

Universidad del Sureste

Medicina Humana.

Materia: biología molecular de la clínica

Químico: Nájera Mijangos Hugo

Resumen

Presenta:

- **Hernández López Luis Alejandro,**

Obtención de la muestra y conversión de ARN a ADN mediante Transcriptasa inversa

La transcriptasa inversa es una ADN polimerasa de origen vírico un tanto especial. Mientras el resto de ADN polimerasas sólo puede obtener ADN a partir de una cadena de ADN, la transcriptasa inversa puede sintetizar ADN a partir de una molécula de ARN. ¡Como el de SARS-CoV-2!

Por tanto, el primer paso para detectar la infección por SARS-CoV-2 mediante PCR es la conversión del ARN monocatenario viral en ADN . Para ello, en primer lugar, se obtiene el material genético del virus a partir de un frotis de nariz o garganta del paciente a diagnosticar y se purifica. Debemos tener en cuenta que en la muestra estamos recogiendo también ARN humano, ARN bacteriano e incluso ARN de otros virus. ¡Menudo lío!

Acto seguido, la muestra de ARN obtenida y purificada se mezcla con la transcriptasa inversa (y otros reactivos), para obtener cadenas de ADN, que podemos cuantificar mediante una PCR cuantitativa. Aquí habrá ADN de muchos orígenes (humano, vírico y bacteriano), pero no todo se amplificará en la PCR, ya que es una técnica dirigida a ciertas secuencias específicas (en este caso, secuencias del ADN retrotranscrito del virus).

PCR cuantitativa

Como os comentaba en el post anterior sobre la técnica de la PCR, 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.

Análisis de Resultados

Una vez se está produciendo la reacción de la PCR cuantitativa de la muestra purificada y retrotranscrita del paciente, podemos obtener los siguientes resultados:

Presencia de fluorescencia en la PCR cuantitativa:

Si se detecta un aumento de la fluorescencia durante la reacción de PCR, estamos ante un claro indicio de la presencia de SARS-CoV-2 en el paciente. Recordad que, en esta prueba diagnóstica, la fluorescencia es producto de la amplificación del ADN que hemos obtenido de la retrotranscripción del ARN del virus.

En este caso, diríamos que la prueba ha dado positivo, es decir, el paciente se encuentra infectado, en cierta medida, por SARS-CoV-2.

Ausencia de fluorescencia en la PCR cuantitativa:

Es posible que la prueba no detecte un aumento de la fluorescencia durante la reacción de PCR. En este caso, diríamos que la prueba ha resultado negativa y, por tanto, el paciente no se encuentra infectado por el virus SARS-CoV-2.

Limitaciones de la prueba mediante RT-PCR cuantitativa

Aunque la RT-PCR cuantitativa es una técnica muy interesante a la hora de detectar la infección por SARS-CoV-2 de los pacientes posiblemente infectados, presenta varias limitaciones asociadas que la hacen menos efectiva de lo que debería.

La primera de las limitaciones de las pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR cuantitativa es que solo pueden determinar la infección por SARS-CoV-2 en el momento de la prueba. Esto quiere decir que, utilizando esta técnica, no podemos saber si un paciente estaba infectado días antes de la prueba.

Otra de las limitaciones de la RT-PCR cuantitativa es la velocidad a la que se lleva a cabo. Aunque, por lo general, la PCR es una técnica bastante rápida para amplificar muestras de ADN, se demora varias horas hasta poder establecer unos resultados. El diagnóstico mediante este método es, por tanto, lento en la situación actual, en la que se necesitan resultados rápidos para poder controlar a los pacientes infectados.

Por último, aunque la RT-PCR cuantitativa es una técnica relativamente fiable, se pueden producir falsos positivos o falsos negativos. Se denominan falsos negativos a todos aquellos resultados negativos de pacientes infectados por SARS-CoV-2, mientras que se considera falso positivo a un resultado positivo de un paciente no infectado. Estos errores en el diagnóstico pueden determinar incorrectamente el seguimiento de los pacientes.

Biografia

<https://www.broadinstitute.org/news/enabling-coronavirus-detection-using-crispr-cas13-open-access-sherlock-research-protocols-and>