



Universidad del Sureste

Licenciatura en Medicina Humana

Materia:

Genética humana.

Trabajo:

RESUMEN: PCR- SARS CoV2.

Docente:

Q.F.B Hugo Najera Mijangos

Alumno:

Casto Henri Méndez Méndez

Semestre y grupo:

3° "A"

**Comitán de Domínguez, Chiapas a; 18 de noviembre de
2020**

Las pruebas diagnósticas para detectar el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 aún están evolucionando y es importante comprender sus particularidades para la interpretación correcta de los resultados. La técnica de elección para su diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR, del inglés reverse transcription-polymerase chain reaction), en tiempo real.

La PCR cuantitativa es una variante de la PCR que nos permite medir en tiempo real la cantidad de fragmentos de ADN que se van produciendo. Para poder cuantificar la muestra de un paciente en este tipo de PCR, se añaden al tubo de ensayo sondas que se unen únicamente a secuencias específicas del ADN retrotranscrito del virus y emiten fluorescencia. Por tanto, a mayor fluorescencia en la muestra, mayor cantidad de copias del ADN obtenido mediante la retrotranscripción del virus SARS-CoV-2.

Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. El gen E es el más utilizado para el cribado y para el diagnóstico de certeza, el RdRp o el ORF1a. En la reacción también se incluyen cebadores que amplifican el gen de alguna proteína humana, que sirva como control de la calidad de la toma de muestra y del proceso de aislamiento del material genético.

Las muestras recomendadas para el diagnóstico del SARS-CoV-2 por RT-PCR son las del tracto respiratorio superior, como el exudado nasofaríngeo y orofaríngeo, aunque en los niños pequeños es preferible el frotis por lavado o aspirado nasofaríngeo. Si se recogen hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos al mismo paciente se pueden introducir juntos en el mismo tubo de medio de transporte para maximizar la sensibilidad de la prueba.

La sensibilidad de la RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2 depende de la carga viral, del día de la infección en que se toma la muestra y de que esta sea de vías respiratorias altas o bajas. También influyen otros factores como el correcto hisopado, su conservación y transporte al laboratorio en condiciones adecuadas.

El ARN viral en el hisopado nasofaríngeo se vuelve detectable por RT-PCR desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo dentro de la primera semana. No obstante, la línea de tiempo de la positividad no es igual en las

diferentes muestras nasofaríngeas. La positividad disminuye más lentamente en el esputo y aún puede persistir después de que los hisopados nasofaríngeos son negativos.

En una RT-PCR en tiempo real la amplificación del material genético se detecta en el mismo momento en que estaba ocurriendo gracias a la cuantificación de la fluorescencia que se emite en cada ciclo. El ciclo umbral (Ct, del inglés thresholdcycle) es el número de ciclos de replicación necesarios para producir una señal fluorescente y usualmente un valor de Ct inferior a 40 se informa como positivo.

Funcionamiento básico y pruebas de alto rendimiento

La RT-PCR cuantitativa en tiempo real, detecta y cuantifica las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes. Entre las tecnologías de sondeo comercializadas, las de mayor uso en los paquetes diagnósticos incluyen las tecnologías TaqMan y Molecular beacon. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. La ventaja con respecto a la PCR convencional es que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción, sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa, como sucede en la PCR punto final.

Los paquetes diagnósticos que emplean RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2 funcionan mediante la lectura de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp), fragmentos ORF1ab, el gen de la envoltura (gen E), el gen de la proteína núcleo cápside (gen N) y el gen S. Con el fin de mejorar la sensibilidad de la detección, la mayoría de los fabricantes eligen dos o más regiones diana de la secuencia de ácido nucleico viral. El diagnóstico se confirma en los pacientes con resultados positivos tanto para la amplificación del gen ORF1ab como para la del gen N o el gen E (18). La RT-PCR de un paso dirigida a fragmentos ORF1b o al gen N del SARS-CoV-2 fue diseñada para reaccionar con el SARS-CoV y los virus estrechamente relacionados, como el coronavirus del MERS, lo que puede

dar lugar a reacciones falso positivas en la identificación del virus causante de la COVID-19.

Variación de resultados según muestras

El exudado nasofaríngeo es generalmente el método de recolección utilizado al hacer el diagnóstico por RTPCR, pero puede pasar por alto una infección en estadios iniciales, en estos casos es útil una muestra más profunda obtenida por broncoscopía. La muestra bronquial tiene la ventaja de detectar con mayor facilidad el ácido nucleico viral en el líquido del lavado alveolar, seguido de los hisopados de esputo nasal y faríngeo.

En un estudio de 4 880 casos, Liu y col. mostraron que el líquido de lavado alveolar exhibió la tasa positiva del 100 % para el fragmento ORF1ab del SARS-CoV-2; el esputo exhibió una tasa positiva del 49,12 %, y las muestras de hisopados nasales y faríngeos mostraron una tasa positiva baja del 38,25 %.

Positividad de los resultados en el tiempo

En la mayoría de los individuos con infección sintomática por COVID-19, el ARN viral en el hisopo nasofaríngeo se detecta desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo al transcurrir una semana. En un estudio realizado por Wölfel y Col, los hisopos de todos los pacientes tomados entre el primer y quinto día dieron positivos al virus, mientras que ninguna de las 27 muestras de orina y 31 muestras de suero resultaron positivas para el ARN del SARS-CoV-2. En otro estudio realizado por Tang-Xiao y col, el período promedio desde el inicio de los síntomas hasta el resultado negativo de la prueba RT-PCR del SARS-CoV-2 fue de 20 días. En algunos casos, el ARN viral ha sido detectado por RT-PCR seis semanas después de la primera prueba positiva.

Muestras no convencionales para el diagnóstico

Los pacientes con neumonía por COVID-19 en estadios avanzados han demostrado una alta carga de ARN viral para el SARS-CoV-2 al ser analizadas muestras de materia fecal, así como una menor presencia del virus en vías respiratorias. En brotes anteriores de coronavirus que causaron eventos epidémicos se comprobó una implicación entérica en la

transmisión, por lo tanto, debe considerarse para detectar el SARS-CoV-2 en los casos avanzados de COVID-19 el análisis de muestras de hisopado rectal.

Eficiencia y automatización de las pruebas RT-PCR

La dependencia de las configuraciones manuales en la prueba RT-PCR es una de las limitaciones fundamentales durante el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 cuando se trata de escalabilidad y velocidad en escenarios de brotes. Por consiguiente, se requieren flujos de trabajo alternativos para permitir el seguimiento rápido de muestras de alta prioridad. Una plataforma RT-PCR totalmente automatizada, que realice la extracción, la amplificación y la detección de material genético viral sin necesidad de interacción humana podría ser la solución, como lo son el sistema NeuMoDx 96 o la prueba Cobas 6800 SARS-CoV-2.

La disponibilidad de pruebas diagnósticas es crucial para el aislamiento de casos positivos y el seguimiento de la cadena epidemiológica de transmisión, donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa resulta de gran utilidad. Esta prueba exhibe altos indicadores de sensibilidad y especificidad. La muestra que ofrece mayor sensibilidad es el exudado nasofaríngeo, aunque se ha documentado la necesidad de emplear hisopados rectales en casos falsos negativos que mantengan síntomas sugerentes de la COVID-19.

Se trabaja en la automatización y optimización de pruebas diagnósticas, donde la prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP) resulta una alternativa eficaz.

Bibliografía

- González García N, Chang Monteagudo A. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y seguimiento de la infección por el virus SARS-CoV-2. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1262>
- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. Journal of Medical Virology. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad. Disponible en: <https://www.mediagraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>