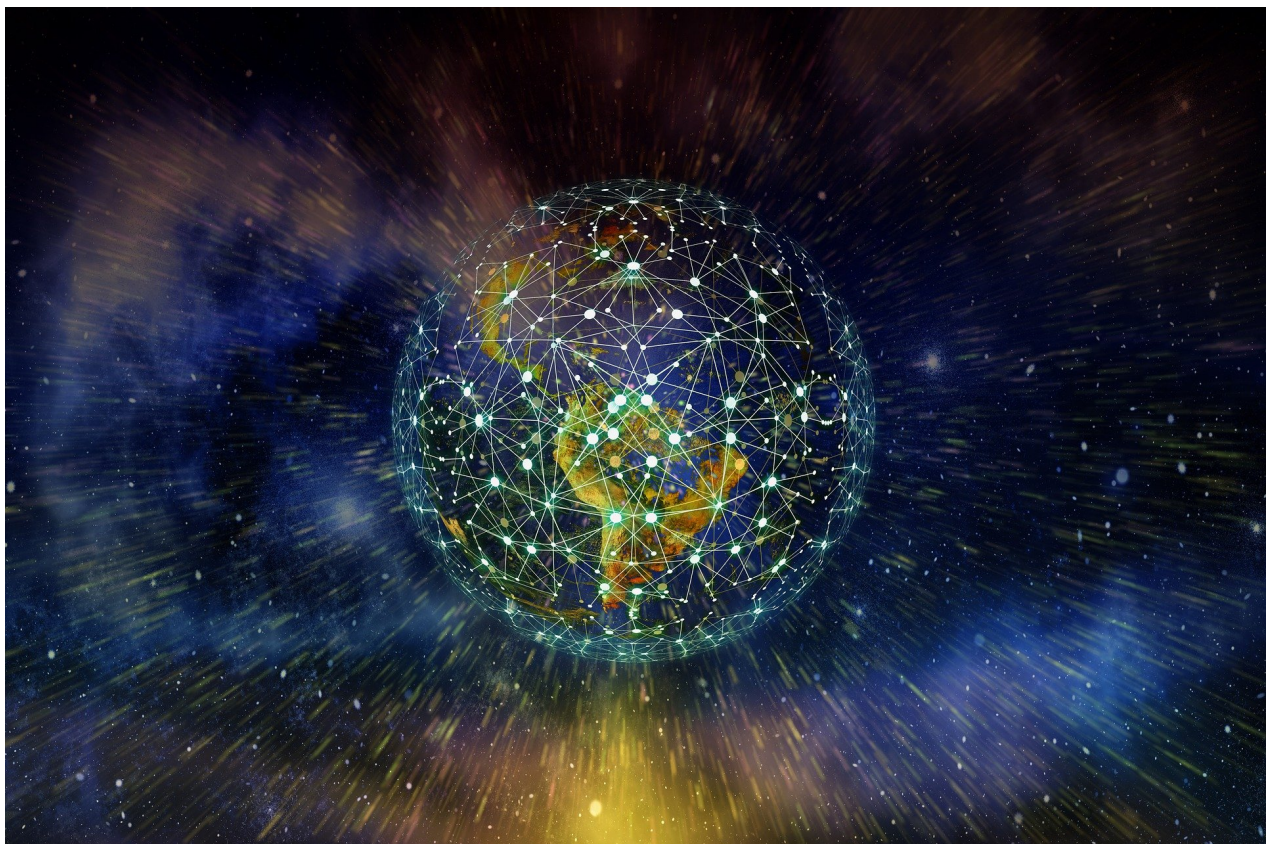


Cómo sobrevivir a una pandemia en un mundo globalizado



Guía docente

Fuente: <https://www.biointeractive.org/es>

**Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación.
Queda prohibida su comercialización o modificación.**

1. Introducción

B. E. toma un avión para regresar, después de un viaje de negocios, de Hong Kong a su hogar, en Minneapolis. No se siente muy bien, pero no le da mayor importancia ya que el trayecto es largo y puede ser producto del cansancio. A los dos días muere en la sala de urgencias del hospital y los médicos no saben qué le ha pasado.

Enseguida aparecen pacientes con sus mismos síntomas: tos seca, fiebre, ataques y hemorragias cerebrales que les llevan a una rápida muerte. Y están en diferentes regiones. No sólo en Minneapolis, sino que habitantes de Chicago, Londres, París, Tokio y Hong Kong muestran la misma sintomatología. Han estado expuestos a un virus que nadie conoce. Los casos se multiplican por miles y la enfermedad traspasa fronteras.

Los investigadores trabajan a contrarreloj para dar con la clave de un virus biológico que continúa mutando y conseguir una potencial vacuna y, en paralelo, se desata la psicosis y se extienden la paranoia y el miedo a la misma velocidad que la infección.



Este es el argumento de la película “Contagio”, dirigida por Steven Soderbergh y estrenada en el año 2011, aunque podría perfectamente ser la descripción de una infección pandémica real, muy similar a la causada por el virus SARS-CoV-2, que desgraciadamente padecemos actualmente.

Visualiza el tráiler aquí:

https://www.filmaffinity.com/es/evideos.php?movie_id=145476

Dos preguntas importantes, para comenzar, que deberíais intentar responder:

1. **¿Cuándo una enfermedad infecciosa pasa a considerarse pandemia?**

2. ¿Cuáles serían las características del virus “perfecto”?

Y piensa si sabrías responder a las siguientes cuestiones:

3. ¿Cómo te enfrentarías a esta situación? ¿Qué harías primero?

4. ¿Qué medidas tomarías para intentar controlar la situación?

5. ¿Cómo identificarías el virus?

6. ¿Con qué tratarías a los enfermos o cómo intentarías evitar contagios?

Abordar una infecció de esta magnitud supone desarrollar una visión global que permita enlazar todos los aspectos de la pandemia: **origen, prevención, enfermedad, medidas de contención, tratamiento, impacto social**, y además una buena **comunicación** a la sociedad, y en particular, **educación**.

No podremos simular todos los perfiles que serían necesarios para comprender la complejidad de la lucha frente a una pandemia. Necesitaríamos ser científicos, genetistas, epidemiólogos, sanitarios, pero también políticos, sociólogos, etc.

A grandes rasgos, estos serían diversos factores a considerar:

Estudio de la enfermedad: qué la causa, cómo se propaga, cuáles son sus síntomas, etc.

¿Qué es un virus?

¿Cómo se produce la infección?

¿Qué implican las mutaciones del virus?

Tratamientos preventivos

Vacunas

Tratamientos terapéuticos

Medicamentos antivirales

Identificar la fuente del brote

Zoonosis

Datos de vigilancia: monitoreo y seguimiento de la enfermedad

Definir medidas que reduzcan la propagación de la enfermedad y disminuyan su impacto

También es fundamental desarrollar buenos sistemas de diagnóstico, que nos permitan detectar los contagios y contener su expansión. En esto centraremos nuestra práctica. Una vez conocido y secuenciado el virus que causa esta pandemia, hemos diseñado los procedimientos para identificar a los pacientes infectados.

¿Cuáles son los sistemas de diagnóstico y en qué consisten?

PCR

Prueba de antígenos

Prueba de anticuerpos

2. Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR

Visualiza este vídeo, que resume el funcionamiento de la PCR (por sus siglas en inglés, *Polimerase Chain Reaction*)

<https://youtu.be/3bsajX0uG8U>

Resuelve las siguientes preguntas:

1. ¿Qué permite la técnica de la PCR?

La PCR es una técnica utilizada en biología molecular que permite conseguir una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una cantidad ínfima de esta biomolécula. Esta técnica fue diseñada tal y como la conocemos por los bioquímicos Kary Banks Mullis y Michael Smith en la década de los 90, quienes consiguieron patentarla.

La PCR se basa en una actividad enzimática que sucede de forma normal en las células de nuestro organismo. En las células, las ADN polimerasas son capaces de replicar el ADN nuclear, para obtener dos copias idénticas, que después serán repartidas a las células hijas en la mitosis. Bien, pues, de igual modo, en la PCR las polimerasas serán capaces de replicar, cual fotocopidora, un fragmento de ADN, en varios ciclos, para obtener una gran cantidad de copias igualitas a ella.

2. Explica brevemente los pasos que deben seguirse

ADN molde: Se trata del fragmento de ADN que queremos amplificar mediante la PCR.

Desoxirribonucleótidos-trifosfato: el ADN está compuesto por 4 tipos de nucleótidos, formados por 4 bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina, por lo que se necesitan estos 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato para poder obtener nuevas moléculas de ADN

Cebadores (en inglés, primers): los cebadores son oligonucleótidos, secuencias cortas de ADN, que se unen a la molécula de ADN molde y sirven como punto de inicio para comenzar la síntesis de ADN. En la PCR necesitamos dos cebadores, cada uno complementario a una cadena del ADN que buscamos amplificar. Estos oligonucleótidos determinan la región del ADN a amplificar.

*ADN polimerasas: la más utilizada dada su efectividad, es la ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, también llamada Polimerasa Taq. Esta polimerasa es idónea para la PCR por su resistencia a las altas temperaturas que se utilizan en el proceso.*

Iones divalentes de magnesio: los iones de carga positiva son cofactores de la polimerasa. Son esenciales para la función de la ADN polimerasa. Normalmente se añade cloruro de magnesio para que al disociarse se libere magnesio.

Solución tampón: para regular el pH, es decir, las condiciones de acidez o basicidad, de nuestra PCR. Los cambios en el pH de la disolución pueden alterar los resultados de nuestra PCR o evitar que se produzca.

Termociclador: aparato que regula la temperatura en cada ciclo de la PCR. Gracias a él es posible realizar esta técnica en muchísimo menos tiempo, ya que para realizarla, se debe modificar la temperatura de la solución en varias ocasiones.

PROCEDIMIENTO: la PCR se compone de varios ciclos, que se repiten unas 30 veces, dependiendo de la cantidad de muestra que necesitamos. Cada ciclo comprende la desnaturalización de la doble hebra de ADN y la síntesis de la una nueva cadena de ADN por cada cadena haya presente. De este modo, si comenzamos con una única molécula de ADN en la muestra, obtendremos 2 en el primer ciclo, 4 en el segundo ciclo... ¡y 2 147 483 648 moléculas en el ciclo número 29!

En la primera parte del ciclo de una PCR, se desnaturalizan la moléculas de ADN de la muestra. Esto significa que las dos cadenas que forman cada molécula se separan, dando lugar a dos moléculas de ADN monocatenario. Normalmente, este primer paso se logra realizar mediante un aumento muy grande de la temperatura de la solución (aproximadamente a 95º).

El siguiente paso de un ciclo de la PCR implica unas moléculas muy importantes, de las que hablaba antes, los cebadores. En este paso, se disminuye la temperatura de la solución para favorecer la unión de los cebadores al ADN monocatenario que habíamos obtenido en el proceso anterior. Recordad que los cebadores se unen al ADN de forma específica, así que solo amplificaremos la región de las moléculas que nos interese.

Acto seguido, se ajusta la temperatura de la solución de nuevo, para que la ADN polimerasa pueda actuar a partir de los cebadores. La temperatura en este paso es dependiente de la ADN polimerasa que se esté utilizando. Por ejemplo, para la polimerasa Taq, la temperatura ideal está entre los 70 ºC y los 80 ºC. En este paso, la polimerasa utiliza como molde las

cadena de ADN monocatenario y va añadiendo al cebador los desoxirribonucleótidos-trifosfato complementarios a la cadena molde, formando una nueva cadena.

3. ¿Cómo diseñarías el sistema para que sea específico de un virus determinado?

Deben diseñarse los cebadores específicos para la secuencia de ADN que se quiera amplificar. En este caso, una secuencia concreta del virus que queramos detectar.

3. Sistemas de diagnóstico del SARS-CoV-2

Hay diferentes pruebas que pueden utilizarse para saber si una persona ha sido infectada por el virus, o si ha pasado la infección.

Visualiza la siguiente animación:

<https://media.hhmi.org/biointeractive/click/spanish/covid-es/detection.html>

La animación presenta tres tipos de pruebas que se pueden usar para saber si una persona está infectada o ha pasado la infección por SARS-CoV-2.

La siguiente tabla compara algunos aspectos importantes de estas pruebas:

Tipo de prueba	Detecta la presencia de	Precisión
Prueba de RT-PCR	Fragmentos del genoma de ARN del virus	Pocos falsos negativos. Usualmente la prueba no se tiene que repetir
Prueba de antígenos	Fragmentos de proteínas virales (antígenos)	Más falsos negativos que la prueba de RT-PCR. Podrían necesitarse más pruebas para confirmar los resultados
Prueba de anticuerpos	Anticuerpos	Pueden dar falsos positivos y falsos negativos

- 1. Imagínate que estás planeando viajar, o visitar a un familiar que vive en un asilo de ancianos. Se requiere que todos los viajeros o visitantes tengan una prueba negativa para infección activa con SARS-CoV-2. ¿Cuál de las pruebas mencionadas en el vídeo y resumidas en la tabla elegirías? ¿O qué otra información te gustaría saber antes de elegir?**

Las respuestas de los estudiantes probablemente variarán. Si los estudiantes priorizan la velocidad, es posible que deseen hacerse la prueba de antígeno. Si priorizan la precisión y quieren menos falsos negativos (por ejemplo, porque les preocupa el riesgo de infectar a un miembro de la familia), es posible que deseen hacerse la prueba RT-PCR. Los estudiantes también pueden discutir otra información que les gustaría saber antes de elegir. Esto podría incluir cosas como la disponibilidad de las pruebas, dónde pueden hacerse la prueba, cuánto costaría cada prueba con o sin seguro médico, si hay otras pruebas que podrían hacerse, etc.

2. Explica cómo una persona podría dar negativo en una prueba de infección activa por SARS-CoV-2 y positivo en la prueba de anticuerpos contra el SARS-CoV-2.

El individuo podría dar negativo para una infección activa y positivo para anticuerpos si estuvo infectado en el pasado y se ha recuperado desde entonces. Como se han recuperado, ya no tendrán el virus. Pero todavía tendrán anticuerpos por haber luchado contra el virus antes.

3. Imagina que tres personas se hacen las tres pruebas. Proporciona una posible explicación para los resultados de las pruebas de cada individuo mostrados en la siguiente tabla.

Individuo	Prueba de RT-PCR	Prueba de antígenos	Prueba de anticuerpos	Explicación
1	Positivo	Positivo	Negativo	<i>Las pruebas de antígeno y RT-PCR de este individuo son positivas porque tiene una infección activa. Su prueba de anticuerpos es negativa porque su sistema inmunológico aún no ha producido anticuerpos contra el virus</i>
2	Positivo	Negativo	Negativo	<i>La prueba de RT-PCR de este individuo es positiva porque tiene una infección activa. Su prueba de antígeno también debería ser positiva, pero produjo un falso negativo en este caso. Su prueba de anticuerpos es negativa porque su sistema inmunológico aún no ha producido anticuerpos contra el virus. (Considere discutir con los estudiantes por qué es más probable que la prueba de antígeno)</i>
3	Negativo	Negativo	Negativo	<i>Las pruebas de antígeno y RT-PCR de este individuo son negativas porque tuvo una infección anterior y se recuperó, por lo que el virus ya no está en su cuerpo. Su prueba de anticuerpos es positiva porque su cuerpo aún tiene los anticuerpos que se crearon para combatir el virus</i>

4. Taller práctico

Antes de la práctica:

Kit recomendado:

<https://www.bio-rad.com/es-es/product/elisa-immuno-explorer-kit?ID=1e3f3100-99f6-49b3-b9a0-2c8aad9d9285>

- Revisar el material del kit y preparar las "work stations", una cada 2 alumnos. Es necesario, aproximadamente, 45 min. -1h de preparación.
- Importante:
 - o Diluid la solución PBS (ve 10X), es necesario una probeta o una botella e idealmente agua destilada para realizar la dilución.
 - o Los anticuerpos vienen liofilizados. Resuspenderlos en PBS (Antes de añadir el tween). La dilución no viene dada por protocolo, tomad datos estándar para ELISA.
 - o Es necesario un recipiente (tipo envase de yogurt) para la solución de lavado. Es necesario papel absorbente para los lavados.
- Dejad todo el material sobre las mesas.
- Hay que explicar el uso de las micropipetas. Especial atención a mencionar las dos posiciones del émbolo, que es donde tienen más dificultad.

Secuencia de contactos definidos:

Cada número, del 1 al 20 fue asignado a uno de los estudiantes de forma aleatoria. Se siguió el protocolo de ELISA indicado en el kit.

En rojo las muestras positivas de partida.

PRIMER CONTACTO		SEGUNDO CONTACTO	
1	11	5	20
2	12	11	4
3	13	16	8
4	14	6	15
5	15	13	1
6	16	17	12
7	17	14	3
8	18	2	9
9	19	18	19
10	20	7	10