



Universidad del Sureste

Escuela de Medicina

**TECNICA DE PCR (REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA) PARA LA DETECCION DE SARS Co V 2.**

Presentan

José Lenin Quiñones López

Docente:

Q.F.B: Hugo Najera Mijangos

8° semestre, grupo "B"

Materia:

BIOLOGIA MOLECULAR

Comitán de Domínguez, Chiapas, 13/05/2021

TECNICA DE PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA) PARA LA DETECCION DE SARS Co V 2.

La técnica para identificar con certeza la presencia del virus SARS-CoV-2, causante de la actual epidemia de CoVID-19, se conoce como PCR en tiempo real. El llamado protocolo de Berlín, estableció una de las primeras metodologías de la prueba de detección, la cual se ha ido refinando conforme ha ido surgiendo más información acerca de los genomas del SARS-CoV-2.

¿Qué es la reacción de PCR?

Es una reacción donde una enzima llamada ADN polimerasa, copia un fragmento de información genética, en este caso derivada del virus, mediante una serie de reacciones de copiado en cadena. De ahí el nombre de la técnica “reacción en cadena de la polimerasa”. Existen dos versiones: una, donde se pueden ver el total las copias del gen al final de las reacciones de copiado; y otra donde se adiciona un reactivo que libera una señal luminosa cada vez que se fabrica una nueva copia de ADN. Esta última se llama PCR en tiempo real.

Por tratarse de un virus que contiene ARN en su genoma, se aísla ARN de la muestra y se copia la información para generar una molécula de ADN que se puede detectar por PCR-TR.

La prueba de PCR-TR tiene dos ventajas: por una parte, permite monitorear la acumulación del ADN conforme se va copiando; por la otra, se pueden contar el número de copias del coronavirus presente en la muestra.

¿En qué consiste la prueba de PCR-TR para el coronavirus?

La prueba consiste en detectar simultáneamente en una reacción de PCR-TR la presencia de varios genes. Las reacciones N1 y N2 detectan fragmentos de genes específicos del SARS-CoV-2 y la reacción N3 detecta un fragmento de un gen de los coronavirus tipo SARS. Esta última detección permitiría detectar la presencia de otros virus, el del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) o el del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS) y así discriminar si el paciente está infectado por SARS-CoV-2 o por otros virus tipo SARS. También se detecta la presencia del gen de la enzima ARNasa P. Este gen es de origen humano, y permite comprobar que, durante la extracción de ARN de la muestra se obtuvo suficiente ARN como para que la prueba pueda detectar al coronavirus. Si la cantidad del gen de ARNasa P no alcanza un valor mínimo de detección, la muestra se descarta.

El kit de detección viene acompañado por fragmentos de ADN sintéticos que permiten confirmar su funcionalidad. Estas pruebas requieren de la certificación y validación de las entidades gubernamentales encargadas del sector salud para garantizar su calidad y validez. De esta forma se evitan los falsos negativos, es decir, que le digan al paciente que no está infectado cuando en realidad sí lo está.

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.

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.

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. Recordar 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.

Bibliografía:

Rubén Megía González. ABRIL 7, 2020. SARS-CoV-2: ¿Cómo detectar el nuevo coronavirus con ayuda de la genética? <https://genotipia.com/sars-cov-2-pcr/>.

Dr. Juan José López Alarcón. Detección molecular de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real. <https://www.estornuda.me/post/deteccion-molecular-de-cov-por-pcr>