

qPCR y RT-qPCR con garantía de éxito para el análisis del coronavirus SARS-CoV-2

Controltecnica

El primer caso conocido del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 se produjo el 1 de diciembre de 2019. El 31 de diciembre del mismo año, las autoridades chinas notificaron a la OMS la existencia de múltiples casos similares a la gripe en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, cuya expansión continúa siendo estrechamente monitorizada. El 11 de febrero de 2020, la Organización Mundial de la Salud le dio el nombre a esta patología: enfermedad del coronavirus 2019 (abreviado "covid-19", de coronavirus disease 2019).

Desde entonces, se han confirmado más de 2.165.000 casos en todo el mundo hasta la fecha (aprox. 20 de abril), y la cifra sigue aumentando. Para responder a la alerta mundial de pandemia, y poder poner freno a la enfermedad, se hizo patente la necesidad de diagnosticarla de manera eficaz e inequívoca para reducir la propagación y el impacto del virus en nuestra sociedad. La técnica más ampliamente utilizada y aceptada para el diagnóstico de la enfermedad en la actualidad, es la PCR en tiempo real, también conocida como qPCR, Real Time PCR o PCR cuantitativa.

La reacción en cadena de polimerasa (RCP, o PCR de sus siglas en inglés) ha revolucionado la biología molecular; sus insuperables características de sensibilidad, especificidad, eficiencia, fidelidad, velocidad, riesgo mínimo de contaminación y relativa sencillez de uso han puesto al alcance de cualquier laboratorio de investigación y diagnóstico la capacidad de realizar ensayos moleculares esenciales (1). Mientras que la PCR es un ensayo cualitativo (respuesta afirmativa/negativa a una serie de preguntas), la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) permite realizar mediciones cualitativas y cuantitativas de genes específicos en una muestra de ácido nucleico. Las grandes posibilidades

de qPCR y RT qPCR han fomentado la aparición de una gran cantidad de aplicaciones en una amplia gama de disciplinas además de la investigación básica. La PCR en tiempo real ha transformado el modo en que los laboratorios de microbiología diagnostican patógenos humanos (2), incluida la evaluación de la carga viral y bacteriana, así como la detección de enfermedades emergentes como nuevas cepas de gripe, o la más reciente, el SARS-CoV-2.

La importancia de las buenas prácticas GLP

Puesto que existen varios parámetros experimentales que pueden tener un impacto considerable en la calidad de los resultados de qPCR y RT qPCR, es determinante la aplicación de una serie de buenas prácticas normalizadas, incluido el empleo de controles rigurosos, la validación y la interpretación no subjetiva de la información. Por ejemplo, una leve diferencia en el pipeteo, la falta de calibración de los instrumentos, el uso inadecuado de genes de referencia, la cuantificación incorrecta y/o la utilización de moldes de ácidos nucleicos impuros pueden generar resultados equívocos.

Las directrices MIQE (siglas abreviadas en inglés de “información mínima necesaria para la publicación de experimentos PCR cuantitativa en tiempo real”) proporcionan un conjunto de buenas prácticas que garantizan la fiabilidad de los resultados de qPCR en cualquier aplicación y definen un conjunto de información esencial, así como una serie de datos deseables que ayudan a garantizar la validez de los resultados (3).

Estas pautas apuntan a distintas categorías generales, incluidas la preparación de muestras, el control de calidad de los ácidos nucleicos, la transcripción inversa, el ensayo de qPCR y el análisis de los datos.

Atención a los pasos previos a la PCR

Para garantizar la validez de los resultados es imprescindible prestar la máxima atención a los pasos de extracción y preparación de muestras antes de las reacciones de transcripción inversa y qPCR. Si el material de partida no está bien caracterizado, puede que los datos de qPCR no sean fiables.

En las directrices MIQE se señala que el uso de equipos como el espectrofotómetro Nanodrop One (Thermo Scientific) (Figura 1) es un método de uso común en la cuantificación de ácidos nucleicos y se recomienda medir todas las muestras de un experimento con un único método, para asegurar la consistencia al comparar datos.



Figura 1. Espectrofotómetro NanoDrop ONE, recomendado en las directrices MIQE

Las directrices también hacen referencia a otras tecnologías como el análisis microfluídico o la ECG electroforesis capilar en gel (por ejemplo, equipos de la marca BiOptic, como el QSep1TM, Figura 2), apta para evaluar la integridad del ARN.

Además, se menciona el análisis espectral de absorbancia de la muestra de ácido nucleico como indicativo de su pureza (3).

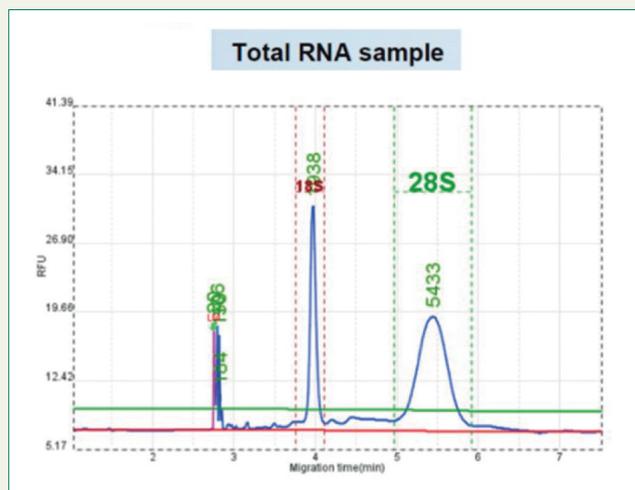
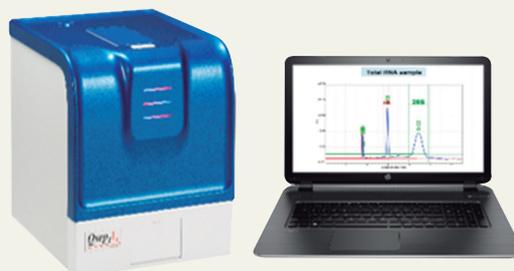


Figura 2. Analizador de fragmentos por CEG de la marca BiOptic, modelo QSep1

La fiabilidad comienza con la cuantificación

La cuantificación precisa de los moldes como medida de control de calidad es básica para garantizar resultados de qPCR válidos. Cuando se utiliza la qPCR para la cuantificación absoluta de secuencias target, los valores de las muestras medidas deben ceñirse a la curva estándar. Sin una precisa cuantificación mediante espectrofotometría de la muestra desconocida, es posible que la cuantificación de secuencias target mediante qPCR no resulte fiable, puesto que la curva de calibración no será lineal en concentraciones de molde muy altas o muy bajas, y la variabilidad de Cq puede resultar considerablemente alta en concentraciones bajas. Una determinación precisa de la concentración de muestra es fundamental para garantizar que los valores Cq resultantes se ceñirán a la porción lineal de la curva de calibración y, por tanto, serán precisos y repetibles.

Cuando se utiliza la cuantificación relativa para determinar cambios en la expresión génica en diversas condiciones, la presencia de grandes diferencias en la cantidad de molde entre las muestras experimentales y las de control aumentará el error potencial en las proporciones de expresión calculadas, mientras que el empleo de cantidades de molde muy bajas incrementará la variabilidad del resultado (Figura 3).

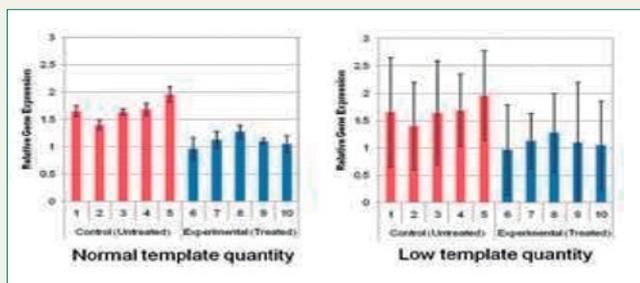


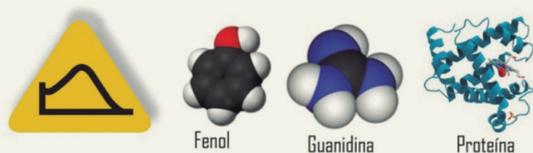
Figura 3. Cantidad de molde vs muestras

El método tradicional de medición de concentraciones de ácido nucleico es la determinación de la absorbancia de luz UV a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro. Por lo general, la cuantificación se realiza tras la extracción de ADN/ARN. Si se realiza la transcripción inversa con los mismos kits de RT y el mismo tipo de muestra, no es necesario cuantificar el ADN después de la RT.

El espectrofotómetro de UV-Vis NanoDrop ONE permite una medición rápida de volúmenes de muestra muy pequeños (de 0,5 – 1 μ L) con un rango dinámico de 2-27.500 ng/ μ L para ADN sin necesidad de cubetas ni diluciones. Este espectrofotómetro permite conocer la concentración de ADN/ARN, así como datos espectrales (de absorbancia) completos, y también la existencia de contaminantes que puedan afectar las aplicaciones "downstream" dentro del protocolo del laboratorio.

La pureza del molde es esencial

Las evaluaciones de pureza se realizan de forma rutinaria con las proporciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . La proporción A_{260}/A_{280} , indicadora de la posible presencia de proteínas, debe aproximarse a 1,8 en ADN puro y a 2,0 en ARN puro, mientras que ambos deben tener una proporción A_{260}/A_{230} de entre 1,8 y 2,2.



En algunas ocasiones, estas proporciones pueden hallarse en dichos rangos aceptables en el caso de muestras impuras, de modo que es importante no dejar de examinar los datos espectrales, y contar con la tecnología Acclaro™ (Figura 4) es esencial para realizar una evaluación completa de la pureza de la muestra.

La tecnología Acclaro™ y el espectro pueden arrojar información adicional sobre posibles contaminantes químicos introducidos mediante los procedimientos de extracción o

mediante los kits, como el fenol, el glucógeno, la guanidina o el EDTA. Muchos de estos contaminantes actúan como inhibidores de la PCR. El EDTA, por ejemplo, puede reducir la concentración de Mg^{2+} , cofactor crítico para la actividad de las DNA polimerasas, mientras que el fenol, las sales de guanidina y el glucógeno u otros polisacáridos procedentes de fuentes vegetales, también pueden inhibir la PCR. La tecnología Acclaro™ está diseñada para facilitar su detección en las muestras.

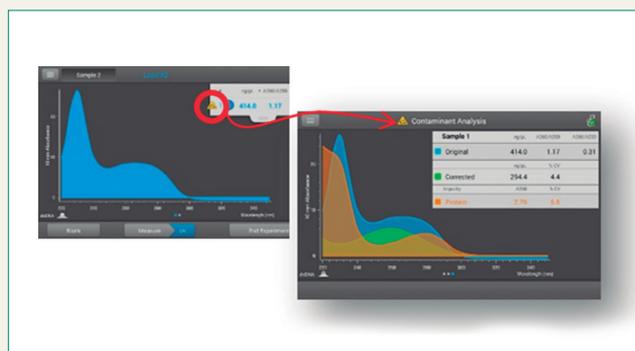


Figura 4. Ejemplo de detección de contaminantes con la tecnología Acclaro™

El efecto de un contaminante en el espectro también puede darse en función de su concentración. Por ejemplo, una concentración muy baja de fenol tiene un impacto casi nulo en el espectro de una muestra de ADN (lo que no significa que no tenga impacto en las aplicaciones posteriores que se le quieran dar a esa muestra), pero sí es detectable mediante la tecnología Acclaro™.

Conclusiones

La PCR abanderó algunos de los más espectaculares avances que ya se consideran corrientes en Biología, y la PCR en tiempo real ha permitido el desarrollo de un gran número de aplicaciones de última generación en una vasta gama de sectores, desde el diagnóstico clínico a las pruebas alimentarias.

Las directrices MIQE constituyen una hoja de ruta para la obtención de resultados de qPCR y RT-qPCR repetibles y fiables en aplicaciones cruciales como el diagnóstico de enfermedades como la COVID-19.

Es fundamental centrarse en los pasos previos a la PCR para obtener datos válidos, puesto que si el material inicial es poco fiable, los resultados tampoco lo serán. Los dos factores clave previos a la PCR para tener éxito son una cuantificación adecuada y la evaluación de la pureza.

Con un espectrofotómetro como el NanoDrop ONE, es posible determinar con precisión y fiabilidad la concentración y pureza

del material inicial, utilizando apenas 1 μL de muestra. Además de determinar las concentraciones de ácidos nucleicos, el espectrofotómetro NanoDrop ONE es capaz de realizar un análisis de los posibles contaminantes presentes en la misma y determinar su concentración.

El coste de omitir los controles de calidad en los pasos previos a la PCR y de no respetar las buenas prácticas sugeridas en las directrices MIQE, puede resultar muy alto: los ensayos son caros, la reextracción y limpieza de las muestras producen retrasos, en caso de ser posibles y no haberse quedado sin la cantidad suficiente de la preciada y/o delicada muestra biológica, y la obtención de falsos negativos puede llegar a costar vidas humanas.

Además, la observación de las buenas prácticas de laboratorio GLP, el almacenamiento y conservación en las condiciones adecuadas de frío de las muestras, alícuotas y reactivos (evitando los ciclos de congelación/descongelación que realizan los equipos domésticos) garantiza la validez de los resultados y la obtención de datos de diagnóstico fiables.

Referencias

1. *A-Z of Quantitative PCR* (Editor: S.A. Bustin), International University Line (IUL), La Jolla, CA, EEUU, 2004.
2. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF, Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbial Rev.* 19, 165-256 (2006).
3. Bustin SA, Benes V, Carson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*, 2009, 55, 611-622.

www.cic-controltecnica.com

(Véase anuncio en la sección Guía del Comprador.)