

## LA TÉCNICA PCR

---

Esta técnica permite amplificar de manera selectiva fragmentos del ADN de un determinado microorganismo, situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas. Estas dos regiones se utilizan como iniciadores en la reacción de síntesis del ADN, que está catalizada por la enzima ADN polimerasa. La reacción de PCR consta de varios ciclos de amplificación sucesivos, cada uno de los cuales incluye tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación. Tras la serie de ciclos, el resultado que se obtiene es la amplificación exponencial del fragmento de ADN seleccionado.

En los diagnósticos por PCR, el ácido nucleico -ADN o ARN- son aislados de la muestra, y posteriormente amplificados (en el caso del ARN con un paso previo de transcripción) utilizando "primers" complementarios específicos para obtener las secuencias del patógeno objeto del ensayo. Las referencias y controles se realizan simultáneamente (los controles internos monitorizan la extracción y la eficiencia de la PCR). Las secuencias amplificadas se visualizan y se graban según los protocolos y la instrumentación.

Nuestros análisis se basan en la PCR a tiempo real (q-PCR), y en ellos se introducen 2 pares de cebadores de los cuales uno de cada pareja, estará ligado a una estructura fluorescente que solamente responde a la excitación cuando el cebador este formando parte del amplicon, resultado de cada ciclo de la amplificación. En cada pocillo de los test, se detectan dos regiones del DNA deseado, de un mismo o de otro organismo.

## VENTAJAS DE LA TÉCNICA PCR

1. Especificidad: La especificidad de la reacción de PCR está condicionada por el carácter restrictivo del fragmento de ADN a amplificar entre las estirpes de una misma especie, entre las especies de un mismo género y entre un grupo de microorganismos filogenéticamente relacionados (Woo et al., 2008).

En resumen, las reacciones de PCR pueden diseñarse para la amplificación de fragmentos de genes basados en caracteres genéticos (la existencia de un transposón, ARN ribosómico), bioquímicos (una enzima del metabolismo), o factores de patogenicidad (hemolisinas, fimbrias etc...)

2. Sensibilidad: Una de las ventajas de la PCR es que tanto la cantidad como la calidad del ADN a amplificar, no necesitan ser muy altas. El ADN extraído a partir de una única célula, puede ser suficiente para una buena reacción de amplificación.

### Las ventajas del diagnóstico por PCR frente a otros métodos diagnósticos son:

1. En muchos test serológicos las reacciones cruzadas reducen la especificidad; un resultado positivo puede estar causado por otro organismo en lugar del buscado. Los ensayos moleculares, por otro lado, son altamente específicos debido a que detectan la secuencia genética única del patógeno buscado. Incluso se pueden distinguir variedades de patógenos de la misma especie.
2. La influencia de falsos positivos son reducidas en los test moleculares, debido a que mientras otros métodos detectan los anticuerpos que inducen los patógenos y que pueden no estar presentes, el diagnóstico molecular detecta el material genético del propio patógeno, lo que demuestra claramente la presencia del patógeno en la muestra.

***Las infecciones latentes o tempranas pueden ser detectadas por PCR antes de que los síntomas de la enfermedad sean apreciables ya que la detección no depende de los niveles de anticuerpos.***

La PCR a tiempo Real permite, por ejemplo:

- Identificación del patógeno específico que causa la patología.
- Selección del tratamiento más apropiado y realización de un seguimiento preciso del paciente.
- Acortar el tiempo necesario para confirmar el diagnóstico clínico.
- Detección temprana de la infección de los patógenos.