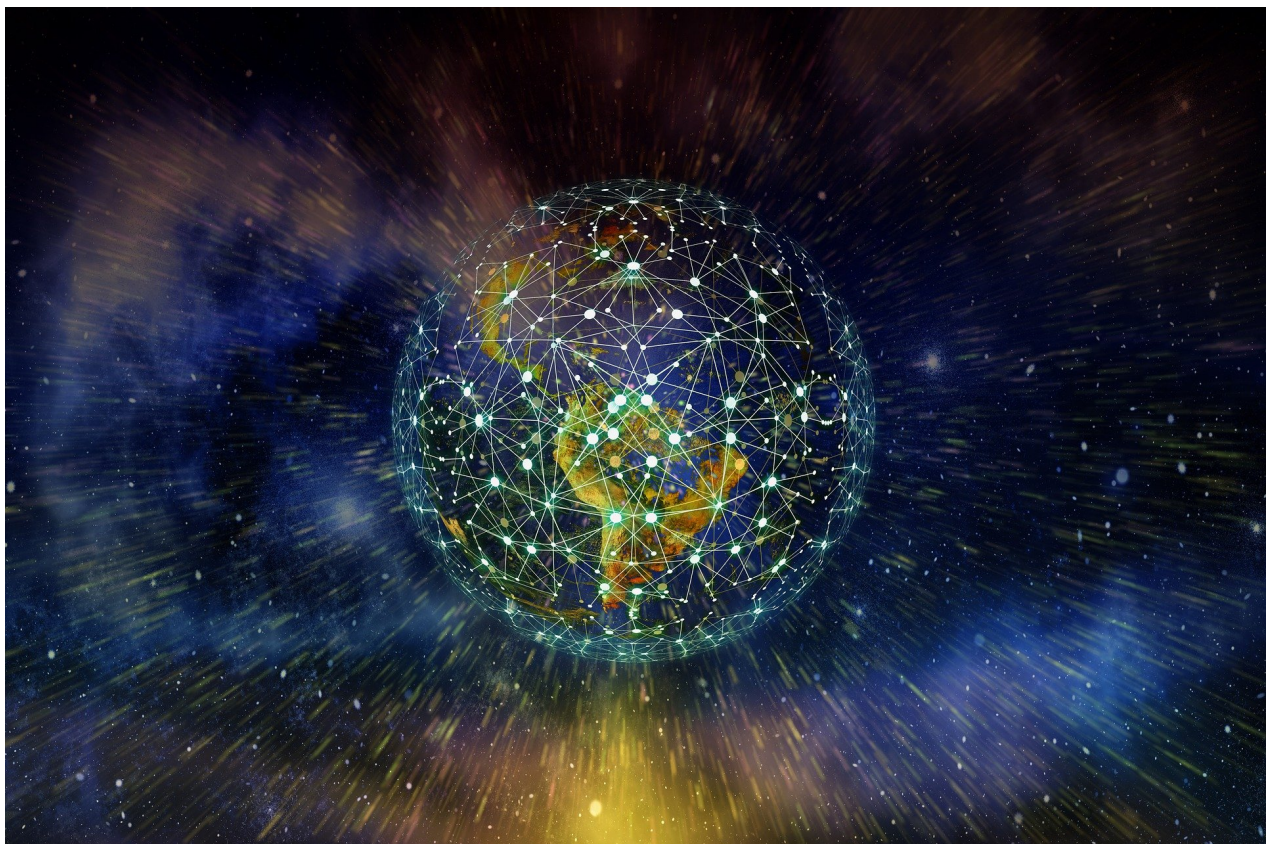


Com sobreviure a una pandèmia en un món globalitzat



Guia docent

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

Aquests materials didàctics són per a ús docent i de recerca. Queda prohibida la seva comercialització o modificació.

1. Introducció

B. E. agafa un avió per a tornar, després d'un viatge de negocis, de Hong Kong a la seva llar, a Minneapolis. No es troba molt bé, però no li dona gaire importància ja que el trajecte és llarg i pot ser producte del cansament. Als dos dies mor a la sala d'urgències de l'hospital i els metges no saben què li ha passat.

De seguida apareixen pacients amb els seus mateixos símptomes: tos seca, febre, atacs i hemorràgies cerebrals que els porten a una ràpida mort. I són de diferents regions. No només a Minneapolis, sinó que habitants de Chicago, Londres, París, Tòquio i Hong Kong mostren la mateixa simptomatologia. Han estat exposats a un virus que ningú no coneix. Els casos es multipliquen per milers i la malaltia traspasa fronteres.

Els investigadors treballen a contrarellotge per a donar amb la clau d'un virus biològic que continua mutant i aconseguir una potencial vacuna i, en paral·lel, es deslliga la psicosis i s'estenen la paranoia i la por a la mateixa velocitat que la infecció.



Aquest és l'argument de la pel·lícula "Contagi", dirigida per Steven Soderbergh i estrenada l'any 2011, encara que podria perfectament ser la descripció d'una infecció pandèmica real, molt similar a la causada pel virus SARS-CoV-2, que malauradament patim actualment.

Visualitza el tràiler aquí:

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

Dues preguntes importants, per començar, que hauríeu d'intentar respondre:

1. Quan una malaltia infecciosa passa a considerar-se pandèmia?

2. Quines serien les característiques del virus “perfecte”?

I pensa si sabries respondre a les preguntes següents:

3. Com t'enfrontaries a aquesta situació? Què faries primer?

4. Quines mesures prendries per intentar controlar la situació?

5. Com identificaries el virus?

6. Amb què tractaries els malalts o com intentaries evitar contagis?

Abordar una infecció d'aquesta magnitud suposa desenvolupar una visió global que permeti enllaçar tots els aspectes de la pandèmia: origen, prevenció, malaltia, mesures de contenció, tractament, impacte social, i a més una bona comunicació a la societat, i en particular, educació.

No podrem simular tots els perfils que serien necessaris per a comprendre la complexitat de la lluita enfront d'una pandèmia. Necessitaríem ser científics, genetistes, epidemiòlegs, sanitaris, però també polítics, sociòlegs, etc.

A grans trets, aquests serien diversos factors a considerar:

Estudi de la malaltia: què la causa, com es propaga, quins són els seus símptomes, etc.

Què és un virus?

Com es produeix la infecció?

Què impliquen les mutacions del virus?

Tractaments preventius

Vacunes

Tractaments terapèutics

Medicaments antivirals

Identificar la font del brot

Zoonosi

Dades de vigilància: monitoratge i seguiment de la malaltia

Definir mesures que redueixin la propagació de la malaltia i disminueixin el seu impacte

També és fonamental desenvolupar bons sistemes de diagnòstic, que ens permetin detectar els contagis i contenir la seva expansió. En això centrarem la nostra pràctica. Un cop conegut i

seqüenciat el virus que causa aquesta pandèmia, hem dissenyat els procediments per a identificar els pacients infectats.

Quins són els sistemes de diagnòstic i en què consisteixen?

PCR

Prova d'antígens

Prova d'anticossos

2. Reacció en Cadena de la Polimerasa, PCR

Visualitza aquest vídeo, que resumeix el funcionament de la PCR (per les seves sigles en anglès, *Polimerase Chain Reaction*)

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

Resol les preguntes següents:

1. Què permet la tècnica de la PCR?

La PCR és una tècnica utilitzada en biologia molecular que permet aconseguir una gran quantitat de còpies d'un fragment d'ADN, partint d'una quantitat ínfima d'aquesta biomolècula. Aquesta tècnica va ser dissenyada tal com la coneixem pels bioquímics Kary Banks Mullis i Michael Smith en la dècada dels 90, qui van aconseguir patentar-la.

La PCR es basa en una activitat enzimàtica que succeeix de manera normal en les cèl·lules del nostre organisme. En les cèl·lules, les ADN polimerases són capaces de replicar l'ADN nuclear, per a obtenir dues còpies idèntiques, que després seran repartides a les cèl·lules filles en la mitosi. Bé, doncs, de la mateixa manera, en la PCR les polimerases seran capaces de replicar, com una fotocopiadora, un fragment d'ADN, en diversos cicles, per a obtenir una gran quantitat de còpies iguals.

2. Explica breument els passos que s'han de seguir.

ADN motlle: Es tracta del fragment d'ADN que volem amplificar mitjançant la PCR.

Desoxiribonucleòtids-trifosfat: l'ADN està compost per 4 tipus de nucleòtids, formats per 4 bases nitrogenades: adenina, guanina, citosina i timina, per la qual cosa es necessiten aquests 4 desoxiribonucleòtids-trifosfat per a poder obtenir noves molècules d'ADN

Encebadors (en anglès, primers): els engreixadors són oligonucleòtids, seqüències curtes d'ADN, que s'uneixen a la molècula d'ADN motlle i serveixen com a punt d'inici per a començar la síntesi d'ADN. En la PCR necessitem dos encebadors, cadascun complementari a una cadena de l'ADN que busquem amplificar. Aquests oligonucleòtids determinen la regió de l'ADN a amplificar.

*ADN polimerases: la més utilitzada atesa la seva efectivitat, és l'ADN polimerasa del bacteri *Thermus aquaticus*, també anomenada Polimerasa Taq. Aquesta polimerasa és idònia per a la PCR per la seva resistència a les altes temperatures que s'utilitzen en el procés.*

Ions divalents de magnesi: els ions de càrrega positiva són cofactors de la polimerasa. Són essencials per a la funció de l'ADN polimerasa. Normalment s'afegeix clorur de magnesi perquè en dissociar-se s'alliberi magnesi.

Solució tampó: per a regular el pH, és a dir, les condicions d'acidesa o basicitat, de nostra PCR. Els canvis en el pH de la dissolució poden alterar els resultats de nostra PCR o evitar que es produeixi.

Termociclador: aparell que regula la temperatura en cada cicle de la PCR. Gràcies a ell és possible realitzar aquesta tècnica en moltíssim menys temps, ja que per a realitzar-la, s'ha de modificar la temperatura de la solució en diverses ocasions.

PROCEDIMENT: la PCR es compon de diversos cicles, que es repeteixen unes 30 vegades, depenent de la quantitat de mostra que necessitem. Cada cicle comprèn la desnaturalització de la doble cadena d'ADN i la síntesi de l'una nova cadena d'ADN per cada cadena hi hagi present. D'aquesta manera, si comencem amb una única molècula d'ADN en la mostra, obtindrem 2 en el primer cicle, 4 en el segon cicle... i 2 147 483 648 molècules en el cicle número 29!

En la primera part del cicle d'una PCR, es desnaturalitzen la molècules d'ADN de la mostra. Això significa que les dues cadenes que formen cada molècula se separen, donant lloc a dues molècules d'ADN monocatenari. Normalment, aquest primer pas s'aconsegueix realitzar mitjançant un augment molt gran de la temperatura de la solució (aproximadament a 95°).

El següent pas d'un cicle de la PCR implica unes molècules molt importants, de les quals parlava abans, els engreixadors. En aquest pas, es disminueix la temperatura de la solució per a afavorir la unió dels encebadors a l'ADN monocatenari que havíem obtingut en el procés anterior. Recordeu que els engreixadors s'uneixen a l'ADN de manera específica, així que només amplificarem la regió de les molècules que ens interressi.

Tot seguit, s'ajusta la temperatura de la solució de nou, perquè l'ADN polimerasa pugui actuar a partir dels engreixadors. La temperatura en aquest pas és dependent de l'ADN polimerasa que s'estigui utilitzant. Per exemple, per a la polimerasa Taq, la temperatura ideal està entre els 70 °C i els 80 °C. En aquest pas, la polimerasa utilitza com a motlle les

cadena d'ADN monocatenari i va afegint a l'encebador els desoxiribonucleòtids-trifosfat complementaris a la cadena motlle, formant una nova cadena.

3. Com dissenyaries el sistema perquè sigui específic d'un virus determinat?

Han de dissenyar-se els encebadors específics per a la seqüència d'ADN que es vulgui amplificar. En aquest cas, una seqüència concreta del virus que vulguem detectar.

3. Sistemes de diagnòstic del SARS-CoV-2

Hi ha diferents proves que poden utilitzar-se per a saber si una persona ha estat infectada pel virus, o si ha passat la infecció.

Visualitza la següent animació:

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

L'animació presenta tres tipus de proves que es poden usar per a saber si una persona està infectada o ha passat la infecció per SARS-CoV-2.

La següent taula compara alguns aspectes importants d'aquestes proves:

Tipus de prova	Detecta la presència de	Precisió
Prova de RT-PCR	Fragments del genoma d'ARN del virus	Pocs falsos negatius. Usualment la prova no s'ha de repetir
Prova d'antígens	Fragments de proteïnes virals (antígens)	Més falsos negatius que la prova de RT-PCR. Podrien necessitar-se més proves per a confirmar els resultats
Prova d'anticossos	Anticossos	Poden donar falsos positius i falsos negatius

- 1. Imagina't que estàs planejant viatjar, o visitar a un familiar que viu en un asil d'ancians. Es requereix que tots els viatgers o visitants tinguin una prova negativa per a infecció activa amb SARS-CoV-2. Quin de les proves esmentades en el vídeo i resumides en la taula triaries? O quina altra informació t'agradaria saber abans de triar?**

Les respostes dels estudiants probablement variaran. Si els estudiants prioritzen la velocitat, és possible que desitgin fer-se la prova d'antigen. Si prioritzen la precisió i volen menys falsos negatius (per exemple, perquè els preocupa el risc d'infectar un membre de la família), és possible que desitgin fer-se la prova RT-PCR. Els estudiants també poden discutir una altra informació que els agradaria saber abans de triar. Això podria incloure coses com ara la disponibilitat de les proves, on poden fer-se la prova, quant costaria cada prova amb o sense assegurança mèdica, si hi ha altres proves que podrien fer-se, etc.

2. Explica com una persona podria donar negatiu en una prova d'infecció activa per SARS-CoV-2 i positiu en la prova d'anticossos contra el SARS-CoV-2.

L'individu podria donar negatiu per a una infecció activa i positiu per a anticossos si va estar infectat en el passat i s'ha recuperat des de llavors. Com s'han recuperat, ja no tindran el virus. Però encara tindran anticossos per haver lluitat contra el virus abans.

3. Imagina que tres persones es fan les tres proves. Proporciona una possible explicació per als resultats de les proves de cada individu mostrats en la següent taula.

Individu	Prova de RT-PCR	Prova d'antígens	Prova d'anticossos	Explicació
1	Positiu	Positiu	Negatiu	<i>Les proves d'antigen i RT-PCR d'aquest individu són positives perquè té una infecció activa. La seva prova d'anticossos és negativa perquè el seu sistema immunològic encara no ha produït anticossos contra el virus.</i>
2	Positiu	Negatiu	Negatiu	<i>La prova de RT-PCR d'aquest individu és positiva perquè té una infecció activa. La seva prova d'antigen també hauria de ser positiva, però va produir un fals negatiu en aquest cas. La seva prova d'anticossos és negativa perquè el seu sistema immunològic encara no ha produït anticossos contra el virus. (Considera discutir amb els estudiants per què és més probable que la prova d'antigen)</i>
3	Negatiu	Negatiu	Negatiu	<i>Les proves d'antígens i RT-PCR d'aquest individu són negatives perquè es va recuperar, per la qual cosa el virus ja no està al seu cos. La seva prova d'anticossos és positiva perquè el seu cos encara té els anticossos que es van crear per a combatre el virus.</i>

4. Taller pràctic

Abans de la pràctica:

Kit recomanat:

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

- Revisar el material del kit i preparar les "work stations", una cada 2 alumnes. És necessari, aproximadament, 45 min. -1 h de preparació.
- Important:
 - Dilueu la solució PBS (veu 10X), és necessari una proveta o una ampolla i idealment aigua destil·lada per a realitzar la dilució.
 - Els anticossos venen liofilitzats. resuspendre'ls en PBS (Abans d'afegir el tween). La dilució no ve donada per protocol, preneu dades estàndard per a ELISA.
 - És necessari un recipient (tipus envàs iogurt) per a la solució de rentada. És necessari paper absorbent per a les rentades.
- Deixeu tot el material sobre les taules.
- Cal explicar l'ús de les micropipetes. Especial atenció a esmentar les dues posicions de l'èmbol, que és on tenen més dificultat.

Seqüència de contactes definits:

Cada número, de l'1 al 20 va ser assignat a un dels estudiants de manera aleatòria. Es va seguir el protocol d'ELISA indicat en el kit.

En vermell les mostres positives de partida.

PRIMER CONTACTE		SEGON CONTACTE	
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