



Universidad del Sureste
Escuela de Medicina
SOLIS PINEDA IRVIN URIEL
Grado.3 Grupo. A
Genética

RESUMEN SOBRE EL USO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCION DE SARS-CoV-2.

QUIMICO NAJERA MIJANGOS HUGO

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2

La forma y estructura de los coronavirus es: la **nucleocápside**, donde está estrictamente contenido el material genético (exclusivamente una secuencia sencilla de ARN de alrededor de 32,000 bases), y empaquetado gracias a la **proteína N**, y de la **envoltura**, compuesta por varias proteínas estructurales como la glucoproteína de membrana o **proteína M**, implicada en el ensamblaje del virus y en contacto con la nucleocápside, la **proteína S**, que forma las espigas responsable de la adhesión a la célula huésped, y la **proteína E**, que interacciona con la **proteína M** para la formación de la envoltura. Estas representan las proteínas estructurales más relevantes, aunque hay otras que son necesarias en el proceso replicativo del virus y de infección y entrada en las células.

¿Qué es la reacción de PCR?

Es una reacción donde una enzima llamada ADN polimerasa, copia un fragmento de información genética, en este caso derivada del virus, mediante una serie de reacciones de copiado en cadena. De ahí el nombre de la técnica “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR por sus siglas en inglés). Existen dos versiones: una, donde se pueden ver el total las copias del gen al final de las reacciones de copiado; y otra donde se adiciona un reactivo que libera una señal luminosa cada vez que se fabrica una nueva copia de ADN (ácido desoxirribonucleico). Esta última se llama PCR en tiempo real (PCR-TR).

La técnica para identificar con certeza la presencia del virus SARS-CoV-2, causante de la actual epidemia de CoVID-19, se conoce como PCR en tiempo real. El llamado protocolo de Berlín, estableció una de las primeras metodologías de la prueba de detección, la cual se ha ido refinando conforme ha ido surgiendo más información acerca de los genomas del SARS-CoV-2.



Por tratarse de un virus que contiene ARN (ácido ribonucleico) en su genoma, se aísla ARN de la muestra y se copia la información para generar una molécula de ADN que se puede detectar por PCR-TR.

La prueba de PCR-TR tiene dos ventajas:

1. Por una parte, permite monitorear la acumulación del ADN conforme se va copiando.
2. Se pueden contar el número de copias del coronavirus presente en la muestra.

Diagnóstico de COVID-19 SARS-CoV-2

En términos generales, los métodos de detección de virus respiratorios podrían clasificarse en tres estrategias diferenciadas, cada una de ellas con sus ventajas y limitaciones:

- 1) Detección del material genético del virus (ARN contenido en la nucleocápside)
- 2) Detección del virus como entidad individual, mediante la detección de antígenos virales.
- 3) Detección de los anticuerpos generados en el organismo huésped infectado (test serológico).

DETECCION DEL MATERIAL GENÉTICO

Esta estrategia es la que usa la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción de la polimerasa en cadena). Es una técnica muy establecida, utilizada de manera rutinaria en todos los laboratorios clínicos y que está basada en la amplificación de fragmentos de ADN mediante ciclos consecutivos de incrementos y bajadas de temperatura, lo que permite, a partir de pocas secuencias iniciales de ADN (pocas copias de material genérico) ampliar a grandes cantidades que pueden ser detectadas mediante fluorescencia.



La técnica amplifica ADN, por lo que en el caso de del ARN vírico es necesario primero convertirlo a ADN (por transcripción inversa, RT, reverse transcription) para a partir de entonces iniciar el proceso de PCR (lo que se llama RT-PCR). Una vez el genoma de interés es secuenciado (como en el caso del SARS-CoV-2, cuya secuencia fue dilucidada a las pocas semanas de su aparición), es necesario encontrar aquellas regiones únicas que lo diferencian de otros virus de la misma familia (que serán las que se amplificarán, previo diseño de sondas de detección), para otorgar a la técnica de la especificidad necesaria.

Los pasos necesarios para llevar a cabo la detección mediante test PCR son:

A) Colección de muestra de paciente (tratándose de un virus respiratorio, aquellas muestras con mayor cantidad de virus serán las de origen respiratorio, muestra nasofaríngea o esputo) mediante un bastoncillo.

B) Extracción de ARN vírico y purificación.

C) La muestra purificada se somete a transcripción reversa para obtener ADN.

D) Realización de la PCR. El cóctel de reactivos donde se añade la muestra tratada contiene las sondas de reconocimiento con marcadores fluorescentes. La reacción de PCR se realiza en termocicladores con distintas prestaciones, habiendo multitud hoy en día, pudiendo en algunos casos ser compactos y permitir la detección simultánea de varias muestras. En términos generales, se identifica como resultados positivos a la presencia de ARN vírico aquellos muestras que resulten en una señal fluorescente por encima de un umbral determinado previamente y negativos aquellos con una fluorescencia menor.



Bibliografía

1.- Dr. Juan José López Alarcón. 2020. Detección molecular de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real. Recuperado de: <https://www.estornuda.me/post/deteccion-molecular-de-cov-por-pcr>

2.- Andrés Melián Rivas. 2020. Detección de COVID -19 (SARS-CoV-2) Mediante la Saliva: Una Alternativa Diagnóstica poco Invasiva. Pág. 316-320. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijodontos/v14n3/0718-381X-ijodontos-14-03-316.pdf>

3.- Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas (NanoB2A). Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19: clasificación, características, ventajas y limitaciones. Pág.2-6. Recuperado de: <https://www.ciencia.gob.es/stfls/MICINN/Ministerio/FICHEROS/TecnicasDiagnosticoCOVID19-ICN2.pdf>

