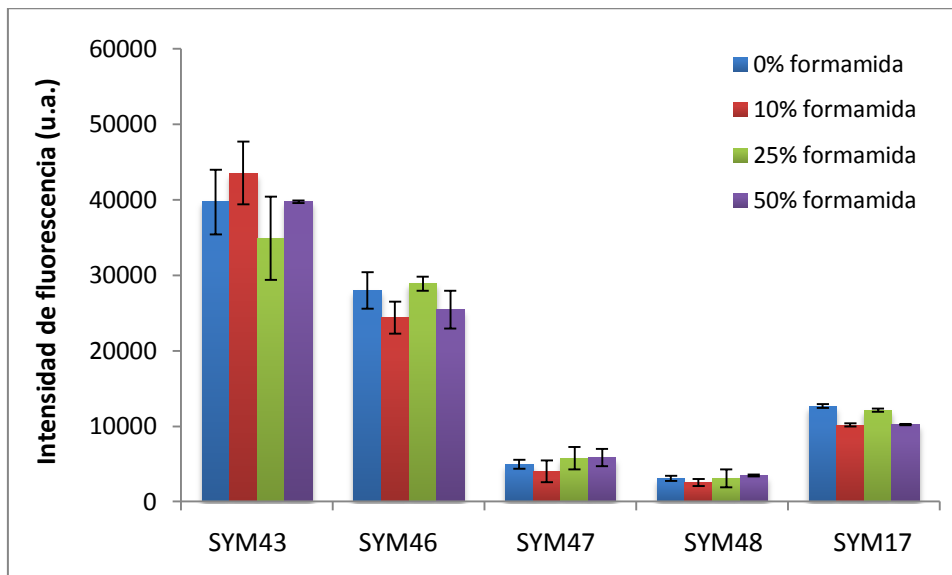


Figura Anexo 3. Valores promedio de intensidad obtenidos frente a los distintos oligonucleótidos sonda empleados. SYM43 es totalmente complementario, SYM46 presenta un desapareamiento o *missmatch*, SYM47 presenta dos SNPs, SYM48 tiene tres polimorfismos de una sola base y SYM17 no es complementario.

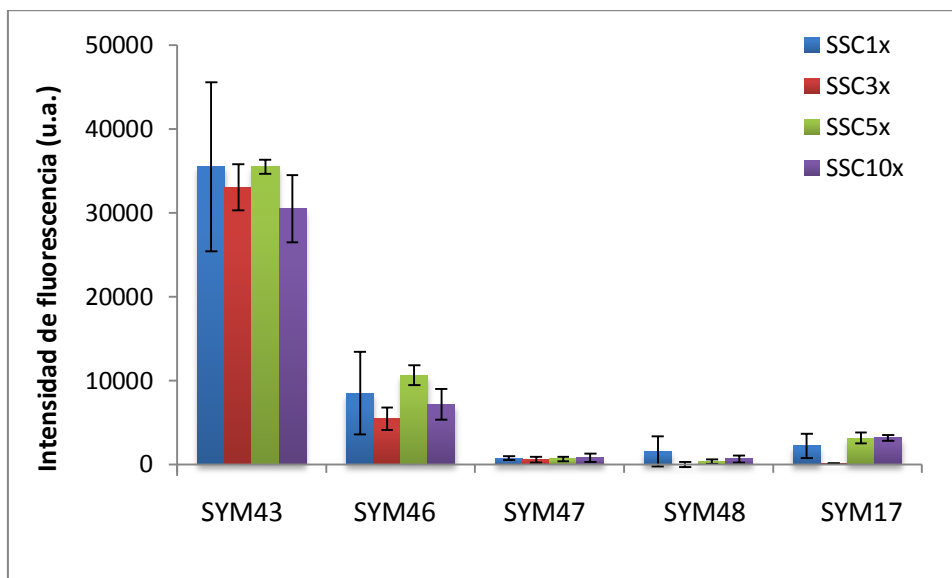


Figura Anexo 4. Valores promedio de intensidad obtenidos frente a las diferentes concentraciones de tampón SSC utilizadas. SYM43 es totalmente complementario, SYM46 presenta un desapareamiento o *missmatch*, SYM47 presenta dos SNPs, SYM48 tiene tres polimorfismos de una sola base y SYM17 no es complementario.

Tabla Anexo 1. Diferentes condiciones testadas en el ensayo directo competitivo de la CRP.

ENSAYO	ARRAY	[PC] (M)	[CRP] (ppm)	[CRP*] (ppm)	TAMPÓN	BSA	TIEMPO INCUBACIÓN	OBSERVACIONES
1	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	0,3, 0,2, 0,1	5, 2, 0,2	PBS-T	No	30'	-
2	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	0,3, 0,24, 0,17, 0,1	0,1, 0,05	PBS-T	No	30'	-
3	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	1, 0,5, 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1, 0,05	0,05	PBS-T	No	30'	-
4	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0	0,05	PBS-T	5%	30'	-
5	4x8 7 réplicas	1,5, 1,3	Diluciones seriadas 1:5 a partir de una disolución madre con una concentración de 120 ppm	Diluciones seriadas 1:5 a partir de una disolución madre con una concentración de 0,034 ppm	PBS-T	5%	30'	Melin <i>et al.</i>, 2011
6	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	50, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0	0,04	PBS-T	5%	30'	-
7	4x8 8 réplicas	5	50, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0	0,04	PBS-T	5%	30'	-
8	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	50, 20, 10, 5, 1, 0,5	0,04	PBS-T	5%	30' cada incubación	Las incubaciones se realizaron por etapas. Primero la CRP* (7 zonas) y en segundo lugar la CRP (6 réplicas).
9	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	50, 20, 10, 5, 1, 0,5	0,04	PBS-T	5%	30' cada incubación	Las incubaciones se realizaron por etapas. Primero la CRP (6 zonas) y en segundo lugar la CRP* (7 réplicas).

10	4x8 8 réplicas	1,3	50, 20, 10, 5, 1, 0,5	0,04	PBS-T	5%	30' cada incubación	Las incubaciones se realizaron por etapas. Primero la CRP (6 zonas) y en segundo lugar la CRP* (7 réplicas).
11	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	50, 20, 10, 5, 1, 0,5	0,04	PBS-T	5%	30' cada incubación	Las incubaciones se realizaron por etapas. Primero la CRP* (7 zonas) y en segundo lugar la CRP (6 réplicas). Además, el tiempo de irradiación con luz UV de los microarrays generados se aumentó a 15'.
12	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	50, 20, 10, 5, 1, 0,5	0,04	PBS-T	5%	30' cada incubación	Las incubaciones se realizaron por etapas. Primero la CRP (6 zonas) y en segundo lugar la CRP* (7 réplicas). Además, el tiempo de irradiación con luz UV de los microarrays generados se aumentó a 15'.
13	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	15, 5, 3, 1, 0,3, 0,1, 0	0,05	10 mM Tris-HCl	5%	30'	pH del tampón: 7,4
14	4x8 8 réplicas 2 BD	1,5, 1,3	15, 5, 3, 1, 0,3, 0,1, 0	5, 2	PBS	5%	30'	Cada BD se incubó con una concentración de CRP*.
15	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	15, 5, 3, 1, 0,3, 0,1, 0	2	Carbonato	5%	30'	pH del tampón: 9,6
16	4x8 8 réplicas	1,5, 1,3	15, 5, 3, 1, 0,3, 0,1, 0	2	MES	5%	30'	pH del tampón: 4,6
17	4x4 8 réplicas	1,36	15, 5, 3, 1, 0,3, 0,1, 0	0,05	PBS	5%	30'	Se adicionó una molécula espaciadora (diacrilato). Ésta estaba a una proporción del 10%.

Tabla Anexo 2. Diferentes condiciones ensayadas en el experimento con los productos de PCR. ¹ Se emplearon tres tipos de revelado, uno sobre cada réplica, con el objetivo de determinar el mejor para los ensayos. ² Cada revelado se aplicó sobre 4 zonas del BD. ³ Los productos de PCR se incubaron junto con los Ab de revelado durante 2h a 37 °C. ⁴ La hibridación se realizó en disolución previamente a la impresión. Así, se generaron *arrays* con productos de PCR ya hibridados con las sondas empleadas. ⁵ En este experimento, se imprimió el hidrogel de PC junto con las sondas DAC y junto con los amplicones ‘abiertos’. ⁶ Se realizaron diferentes controles como el de inmovilización de las sondas, mediante el uso de SYM44, y el de hibridación, mediante el empleo de SYM43. Así, una de las réplicas se incubó con el oligonucleótido SYM5 (0,05 µM). ⁷ Cada revelado se aplicó a dos réplicas. Así, una de ellas no se incubó con productos de PCR con la finalidad de verificar que la intensidad de fluorescencia obtenida no era de los Ab que quedaban atrapados en el hidrogel y correspondía a los amplicones hibridados. Comentar que, salvo que se indique lo contrario, todos los productos de PCR pertenecen a la especie *Salmonella*.

ENSAYO	ARRAY	SONDAS	PRODUCTOS PCR	TAMPÓN	PRE-HIBRIDACIÓN	HIBRIDACIÓN	REVELADO	CONCENTRACIONES DE AB DE REVELADO	TIEMPO DE INCUBACIÓN DE AB
1¹	4x6 3 réplicas	DAC1: 5, 1, 0,5 y 0,1 µM	Dilución 1/10	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	1h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Au	Antidig IgG: 1/10000 GAR-Au: 1/100	30' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC4: 5 µM					Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/1000 GAR-Alexa: 1/50	
2	4x6 8 réplicas 2 BD	DAC1: 5, 1, 0,5 y 0,1 µM	Diluciones: 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/500, 1/750 y 1/1000	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	1h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Au	Antidig IgG: 1/10000 GAR-Au: 1/100	30' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC4: 5 µM	Dilución 1/50 del control negativo				Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/1000 GAR-Alexa: 1/50	
3	4x8 8 réplicas	DAC1: 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 µM	Diluciones: 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/500, 1/750 y 1/1000	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC4: 5 µM	Dilución 1/50 del control negativo						

4²	4x8 8 réplicas	DAC1: 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 µM	Diluciones: 1/10, 1/25, 1/100 y 1/250	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Au	Antidig IgG: 1/10000 GAR-Au: 1/100	45' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC4: 5 µM					Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	
5³	4x8 8 réplicas	DAC1: 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 µM	Diluciones: 1/10, 1/25, 1/100 y 1/250	SSC 1× con 15% de formamida	No	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	
	PC 1 M	DAC4: 5 µM							
6⁴	4x4 5 réplicas	DAC1: 5, 1, 0,5 y 0,1 µM	Dilución 1/25	SSC 1× con 15% de formamida	No	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC4: 5 µM							
7⁵	4x12 3 réplicas	DAC1: 5, 1, 0,5 y 0,1 µM	Diluciones: 1/25, 1/50 y 1/100.	SSC 1× con 15% de formamida	No	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 1 M								
8	4x6 8 réplicas	DAC3: 1, 0,5, 0,1 y 0,015 µM	Diluciones: 1/25, 1/50 y 1/75.	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC6: 0,5 µM	Dilución 1/50 de <i>Campylobacter</i> .						
9	4x6 8 réplicas	DAC6: 1, 0,5, 0,1 y 0,015 µM	Diluciones: 1/25, 1/50 y 1/75 de <i>Campylobacter</i> .	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC3: 0,5 µM	Dilución 1/50 de <i>Salmonella</i> .						
10	4x8 8 réplicas	DAC3: 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,015 µM	Diluciones: 1/25, 1/50 y 1/75.	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 5 M	DAC6: 1 µM	Dilución 1/50 de <i>Campylobacter</i> .						

11⁶	4x8 8 réplicas	DAC3: 5, 1, 0,5, 0,1 µM	Diluciones: 1/25, 1/50 y 1/75.	SSC 1× con 15% de formamida	30' a 37 °C	2h a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/50	45' a temperatura ambiente
	PC 5 M	DAC6: 1 µM	Dilución 1/50 de <i>Campylobacter</i> .						
12⁷	4x8 8 réplicas	DAC3: 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,015 µM	Dilución 1/40 de <i>Salmonella</i> .	SSC 1× (4 réplicas)	No	2h 30' a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/1000 GAR-Alexa: 1/100	30' a temperatura ambiente
	PC 5 M	DAC6: 1 µM		SSC 5× (3 réplicas)				Antidig IgG: 1/4000 GAR-Alexa: 1/50	
13⁷	4x8 8 réplicas	DAC3: 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,015 µM	Dilución 1/40 de <i>Salmonella</i> .	SSC 1× (4 réplicas)	No	2h 30' a 37 °C	Antidig IgG + GAR-Alexa	Antidig IgG: 1/1000 GAR-Alexa: 1/100	30' a temperatura ambiente
	PC 1 M	DAC6: 1 µM		SSC 5× (3 réplicas)				Antidig IgG: 1/4000 GAR-Alexa: 1/50	
								Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/100	
								Antidig IgG: 1/100 GAR-Alexa: 1/100	

ANEXO DE ESTADÍSTICA

Linear Regression

Data source: Data 1 in Notebook1

$$\text{Col 2} = 1184,258 + (108845,893 * \text{Col 1})$$

N = 6

R = 0,993 Rsqr = 0,987 Adj Rsqr = 0,983

Standard Error of Estimate = 263,488

	Coefficient	Std. Error	t	P
Constant	1184,258	245,294	4,828	0,008
Col 1	108845,893	6298,576	17,281	<0,001

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	20732999,686	20732999,686	298,634	<0,001
Residual	4	277704,388	69426,097		
Total	5	21010704,074	4202140,815		

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,430)

Constant Variance Test: Passed (P = 0,060)

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,999

Ajuste realizado en el ensayo de la CRP* para una concentración de MPC 1,5 M.

Linear Regression

Data source: Data 1 in Notebook1

$$\text{Col 3} = 343,808 + (81089,107 * \text{Col 1})$$

N = 6

R = 0,985 Rsqr = 0,971 Adj Rsqr = 0,964

Standard Error of Estimate = 292,651

	Coefficient	Std. Error	t	P
Constant	343,808	272,444	1,262	0,276
Col 1	81089,107	6995,704	11,591	<0,001

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	11507025,770	11507025,770	134,358	<0,001
Residual	4	342579,147	85644,787		
Total	5	11849604,917	2369920,983		

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,290)

Constant Variance Test: Passed (P = 0,060)

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,989

Ajuste realizado en el ensayo de la CRP* para una concentración de MPC 1,3 M.

Linear Regression

Data source: Data 1 in Notebook1

$$\text{Col 2} = 4657,333 + (487017,500 * \text{Col 1})$$

N = 3

R = 0,975 Rsqr = 0,950 Adj Rsqr = 0,900

Standard Error of Estimate = 3954,905

	Coefficient	Std. Error	t	P
Constant	4657,333	6041,218	0,771	0,582
Col 1	487017,500	111861,615	4,354	0,144

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	296482556,633	296482556,633	18,955	0,144
Residual	1	15641276,042	15641276,042		
Total	2	312123832,674	156061916,337		

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P = <0,001)

Constant Variance Test: Failed (P = <0,001)

Power of performed test with alpha = 0,050: <0,001

The power of the performed test (<0,001) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists.
Negative results should be interpreted cautiously.

Ajuste realizado para el cálculo del límite de detección (LOD).

Linear Regression

Data source: Data 1 in Notebook3

$$\text{Col 2} = 25750,058 + (2731,872 * \text{x column 1})$$

N = 4

R = 0,978 Rsqr = 0,957 Adj Rsqr = 0,935

Standard Error of Estimate = 1438,105

	Coefficient	Std. Error	t	P
Constant	25750,058	1171,208	21,986	0,002
x column 1	2731,872	410,887	6,649	0,022

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	91423306,699	91423306,699	44,205	0,022
Residual	2	4136290,903	2068145,452		
Total	3	95559597,602	31853199,201		

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,770)

Constant Variance Test: Failed (P = <0,001)

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,615

Ajuste realizado para el cálculo de las concentraciones de SYM44 finales (tras el lavado).