

PCR en Tiempo Real

Introducción

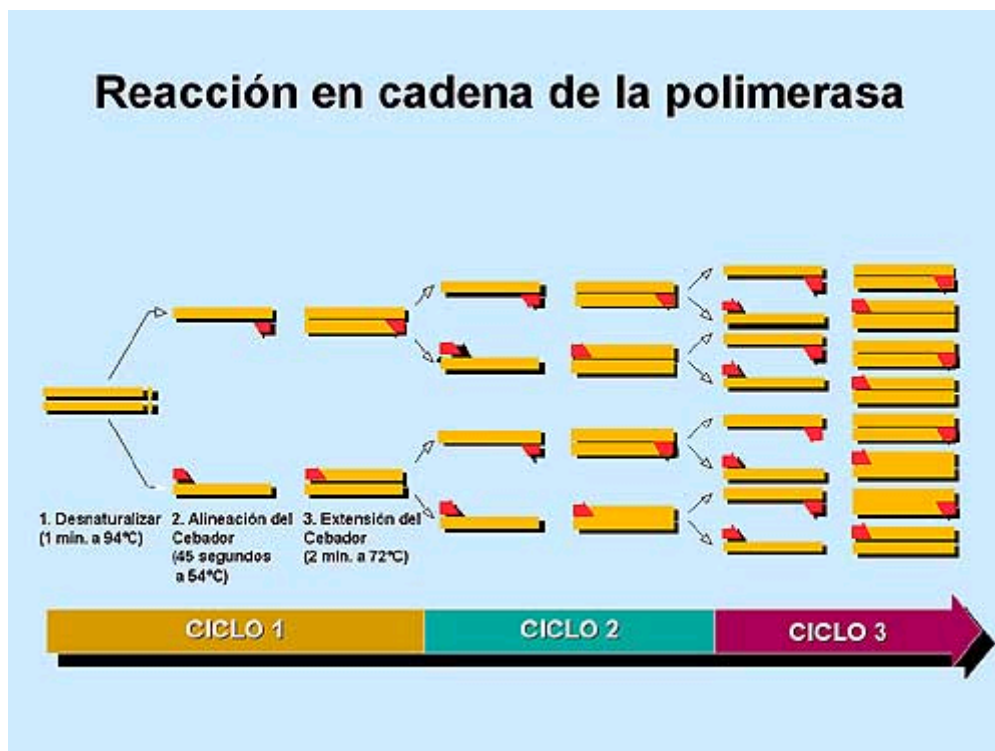


Introducción general

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.



A continuación desarrollamos un programa monográfico sobre la PCR Cuantitativa en los siguientes apartados:

Consideraciones generales

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras clínicas, todavía no se ha encontrado un método automático universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra.

En esta parte vamos a revisar algunos de los principios básicos que pueden ayudar a desarrollar tanto protocolos nuevos de extracción como a mejorar los ya existentes eliminando el uso de soluciones peligrosas, centrifugaciones y múltiples pasos.

Tabla I. Consideraciones necesarias para seleccionar el método de preparación de la muestra más adecuado.

Consideraciones para desarrollar un método de preparación de la muestra

- Consideraciones de la muestra

- Tipo de muestra: sangre, plasma, suero, esputo, orina, LCR, etc.

- Procesamiento de la muestra durante o después de la recogida (recogida de sangre en tubos con EDTA, citrato, heparina; licuefacción del esputo; etc.)

- Volumen de muestra a procesar

- Nivel de ácido nucleico extraño (fluido seroso *versus* purulento; sangre completa *versus* plasma o suero)

- Propiedades físicas de la muestra (torunda de algodón, fluido, tejido, viscosidad, etc.)

- Presencia o ausencia de inhibidores de la amplificación

- Consideraciones del organismo

- Carga bacteriana dentro de la muestra (número de organismos patógenos por volumen de muestra)

- Resistencia de la pared celular frente a la lisis (dificultad de lisar hongos y especies de *Mycobacterium*)

- Tendencia del microorganismo a lisar espontáneamente (*Mycoplasma*)

- Deseo de esterilizar la muestra durante la preparación de la misma (*Mycobacterium* spp., HCV, HIV, etc)

- Características de los ácidos nucleicos

- RNA *versus* DNA

- Doble cadena *versus* cadena sencilla

- Requerimiento de aislar el RNA sin contaminaciones de DNA (pe, cuantificación de la carga viral de HIV sin amplificar el provirus)

Criterios para optimizar el método de preparación de la muestra

- Elección de la muestra más apropiada
- Sensibilidad deseada del ensayo
- Volumen requerido de muestra para procesar
- Número de tests diferentes a realizar sobre la misma muestra procesada
- Estabilidad de la diana durante la recogida y procesamiento de la muestra (inactivación de nucleasas)

- Evitar el uso de soluciones tóxicas
- Evitar la centrifugación excesiva
- Eliminación de los inhibidores de la amplificación mediante diluciones
- Cantidad mínima de muestra a manejar
- Robustez del protocolo
- Ausencia de equipamiento muy específico

El método ideal de preparación de la muestra representa un equilibrio entre los requerimientos de la muestra y el microorganismo diana a detectar. Una vez que se ha elegido el microorganismo, la patogénesis de la infección generalmente dicta la muestra más adecuada y el número de microorganismos que probablemente estén en dicha muestra. Por otro lado, la determinación de la sensibilidad deseada del ensayo y el número de tests a realizar en la muestra procesada, dictan el volumen requerido de muestra para procesar.

Tomando el cultivo microbiológico como técnica de referencia, éste ha dirigido la selección de la muestra más adecuada en muchas de las enfermedades infecciosas, pe, sangre o plasma para el VIH y HCV, torundas de algodón endocervicales para *Chlamydia*, etc. Para maximizar la probabilidad de diagnosticar una infección, debería muestrearse el mayor volumen de muestra posible. Sin embargo, ya que los volúmenes de reacción habituales son de 100µL o menos, hay que llegar a un equilibrio entre los complicados y tediosos pasos de concentración de la muestra (precipitación con etanol, captura de ácidos nucleicos, centrifugación) y la sensibilidad del ensayo.

El tamaño de la muestra se hace crítico cuando el número de agentes infecciosos por volumen de test es muy pequeño. Si el método de amplificación es lo suficientemente sensible como para detectar el producto generado por una sola molécula diana, la probabilidad de un falso negativo, es decir, de ausencia de la señal específica de amplificación cuando la diana se encuentra presente en la muestra, puede estimarse con la ecuación:

$$P_N = \frac{C^N}{N! \cdot e^C}$$

donde "C" es el número medio de copias de molécula diana en solución, "N" es el número de copias en la muestra y P_N es la probabilidad de detectar N copias.

Tabla II. Probabilidad de obtener un resultado negativo por el bajo número de copias de la diana

Número de copias (C)	% de falso negativo
1	36,7880
5	0,6738
10	0,0045

Los métodos de preparación de la muestra pueden contribuir de muchas formas a la fiabilidad de la detección de la diana en muestras clínicas. Si la eficiencia de recuperación de la diana de un método de preparación es baja, puede ocasionar un elevado número de falsos negativos. Hay un gran número de compuestos en las muestras clínicas que pueden inhibir los sistemas de detección al interactuar con compuestos de la reacción enzimática. Por otro lado, si la concentración de dianas en la muestra es suficientemente elevada, la dilución de la muestra puede eliminar los inhibidores al mismo tiempo que mantiene los ácidos nucleicos a niveles a los cuales la probabilidad de alicuotar cero copias es baja.

Hasta la fecha se ha realizado muy poca investigación y hay pocos datos sobre las sustancias presentes en fluidos biológicos que pueden inhibir las enzimas utilizadas en las reacciones de amplificación. Se sabe que los pigmentos ($0,8\mu\text{M}$) y sus derivados metabólicos son inhibidores de las DNA polimerasas, El líquido cefalorraquídeo (LCR), la orina y los esputos pueden también contener inhibidores de la *Taq* polimerasa aunque no han sido caracterizados. Los polisacáridos ácidos, componentes de las glicoproteínas presentes en los esputos son inhibidores de las polimerasas. Muchos de los reactivos utilizados tradicionalmente en la purificación de los ácidos nucleicos, como el EDTA, el SDS, el cloruro de guanidinio son inhibidores de las enzimas de amplificación, por lo que su uso para solubilizar las membranas celulares o inactivar las nucleasas, requiere pasos adicionales de eliminación o neutralización.

Un problema adicional aparece cuando se utilizan métodos como la lisis alcalina, el hervido y el secado que pueden producir parcialmente DNAs de cadena sencilla, los cuales pueden servir más fácilmente como sustratos inespecíficos para el *annealing* de sondas en condiciones no muy estrictas y, por lo tanto, disminuir la especificidad del sistema de amplificación.

Los patógenos que poseen RNA y DNA a lo largo de su ciclo vital (como el VIH) presentan una cuestión adicional si se desea detectar solamente el RNA viral. La RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) detecta tanto el DNA proviral como el RNA viral a menos que se añadan pasos de eliminación de dicho DNA proviral. Los métodos de amplificación que en teoría son capaces de utilizar solamente moldes de RNA (como la 3SR) no amplifican el DNA proviral a menos que se incluya un paso de desnaturalización en el protocolo de extracción de la muestra.

Otro punto importante en la preparación de la muestra hace referencia a la diferenciación entre microorganismos viables y no viables, ya que los métodos que amplifican los ácidos nucleicos pueden detectar microorganismos muertos, inactivos o en replicación. Esto puede ser una ventaja cuando la viabilidad del microorganismo se pierde rápidamente durante la recogida o el transporte de la muestra o cuando el microorganismo no se puede cultivar. Por otro lado, la discriminación entre microorganismos viables y no viables presenta un grave problema si los no viables permanecen en la muestra una vez que la infección ha desaparecido.