



CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

## **MEMORIA DE LA NECESIDAD DE ADQUISICIÓN POR EMERGENCIA DE UN EQUIPO PCR DIGITAL (EN GOTAS)**

### **Introducción**

Debido a la pandemia causada por el virus SARS-CoV2, el Gobierno de España ha solicitado ayuda y encargado al CSIC llevar a cabo investigaciones relacionadas con el virus SARS-CoV2 y la enfermedad que produce (COVID-19), así como otros temas relacionados con la materia.

En este contexto, un tema muy relevante es poder detectar el SARS-CoV2 con métodos específicos y altamente sensibles. En este sentido, la PCR digital, es una tecnología clave en investigaciones, diagnósticos complementarios sobre COVID-19, y en general en aquellos casos en que sea necesario máxima sensibilidad (estos equipos detectan hasta 1 molécula de RNA/DNA).

### **Necesidad y Urgencia**

Actualmente se están realizando test de diagnóstico para COVID-19 de detección rápida (antígeno y anticuerpo) con una tasa de error alta. Para confirmar los falsos negativos, o para llevar a cabo tests más fiables, se llevan a cabo PCRs cuantitativas, con una fiabilidad mucho mayor y con un número de falsos negativos inferior. Pero cuando la **carga viral es muy baja** (muy al principio o muy al final de la infección) **la PCR cuantitativa no es capaz de detectar positivos**, y por lo tanto esas personas son trasmisoras del virus. En casos de personal de ayuda social, y en particular del personal sanitario, es muy importante poder detectar una mínima carga viral antes de permitir a esa persona acudir a su puesto de trabajo. **La PCR digital tiene una sensibilidad muy superior**, es realmente cuantitativa sin necesidad de estándares internos, y es menos sensible a inhibiciones. Es una **tecnología fundamental para poder detectar una mínima carga viral** en personal clínico que haya padecido COVID-19 y por lo tanto una vez aparentemente recuperado, autorizar su vuelta a la asistencia clínica.

Por ello es una tecnología extremadamente necesaria a ser **adquirida con urgencia** para **diagnóstico clínico de casos particulares** en los que haya que **descartar una mínima presencia de SARS-CoV2**. Además, esta tecnología es de **extrema necesidad en proyectos de investigación básica** relacionados con este **virus**, debido a su sensibilidad y precisa cuantificación. La disponibilidad de este equipo ofrecerá un apoyo importante a los numerosos proyectos COVID19 que se están financiando en el CSIC y en otros organismos públicos de investigación y avanzar rápidamente en el conocimiento del virus para combatirlo.

También **urge su necesidad** para, de manera muy precisa, poder **cuantificar** las diferencias de expresión de los **receptores humanos** que usa el virus, **las citoquinas alteradas**, etc, o características del **genoma y transcriptoma humano**, en pacientes con distintas sintomatologías, y así entender mejor esta heterogénea y compleja enfermedad para poder combatirla.

C/Nicolás Cabrera 1  
Cantoblanco (Campus UAM)  
28049 - Madrid .  
Teléfono: +34-911964401  
Fax: +34-911964420

CSV : GEN-735c-12c6-44cf-665d-16af-6f03-f60f-fd20

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://portafirmas.redsara.es/pf/valida>

FIRMANTE(1) : MARIA BEGOÑA AGUADO OREA | FECHA : 06/04/2020 10:09

FIRMANTE(2) : GERMAN LERMA RODRIGO | FECHA : 06/04/2020 10:34 | Sin acción específica





CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

El equipo se localizará en el Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva (GENGS) del CBMSO (CSIC-UAM), siendo manipulado por el personal altamente cualificado del mismo, con gran experiencia en PCR cuantitativa. Se ofrecerá como prestación urgente y prioritaria a cualquier investigación o necesidad clínica relacionada con COVID-19.

### **Financiación:**

Con cargo al programa **INCIDENCIAS COVID-19**, aplicación presupuestaria **463 AF 620.31.127**

### **Fundamentos de la tecnología:**

La tecnología de PCR digital se fundamenta en los siguientes principios básicos:

- Partición/dilución de la muestra hasta alcanzar 0 ó 1 copia del ADN (ARN) diana por partición.
- Amplificación y detección específica mediante PCR en presencia de un fluoróforo.
- Conteo del número de reacciones positivas tras la amplificación.

La partición/dilución de la muestra permite la detección y cuantificación de dianas moleculares con alta sensibilidad, exactitud y especificidad; mitiga efectos de inhibición, de competición entre dianas y mejora la capacidad de discriminación en ensayos basados en diferencias de un solo nucleótido. Permite una productividad elevada sin dependencia de la eficiencia de reacción (existente en la qPCR).

Entre las diversas e interesantes aplicaciones de la tecnología, más en relación a COVID-19 se encuentran:

- Cuantificación absoluta sin necesidad de estándares internos: **idónea para análisis de carga viral**, cuantificación microbiana y parasitaria, calibración de estándares moleculares, cuantificación variación en número de copias, etc.
- Detección y cuantificación de secuencias raras en muestras de alta complejidad.
- Expresión génica, especialmente en casos de ARNs de baja expresión.
- Cuantificación de librerías de secuenciación masiva (NGS).
- Validación de resultados de NGS (polimorfismos, variaciones de número de copias, etc.).
- Detección rápida, precisa y económica de edición genómica obtenida mediante CRISPR-Cas9 y similares.

### **PCR digital en gotas (ddPCR):**

Dentro de los equipos en el mercado capaces de realizar PCR digital, se encuentra el ddPCR AUTODG de Bio-Rad. Este sistema es el único que realiza la **PCR digital en gotas (ddPCR, del inglés droplet digital PCR)** de manera totalmente automática y con una capacidad para procesar 96 muestras en cada carrera. Todas las alternativas de PCR digitales no son automáticas y tienen mucha menos productividad de procesamiento de muestras.

C/Nicolás Cabrera 1  
Cantoblanco (Campus UAM)  
28049 - Madrid .  
Teléfono: +34-911964401  
Fax: +34-911964420

CSV : GEN-735c-12c6-44cf-665d-16af-6f03-f60f-fd20

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://portafirmas.redsara.es/pf/valida>

FIRMANTE(1) : MARIA BEGOÑA AGUADO OREA | FECHA : 06/04/2020 10:09

FIRMANTE(2) : GERMAN LERMA RODRIGO | FECHA : 06/04/2020 10:34 | Sin acción específica





CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

Existen en el mercado otros sistemas de PCR digital, pero esta es PCR digital en gotas, de modo que se analizan 20.000 gotas (reacciones) en cada uno de los 96 pocillos de una placa (96 muestras). Actualmente una empresa francesa también ofrece un sistema de PCR digital en gotas, pero sólo puede analizar 12 muestras en lugar de 96.

Por otro lado, el Servicio GENGS del CBMSO, ya posee experiencia previa con un equipo similar, localizado en la Fundación Jiménez Díaz (Madrid), para el cual el personal del Servicio realizó el diseño experimental y el análisis de los resultados (mediante el software correspondiente) para un experimento requerido por un revisor de la prestigiosa revista *Nature*, que solicitó a un investigador del CBMSO, siendo finalmente aceptado y publicado (Parras et al, *Nature*, 560:441-446, 2018).

Este aspecto es muy relevante, ya que una vez recibido el equipo los investigadores pueden comenzar a utilizarlo de manera inmediata sin que sea preciso un curso de formación adicional, lo que ralentizaría la consecución del fin que se pretende y que no es otro que conseguir ayudar en el conocimiento y erradicación de la enfermedad.

### **CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA AUTOMÁTICO DE ddPCR AUTODG (Bio-Rad)**

El sistema automático de PCR digital es capaz de realizar la cuantificación absoluta de secuencias génicas sin necesidad de utilizar recta de patrón. El sistema automático es un sistema multimodular para poder separar las distintas zonas pre- y post-digital PCR y está compuesto de un equipo de generación de particiones automático, un termociclador, un sellador de placas y un lector de particiones y análisis de datos.

Las características de los equipos que componen este sistema automático de PCR digital PCR:

#### **1. Sistema de generación de particiones para digital PCR automático:**

- Capacidad para trabajar con hasta 96 muestras.
- Generar 20.000 particiones de cada una de las 96 muestras de manera automática y las transfiere a una placa de 96 pocillos también de modo automático.
- Puede trabajar con RNA, cDNA o DNA.
- Fácil y rápido de programar. El equipo guía al usuario en todo el proceso de carga de reactivos y muestras
- Posee un filtro HEPA que reduce la contaminación y permite que el sistema pueda ser instalado en cualquier entorno de laboratorio.

#### **2. Termociclador Deep Well:**

- Capacidad para trabajar con hasta 96 muestras
- Permiten trabajar con volúmenes de 1-125 ul.
- Sistema Peltier de calentamiento/enfriamiento
- Gradiente de Temperatura para optimización de reacciones de ddPCR.

#### **3. Sellador de placas automático:**

- Permiten el sellado consistente y uniforme por calor de placas de 96 y 384 pocillos de modo automático.
- Rango de temperatura entre 100 y 190°C.
- Fácil y rápido de programar.

C/Nicolás Cabrera 1  
Cantoblanco (Campus UAM)  
28049 - Madrid .  
Teléfono: +34-911964401  
Fax: +34-911964420

CSV : GEN-735c-12c6-44cf-665d-16af-6f03-f60f-fd20

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://portafirmas.redsara.es/pf/valida>

FIRMANTE(1) : MARIA BEGOÑA AGUADO OREA | FECHA : 06/04/2020 10:09

FIRMANTE(2) : GERMAN LERMA RODRIGO | FECHA : 06/04/2020 10:34 | Sin acción específica





CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

#### 4 Lector de fluorescencia de digital PCR:

- Capaz de procesar desde 1 a 96 muestras simultáneamente.
- Calibrado para trabajar con tres fluorocromos (FAM, HEX o VIC) e intercalantes de ADN de segunda generación (EvaGreen)
- Permite la realización de ensayos multiplex en una misma muestra.
- Permite utilizar como muestras RNA, cDNA y DNA
- Tiene un rango dinámico lineal de cinco órdenes de magnitud.
- Precisión en los datos de un +/- 10%
- Está gestionado por un software de control y análisis capaz de realizar los siguientes análisis: cuantificación absoluta, cuantificación de eventos poco frecuentes, determinación de la variación del número de copias y estudios de expresión génica.

#### Datos de la empresa:

Razón Social: Bio-Rad Laboratories, S.L.

Dirección: C/ Caléndula, 95 - Edificio M - Miniparc II, 28109 Alcobendas

CIF: A 79389920

Teléfono de contacto: 91 590 52 43

Apoderado: José M<sup>a</sup> Fernández. DNI: 2512894Y

Madrid 06 de abril de 2020

Fdo: La investigadora principal

Fdo: El Gerente

Firmado por AGUADO OREA  
MARIA BEGOÑA - DNI  
02603175N el día 06/04/2020  
con un certificado emitido  
por AC Administración  
Pública

Begoña Aguado Orea

Germán Lerma Rodrigo

C/Nicolás Cabrera 1  
Cantoblanco (Campus UAM)  
28049 - Madrid .  
Teléfono: +34-911964401  
Fax: +34-911964420

CSV : GEN-735c-12c6-44cf-665d-16af-6f03-f60f-fd20

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://portafirmas.redsara.es/pf/valida>

FIRMANTE(1) : MARIA BEGOÑA AGUADO OREA | FECHA : 06/04/2020 10:09

FIRMANTE(2) : GERMAN LERMA RODRIGO | FECHA : 06/04/2020 10:34 | Sin acción específica

