

**Universidad Del Sureste**

**Materia: Biología Molecular de la Clínica**

**Docente: QFB Hugo Nájera Mijangos**

---

**Resumen: Uso de la PCR para la detección de SARS-  
CoV-2**

**Alumno: José Alfredo Sánchez Álvarez**

**8° Semestre      Grupo “Único”**

**Comitán de Domínguez**

**17/11/2020**

## **USO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCION DE SARS-CoV-2**

La confirmación estándar de la infección aguda por el SARS-CoV-2 se basa en la detección de secuencias virales específicas mediante pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (AAN), como la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR). Las dianas de las pruebas de amplificación son ciertas regiones de los genes E, RdRP, N y S.

Los métodos moleculares son altamente sensibles y específicos, requieren de personal entrenado y de infraestructura de bioseguridad nivel II o infraestructura equivalente con cabinas de bioseguridad o cabinas de contención primaria para el procesamiento seguro de las muestras previa a la inactivación. La adecuada toma de muestra (en general hisopado nasofaríngeo, o muestras del tracto respiratorio inferior en pacientes en asistencia respiratoria mecánica) resulta fundamental para minimizar la posibilidad de falsos negativos.

Una vez que una persona ha sido infectada por el virus, el tiempo medio que tarda en presentar síntomas (período de incubación) es de 5 a 6 días, con un intervalo de entre 1 y 14 días después de la exposición. El virus puede ser detectado en las vías respiratorias superiores de 1 a 3 días antes de aparecer los síntomas. La concentración de SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores alcanza su valor más alto en torno al momento de la aparición de los síntomas, después de lo cual va disminuyendo paulatinamente.

Algunos estudios comunican mayores cargas virales en los enfermos graves que en los enfermos leves, pero otros estudios no dan cuenta de esas diferencias. La presencia de ARN viral en las vías respiratorias inferiores, así como en las heces en un subconjunto de personas, aumenta durante la segunda semana de la enfermedad. En algunos pacientes, el ARN viral solo puede detectarse durante

algunos días, mientras que en otros se puede detectar durante varias semanas, incluso meses.

La presencia prolongada de ARN viral no supone necesariamente una infecciosidad prolongada. Varios estudios describen una correlación entre la reducción de la infecciosidad y los siguientes factores: i) el mayor número de días transcurridos desde la aparición y resolución de los síntomas, ii) la disminución de la carga viral en las secreciones respiratorias, y iii) un aumento de los anticuerpos neutralizantes

En pacientes de los que se sospecha seriamente la infección por el SARS-CoV-2 y los hisopados de las vías respiratorias superiores son negativos, es posible detectar ARN viral en secreciones de las vías respiratorias inferiores, como esputos o material de lavado broncoalveolar.

Se ha demostrado que las heces o los hisopados rectales son positivos para el ARN del SARSCoV-2 en un subconjunto de pacientes; algunos estudios sugieren que esta positividad es prolongada en comparación con la de las muestras de las vías respiratorias. En muestras de líquido bucal (por ejemplo, saliva inducida), las tasas de detección comunicadas en comparación con las muestras de vías respiratorias altas del mismo paciente varían ampliamente; se dispone de datos limitados sobre la idoneidad de la detección de SARS-CoV-2 en muestras de gargarismos o enjuagues bucales

Las llamativas diferencias en la sensibilidad de las evaluaciones de líquidos bucales se deben posiblemente a grandes diferencias en las técnicas de recogida, transporte y conservación de muestras, así como a la evaluación de diferentes poblaciones de prueba.

Aunque hay evidencia de que SARS-CoV-2 puede detectarse en muestras respiratorias durante el período pre-sintomático de la infección e incluso en personas asintomáticas, el pico en la carga viral y la transmisibilidad parece ocurrir

cerca del momento del inicio de los síntomas. La ocurrencia de una alta proporción de estudios de RT-PCR con resultados falsos negativos en muestras tomadas antes del inicio de los síntomas e incluso en el primer día de estado de la enfermedad ha sido demostrada

La toma de muestra para diagnóstico debe realizarse preferentemente en los primeros días desde el inicio de los síntomas y en caso de realizarse en forma muy temprana (primer día) y existir una elevada sospecha diagnóstica debería solicitarse una nueva muestra y repetirse la determinación. Por lo tanto, se desaconseja la realización de la prueba en personas asintomáticas, ya que la no detección del virus carece de valor y puede llevar a interpretaciones e indicaciones incorrectas. En la situación de contacto estrecho con caso positivo, si el individuo no presenta síntomas se recomienda cumplir estrictamente las medidas de aislamiento establecidas en las recomendaciones nacionales

Detección de SARS-CoV-2 mediante pruebas de biología molecular por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR). Usos recomendados de la prueba:

- 1.-Confirmación diagnóstica en personas consideradas casos sospechosos
- 2.-Alta de aislamiento en pacientes con formas graves de COVID-19

El uso de esta prueba en otros escenarios debe ser adecuadamente evaluado haciendo un minucioso balance de eficiencia

#### Muestras humanas respiratorias

- Hisopados oro y nasofaríngeos
- Lavado bronquial
- Aspirado traqueal
- Esputo

Las pruebas se llevan a cabo en un equipo que usa ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento lo que lleva a la amplificación de material genético viral hasta conseguir niveles detectables.

#### Interpretación

- Resultado Positivo: Confirma una Infección por SARS-CoV-2
- Resultado Negativo: Ausencia de virus/ARN o en cantidades no detectables (por la prueba en uso). Recomendación: Procesar más muestras y repetir la prueba si hay fuerte sospecha clínica o epidemiológica.

La OMS recomienda que para validar las muestras positivas todas deberán procesarse por duplicado. En el caso de pacientes, se recomienda tomar dos o más tipos de muestras o bien del mismo tipo tomadas en días diferentes, además de incluir en todos los análisis controles negativos para detectar contaminación cruzada entre muestras.

La muestra biológica debe mezclarse vigorosamente con N-acetil-L-cisteína en volúmenes iguales y 0.9% de cloruro de sodio. Este proceso se lleva a cabo siempre bajo condiciones estériles y libres de ARNsas en un área con nivel de bioseguridad nivel 3 dedicada exclusivamente para la extracción de ARN y utilizando sólo material preparado para extracción de ARN.

Las muestras de ARN viral del SARS-CoV se mantiene a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su proceso. La amplificación del genoma viral se lleva a cabo utilizando iniciadores que amplifican una región del genoma del virus del SARS. Se efectuó la retrotranscripción y primera amplificación en un solo paso (RT-PCR). Posteriormente, para aumentar la sensibilidad en la detección y para confirmar que la secuencia amplificada es específica del SARS-CoV, se realiza una segunda amplificación (PCR anidada). La visualización del producto amplificado se realiza mediante análisis electroforético, en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X y teñido con bromuro de etidio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Juarez, B. L. (2020). Actualización Diagnóstica de Laboratorio SARS-CoV-2. *CDC-Oficina Regional Centroamérica*, 1-32.

Salud, O. M. (2020). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2. OMS. 1-26.

Salud, S. D. (2020). Informe técnico. Reunión de expertos sobre uso de pruebas de laboratorio para identificar SARS-CoV-2. Secretaria de Salud. 1-13.