



UNIVERSIDAD DEL SURESTE

ESCUELA DE MEDICINA

Ana Laura Villatoro Ortiz

Biología Molecular

Semestre: 8°

Grupo: "B"

Q.F.B. Hugo Mijangos Nájera

Comitán de Domínguez, Chiapas

a 11 de Mayo de 2021.

“PCR PARA LA DETECCIÓN DE SARS-COV-2”

Todo inició en diciembre del 2019, al reportarse, en Wuhan, China, pacientes con neumonía de causa desconocida que desencadenó un sinnúmero de estudios para la identificación del agente etiológico, que es un nuevo beta coronavirus: SARS-CoV-2. Este virus es el causante de la enfermedad COVID-19 y el séptimo coronavirus que infecta a los humanos. Desde su identificación se ha incrementado, exponencialmente, la cantidad de casos en todo el mundo. Es sorprendente la gran rapidez con la que se identificó la causa, valiéndose de las diferentes técnicas modernas para la secuenciación y obtención del ARN, que hizo posible, en alrededor de 1 mes, contar con el método diagnóstico en la fase aguda, que es la PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) para SARS-CoV-2. En una línea del tiempo puede observarse la secuencia de eventos en la que, desde que se reportan los casos de neumonía en Wuhan, pasaron solo 10 días para tener la primera secuenciación del genoma del virus, lo que es sorprendente.

Hasta el momento se dispone de dos tipos de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de COVID-2019:

1. Diagnóstico agudo del virus SARS- CoV-2 en enfermedad aguda 3-7 días: la prueba de referencia es la técnica de reacción en cadena de polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), que es una prueba de biología molecular en la que se detecta y amplifica una o varias regiones específicas del virus.
2. Diagnóstico de formación de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 después de 7 días: la prueba indicada es por medio de ELISA o inmunocromatografía para la detección de anticuerpos IgM e IgG para el virus SARS-CoV-2.

RT-PCR para detección del SARS-CoV-2 El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de ~ 30 kb de tamaño del genoma, que pertenece al género Coronavirus y a la familia Coronaviridae. La estructura del SARS-CoV-2 es similar a la del SARS-CoV con un tamaño de virión que varía de 70 a 90 nm. Las proteínas virales de punta, membrana y envoltura del coronavirus están incrustadas en la bicapa lipídica derivada de la membrana del huésped que encapsula la nucleocápside helicoidal que comprende ARN viral. El genoma comprende 6-11 marcos de lectura abiertos (ORF) con 5' y 3' regiones flanqueadas no traducidas (UTR). El método diagnóstico de la infección, en su fase aguda, se basa en la detección del ARN viral de las muestras clínicas de los pacientes infectados. Para ello se utiliza una técnica de RT-PCR que detecta diferentes regiones genómicas constantes.

Los protocolos autorizados por la OMS para la realización de la RT-PCR para virus SARS-CoV-2 durante la pandemia son: CDC de China, Instituto Pasteur, Paris, Francia, CDC de Estados Unidos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón, Alemania Charite, Hong Kong HKU, Instituto Nacional de Salud de Tailandia y las regiones genómicas específicas que amplifican cada uno de estos protocolos. En estas primeras técnicas se lleva a cabo la extracción de ácidos nucleicos en un equipo aparte y, posteriormente, se practica

una PCR individual para cada uno de los primeros, esto implica un tiempo de procesamiento de 6 horas.

En el transcurso de estos meses se han autorizado equipos comerciales que han acortado el tiempo de proceso de 6 a 3 horas, en los que es posible la extracción, amplificación y lectura en un solo equipo automatizado, con lo que disminuye el riesgo de contaminación del personal y de la muestra. En este tipo de pruebas moleculares un punto crítico es la toma de la muestra. Hasta hoy, las pruebas aceptadas por la OMS para RT-PCR para SARS-CoV-2 son hisopados nasofaríngeos, faríngeos y, en pacientes intubados, aspirados bronquioalveolares. La toma de la muestra es un proceso crítico para incrementar la sensibilidad de la prueba y disminuir el riesgo de contagio al tomador de la muestra. Para esto deben cumplirse los estándares de equipo de protección personal que constan de:

- a) Cofia para cubrir la cabeza.
- b) Lentes de protección ocular.
- c) Cubre bocas N95.
- d) Bata quirúrgica desechable.
- e) Doble guante desechable.
- f) Botas desechables.

Deben cumplirse los protocolos del CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) y el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica) para el vestido y retiro del equipo de protección mencionado.

Envío y embalaje de muestras al laboratorio donde se procesará la muestra Las muestras de COVID-19 deben seguir el Reglamento Modelo de las Naciones Unidas y cualquier otro reglamento aplicable, dependiendo del modo de transporte utilizado. Puede encontrarse información en la Guía de la OMS para regulaciones para el transporte de sustancias infecciosas 2019-2020 (aplicable a partir del 1 de enero de 2019). Las muestras de pacientes de casos sospechosos o confirmados deben transportarse como UN3373, “Sustancia biológica, Categoría B”, cuando son para diagnóstico. Deberá hacerse con triple embalaje:

- 1.- Todas las muestras deberán estar contenidas en un tubo con medio de transporte viral, perfectamente cerrado y etiquetado, que se manejará desde su toma hasta la recepción en el laboratorio a temperatura entre 2 a 8 °C.
2. Las muestras se colocarán en una gradilla dentro de una hielera rígida, que contendrá refrigerantes para mantener la muestra entre 2 a 8 °C.

3. La hielera se colocará en otro contenedor para su transporte hasta el laboratorio donde se procesará.

En el transcurso de estos meses, diversas plataformas moleculares han implementado nuevos equipos para identificación del SARS-CoV-2; por ejemplo: la plataforma Gene Xpert, con la prueba Xpert Xpress SARS-CoV-2 test de la compañía Cepheid, que amplifica los 2 genes: el gen de la proteína E y el gen de la proteína N2.

El equipo Film Array Biofire ha agregado, a su panel de virus respiratorios, el SARS-CoV-2 II con el nombre Panel Respiratorio Biofire que emite un reporte cualitativo en 45 minutos; detecta dos regiones genómicas del SARS-CoV-2: el gen de la proteína S y el gen de la proteína M.

Esta prueba permite, además de la identificación del virus SARS-CoV-2, la detección de 19 virus respiratorios y la posibilidad de coinfección, que puede suceder en 17-20% de los casos. En la temporada invernal permitirá diferenciar entre infección por Influenza A o B vs enfermedad COVID-19. Ambas pruebas están autorizadas por la FDA (Federal Drug Administration) y los equipos permiten automatizar completamente la extracción, amplificación y lectura de la PCR. Son equipos pequeños que permiten una implementación sencilla que deberán cumplir los estándares de bioseguridad en el laboratorio de microbiología para el manejo de muestras con probable SARS-Cov-2, que son los mismos que la toma de la muestra. De las plataformas moleculares destaca un grupo de uso cercano al paciente (point of care) durante esta pandemia: la prueba para SARS-Cov-2 del equipo Abbot ID now permite el reporte en 5 minutos. Fue aprobada por la FDA aunque el 14 de mayo también publicó una alerta por el reporte de falsos negativos de la prueba. Por este motivo permanece en análisis para las consideraciones correspondientes; mientras tanto debe tenerse cautela en el diagnóstico con esta prueba. La prueba de RT-PCR puede dar resultados falsos negativos por los siguientes factores:

1. Toma inadecuada de la muestra.
2. Recolección tardía de la muestra o en etapas muy tempranas de la infección.
3. Manipulación y envío inadecuado de la muestra (pérdida de la cadena fría).
4. Razones técnicas de la prueba relacionadas con los protocolos implementados al inicio de la pandemia: son muy manuales y por ello existe un sinnúmero de factores que pueden alterar la sensibilidad de la prueba.
5. Mutaciones virales.
6. Inhibición de la PCR. Por los motivos anteriores, la bibliografía publica sensibilidades variables de 60 a 80%, en general.

FUENTE DE INFORMACIÓN

Acta Pediatr Mex. Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS-CoV-2. INP. 2020;41(Supl 1):S51-S57. <https://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2020/apms201h.pdf>

Secretaría de Salud. Lineamiento estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de COVID-19. Secretaría de Salud México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/552972/Lineamiento_VE_y_Lab_Enf_Viral_20.05.20.pdf