



UNIVERSIDAD DEL SURESTE

MEDICINA HUMANA

ASIGNATURA: BIOLOGIA MOLECULAR EN LA CLINICA.

CATEDRATICO: QFB. Hugo Nájera Mijangos.

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

Alumno:

HÉCTOR ALEJANDRO TRUJILLO CORDERO.

8° SEMESTRE GRUPO "A"

TURNO MATUTINO

COMITAN DE DOMÍNGUEZ, CHIAPAS A 17 DE NOVIEMBRE
DEL 2020.

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

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2) es un virus del ARN de una sola cadena de sentido positivo. Es la cepa viral que causa la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Las herramientas de diagnóstico se basan en la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real). Se ha demostrado la posibilidad de obtener un resultado falso positivo cuando los imprimadores no se verifican durante el desarrollo de conjuntos de imprimación para la detección de SARS-CoV-2 a través de PCR en tiempo real.

El ADN constituye nuestro material genético, pero SARS-CoV-2 no contiene ADN de doble cadena, sino ARN, de una sola cadena. Como las pruebas de PCR solo pueden hacer copias de ADN, primero hay que convertir el ARN en ADN.

La máquina PCR calienta la mezcla. Esto hace que el ADN de doble cadena se desenrede y el cebador pueda unirse al ADN a medida que se enfría, proporcionando un punto de partida para que la enzima constructora de ADN lo copie. Este proceso continúa a través de repetidos calentamientos y enfriamientos hasta que se han creado millones de copias del ADN.

La fluorescencia aumenta a medida que se producen más copias y, si cruza un cierto umbral, la prueba es positiva. Si el virus no estaba presente en la muestra, la prueba PCR no habrá hecho copias, por lo que el umbral de fluorescencia no se alcanzará y, en ese caso, la prueba será negativa.

Esto explica cómo la PCR amplifica el código genético del virus, pero no cómo se detecta. Aquí es donde entran los colorantes fluorescentes, añadidos al tubo de ensayo mientras se copia el ADN. Se unen al ADN copiado, lo que aumenta su fluorescencia haciendo que emitan más luz, que permite confirmar la presencia del virus.

El procedimiento de PCR en laboratorio consta de dos partes: 1) extracción de ácidos nucleicos y 2) reacción de amplificación. Lo ideal es que ambos procesos estén automatizados para disminuir errores y aumentar la rapidez diagnóstica de todo el proceso. Los laboratorios de microbiología clínica deben disponer de suficiente material fungible compatible con la infraestructura de la que se dispone en cada centro, con objeto de hacer un diagnóstico rápido y fiable. (Gestoso-Pecellín, 2020)

Se basa en la detección del genoma (ARN) del SARSCoV-2 mediante ensayos de RT-PCR. Este tipo de pruebas pueden tener alta sensibilidad y especificidad y son las indicadas por la OMS y OPS para realizar la confirmación diagnóstica de COVID-19. Pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos Son las pruebas moleculares, que se basan en la detección del ácido ribonucleico (ARN) del SARSCoV-2 mediante ensayos de RT-PCR, fundamentada en la amplificación del genoma del virus.

Es la prueba recomendada tanto para el seguimiento epidemiológico, como para la evaluación de pacientes en los ensayos de diagnóstico y de evaluación de intervenciones.

La prueba de PCR en tiempo real con transcriptasa reversa (RT-PCR), está basada en la obtención de ADN complementario (cADN) desde una cadena de ARN mediante la transcripción reversa (RT por sus siglas en inglés), luego se detectan pequeñas secuencias del genoma viral mediante PCR en tiempo real. (Gallegos, 2020)

La PCR es una técnica muy sensible y específica, que se realiza en los laboratorios de microbiología para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas. La interpretación de la PCR se debe hacer con prudencia dentro del contexto clínico, sobre todo cuando el resultado es negativo. (Gestoso-Pecellín, 2020)

- Falsos negativos: pueden aparecer falsos negativos por distintas circunstancias; por ejemplo: toma inadecuada de la muestra, por retraso en el transporte, por error en el etiquetado de la muestra a lo largo del proceso. Además, en caso de elevada sospecha clínica y resultado negativo de la PCR su interpretación debe hacerse con prudencia, y se recomienda repetir el estudio.
- Falsos positivos: errores en el etiquetado de la muestra a lo largo del proceso, por contaminación cruzada entre muestras.

TIPOS DE MUESTRAS

Muestras del tracto respiratorio:

- a. Superior: exudado nasofaríngeo/orofaríngeo en pacientes ambulatorios.
- b. Inferior: preferentemente lavado broncoalveolar, esputo (si es posible) y/o aspirado endotraqueal especialmente en pacientes con enfermedad respiratoria grave

Estas pruebas detectan la presencia directa del virus y han demostrado alta sensibilidad y especificidad, no han mostrado reactividad cruzada con otros coronavirus, ni otros virus respiratorios estacionales; además pueden ser usadas en cualquier contexto. La carga viral disminuye luego de la fase aguda de la enfermedad, por esto después del séptimo día (y entre más cercana al día 14^o luego de inicio de síntomas) puede encontrarse falsos negativos. (Gallegos, 2020)

PROCEDIMIENTO PARA LA RECOGIDA DE MUESTRA.

Es tan importante la correcta colocación del EPI como la retirada. Se necesita para la muestra respiratoria hisopo de algodón o poliéster, un contenedor con medio líquido para transportar el hisopo, un segundo embalaje que debe estar seco en su interior y un tercer embalaje que pueda soportar golpes. recogida de exudado de acceso orofaríngeo o nasofaríngeo (preferiblemente). Es necesario un hisopo seco con punta de algodón o fibra de poliéster; La obtención de la muestra se realizará por ambas cavidades nasales con el mismo hisopo, insertándose en cada fosa nasal paralela al paladar e introduciendo pasando las coanas hasta llegar a la pared nasofaríngea. Una vez allí se frota el hisopo con cuidado y es retirado con igual cuidado con movimientos rotatorios; el hisopo se coloca en un vial que contiene de 2-3 ml de medio de transporte y se desecha el resto del aplicador pudiéndose cerrar la muestra correctamente. (Gestoso-Pecellín, 2020)

Las muestras de PCR se deberán almacenar individualmente con la identificación correcta del usuario en un lugar a 4° C y según el protocolo del Ministerio de Sanidad, podrían estar refrigeradas a esa temperatura de 24 a 48 h. (Gestoso-Pecellín, 2020)

Las pruebas de PCR son una forma bastante fiable de comprobar la existencia de enfermedades infecciosas, sin embargo, también tienen limitaciones.

La primera es que llevan tiempo. Se necesitan unas pocas horas obtener resultados, baja disponibilidad de reactivos necesarios, contaminación o la degradación y solo pueden indicar si alguien tiene el virus en el momento de la prueba.

Bibliografía

Gallegos, S. E. (2020). LINEAMIENTOS PARA EL USO DE PRUEBAS MOLECULARES RT-PCR, PRUEBAS DE ANTÍGENO Y. *MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL*, 34.

Gestoso-Pecellín, L. (2020). Recomendaciones y uso de los diferentes tipos de test para detección de infección por SARS-COV-2. *Elsevier Public Health Emergency Collection*, enferm clin, 9. <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2020.10.001>