

DETECCIÓN DE COVID-19 POR RT-qPCR

Ref.PCR12

1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes a nivel teórico en algunas variantes de la PCR, como es amplificar fragmentos de ARN (RT-PCR) y cuantificar la concentración de una molécula concreta de ácido nucleico presente en una muestra (PCR cuantitativa o PCR a tiempo real).

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología molecular y realizarán una simulación mediante PCR estándar para la detección del Covid-19.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 COVID-19

COVID-19, acrónimo de coronavirus disease 2019, también es conocida como coronavirus, es una enfermedad infecciosa causada por el virus del SARS-CoV-2.

La enfermedad se detectó por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad china de Wuhan (provincia de Hubei), pero rápidamente se extendió a más de 100 territorios. Declarándose el 11 de marzo de 2020 como pandemia por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La transmisión de este virus se produce a través de las pequeñas gotas que se emiten al hablar, estornudar o toser emitidas por el portador y que pasan a la otra persona mediante la inhalación, o bien se depositan sobre las superficies, infectándose con el contacto de las manos con los objetos contaminados y posteriormente toman contacto con las mucosas orales, nasales y oculares. Ésta es la principal vía de transmisión ya que pueden permanecer días en los fómites. Estas gotitas reciben el nombre de microgotas de Flügge.

La sintomatología de la enfermedad es muy similar a la de la gripe, hecho que ha complicado la detección de los primeros casos en los diferentes países. Incluyen fiebre, tos seca, disnea, mialgia y fatiga. En los casos más graves puede producir una neumonía, síndrome de dificultades respiratoria aguda, sepsis y choque séptico. No existe tratamiento específico, sino que las medidas terapéuticas principales consisten en aliviar los síntomas, con la toma de antipiréticos y el mantenimiento de las funciones vitales con respiradores. Pero en muchos de los casos, sobre todo en personas jóvenes no presentan ninguna sintomatología, aun estando infectados, es lo que se denomina portadores de la enfermedad.

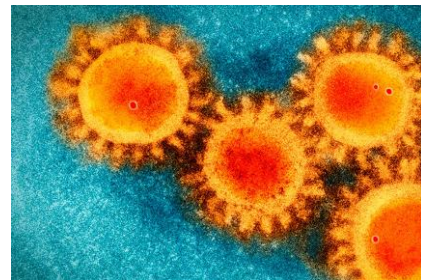
Los síntomas aparecen entre los dos y catorce días después de haber estado en contacto con el virus. Es decir que tiene un período ventana de 15 días. Este contagio se puede prevenir con el lavado frecuente de manos, desinfección de manos y superficies, cubriéndose al toser o estornudar la boca con el brazo o con

un pañuelo de un solo uso. El uso de mascarillas está en controversia, la OMS declara que no es necesaria, mientras que la CDC está a favor. Es sobre todo útil en ambientes cerrados donde la distancia entre las personas no es la recomendada y por tanto al llevarla las gotitas que se liberan al hablar no entran en contacto con las otras personas.

Características del virus

COVID-19 es un tipo de Orthocoronavirinae. Parece tener un origen zoonótico, es decir, que pasó de un huésped animal a uno humano. El genoma del virus está formado por una sola cadena de ARN, y se clasifica como virus ARN monocatenario positivo. El ARN del virus SARS-CoV-2 codifica 4 proteínas estructurales: la proteína S (proteína espina, "spikeprotein"), la proteína E (envoltura), la proteína M (membrana) y la proteína N (nucleocápside).

La proteína N está en el interior del virión asociada al RNA viral, y las otras tres proteínas están asociadas a la envoltura viral. La proteína S se ensambla en homotrímeros, y forma estructuras que sobresalen de la envoltura del virus, dándole la conformación de pequeñas espinas que salen de la superficie. La proteína S contienen el dominio de unión al receptor celular y por lo tanto es la proteína determinante del tropismo del virus. Además, es la proteína que tiene la actividad de fusión de la membrana viral con la membrana celular, momento en el cual se libera el genoma viral en el interior de la célula que va a infectar.

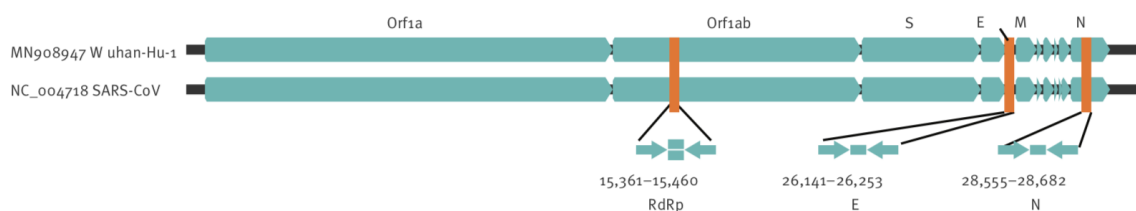


El SARS-CoV-2 penetra en la célula empleando como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2 por sus siglas en inglés), una exopeptidasa de membrana presente fundamentalmente en el riñón, los pulmones y el corazón.

Detección del virus

La prueba de elección para el diagnóstico de COVID-19 es la PCR cuantitativa o a tiempo real realizada en muestras de sangre o de muestras respiratorias tomadas con hisopos. Los resultados se obtienen a las pocas horas o al día. **Es la técnica de elección ya que es la que presenta más sensibilidad y especificidad.** Esta técnica se ha realizado sólo a aquellas personas que presentan síntomas o que están en fases críticas de la enfermedad. Aunque se puede realizar a cualquier persona presente síntomas o no, pudiendo así detectar a todos los pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Para la detección del virus se pueden emplear distintos genes que se amplifican en la PCR. Estos genes pueden ser el gen E, el N, el S y el M. Aunque tal y como podemos ver en el esquema a continuación, también puede amplificarse el gen RdRp. Actualmente, los genes de elección para la detección del coronavirus normalmente son el gen E y el gen RdRp (gen de la polimerasa de RNA). El gen E es común entre los betacoronavirus, mientras que el gen RdRp es específico de Covid19. De esta forma podemos detectar con seguridad que se trata del covid-19 y no de otro betacoronavirus.



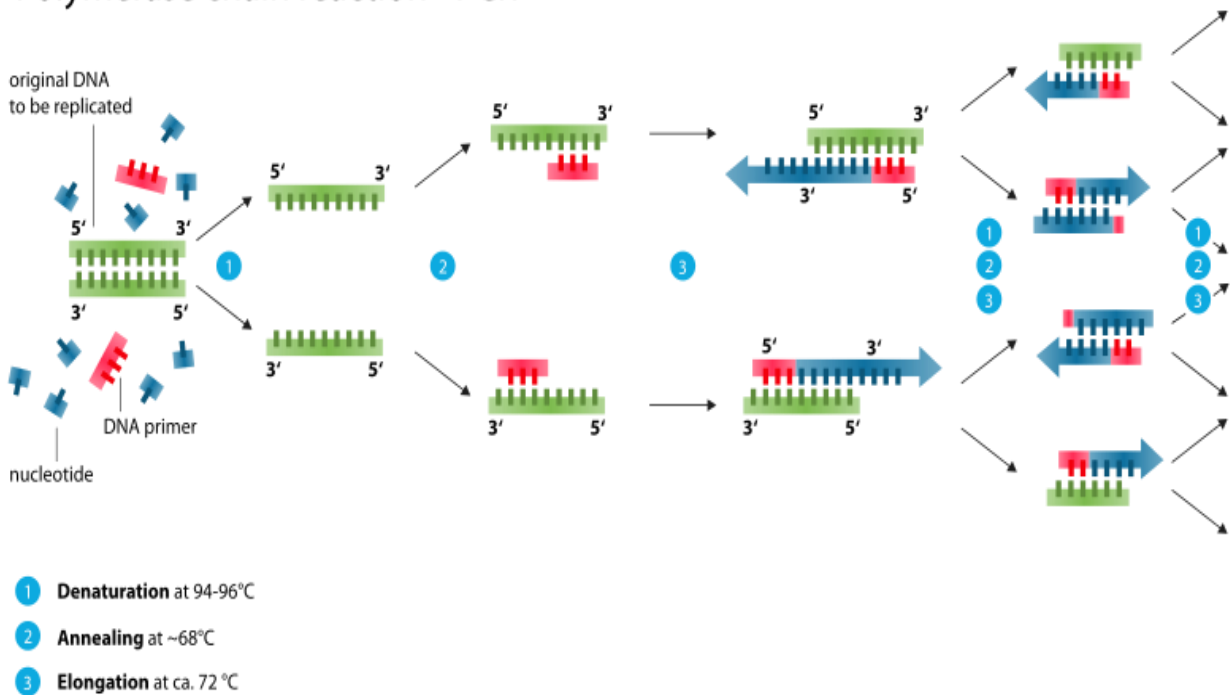
E: envelope protein gene; M: membrane protein gene; N: nucleocapsid protein gene; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase gene; S: spike protein gene.

2.2 PCR

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como "target" (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como "primers" (cebadores). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN, Taq polimerasa y los 4 dNTPs en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de la reacción es de 25-50 μl . En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) la una de la otra a 94°C , mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre $45\text{-}65^{\circ}\text{C}$ que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.

Polymerase chain reaction - PCR



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.3 RT-PCR

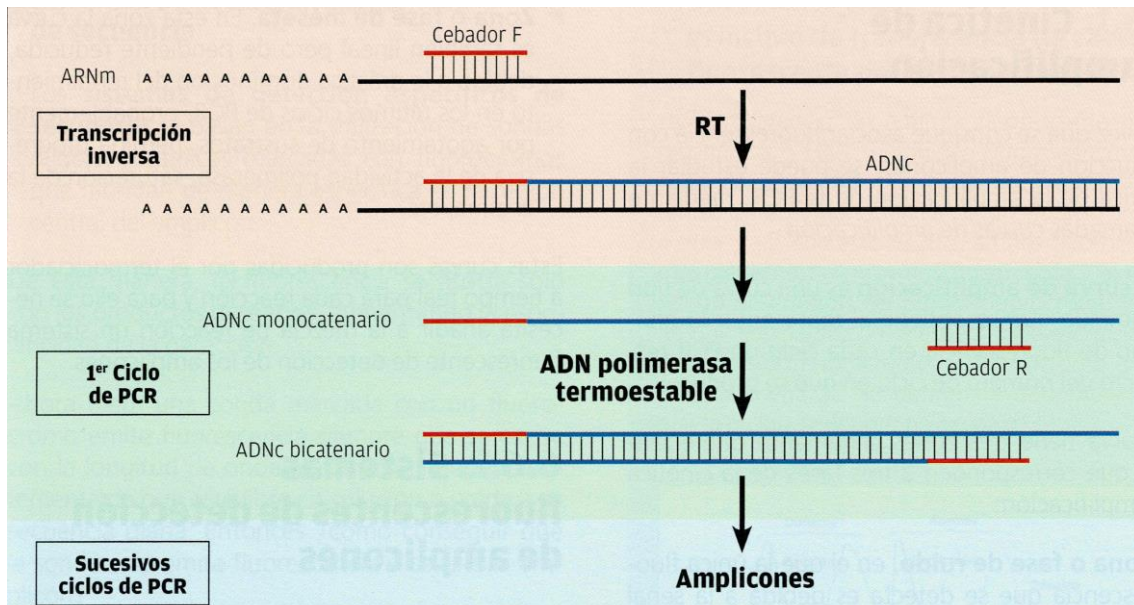
La RT-PCR retrotranscripción es una PCR que se utiliza para generar fragmentos de DNA, en este caso llamado cDNA **a partir de muestras de RNA**. Esto es debido a que en el caso de los virus RNA, es decir, que su material genético es el ARN, para poder hacer la detección se necesita previamente este paso.

No se debe confundir la PCR a tiempo real con la RT-PCR. La RT-PCR se trata de una PCR donde se realiza la retrotranscripción.

Dado que las ADN polimerasas termoestables utilizan ADN como molde, para amplificar ARN mediante PCR es necesario realizar:

1. Un paso de síntesis de ADNc mediante una retrotranscriptasa (RT) o transcriptasa inversa.
2. Un segundo paso en el que una ADN polimerasa termoestable utiliza el ADNc como molde y lo amplifica.

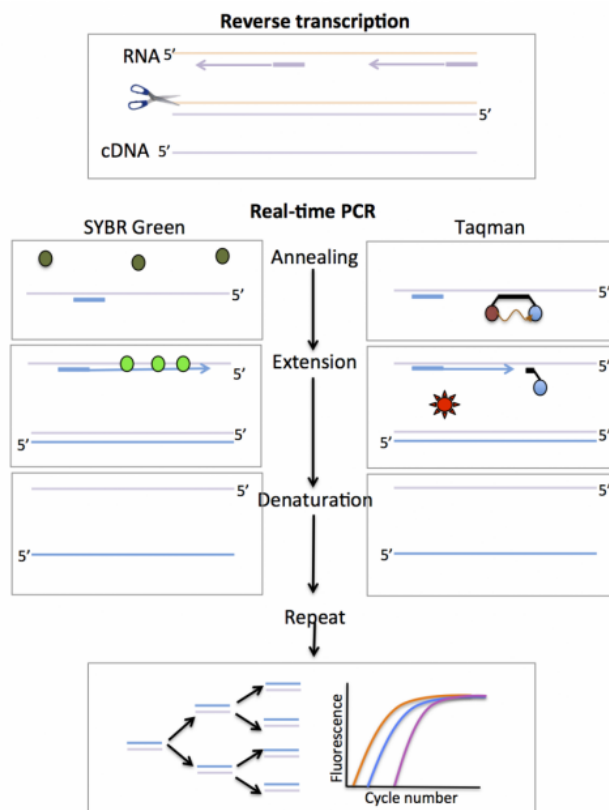
Estos 2 pasos se pueden realizar en 2 tubos independientes o en el mismo tubo.



2.4 PCR a TIEMPO REAL

La PCR a tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y al mismo tiempo cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. Para ello, al igual que en una PCR convencional se necesita un molde de ADN, un par de cebadores específicos, dNTPs, tampón de la reacción y una ADN polimerasa termoestable. Además, a diferencia de la convencional se le añade una sustancia marcada con un fluoróforo. El termociclador en este caso está dotado de un sensor de fluorescencia que tras cada amplificación mide la fluorescencia del fluoróforo.

El proceso de PCR, por lo general tal y como se ha explicado en el apartado anterior, consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten 25-40 veces, llamados ciclos, cada uno con un mínimo de tres etapas: la primera, en torno a los 95 °C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; la segunda, a una temperatura en torno a los 50-60 °C, permite el alineamiento de los cebadores al ADN molde; la tercera, a 68-72 °C, facilita la polimerización por parte de la ADN polimerasa. Dado el pequeño tamaño de los fragmentos amplificados usualmente en este tipo de PCR puede omitirse el último paso, pues la enzima es capaz de amplificar durante la rampa entre la temperatura de anillamiento y la de desnaturalización. Además, algunos termocicladores añaden a cada ciclo unos segundos a otra temperatura, por ejemplo 80 °C, a fin de reducir el ruido por la presencia de dímeros de cebadores cuando se emplea un colorante inespecífico. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, tales como la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y desoxirribonucleótidos (dNTPs) en la reacción o la temperatura de unión de los cebadores.



El proceso de PCR, por lo general tal y como se ha explicado en el apartado anterior, consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten 25-40 veces, llamados ciclos, cada uno con un mínimo de tres etapas: la primera, en torno a los 95 °C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; la segunda, a una temperatura en torno a los 50-60 °C, permite el alineamiento de los cebadores al ADN molde; la tercera, a 68-72 °C, facilita la polimerización por parte de la ADN polimerasa. Dado el pequeño tamaño de los fragmentos amplificados usualmente en este tipo de PCR puede omitirse el último paso, pues la enzima es capaz de amplificar durante la rampa entre la temperatura de anillamiento y la de desnaturalización. Además, algunos termocicladores añaden a cada ciclo unos segundos a otra temperatura, por ejemplo 80 °C, a fin de reducir el ruido por la presencia de dímeros de cebadores cuando se emplea un colorante inespecífico. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, tales como la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y desoxirribonucleótidos (dNTPs) en la reacción o la temperatura de unión de los cebadores.

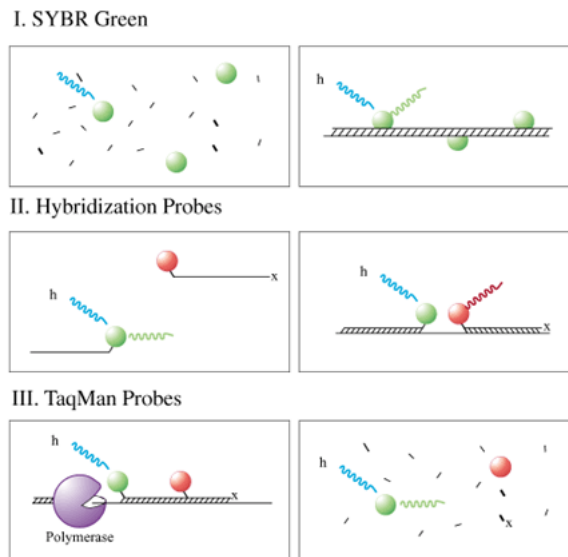
Podemos encontrar diferentes aplicaciones de la PCR a tiempo real entre ellas:

- **Cuantificación absoluta:** expresan el resultado final (cantidad de secuencia diana en la muestra) en unidades de concentración, por ejemplo, ug/ul o en número de copias por unidad de volumen. Este tipo de cuantificación requiere la elaboración de una curva de calibración con patrones que tengan una concentración conocida.
- **Cuantificación relativa:** consiste en expresar la concentración de la secuencia diana en relación con la concentración de un gen de referencia que está presente en todas las muestras con un número constante de copias. Este tipo de pruebas no es necesaria una curva de calibración con patrones.
- **Genotipado:** sirve para determinar la información genética de un organismo y diferenciarlo del resto, sobre todo se usan para el estudio de polimorfismos.

También en cuanto a los fluoróforos utilizados o la molécula que emite señal pueden ser distintas:

- **Agentes intercalantes:** son agentes que se intercalan en el ADN tanto en el surco mayor como en el menor y emiten una fluorescencia de 1000 veces más que cuando no está intercalado. Un ejemplo es el SYBRGreen.

- Fluorescentes específicos:
 - Hibridación: emisor y receptor a poca distancia
 - Hidrólisis: emisión cuando fluorescente se aleja del quencher (quencher es el que impide la emisión de fluorescencia), un ejemplo son las sondas Taqman.
 - Molecular Beacon: emisión cuando el fluorescente se aleja del quencher, ya que la región central permanece unida al ADN.



3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

En esta práctica se hará una simulación de la técnica de detección de Covid19 mediante la técnica de PCR convencional. Para ello se suministrarán tres muestras de pacientes a los cuáles se les realizará la técnica de PCR para poder ver si son positivos o no a Covid19.

4. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10x	100ml	Temperatura ambiente
Agarosa	1,5 gr	Temperatura ambiente
Mix PCR detección Covid-19	2 x 350 µl	Conservar a -20°C
Control positivo ADN Covid-19	10 µl	Conservar a -20°C
Control negativo ADN Covid-19	10 µl	Conservar a -20°C
Muestra paciente 1	75 µl	Conservar a -20°C
Muestra paciente 2	75 µl	Conservar a -20°C
Muestra paciente 3	75 µl	Conservar a -20°C
GELSAFE tinción ADN	25 µl	Conservar a -20°C

Tampón de electroforesis 10 X para preparar Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo para hacer los gels y el de la cubeta.

5. PRÁCTICA

5.1 EXTRACCIÓN DNA

El paso previo a cualquier estudio genético suele ser el aislamiento del ADN genómico, esto se puede llevar a cabo de diferentes formas (métodos caseros, kits comerciales, etc.) y a partir de diferentes muestras (sangre, tejido, etc.).

Para la realización de esta práctica no es necesario la extracción del ADN de los alumnos, ya que suministran muestras de ADN genómico humano.

5.2 REACCIÓN DE LA PCR

NOTA: Utilizar siempre puntas con filtro y cambiar de punta cada vez que se realiza una acción para evitar contaminaciones que puede dar lugar a falsos resultados.

1. Utilizar 2,5 μ l (100-250ng) del ADN de cada extracción de ADN. Importante:
 - a) Preparar un control negativo de amplificación, para ello colocar 2,5 μ l de agua libre de nucleasas en lugar del ADN, esto sirve para saber si los reactivos o micropipetas y puntas pueden estar contaminados con ADN, no se ha de amplificar nada.
 - b) Preparar las reacciones de amplificación con las muestras de los paciente 1, 2 y 3 suministradas, para ello colocar 2,5 μ l del ADN proporcionado en el kit
2. Las concentraciones típicas de los "primers" y parámetros utilizados dependerá de cada sistema utilizado. Una concentración final típica de "primers" es 0,5 μ M.

Reactivos	Volumen
Mix PCR	22,5 μ l
ADN (100-250ng)	2,5 μ l
Volumen total	25 μ l

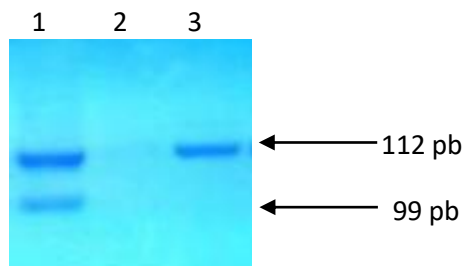
3. Mezclar bien, el colorante rosa está incluido en la polimerasa facilitando el proceso.
4. Realizar el proceso de amplificación. Importante: Para la activación de la Polimerasa "Hot Star" es necesario programar un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, después programar los 35 ciclos específicos de cada producto a amplificar.

Programa PCR Covid-19

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Hot Star	95°C	10 minutos
Ciclos PCR Realizar 35 ciclos	95°C	30 segundos
	62°C	30 segundos
	72°C	45 segundos
Extensión final	72°C	10 minutos
Final	4°C	

5. El producto de la PCR puede ser sembrado directamente en un gel de agarosa al 1%, ya que el colorante rojo actúa como tampón de carga.
NOTA: Utilizar el método de detección o tinción del ADN que se use en el laboratorio. Le recomendamos el uso del DANABLUE o GELSAFE, nuestros métodos no tóxicos.

6. RESULTADOS

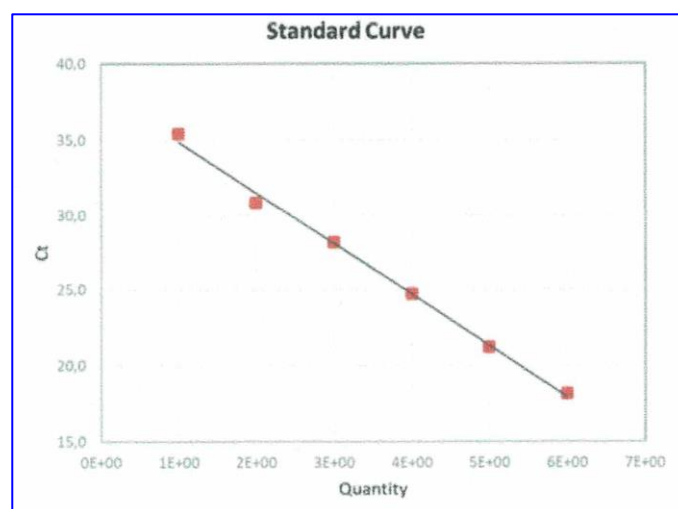


Gel de agarosa 1%

- 1: Muestra positiva al gen E (121 pb) y gen RdRp (99 pb)
- 2: Muestra negativa en Covid19
- 3: Muestra positiva al gen E (99pb)

Se presenta un ejemplo del resultado de la amplificación de diferentes muestras de pacientes que se les ha realizado la prueba del Covid19. En él podemos ver que el paciente 1 es positivo a Covid-19, ya que presenta las dos bandas de amplificación de los dos genes de elección, uno es el gen E común entre los betacoronavirus y el otro es el gen RdRp específico para Covid-19. Por otro lado, el paciente 2 es negativo a Covid19, ya que no se amplifica ningún de los dos genes. Finalmente, el paciente 3 es negativo a Covid-19, ya que no presenta la banda de 99pb que es la específica para este virus, pero si presenta la banda de 122 pb que es la que detecta betacoronavirus. Esto puede ser debido a que realmente sea un negativo real o bien que, por cualquier problema durante la PCR, ya sea que los primers no se han unido correctamente, la muestra estaba un poco degradada, ... sea un falso negativo. Por este motivo, en este paciente se le repetiría la PCR para confirmar si se trata de un negativo real.

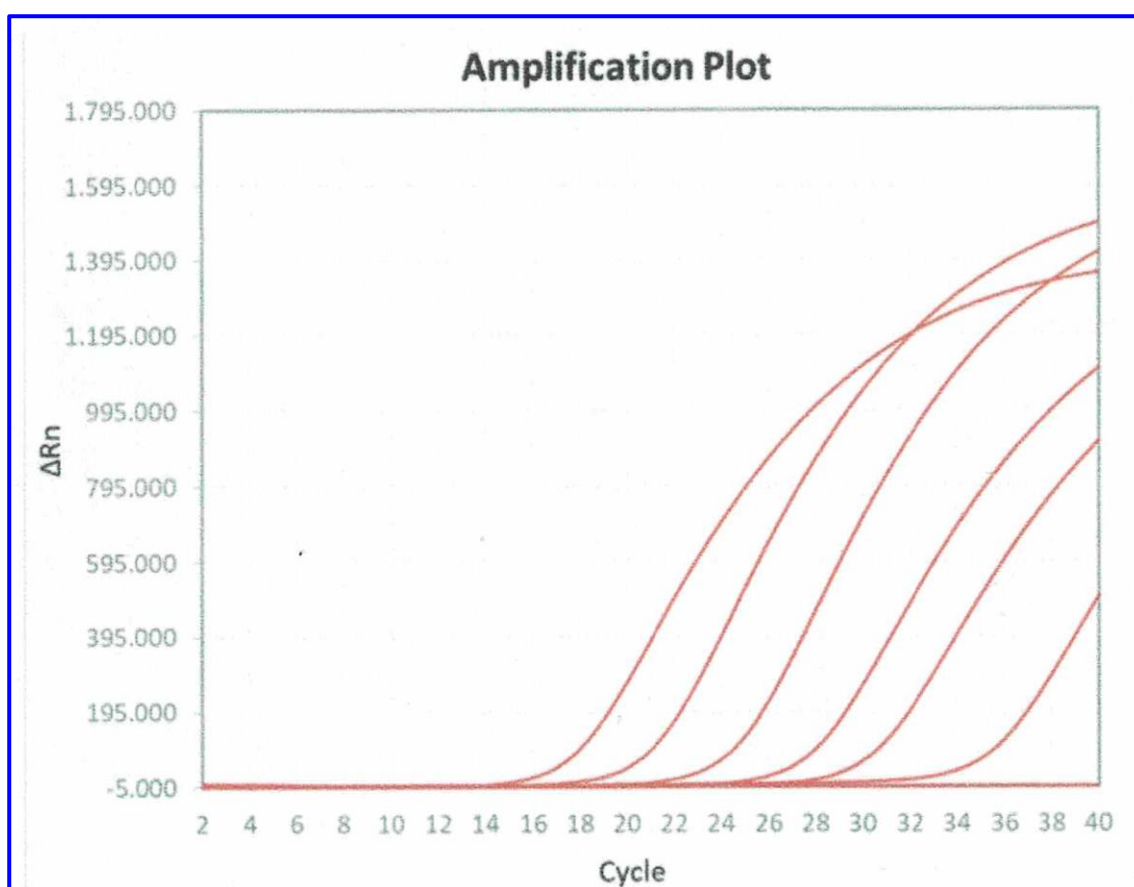
A continuación presentamos los resultados reales utilizando un kit comercial para la detección de Covid-19 por RT-qPCR: CoVID-19 dtec-RT-qPCR Test de GPS



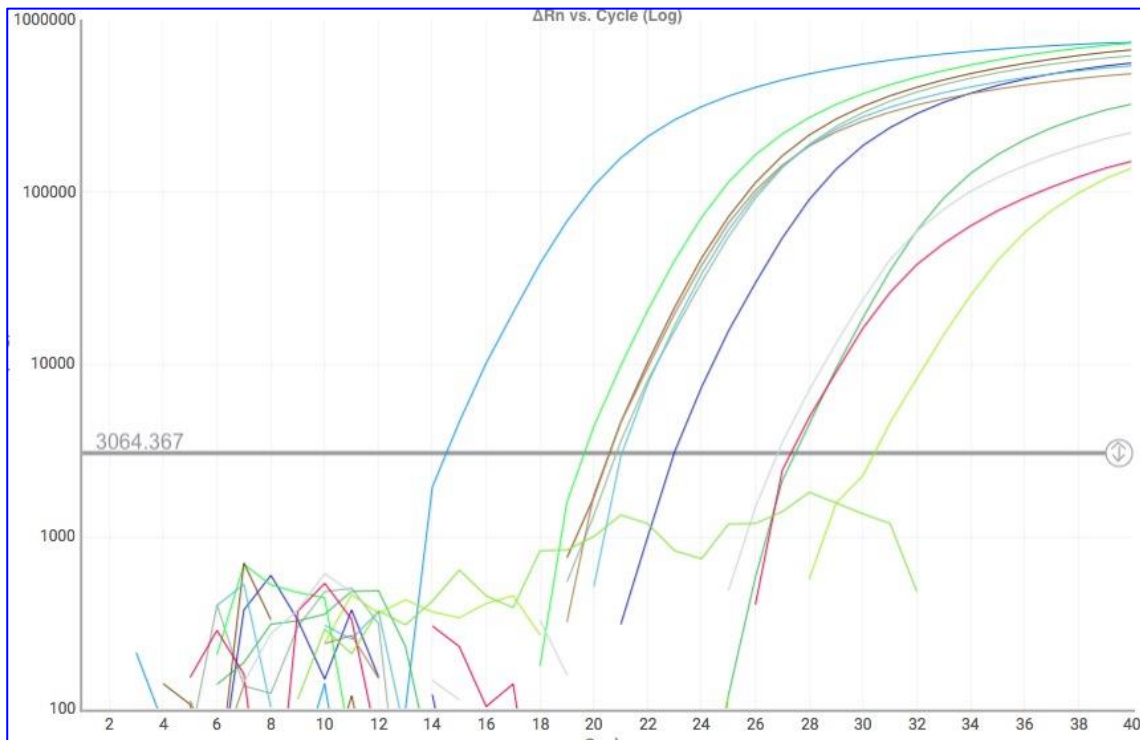
Preparación de la curva estándar con concentraciones conocidas de la diana a amplificar respecto al Ct.

Copias	Ct
10^6	18,1
10^5	21,2
10^4	24,7
10^3	28,2
10^2	30,8
10^1	35,4

Para realizar el cálculo, se detecta el ciclo de PCR en el cual la fluorescencia de la muestra alcanza un valor por encima del límite de detección. **Este ciclo se denomina punto de corte o ciclo umbral, Ct (del inglés Thresholdcycle).**



Curva de amplificación de los diferentes estándares con la forma sigmoide típica que se obtiene al representar la emisión de fluorescencia en cada ciclo de PCR respecto al número de ciclo en que se produce.



Se presenta un resultado real donde se puede observar las curvas de los estándares con muestras positivas y muestras negativas para Covid-19

7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
2. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers"?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde)
3. **¿Qué muestras han dado positivas para Covid 19?**
4. **¿Por qué se realiza una prueba de PCR para la detección de Covid 19? ¿Cuáles son las ventajas de esta técnica?**

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es