

## Entrevista Crowe-Bustin sobre la RT-PCR

David Crowe

[David.Crowe@theinfectiousmyth.com](mailto:David.Crowe@theinfectiousmyth.com)

Hola Soy David Crowe y este es el episodio 251 de The Infectious Myth. Esta semana vamos a tratar un tema muy técnico, la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa).

La RT-PCR es la tecnología principal que se emplea para realizar los test de la COVID-19 también conocido como test del coronavirus.

La COVID-19 (Coronavirus Infectious Disease-19) es la enfermedad infecciosa causada supuestamente por el coronavirus.

El nombre técnico completo del coronavirus es SARS-Cov-2 (Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus-2) o coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave.

El profesor Stephen Bustin, profesor de la Anglia Ruskin University (UK) es un experto reconocido mundialmente en PCR cuantitativa (qPCR) y su investigación se centra en traducir técnicas moleculares en herramientas prácticas y fiables para la realización de diagnósticos.

Mención de los títulos y libros y artículos sobre PCR de Bustin...

Es especialmente destacable un artículo suyo de 2017 sobre la *falta de reproducibilidad* de los ensayos de RT-qPCR en investigación molecular...

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/eci.12801>

... y el desarrollo de las recomendaciones MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments · Guidelines)

**DC** (David Crowe): Bienvenido al programa, Stephen.

**SB** (Stephen Bustin): Gracias.

DC: Poca gente conoce el funcionamiento de la RT-PCR, la técnica empleada para realizar el test del coronavirus.

Podríamos decir que hay cuatro pasos en la realización de la RT-PCR:

1. Extracción de ARN
2. Conversión a ADN complementario

### 3. Multiplicación del ADN mediante PCR

### 4. Secuenciación

SB: En realidad la secuenciación no es parte de la RT-PCR. Primero se hace la RT-PCR para después poder hacer la secuenciación del material genético, que es una técnica separada.

DC: Los términos que usas son qPCR, que es una PCR cuantitativa que se hace en tiempo real y por otra parte RT-qPCR que es una qPCR con transcriptasa inversa.

El problema es que hay dos RT:

- RT (acrónimo de Reverse Transcriptase) como transcriptasa inversa, enzima que convierte el ARN en ADN complementario.
- RT (acrónimo de Real Time) como tiempo real

¿Qué significa PCR en tiempo real?

SB: Las recomendaciones MIQE que desarrollamos lo definen bien.

La RT-PCR es una PCR con transcripción inversa (RT) previa.

Pero cuando hablamos de tiempo real, lo hacemos para diferenciar entre dos tipos de ensayos:

- Los ensayos convencionales (no en tiempo real) en los que el resultado de la PCR se ve al final del proceso en forma de fluorescencia en un gel.
- Los ensayos en tiempo real en los que los resultados de la PCR se van viendo en una pantalla a medida que la reacción avanza. La pantalla muestra una curva que va creciendo a medida que la reacción progresa y se genera más producto.

DC: Entiendo, la cantidad de ADN producido se mide por fluorescencia. En cada ciclo la fluorescencia va aumentando a medida que se va produciendo ADN. Y en la PCR en tiempo real, el resultado se va viendo en la pantalla...

SB: Correcto.

### Primers and probes (cebadores y sondas)

DC: Veamos estos dos términos, primers y probes...

SB: Los **cebadores** (primers) son para delimitar el inicio y el fin de la secuencia diana, la secuencia que se quiere multiplicar. Los cebadores son suficientes para

generar el producto de la PCR (ADN amplificado) que después se puede detectar con un tinte (colorante) fluorescente no específico. Las **sondas** (probes) (que emiten fluorescencia cuando la polimerasa hace la reacción) aportan más fiabilidad porque añaden especificidad al test (las moléculas de tinte podrían unirse a material no específico, es decir material que se ha replicado por error). En otras palabras, las sondas se emplean como medida de seguridad. Hacen que el test sea más específico.

DC: O sea que los cebadores son imprescindibles y las sondas son opcionales.

SB: Correcto. Si la finalidad del ensayo es obtener un diagnóstico, hay que emplear las sondas pero para otros usos no es necesario (para no encarecer el ensayo).

DC: En un artículo tuyo de 2017 hablas de la **crisis de reproducibilidad** de los ensayos de RT-PCR en la ciencia y haces referencia a cinco estudios que se intentaron reproducir: en dos de los casos se consiguió, en otro caso no se pudo y los dos casos restantes no se pudieron interpretar.

Dices que en la investigación biomédica se realizan muchos ensayos de RT-PCR pero que, cuando estos ensayos se reproducen, suelen presentar resultados diferentes.

SB: Sí, en principio lo que dices es correcto. Según cómo se realice la RT-PCR se pueden obtener resultados muy distintos. Depende de cómo se preparen las muestras, qué enzimas de RT se utilicen, qué protocolos se empleen y cómo se interpreten los datos obtenidos.

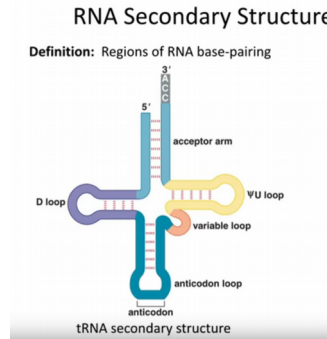
DC: Veamos la **fase de extracción de ARN**. Hablas de la copurificación de inhibidores...

SB: Sí, tanto la transcriptasa inversa como la polimerasa utilizada en la PCR son en parte sensibles a la inhibición por componentes comúnmente presentes en las muestras.

DC: ¿Significa esto que si no haces la extracción de ARN de manera apropiada puedes acabar con menos ADN porque algo de la muestra ha producido una inhibición del proceso?

SB: No, lo que ocurre es que, debido a que las enzimas están inhibidas, la curva indicadora del resultado muestra una cantidad menor de ADN (o ARN) de la que debería mostrar. Es **inhibición de las enzimas**.

DC: También hablas de las **estructuras secundarias**... ¿Te refieres a que el ADN se dobla y enrolla como en las proteínas?



Fuente: Internet

SB: Sí, mucha gente cuando piensa en una molécula de ARN se imaginan una cadena lineal pero en la vida real, en el ARN, incluyendo el genoma del SARS-Cov-2, se forma una estructura secundaria enormemente compleja en la que secuencias complementarias bastante separadas se juntan formando zonas de doble cadena y plegamientos.

Es muy importante. Imaginemos que estamos utilizando un cebador para iniciar la transcripción inversa. Si este cebador se tiene que unir a una zona de ARN en la que hay bastante estructura secundaria, puede tener dificultades para conseguirlo y esto producirá una cierta inhibición del proceso de transcripción inversa. Es decir, afectará a la sensibilidad del ensayo.

DC: ¿Y no hay manera de estirar el ARN para eliminar estas estructuras secundarias?

SB: Aquí es donde el diseño del ensayo es de gran importancia. Por eso se pueden tener resultados diferentes en distintos test. Imaginemos que tú y yo diseñamos dos reacciones diferentes de RT-PCR en las que los cebadores están enfocados a zonas distintas. Digamos que mis cebadores están dirigidos a una área con bastante estructura secundaria y los tuyos hacia una zona de estructura de bucle. Tu cebador será mucho más eficiente en la transcripción inversa porque llegará más fácilmente al ARN. Podría ser que mi ensayo no detectara nada y diera un resultado negativo mientras que el tuyo fuera positivo. Obtendríamos resultados diferentes.

DC: Siguiendo tu ejemplo, ¿Sabía yo de antemano que habían estructuras secundarias o sencillamente tuve suerte?

SB: Hay programas que predicen varias estructuras secundarias. No son perfectos pero es mejor que nada. Si se utilizan estos modelos predictivos se obtienen resultados mejores. No funciona siempre pero, en general, es

importante intentar encontrar la zona de bucle porque la sensibilidad del ensayo será mucho mayor.

DC: También mencionas la **degradación** de los ácidos nucleicos durante la preparación o el almacenamiento... ¿Qué condiciones producen la degradación? ¿Tiempo de almacenamiento, temperatura...?

SB: Supongo que te refieres al ARN. La idea general es que el ARN es muy inestable. Si tienes ARN y lo congelas y descongelas varias veces, se degrada. Si lo mantienes a temperatura ambiente se degrada. Si lo calientas también se degrada. En la vida real las cosas no son sencillas, todo depende de las condiciones. En un proyecto comprobé que si el ARN se mantiene seco, permanece siendo amplificable y detectable durante unos 20 años. Como en muchas cosas de biología, no hay una respuesta de si o no al 100%. Se trata de asegurar que el ARN se extrae y se almacena de la mejor manera posible. Si se mantiene en un frigorífico se mantendrá estable y no se degradará.

DC: Supongo que es mejor no descongelar más de una vez...

SB: Lo que solemos hacer cuando tenemos el ARN es hacer partes. Tomamos la primera parte y con ella preparamos el ADNc y lo almacenamos. Las otras partes de ARN las mantenemos congeladas hasta que las necesitemos. Intentamos no utilizarlas más de dos o tres veces.

DC: También hablas de la **integridad** del ARN, y dices que se mide con el parámetro RIN (RNA Integrity Number).

SB: Un colega lo publicó. Muchos artículos científicos tienden a no tener en cuenta la integridad del ARN. Algunas personas utilizan un equipo que se llama Bioanalizador y que mide los picos 18 y 28S del ARN. Hay un algoritmo que mira el electroferograma (gráfico para analizar los resultados de una electroforesis) y dependiendo del ratio entre los picos 18 y 28S, y otros parámetros calcula el RIN (Número de integridad del ARN). RIN=10 indica que la calidad del ARN es óptima y RIN=1 indica que la calidad es baja.

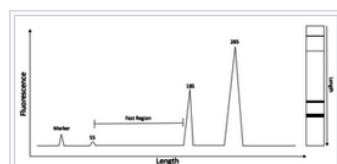


Figure 1. An idealized electropherogram trace that would have an RIN of approximately 10. To the right is

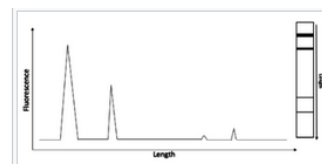


Figure 2. An idealized electropherogram trace that would have an RIN of approximately 1 or 2. Unlike

Fuente: Wikipedia

Si extraemos ARN de un cultivo de tejido podemos esperar un RIN=10. En cambio en una muestra degradada de ARN, el valor del RIN puede estar entre 1 y 4. Esto es solo importante si queremos cuantificar el ARN. Si sólo buscamos una respuesta de sí o no, si el ARN está degradado evidentemente no obtendremos nada. Si solo pretendemos saber si hay ARN o no, la diferencia entre un RIN de 7 u 10 es muy pequeña. Pero si intentamos medir la carga viral, entonces sí es una cuestión importante.

DC: Si intentamos comparar una muestra fresca con un RIN alto, con una muestra congelada y un tanto degradada con un RIN más bajo, ¿podría ser un problema? Es decir, ¿tendríamos problemas al comparar dos ARN de integridad diferente?

SB: Podríamos tener problemas si la muestra no se hubiera conservado bien y si pretendiéramos hacer una valoración cuantitativa. Si solo se trata de una valoración cualitativa, es decir solo saber si el ARN está ahí o no, es menos importante.

DC: Bien, pasemos al paso de la **transcripción inversa (RT)**. En este paso el ARN se convierte en ADNc (ADN complementario). Este paso es necesario porque la PCR sólo amplifica ADN (no ARN). ¿No es así?

SB: La polimerasa Taq no es muy eficiente duplicando el ARN. Puede hacerlo, pero no lo hace bien. Por eso se debe utilizar una enzima especial llamada Transcriptasa Inversa.

DC: Uno de los problemas que mencionas es la falta de reproducibilidad en caso de que haya pocas copias. Es decir si la cantidad de ARN es muy pequeña, puedes obtener una cantidad impredecible de ADNc... ¿Es así?

SB: La **enzima RT** no es muy eficiente al convertir ARN en ADN. Si obtienes un **rendimiento del 50%** puedes estar contento. Si tienes una copia puedes detectarla o no. Si tienes cinco copias, lo mismo. Como decía antes, el problema no se da tanto cuando lo que quieres saber es si el ARN está ahí o no (que es lo que se suele hacer en los ensayos de diagnóstico de patógenos), sino cuando quieres hacer una cuantificación de la cantidad exacta de ARN que había al principio, por ejemplo cuando quieres conocer la carga viral, la carga patógena.

Y, otra cosa, las propiedades de las diversas transcriptasas inversas son diferentes. Unas son mejores que otras.

DC: En tu artículo mencionas una diferencia de un factor de 100 en la producción de ADN...

SB: Mika Kubista, un científico suizo, publicó un artículo hace 15 o 16 años en el que mostraba diferencias significativas en la producción de ADN. Las transcriptasas han mejorado mucho desde entonces, recientemente hemos publicado diferentes estudios, pero diría que aún se dan unas diferencias de un factor de 10.

DC: Una **diferencia de un factor de 10** parece un verdadero problema si de lo que se trata es de cuantificar. Es más o menos lo equivalente a tres ciclos de PCR, ¿no es así?

SB: Como dije antes, las cosas no son siempre así de claras. En algunos ensayos esto se puede ver de manera evidente pero en otros no. Lo que hemos visto es que la polimerasa tiene preferencia por ciertos nucleótidos en el extremo 3' de los cebadores. Algunos cebadores inician el proceso mejor que otros. Si en dos ensayos separados empleamos diferentes bases 3', podemos tener resultados diferentes. Pero no se puede generalizar. Lo que recomendamos en las recomendaciones MIQE es que se haga más de una RT. La PCR es bastante reproducible; lo que produce los problemas es la fase de RT. La estrategia que mucha gente sigue es hacer primero la transcripción inversa (RT) a partir del ARN y después hacer múltiples PCR. Pero en las recomendaciones MIQE sugerimos hacer dos o tres RT y después hacer la PCR porque esto permite hacerse una idea del grado de incertidumbre de los datos obtenidos.

DC: Si lo entiendo bien recomendais hacer dos o tres pasos RT y a continuación las correspondientes PCR. Después, los datos obtenidos permiten saber qué tipo de enzima de transcriptasa inversa o qué tipo de configuración de ensayo es más eficiente. ¿Es así?

SB: Sí, pero quiero enfatizar una vez más que esto solo es importante cuando se hace un proceso cuantitativo. Cuando lo que nos interesa es ver si hay expresión o inexpressión, o cuando se trata de mostrar diferencias muy pequeñas, para patógenos, no es crucial porque que entonces que tengas 100 ó 1000 copias da probablemente lo mismo... suponiendo, claro, que la detección es fiable.

DC: Está claro, pues, que la RT es un paso importante, que plantea problemas de reproducibilidad y que la cantidad de material que se produce al final puede variar bastante.

## PCR

DC: En este paso el ADN se va amplificando en múltiples ciclos. En cada ciclo se duplica la cantidad de ADN. En teoría, si detectamos solo 1 copia de la hebra de

ADN que buscamos, al final del primer ciclo tendremos 2, al final del segundo ciclo tendremos 4, al final del tercer ciclo 8, etc, es decir potencias de 2. Esto es, doblamos en cada ciclo, ¿es así?

SB: Esto es lo que llamamos **eficiencia de la PCR**. En las recomendaciones MIQE hacemos énfasis en que los autores indiquen este valor pero en muchos casos no se hace. Es crucial, absolutamente crucial. Porque si en cada ciclo doblamos la cantidad de la secuencia diana (lo que equivaldría a una eficiencia del 100%), tendremos una sensibilidad mucho mayor que si tenemos una eficiencia del 50%. Si queremos estar seguros de que un resultado negativo es negativo, necesitamos conocer la eficiencia de nuestra reacción. La eficiencia de una reacción depende de varias cosas pero es fácil de medir. Como la multiplicación es exponencial, la eficiencia debe ser lo más cerca posible al 100%.

DC: Una de las frases que he leído sobre la PCR es que los errores también se multiplican de manera exponencial.

SB: Sí, si tienes una eficiencia del 80%, la diferencia en el resultado final puede ser significativa.

DC: He visto que en el test del coronavirus se trabaja con un límite preestablecido de **número de ciclos**. He visto, por ejemplo, los números 36 y 37. Si se consigue producir suficiente ADN antes de llegar a este límite, el resultado se considera positivo. En caso contrario es negativo. Parece un tanto arbitrario...

SB: Sí. No tiene ningún sentido.

DC: Teniendo en cuenta la eficiencia y el número de ciclos, podríamos decir que es una manera de "mover los límites de la prueba". Por ejemplo, una eficiencia del 100% y 37 ciclos comparado con una eficiencia del 50% y el mismo número de ciclos son dos cosas muy distintas. Obtendríamos resultados diferentes, ¿no es así?

SB: Correcto.

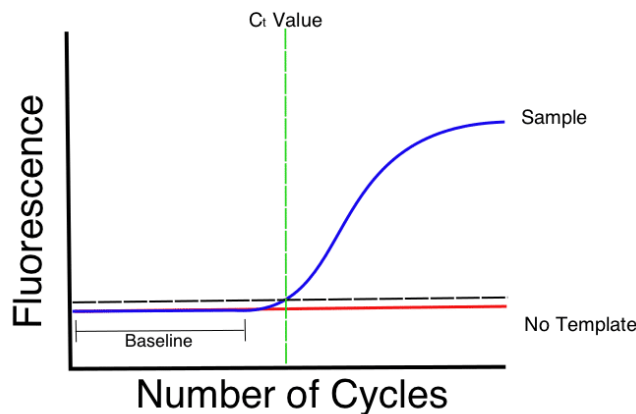
DC: La elección del número de ciclos es arbitraria. ¿Hay alguna manera más correcta de hacerlo?

SB: Volvamos al número de ciclos. Depende de varias cosas. En primer lugar, diferentes instrumentos pueden dar un distinto número de ciclos. Diferentes master-mix de PCR (mezcla de reactivos) pueden dar un distinto número de



ciclos. Diferentes lotes de muestras pueden dar un distinto número de ciclos. El número de ciclos “per se” no es una buena medida.

El segundo punto es que, para muchos instrumentos, una vez que sobrepasas un límite de ciclos de (digamos) 35 puedes empezar a dudar de la fiabilidad de tu resultado porque puede ser debido a una sola copia. Para estar seguro, lo ideal es obtener el resultado en el rango de 20's y 30's. Y a menos que tengas una idea de la eficiencia de la PCR y que estés convencido de la ausencia de inhibición, es muy difícil estar seguro de lo que representa el resultado, a menos que sea una cifra muy clara por debajo del límite.



Extracto de Internet:

La **línea de umbral** es el nivel de detección o el punto en el que una reacción alcanza una intensidad fluorescente por encima de los niveles de fondo. Antes de realizar la PCR, usted (o el software en su cicladora) establece un nivel de umbral. Esta es literalmente una línea en su gráfico que representa un nivel por encima de la fluorescencia de fondo, que también se cruza con su curva de reacción en algún lugar al comienzo de su fase exponencial (Figura 1).

El valor de **C<sub>q</sub>** o el valor de cuantificación del ciclo es el número del ciclo de PCR en el que la curva de reacción de su muestra se cruza con la línea de umbral. Este valor indica cuántos ciclos tardó en detectar una señal real de sus muestras. Las ejecuciones de PCR en tiempo real tendrán una curva de reacción para cada muestra y, por lo tanto, muchos valores de C<sub>q</sub>. El software de su cicladora calcula y registra el valor de C<sub>q</sub> para cada una de sus muestras.

SB: Mi sugerencia es, antes de hacer el proceso de transcripción inversa, añadir un “spike” de ARN (un ARN distinto para que actúe de control) al ARN diana que queremos tratar. De este modo ambos ARN's se transcribirán. Como pondremos una cantidad bien definida de “spike”, sabremos qué C<sub>q</sub> (número de ciclos) esperar al final de la ronda. Y esto dependerá de los instrumentos y los

reactivos empleados. Y, claro, una vez establecido este valor en un laboratorio, hay que ser consistente. De este modo, cada laboratorio tiene su valor que es distinto al de los demás.

DC: ¡Ya entiendo! Sería una especie de vara de medir de cada laboratorio (en el mío sería, por ejemplo, 27 ciclos, y en el tuyo 29. Pero estaría bien porque este valor solo sería válido para el propio laboratorio. No se debería comparar con otros.

SB: Permíteme seguir... Digamos que hemos obtenido un valor de  $C_q=25$  para el "spike" (la mezcla con los dos tipos de ARN). Pero sabemos que si no hubiéramos añadido la muestra, hubiéramos tenido  $C_q=20$ . Por lo tanto sabemos que la muestra contiene algo que produce inhibición. Si obtenemos lo que esperamos, después podemos relacionar directamente el valor de  $C_q$  que obtengamos para el virus con el de la muestra con "spike" y llegar a un valor que es comparable entre tú y yo... y es totalmente significativo.

DC: Pero aún podría haber diferencias derivadas de los puntos que has mencionado antes y que hicieran que la muestra del virus y la muestra con "spike" se comportaran de manera distinta, ¿no es así?

SB: No. Sería suficientemente exacto como para medir de manera aproximada la carga viral.

DC: De acuerdo. Otra pregunta: ¿Si hiciéramos un número suficientemente grande de ciclos, podríamos obtener una "producción fantasma"?

SB: De nuevo, depende de qué pretendas con tu ensayo. En principio, utilizando sondas, no debería suceder pero en la práctica puede ocurrir... sí.

DC: Es decir, que si hacemos unos 40 ciclos, por ejemplo, podríamos obtener un resultado positivo que en realidad sería un falso positivo, ¿no es cierto?

SB: No estaría satisfecho en absoluto con una PCR de 40 ciclos.

DC: Una recomendación del Reino Unido dice que cada área geográfica puede hacer el número de ciclos que desee pero que si el valor es mayor que 40, habría que repetir el ensayo. Pero me sorprendería que todo el mundo lo hiciera...

SB: No, el valor del  $C_q$  (número de ciclos) por sí solo no es significativo. Hay otros parámetros que deben definirse antes para que el  $C_q$  tenga significado.

DC: He leído dos artículos que publican el  $C_q$  que han usado. En uno de ellos el valor de corte para definir un resultado positivo es 36 y los valores 37 a 39 se

consideran resultado indeterminado, esto es, que requiere hacer otro test. En el otro artículo se considera que el valor de corte para positivo es 37 y no se contempla la posibilidad de resultado indeterminado.

SB: Me encantaría que fuera así. Pero es completamente dependiente de los instrumentos, los reactivos y las sondas. Como he dicho el Cq por sí solo no significa demasiado.

DC: También mencionas un método de **arranque en caliente** (hot-start). ¿Puedes explicarlo?

SB: El arranque en caliente tiene que ver con el hecho de que la polimerasa se activa a alta temperatura pero también tiene cierta actividad a temperatura ambiente. Introducimos los cebadores y el ADN (o ARN) junto con la polimerasa pero, debido a que a temperatura ambiente la polimerasa tiene algo de actividad y a que los cebadores se pueden unir de manera no específica, se puede producir una cierta polimerización no específica a temperatura ambiente que cree producto no deseado. Por eso, hace tiempo se desarrollaron métodos de arranque en caliente que pueden utilizar una modificación química o un anticuerpo que se une a la polimerasa y la desactiva a temperatura ambiente.

Arranque en caliente significa que antes de empezar la PCR, la polimerasa se calienta durante 10 minutos a 95° y esto hace que se desprendan los anticuerpos (que vienen unidos a la polimerasa para desactivarla) permitiendo que esta se active. A continuación, cuando se alcanza la temperatura de anillamiento correcto, empieza el primer ciclo. De esta manera se reducen significativamente las uniones no específicas de los cebadores

DC: Ya entiendo. Se trata de eliminar el problema de la polimerización a temperatura ambiente.

SB: Exacto.

DC: Cuando hay actividad de polimerasa a temperatura ambiente, ¿significa que se están formando cadenas de ADN?

SB: Sí, lo que sucede es que si tenemos dos cebadores, ADN y polimerasa sin la capacidad de arranque en caliente, y los mantenemos en frío tendremos síntesis de ADN. Y si después hacemos la PCR, obtendremos amplificación de producto no específico porque los cebadores se unen a zonas a las que normalmente no se unirían ya que a cero grados los cebadores se unen a cualquier cosa. Puede aparecer el "background" (ruido de background, ruido de

fondo, amplificación de material no específico). Y el problema del background no solo es que da falsos positivos sino que reduce la sensibilidad del ensayo.

DC: ¿Se utiliza normalmente el arranque en caliente?

SB: Sí es la forma estándar de proceder.

DC: También hablas de reacciones en un paso o en dos pasos...

DB: Esta es una distinción fundamental. La diferencia esencial es la siguiente... Si intentas detectar un patógeno, normalmente estás interesado en detectar 1, 2 ó 5 de una serie de 10 patógenos diferentes. Lo que se hace en la **reacción de un solo paso** es que el paso del ARN a ADNc se realiza con un cebador específico. Se mezcla la transcriptasa inversa con la polimerasa Taq en un mismo tubo con los dos cebadores (forward y reverse) y se deja 10 minutos a 50 grados, lo que permite que los cebadores específicos de ARN se unan al ARN. Después la transcriptasa inversa extiende el cebador y tras algunos minutos se calienta todo a 95 grados, lo que hace que se desactive la RT y se active la polimerasa, iniciándose la PCR.

Las ventajas de la reacción en un paso son que se hace en un solo tubo, requiere menos tiempo y es más fácil de implementar. El problema es que, como vimos antes en relación con las estructuras de ARN, si los cebadores (primer and forward) no están bien diseñados o si el cebador del ARN no está bien pensado, el ensayo puede ser menos sensible de lo deseado.

Pero si lo que se pretende es buscar decenas o cientos de dianas diferentes en la muestra, pueden surgir problemas. Entonces es cuando es recomendable emplear la reacción en dos pasos.

La diferencia entre hacerlo en un paso o en dos es que, en **la reacción en dos pasos**, como no se pueden encontrar cebadores específicos, se suelen emplear oligonucleótidos aleatorios muy cortos que se unirán por todas partes al ARN. La primera reacción es solo el paso de la RT en la que los cebadores aleatorios generarán una gran cantidad de ADNc. Después se toma una parte de este ADNc y se hace la reacción de PCR con cebadores específicos.

En la reacción en un solo paso tenemos un solo "tiro" para realizar el ensayo. En la reacción en dos pasos conservamos el ADNc generado en el primer paso y podemos hacer tantas PCR como deseemos (mientras no se acabe el ADNc). Las principales ventajas son que (a) tenemos muchas muestras para trabajar y (b) podemos optimizar los cebadores para la PCR (en lugar de para la RT y la PCR) y por lo tanto podemos obtener una sensibilidad mayor.

Pero en la vida real todo esto no es tan sencillo como parece. Unas veces es más sensitiva la reacción en un paso y otras veces lo es la reacción en dos pasos. No se puede predecir.

DC: Hablemos un poco de la **longitud de los cebadores**. ¿Pueden aparecer problemas por elegir cebadores demasiado largos o demasiado cortos?

DB: Lo que se suele hacer es utilizar un programa de diseño de cebadores. Yo tengo un programa que se llama Beacon Designer que me permite diseñar los cebadores. La mayoría de cebadores tienen una longitud de 18 a 23 letras (nucleótidos). El problema no suele ser tanto la longitud del cebador sino que se hayan diseñado o no con la especificidad suficiente, para que no se unan también a otras cosas.

En el caso de patógenos bacterianos no es un problema porque la secuencia diana es única pero, obviamente, si tratas de distinguir entre un coronavirus estándar y el SARS-CoV-2, es muy importante hacer un diseño afinado de los cebadores. La longitud "per se" no es tan esencial. Yo diría que si se trata de hacer un ensayo muy específico con una temperatura de anillamiento bastante alta, es más recomendable emplear cebadores más largos. Pero si se trata de diseñar cebadores para, por ejemplo, dianas fúngicas que son más ricas en contenido GC, deben ser más cortos que los cebadores bacterianos que tienen más contenido AT. Por ejemplo en el caso de la bacteria *Clostridium difficile* los cebadores deben tener una longitud de entre 25 y 28 letras pero para el hongo XXX es suficiente con cebadores de 16 a 18 letras porque es muy rico en contenido CG. No hay una regla definitiva pero, en general, se trabaja con una longitud de aproximadamente 20 letras para los cebadores y, dependiendo de qué sondas se utilicen, su longitud puede estar entre 18 y 25 letras. Aunque hay sistemas que emplean sondas más cortas.

DC: Parece que es un área de alta especialización...

DB: Sí. Puede hacerse una analogía entre los cebadores y los neumáticos de un coche: son los que unen las enzimas a su diana. Y si los cebadores no están bien diseñados, esto es, si hay alguna posibilidad de no especificidad, entonces es cuando todo el proceso va mal. Y en ese caso las sondas no ayudan.

DC: Hablemos un poco de las **recomendaciones MIQE**. Son pautas que indican la información a incluir en los artículos sobre ensayos para facilitar su reproducibilidad, ¿no es así?

DB: Mucha gente piensa que hacer una PCR es fácil porque solo hay que poner la muestra, los cebadores y ya está.

Hace 18 años estuve involucrado en la controversia que relacionaba el autismo con la triple vacuna vírica (MMR). Algunas personas creían que la administración de esta vacuna provocaba autismo. Los únicos datos reales que se publicaron sobre esto eran datos de RT-qPCR. Tuve que analizar un par de artículos que se habían publicado junto con otro montón de datos no publicados que se mandaron a los tribunales.

Pues bien, muy pronto me quedó claro que las personas que habían realizado los experimentos habían hecho mal todo lo que podía ir mal. Los diseños eran incorrectos, los protocolos eran incorrectos y la forma en que informaban de los datos era también incorrecta. Esto fue en 2005. El juicio se celebró en 2007 en Washington DC.

Entre estas fechas creamos un grupo de personas de varias partes del mundo (EUA y Europa) interesadas en la PCR y mantuvimos varias reuniones para hablar de la PCR en tiempo real. Una de las conclusiones fue que debíamos desarrollar unas recomendaciones sobre cómo realizar los ensayos. En primer lugar para ayudar a desarrollar los protocolos de los ensayos (cuestiones a tener en cuenta en el diseño de los cebadores y las sondas, cómo hacer la extracción del ARN, etc.) y en segundo lugar para ayudar a incluir en las publicaciones la información necesaria que permitiera hacer la revisión o la reproducción del experimento, es decir para ayudar a evaluar la calidad técnica de los artículos y ver si los resultados eran reales.

Una de las razones por las que se publican los artículos científicos es permitir que otras personas revisen el trabajo realizado y lo reproduzcan para ver si se obtienen los mismos resultados.

Se han publicado muchos artículos que describen experimentos en los que se han realizado test E.L.I.S.A. o Western Blot y PCR. Pues bien, en todos ellos, los cultivos celulares, el E.L.I.S.A. y el Western Blot se describen con un gran detalle pero en lo referente a la PCR solo dicen un escueto: "hemos hecho qPCR".

DC: Ja , ja , ja. O sea que no describen ni los cebadores...

DB: Muy a menudo no indican los cebadores y, si lo hacen, muchas veces las secuencias son erróneas. Ni idea de como realizaron la RT, ni idea de cómo hicieron la PCR... pero sostienen que la qPCR tiene la capacidad de cuantificar ciertas cosas. Y este problema de la cuantificación es más frecuente que en el mundo de la práctica.

Esto es lo que nos llevó a publicar inicialmente sobre la PCR en 2009 y a desarrollar las recomendaciones MIQE en 2013.

Ahora estamos discutiendo hacer algo similar para el test del coronavirus.

DC: Bueno, creo que puede ser algo que valga la pena... Resumiendo, si lo entiendo bien, las recomendaciones MIQE indican cómo hacer la RT-PCR y cómo publicar la información en los artículos de manera que otras personas puedan evaluar y reproducir el experimento.

DB: Así es.

DC: En tu artículo aportas también datos que indican que cuando se reproduce un experimento, los **resultados de cuantificación** pueden variar en un factor de entre 10 y 30.

DB: Sí, puede ocurrir...

DC: Me sorprende que la gente publique secuencias erróneas de los cebadores. Parecería que es solo una cuestión de copiar y pegar una información que debe estar almacenada en algún lugar...

DB: Sí esta es la interpretación normal. Pero si nos dejamos llevar un poco por teorías de la conspiración, podríamos pensar que algunas personas no publican las secuencias a propósito... para que no se sepa lo que han hecho...

DC: Ohhh! Sí, puede parecer un poco conspiranoico pero lo otro resulta difícil de entender. Porque si has estado mucho tiempo desarrollando la secuencia de los cebadores, tienes que guardar la información en un archivo y después mandarla a la persona que los generará. Y tienes que asegurarte de que lo haces bien porque si generas los cebadores mal, el experimento saldrá mal...

DB: Una explicación es que muchas veces la gente obtiene mal la información de la orientación de los cebadores (5' a 3' , 3' a 5'). Es decir que los cebadores están mal orientados. Esto es bastante frecuente. También he tenido ejemplos en los que solo se ha publicado parte de la secuencia de los cebadores. ¿Por qué? No lo sé. Otras veces publican una secuencia distinta...

DC: Pasemos a la **secuenciación**. Una de las confusiones que tengo es: ¿se secuencian el ARN o el ADNc?

DB: En qPCR no se hace ningún tipo de secuenciación. Lo único que se hace es (a) la amplificación del producto y (b) la detección del mismo mediante sondas (por eso son necesarias). Como tenemos una sonda específica que se une sólo a la secuencia diana que tratamos de amplificar, estamos convencidos de que

hemos obtenido lo que buscábamos. Si hacemos una RT-PCR única con una sonda única, obtenemos producto amplificado de una secuencia única (que era la diana).

La secuenciación es otra cosa. En la PCR sabemos qué buscamos (una secuencia concreta) mientras que en la secuenciación no sabemos lo que buscamos. En la secuenciación se generan muchas secuencias de ADNc... El ARN se convierte en ADNc y, una vez más, este es el punto crítico porque ahí tenemos el problema de la RT. Pero si solo intentamos ver qué mensajeros o patrones hay presentes se puede hacer una reacción RT-PCR y después enlazarla con una secuenciación. Esto nos dará un montón de información de lo que hay presente.

DC: Entiendo, o sea que primero hay que hacer la PCR para obtener el material y después este material se secuencia.

DB: Sí, se prepara una biblioteca del objetivo...

DC: Bueno, creo que no tengo más preguntas. Es increíble la cantidad de cuestiones que hemos abordado hoy. Te agradezco mucho la paciencia que has mostrado. ¿Hay algo que quisieras añadir a todo lo que has dicho?

DB: Sí. Creo que tenemos un **problema de reproducibilidad** en general en toda la ciencia y en particular en la ciencia biológica-médica. Y que este problema no está suficientemente reconocido.

Parece que los editores de las principales revistas de medicina no están excesivamente interesados en asegurar que los artículos que publican sean técnicamente sólidos. Digo esto porque hay numerosos ejemplos de artículos publicados de revistas importantes que han debido ser retractados. Las revistas son empresas comerciales, venden publicidad y parece que mientras lo que se publica tenga cierto interés para la prensa los editores ya se sienten satisfechos...

DC: Así es. Personalmente sé que en estos momentos no es demasiado difícil publicar un artículo, por ejemplo, en el NEJM o en el JAMA si tienes algo fresco sobre el coronavirus...

DB. Sí eso también es cierto. También depende de quién es el autor y a qué institución pertenece. Hay muchas cosas que no se hacen de manera correcta en el actual sistema de publicaciones de biología.

Y una última cosa, parece que la **RT-PCR** que todos creen que es fácil de realizar **está creando problemas** de manera particular.



DC: Sí, ya entiendo. Tienes una máquina nueva y radiante, le pones las muestras, la máquina lo hace todo sola y al final produce un resultado en forma de gráfico... y esto te lleva a creer que su funcionamiento es más sencillo de lo que parece y el resultado más preciso de lo que en realidad es.

DB: Absolutamente.

DC: Pasemos a otra cuestión. Vivimos en un mundo digital, tenemos ordenadores desde la década de 1950 y todo el mundo sabe que los ordenadores son binarios pero, en biología (que yo sepa), la únicas cosas que son digitales son el ARN y el ADN, que son códigos de cuatro letras (bases).

Y si se tiene la secuencia del ARN o del ADN en el ordenador se puede generar ese ARN o ADN. En cambio con otros elementos, por ejemplo las proteínas, esto no puede hacerse. Es como si esto nos hiciera centrarnos solo en el ARN y el ADN, ignorando todas las incertidumbres que rodean su manipulación, que es química y biológica.

DB: Sí, ciertamente ha sido así en el pasado, pero las cosas han mejorado. Antes solíamos hacer cuantificación de ARN porque teníamos la tecnología para hacerlo, en cambio no podíamos cuantificar fácilmente proteínas. Esto era así en la década de los 70. En la actualidad la mayoría de artículos de cualquier revista médica requieren no solo un resultado basado en ARN sino también algún tipo de validación de proteínas.

Es ligeramente distinto para los artículos sobre patógenos porque ahí tenemos ARN y no se busca la expresión de genes, se busca la presencia y las acciones del patógeno. Pero si se intenta hacer un estudio sobre la biología de un virus, definitivamente se necesitan datos de ARN y de proteínas.

Hay que tener en cuenta también que antes creíamos que había solo ARN mensajero, ARN ribosomal y ARN de transferencia, pero ahora sabemos que hay muchos más tipos de ARN. Es extremadamente complejo. Y hacer un test de RT-qPCR para detectar algo está muy bien pero debe ponerse en contexto con otros experimentos que deben llevarse a cabo para validar y tal vez explicar cual es el resultado.

Desafortunadamente esto significa que deberíamos hacer las cosas mucho más lentamente de lo que nos vemos obligados a hacer. Todos estamos bajo la presión de publicar y obtener resultados y, ciertamente, que tengamos resultados que tiendan a ser incorrectos no ayuda.

DC: Estoy de acuerdo. Vivimos en una sociedad en la que muchas veces la velocidad de respuesta es un parámetro al que se le da más valor que a la exactitud o al hacer las cosas bien...

Te agradezco mucho el tiempo que nos has dedicado para tratar este tema que es tan importante.

DB: Muchas gracias por invitarme y permitirme hablar de esta cuestión. Espero que ayude a entender un poco mejor los problemas que estamos afrontando con los test del coronavirus, que son considerables... Es increíble que nos encontremos en una situación de confinamiento como la que estamos viviendo...

DC: Sí, hay mucha confusión sobre lo que está sucediendo...

DB: Lo que encuentro francamente asombroso es que la gente se refiera a la PCR como un test de antígenos. Se lo escuché a un político en la BBC. La PCR no tiene nada que ver con un test de antígenos. Es un error de comprensión.

DC: Una última pregunta. He oído que hay un test molecular del coronavirus que se hace en 5 minutos. Evidentemente si se hace en 5 minutos es imposible que sea una PCR. ¿Sabes a qué se refieren?

DB: Bueno, no es imposible... podría ser un test LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) o podría ser un dispositivo de flujo lateral basado en proteínas. Si tenemos el antígeno unido a un dispositivo de flujo lateral, poniendo una gota de sangre, la presencia de anticuerpos se puede detectar en 5 minutos...

¿Se hace con una muestra nasal o de sangre?

DC: Creo que nasal.

DB: Entonces podría tratarse de un test LAMP...

DC: Algún día lo sabremos... Gracias una vez más por tu participación.

DB: Gracias.