



Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
Instituto Nacional de Metrología de Colombia	Claudia Angélica Guillén Subdirectora de Servicios Metrológicos y Relación con el Ciudadano
María del Rosario González Márquez Directora general	Jairo Gustavo Ayala Forero Subdirector de Metrología Física
José Álvaro Bermúdez Aguilar Secretario general	Rodolfo Manuel Gómez Rodríguez Jefe Oficina de Informática y Desarrollo Tecnológico
Laura Lorena Rivera Roa Jefa Oficina Asesora de Planeación	Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM / Av. Cra. 50 No. 26 - 55 Int. 2 CAN / Bogotá D.C. Colombia / Teléfono: +57 (601) 254 22 22 / Código Postal: 111321 / www.inm.gov.co / contacto@inm.gov.co
Edna Julieth Villarraga Farfán Subdirectora de Metrología Química y Biología	

Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) /Carlos Andrés Castro Rojas, Claudia Patricia Tere Peña, María Mercedes Arias Cortés [y otros] -- Bogotá DC, (Colombia): Instituto Nacional de Metrología, 2023.
132 páginas
Incluye referencias bibliográficas, tablas e imágenes.
ISBN 978-628-95752-5-5
1.Objetivo 2. Alcance 3. Abreviaturas y símbolos 4. Introducción 5. Definiciones 6. Fundamentos de la técnica de PCR 7. Selección de la técnica de PCR 8. Consideraciones de recursos 9. Procedimientos operativos de análisis 10. Estimación de la incertidumbre de medición 11. Presentación de los resultados 12. Aseguramiento de la validez de los resultados 13. Trazabilidad metrológica de los resultados 14. Problemas frecuentes y soluciones.

Edición y redacción

Carlos Andrés Castro Rojas
Claudia Patricia Tere Peña
María Mercedes Arias Cortés
Andrés Felipe León Torres
John Emerson Leguizamón Guerrero
Sergio Luis Dávila González
Gustavo Adolfo Garzón Fajardo
Karla Geraldine Rodríguez Mejía

Fotografía

Valentina Ospina Rodríguez

Diseño y diagramación



Puntoaparte.com

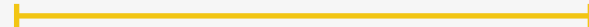
ISBN 978-628-95752-5-5
Primera edición: Noviembre de 2023

Esta publicación puede ser citada como:

Castro-Rojas, C., Tere-Peña, C., Arias-Cortés, M. y otros. Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Bogotá DC. Colombia: Instituto Nacional de Metrología. 2023. 132 pp.

Esta guía se desarrolló en el marco del proyecto “Plan de Fortalecimiento del Instituto Nacional de Metrología como Centro de Investigación” (Código 9932100271370) financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MinCi

Contenido



Objetivo
Página 8



Alcance
Página 9



**Abreviaturas
y símbolos**
Página 10



01. Introducción
Página 12



02. Definiciones
Página 14



**03. Fundamentos de
la técnica de PCR**
Página 26



**04. Selección de la
técnica de PCR**
Página 36



**05. Consideraciones
de recursos**
Página 38



**06. Procedimientos
operativos de análisis**
Página 44



**07. Estimación de la
incertidumbre de medición**
Página 92



**08. Presentación de
los resultados**
Página 96



**09. Aseguramiento de la
validez de los resultados**
Página 104



**10. Trazabilidad metrológica
de los resultados**
Página 11



Objetivo

Brindar lineamientos a las personas encargadas de la implementación, verificación y control metrológico de los ensayos de detección y medición de ácidos nucleicos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para asegurar la validez de los resultados obtenidos mediante los métodos de detección y/o cuantificación en los modos punto final y tiempo real.



Alcance

Esta guía ofrece un marco conceptual y operativo para contribuir al aseguramiento de la validez de los resultados de los análisis y las mediciones basadas en la PCR en tiempo real y las detecciones basadas en la PCR punto final. En función de las necesidades de los laboratorios de ensayo, esta guía puede ser usada como un documento de referencia para implementar sus propios procedimientos, manuales e instructivos. Los lineamientos y las recomendaciones que ofrece esta guía están en la misma línea de los requerimientos establecidos en las normas ISO 17025:2017 e ISO 15189:2022 y con la guía de *Información mínima para la publicación de experimentos de PCR en tiempo real (MIQE)*. Cuando sea pertinente, en el documento se hace referencia

a estas u otras normas nacionales o internacionales aplicables.

Este documento está enfocado en el análisis



Abreviaturas y símbolos

ADN	ácido desoxirribonucleico	CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
cADN	ADN complementario	Cq	ciclo umbral/ ciclo de cuantificación
gADN	ADN genómico	DEPC	pirocarbonato de dietilo
AN	ácidos nucleicos	ddPCR	PCR digital modo gotas
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos	dNTPs	deoxinucleótidos fosfato
ARN	ácido ribonucleico	dsADN	ADN doble cadena
mARN	ARN mensajero	dsARN	ARN doble cadena
rARN	ARN ribosomal	E	eficiencia de amplificación
CC	control de calidad	FN	tasa de falsos negativos
cdPCR	PCR digital modo chips	FP	tasa de falsos positivos



GADPH	gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	PP	probabilidad posterior
GUM	guía para la expresión de incertidumbre en la medición	qPCR	PCR en tiempo real
Ha	hipótesis alternativa	RSD	desviación estándar relativa
Ho	hipótesis nula	RT	retrotranscripción o transcripción reversa
LR	índice de probabilidad	RT-PCR	PCR transcriptasa reversa
MR	material de referencia	SDS	dodecil sulfato de sodio
MRC	material de referencia certificado	SP	especificidad
NMKL	Comité Nórdico de Análisis de Alimentos	SS	selectividad
pb	pares de bases	ssADN	ADN cadena sencilla
		u_m	incertidumbre de medición

NOTA 1: el ciclo de cuantificación es un término genérico que incluye el ciclo umbral (Ct), ciclo de cuantificación (Cq), el punto de cruce (Cp), el punto de despegue y todos los demás términos específicos del instrumento que se refieren al ciclo fraccional utilizado para cuantificar la concentración de la secuencia objetivo en el ensayo de qPCR (1)

NOTA 2: el ciclo de cuantificación está basado en un umbral aplicado a todas las muestras o en un análisis de regresión de la señal para cada muestra (1).

- ✓ **Concentración en número de copias:** número de moléculas (copias) que contienen una secuencia específica de ácido nucleico en un volumen definido (1).
- ✓ **Confirmación metrológica:** conjunto de operaciones requeridas para asegurarse de que el equipo de medición es conforme a los requisitos correspondientes a su uso previsto (4).
- ✓ **Control interno de amplificación:** secuencia conocida de ADN no relacionada con el ADN objetivo y que, usando los mismos reactivos de la mezcla de reacción, es coamplificada con sus propios primers en la misma corrida junto con el ADN objetivo. Puede ser una secuencia de ADN exógena, adicionada a la muestra de ensayo (anexo 1), o un ácido nucleico que, normalmente, está siempre presente como parte de la matriz de la muestra de ensayo (control endógeno). La ausencia de señal que se genera a partir de

este control indica un resultado falso negativo que puede ser atribuido a la presencia de inhibidores en la mezcla de reacción, incluida la propia muestra de ensayo; teniendo en cuenta que, sí se pueda detectar una señal de amplificación a partir de una dilución de la misma muestra que contiene este control. En caso contrario, la ausencia de señal positiva a cualquier concentración de la muestra control evidencia problemas con los reactivos de amplificación utilizados y/o el procedimiento de ampl

✓ **Control positivo del proceso:** es un control interno que corresponde a la secuencia de ADN o ARN objetivo, capaz de ser amplificada y detectada/cuantificada usando el método de procesamiento y amplificación seleccionados, que se adiciona en una cantidad fija a una muestra blanco o matriz, antes del proceso de extracción (enriquecimiento de la matriz). Permite evaluar aspectos de todo el procesamiento de la muestra, como la eficacia del proceso de extracción, la presencia de inhibidores en la muestra que puedan afectar la retrotranscripción y/o la amplificación, problemas asociados a las diluciones o a los ajustes del método de amplificación y/o a problemas con los reactivos de amplificación (5).

✓ **Control sin molde, (NTC por sus siglas en inglés):** reacción de control que contiene todos los reactivos, excepto el molde del ácido nucleico de la muestra de ensayo (1). Su función es evaluar la posibilidad de que la formación de dímeros de primers puedan interferir con la eficiencia de la reacción de amplificación y la detección del producto de amplificación y/o para evaluar la presencia de material contaminante en la mezcla de reacción que pueda dar lugar a la detección de falsos positivos en la etapa de amplificación. También, se puede usar en ensayos de qPCR para evaluar el ruido de fondo del ensayo y establecer la respectiva línea base.

NOTA: este control se utiliza para demostrar la ausencia de ácidos nucleicos contaminantes. En lugar del ADN molde, por ejemplo, se añade a la reacción un volumen correspondiente de agua

libre de ácido nucleico. A veces, también se utiliza el término «control de reactivos de PCR» (1).

✓ **Corrida:** nombre genérico asociado al proceso de amplificación de una muestra de ens

de amplificación, unido a una sonda de ADN complementaria a la secuencia del ADN molde. El concepto de detección está asociado, en el ámbito clínico, a los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) que, en conjunto, se refieren a las técnicas de amplificación usadas para detectar una secuencia específica de un ácido nucleico que permita la identificación de una especie o subespecie de microorganismo.

- ✓ **Gen de interés (GOI, por sus siglas en inglés):** en relación con los ensayos de medición de expresión por qPCR, el gen de interés es el gen cuyo nivel de expresión es analizado o cuya secuencia es amplificada con fines de análisis, detección y/o cuantificación (1,10, 12).
- ✓ **Gen de referencia (GOR, por sus siglas en inglés):** en relación con los ensayos de medición del nivel de expresión de uno o varios genes de interés por qPCR, el gen de referencia es un gen específico presente en cada muestra a una concentración aproximadamente constante, que es resistente a las fluctuaciones de respuesta debido a cambios en las condiciones biológicas o experimentales, o es estable dentro de una especie o taxón en particular (1). Este gen de referencia se usa, habitualmente, para realizar la normalización del valor de expresión relativa del gen de interés en los métodos de medición basados en qPCR. También, puede ser usado como control interno de amplificación en los ensayos basados en PCR punto final.

NOTA: históricamente, los genes de referencia se han denominado genes constitutivos. Sin embargo, al medir el ARN, se pueden utilizar muchos objetivos que no se pueden considerar genes constitutivos; de ahí que el término de preferencia sea «gen de referencia» (10).

- ✓ **Identificación:</**

NOTA: las mediciones no son de aplicación a las propiedades cualitativas.

NOTA: una medición supone una comparación de magnitudes o el conteo de entidades.

NOTA: una medición supone una descripción de la magnitud compatible con el uso previsto de un resultado de medida, un procedimiento de medida y un sistema de medida calibrado, conforme a un procedimiento de medida especificado, incluyendo las condiciones de medida.

✓ **Mensurando:** magnitud que se desea medir (8).

NOTA 1: la especificación de un mensurando requiere del conocimiento de la naturaleza de la magnitud y de la descripción del estado del fenómeno, cuerpo o sustancia, cuya magnitud es una propiedad, incluyendo las componentes pertinentes y las entidades químicas involucradas (8). Por ejemplo, en la detección del virus SARS-CoV-2 para el diagnóstico clínico de COVID-19 mediante qPCR, el mensurando se podría definir como la secuencia del gen E que está flanqueada por los primers específicos en el ARN genómico de los viriones de SARS-CoV-2, presentes en una muestra de hisopado nasal; o bien, el mensurando podría ser la misma secuencia del gen E flanqueada por los mismos primers específicos, pero en una muestra de plasma sanguíneo. Para este ejemplo, aunque los mensurandos son diferentes porque las muestras son distintas, la secuencia objetivo es decir el analito, en ambos casos, sería la misma secuencia de ARN que es retrotranscripta y, posteriormente, amplificada usando los primers específicos.

NOTA 2: la medición, incluyendo el sistema de medida y las condiciones bajo las cuales esta se realiza, podría alterar el fenómeno, cuerpo o sustancia, de tal forma que la magnitud bajo medición difiera del mensurando. En este caso, sería necesario efectuar la

detectados típicamente mediante un procedimiento de electroforesis en gel combinado con la utilización de un fluoróforo intercalante en el ADN producido (3,7).

- ✓ **PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés):** procedimiento enzimático que combina la amplificación *in vitro* de segmentos de ADN específicos con la detección y cuantificación de productos de PCR específicos durante el proceso de amplificación (1,7).

Nota: mientras que la PCR produce copias de la secuencia de ADN específica, el marcador fluorescente emite fluorescencia en proporción directa a la cantidad de ADN presente (que, teóricamente, se puede usar para calcular la cantidad original de ese ADN presente en una muestra antes del inicio de la PCR) (1).

- ✓ **Primers (oligonucleotidos) o cebadores:** secuencias de oligonucleótidos sintéticos de ADN de longitud definida, complementarios a los extremos 3' de cada una de las dos cadenas de la molécula de ADN, que contiene la secuencia objetivo y que delimitan dicha secuencia objetivo del ADN analíticamente relevante para los ensayos de detección y medición por PCR (1,6,16). Por lo general, tienen de 15-30 nucleótidos.
- ✓ **qPCR con transcripción reversa, RT-qPCR:** proceso por el cual una cadena de ARN se retrotranscribe en su ADN complementario (cADN) usando la enzima transcriptasa reversa y el cADN resultante se amplifica posteriormente mediante qPCR (3).

Nota: este proceso puede ser de uno o dos pasos.

de magnesio, la presencia de sales de cationes monovalentes (KCl o NaCl) y una temperatura elevada (17).

La mezcla de reacción, que contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo el proceso de amplificación, se coloca en un equipo de amplificación (termociclador); allí se llevan a cabo ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento que permiten amplificar la región específica del ADN. Cada uno de estos ciclos de amplificación consta de las siguientes etapas (figura 1) (16):

Etapas de desnaturalización inicial: en esta fase, se da la disociación de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas ambas cadenas del dsADN molde. Se caracteriza por darse a una temperatura elevada (entre 94 °C y 96 °C), por lo general, por un periodo fijo de entre 1 a 2 minutos.

1 a 2 min | 94 °C - 96 °C

Etapas de anillamiento: en esta fase, se da la unión de los *primers* por complementariedad de bases con la secuencia objetivo a cada una de las cadenas en la molécula de ADN. La temperatura de esta etapa del proceso depende de la secuencia de los *primers* empleados y, por lo general, se encuentra entre 3 °C y 5 °C por debajo de la temperatura de fusión de los *primers* (T_m); habitualmente, se establece dentro

del rango de entre 50 °C y 60 °C por un periodo fijo de entre 15 a 30 segundos.

15 a 30s | 50 °C a 60 °C

Etapas de extensión o elongación: en esta fase, la ADN polimerasa añade nuevos nucleótidos complementarios a la cadena molde a partir de los extremos 3' libres de los *primers*. El resultado es una nueva molécula de ADN de doble cadena. La temperatura, en esta etapa, generalmente se fija entre 70 °C y 72 °C para permitir que la enzima trabaje cerca de su máxima eficiencia por un periodo de entre 30 y 60 segundos. Si bien su duración es dependiente del tamaño del fragmento que se va a amplificar, este tiempo sugerido es adecuado para fragmentos menores de 1000 pb.

30 a 60s | 70 °C a 72 °C

Etapas de desnaturalización en ciclo: en esta etapa del proceso, la temperatura se eleva (94 °C - 96 °C) en un periodo fijo de entre 15 y 30 segundos para liberar, parcialmente, las dos cadenas de ADN de los amplicones generados.

15 a 30s | 94 °C - 96 °C

Las etapas 2 a 4 se repiten de manera cíclica en el termociclador. Son habituales 25 a 45 ciclos (25X - 45X) de amplificación. Con cada ciclo de amplificación y en condiciones ideales, la cantidad de amplicones se incrementa exponencialmente por un factor de 2ⁿ, en donde (n) es el número de ciclos.

NOTA: en los ensayos basados en qPCR, habitualmente las etapas de anillamiento y extensión se llevan a cabo conjuntamente si la T_m del amplicón lo permite y es particularmente importante cuando se usan sondas TaqMan®.

3.1. PCR PUNTO FINAL

Esta técnica se caracteriza por realizar una amplificación a punto final, seguida por la visualización de los productos de amplificación mediante una electroforesis en gel, que puede ser en una matriz de agarosa o de poliacrilamida. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa (aportada por el grupo fosfato), por lo que, al realizar la electroforesis, estos migran en dirección al ánodo (polo positivo). La electroforesis tiene una capacidad de separación de diferentes fragmentos de tamaños desde 50b hasta 2Mb, dependiendo del tipo de gel y de la concentración de la matriz (18). Entre las ventajas que ofrece la PCR en punto final, se tiene que es una técnica de relativo bajo costo, que se puede implementar con facilidad en la mayoría de los laboratorios de ensayo y que permite la detección de secuencias específicas de ADN, o de ARN en combinación con la retrotranscripción, con un alto grado de confianza si el método ha sido validado de manera apropiada; además, se puede

usar como técnica preparativa para otros tipos de análisis moleculares. Teniendo en cuenta la gran cantidad de bases de datos con información creciente de secuencias de diferentes especies, es relativamente sencillo diseñar métodos de detección con un alto nivel de reproducibilidad, basados en esta técnica. Dado el empleo generalizado de la PCR, hay muchos métodos normalizados ya publicados. Por otra parte, se puede asociar fácilmente a otros procedimientos postamplificación, que requieran cantidades apreciables de ADN. Las limitaciones de la PCR punto final incluyen su baja sensibilidad y su bajo rango dinámico, lo que restringe su uso a métodos de detección, es decir ensayos cualitativos. Otra limitación inherente a la técnica es la necesidad de realizar la detección de manera independiente a la amplificación, lo que obliga a hacer manipulaciones adicionales a las muestras de ensayo con el consiguiente riesgo de contaminación cruzada.

La ecuación 1 permite calcular la eficiencia del proceso de amplificación en donde (E) es la eficiencia de amplificación definida como el número de copias de ADN, obtenidas en cada ciclo, y (b) es la pendiente de la curva de calibración. En condiciones ideales, en esta fase, se generarían dos copias ($E = 2$) a partir de cada molécula de ADN presente en la muestra en cada ciclo: $2 = 10^{-1/b}$, lo que implica una pendiente para la curva de calibración de -3.322. En la práctica, la eficiencia se expresa en porcentaje (% E) y son comunes porcentajes de eficiencia de amplificación de entre 90 % y 110 % (1):

$$\%E = (E - 1) * 100 \%$$

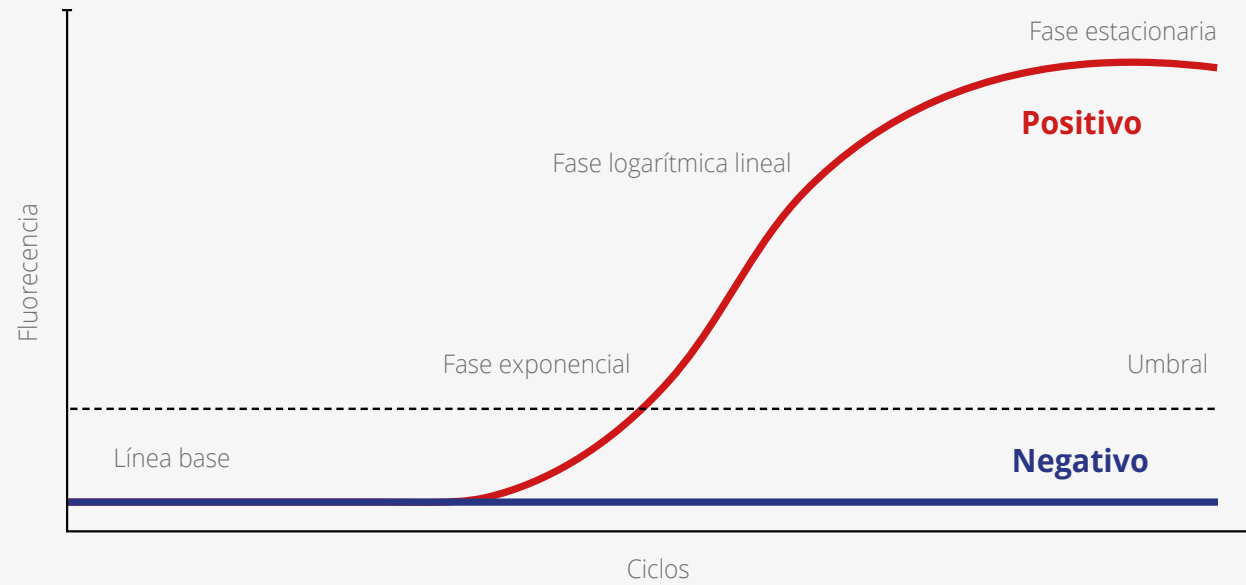
Ecuación 2

Es importante destacar que, la eficiencia de amplificación se afecta por factores como la secuencia de los *primers*, la cantidad de *primers* en la mezcla de reacción, la cantidad de ADN molde inicial, el tipo de ADN polimerasa, la cantidad de Mg^{2+} disponible en la mezcla de reacción, las condiciones de amplificación y la presencia de activadores o inhibidores en la mezcla de reacción, de forma que las variaciones, en estos factores, alteran la eficiencia y, por lo tanto, los resultados de la PCR.

En esta fase exponencial del proceso de amplificación, se determina el ciclo umbral o ciclo de cuantificación (Cq), que corresponde al ciclo de amplificación a partir del que se detecta una señal dada de fluorescencia, asociada al proceso de am-

plificación por acumulación de un número suficiente de amplicones y que, en forma gráfica, corresponde

FIGURA 2.
Fases de la cinética de amplificación por qPCR



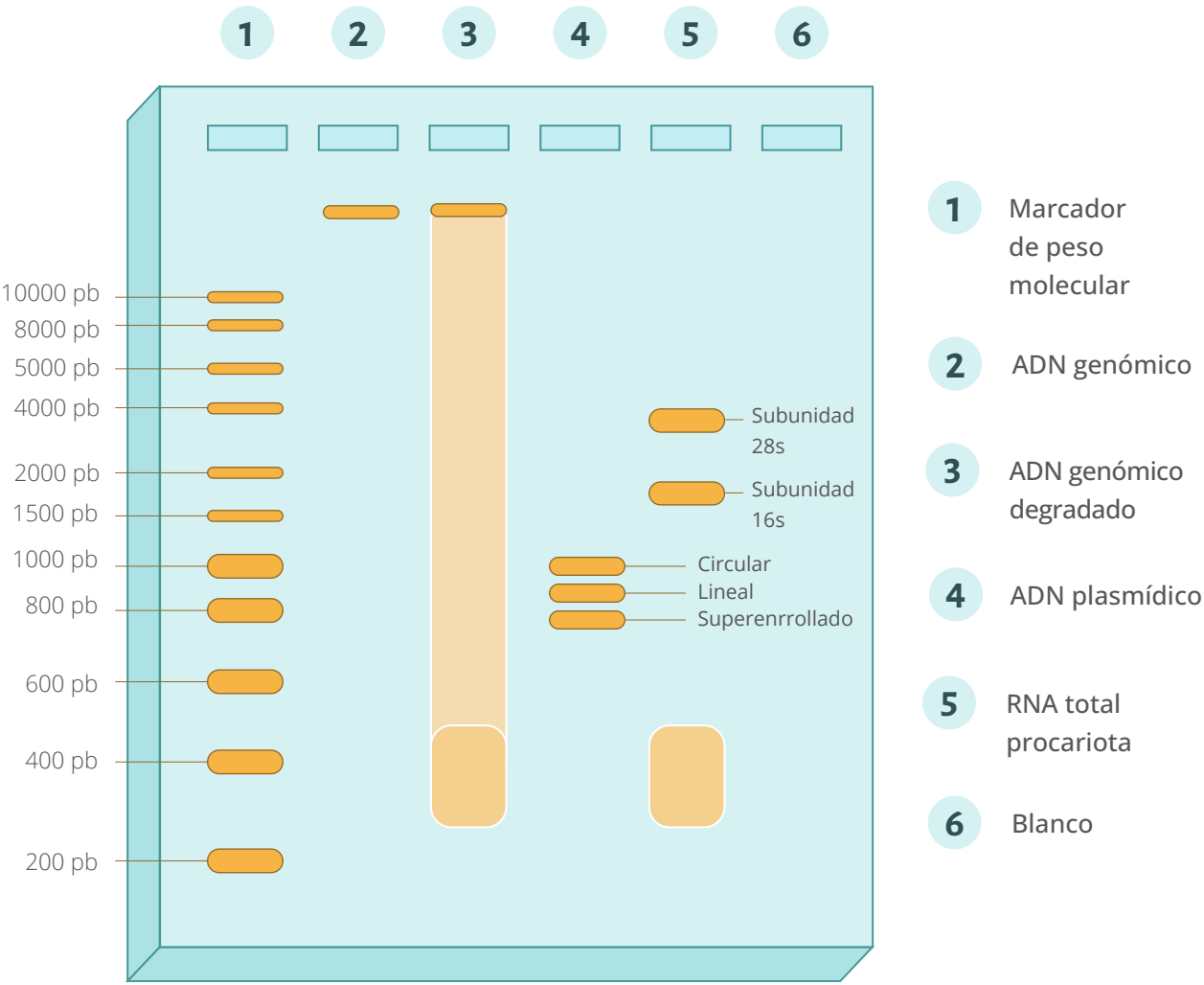
3.3. PCR DIGITAL (*DIGITAL PCR* O *dPCR*)

Es una técnica con mayor sensibilidad, empleada, principalmente, en los ensayos clínicos e identificación de microorganismos en concentraciones muy bajas. Esta técnica ofrece una cuantificación precisa y absoluta de los ácidos nucleicos sin el uso de una curva de calibración y sin dependencia de la eficiencia de amplificación.

La PCR digital funciona al dividir una muestra de ADN o cADN en muchas particiones, ya sea en múltiples gotas o en múltiples pozos en los que se llevan a cabo reacciones de PCR para-

lelas individuales. Aquellas particiones en las que se amplifique la región objetivo producirán señal mediante la emisión de fluorescencia a partir de un fluoróforo, que se ha adicionado previamente a la mezcla de reacción y que es capaz de intercalarse a

FIGURA 5.
Electroforesis de ADN en gel de agarosa



Otras técnicas utilizadas para hacer la evaluación de integridad de ADN incluyen PCR

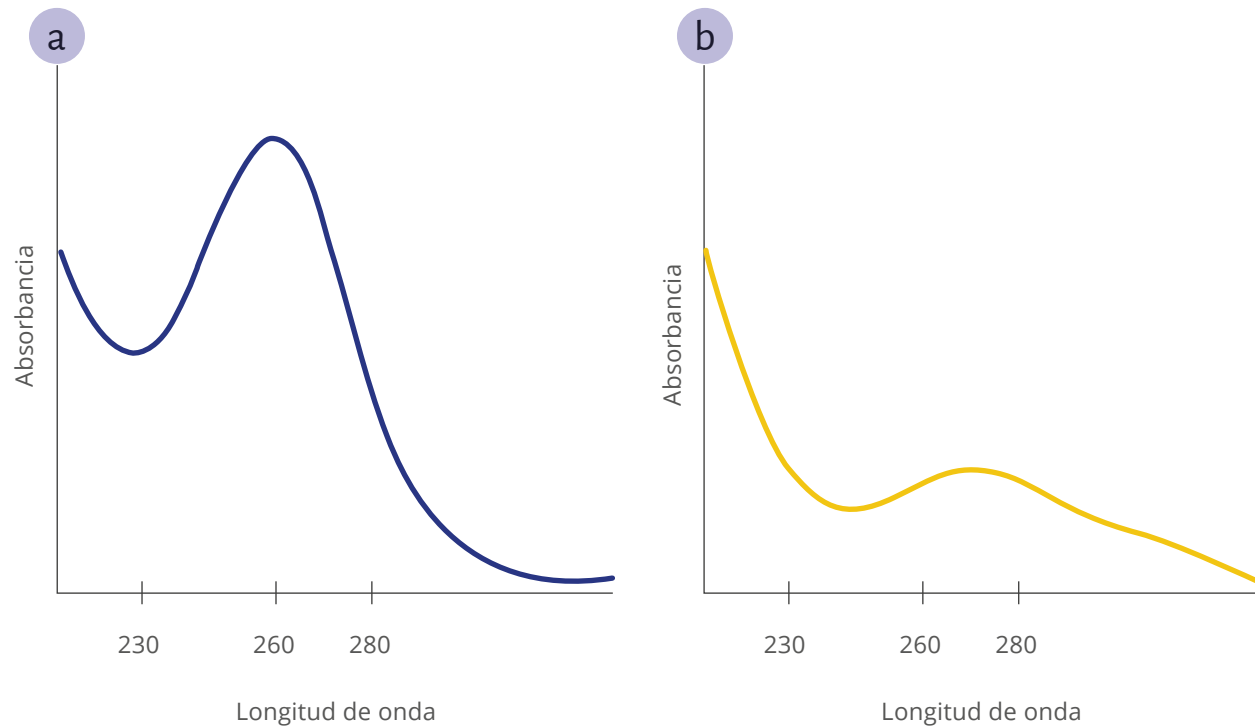
Como hay varios contaminantes que pueden inhibir tanto la PCR, como la transcripción inversa, el laboratorio debe definir sus umbrales para rechazar o aceptar una muestra. Es importante tener en cuenta que la relación de absorbancias a 260 nm / 280 nm puede variar con el pH y la fuerza iónica (34). En la norma ISO 21571 se proporcionan más detalles con respecto a la extracción de ácidos nucleicos con fines de análisis. En las figuras 6a y 6b se muestra un espectro de absorbancia de buena y baja calidad para un ácido nucleico, respectivamente.



FIGURA 6.

Espectro de absorbancia de muestras de ácido nucleico.

Espectros de absorción típicos para extractos de ácidos nucleicos



la mezcla. No se debe emplear vórtex para homogeneizar las muestras, sobre todo, cuando se trabaja con ácidos nucleicos de gran tamaño (por ejemplo, gADN), dado que induce la fragmentación de los ácidos nucleicos.

Para las soluciones que contienen ADN polimerasa y las enzimas en general, se sugiere hacer una inversión suave para mezclar, dado que la agitación fuerte puede inducir la desnaturalización y su consecuente inactividad. Adicionalmente, se deben tener en cuenta todas las condiciones de uso recomendadas por el fabricante para su adecuado desempeño durante la PCR. Por ejemplo, las polimerasas Hot-Start requieren de un calentamiento a 95 °C para activarse y empezar a polimerizar, por lo

que no hay ningún inconveniente en mantener la mezcla de reacción a temperatura ambiente mientras se lleva al termociclador. Sin embargo, otras mezclas contienen polimerasas que se deben mantener en hielo durante su traslado al termociclador para evitar amplificaciones de fragmentos inespecíficos (17).

En general, cuando se utilizan reactivos comerciales individuales, la ADN polimerasa se comercializa con un buffer específico formulado para asegurar su estabilidad y una óptima amplificación; sin embargo, en algunos casos, se pueden emplear aditivos en la mezcla de reacción, que pueden mejorar el desempeño de la PCR (tabla 5); esto, siempre y cuando, se haya validado su uso (20).

TABLA 5.
Aditivos empleados en la mezcla de PCR

REACTIVO	FUNCIÓN	CONCENTRACIÓN RE
----------	---------	------------------

