



# Universidad del Sureste

## Escuela de Medicina

### Prueba PCR de SARS-CoV-2

Gómez Vázquez Juan Carlos

Biología clínica

8° "A"

Comitán de Domínguez, Chiapas; a 14/mayo/2021

Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. El gen E es el más utilizado para el cribado y para el diagnóstico de certeza, el RdRp o el ORF1a. En la reacción también se incluyen cebadores que amplifican el gen de alguna proteína humana, que sirva como control de la calidad de la toma de muestra y del proceso de aislamiento del material genético.

Las muestras recomendadas para el diagnóstico del SARS-CoV-2 por RT-PCR son las del tracto respiratorio superior, como el exudado nasofaríngeo y orofaríngeo, aunque en los niños pequeños es preferible el frotis por lavado o aspirado nasofaríngeo. Si se recogen hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos al mismo paciente se pueden introducir juntos en el mismo tubo de medio de transporte para maximizar la sensibilidad de la prueba.

Las muestras del tracto respiratorio inferior como el esputo, aspirado endotraqueal, lavado broncoalveolar o broncoaspirado se reservan para pacientes con enfermedad respiratoria grave. También hay evidencias recientes de que la saliva puede ser fiable para detectar SARS-CoV-2.

La sensibilidad de la RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2 depende de la carga viral, del día de la infección en que se toma la muestra y de que esta sea de vías respiratorias altas o bajas. También influyen otros factores como el correcto hisopado, su conservación y transporte al laboratorio en condiciones adecuadas.

Según un metanálisis en países con prevalencia de COVID-19 de menos del 10 %, la sensibilidad agrupada de la prueba es del 89 %, el valor predictivo positivo oscila entre el 47,3 y el 96,4 %; mientras el valor predictivo negativo se encuentra entre el 96,8 y el 99,9 %. La especificidad es del 100 %, porque el diseño de los cebadores es específico de la secuencia del genoma del SARS-CoV-2, aunque pueden ocurrir falsos positivos debido a errores técnicos y contaminación de reactivos. Hay pocos datos disponibles sobre las tasas de resultados falsos positivos y falsos negativos para las diversas pruebas de RT-PCR disponibles.

A toda persona con sospecha de infección por el SARS-CoV-2 se le debe realizar una RT-PCR en las primeras 24 horas. Si la prueba resultara negativa y hubiera alta sospecha clínica de COVID-19 se repetiría a las 48 horas con una nueva muestra del tracto respiratorio, con lo que se consigue un aumento de la sensibilidad diagnóstica de hasta el 29 %.

El ARN viral en el hisopado nasofaríngeo se vuelve detectable por RT-PCR desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo dentro de la primera semana. No obstante, la línea de tiempo de la positividad no es igual en las diferentes muestras nasofaríngeas. La positividad disminuye más lentamente en el esputo y aún puede persistir después de que los hisopados nasofaríngeos son negativos. La positividad en pacientes graves puede mantenerse más de 3 semanas después del inicio de la enfermedad, momento en el cual la mayoría de los casos leves arrojan un resultado negativo.

En una RT-PCR en tiempo real la amplificación del material genético se detecta en el mismo momento en que esta va ocurriendo gracias a la cuantificación de la fluorescencia que se emite en cada ciclo. El ciclo umbral (Ct, del inglés *threshold cycle*) es el número de ciclos de replicación necesarios para producir una señal fluorescente y usualmente un valor de Ct inferior a 40 se informa como positivo. Los valores de Ct más bajos representan mayores cargas de ARN viral, por lo que los valores de Ct que se obtienen en pacientes gravemente enfermos suelen ser inferiores a los valores de los casos leves.

Aunque la RT-PCR en tiempo real juega un peso fundamental en el algoritmo diagnóstico de la COVID-19, no puede excluirse que la calidad de las pruebas moleculares para detectar el SARS-CoV-2 pueda verse comprometida por una serie de factores preanalíticos y analíticos. Algunos de estos son comunes a otras áreas de diagnóstico, como los errores de identificación de la muestra, las dificultades en su recolección, manejo y almacenamiento, el rendimiento del ensayo o del equipo, la experticia de quien interpreta los resultados; mientras que otros problemas son muy específicos y, por lo tanto, deben buscarse de manera más distintiva, como la ventana de diagnóstico específica, la contaminación de la muestra, entre otros.

Tras la confirmación del caso por biología molecular también es recomendable la extracción de dos muestras de suero, debido a que la detección de anticuerpos IgG-IgM frente a coronavirus por un análisis de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), es útil para la valoración de la respuesta inmunitaria humoral. La primera muestra debe recogerse a partir del séptimo día de inicio del cuadro clínico y la segunda, de 14 a 30 días después. El estudio de anticuerpos pudiera hacerse de inmediato en caso de necesidad clínica urgente como un preoperatorio o un receptor para trasplante.

Debe tenerse en cuenta que el curso temporal de la positividad de la RT-PCR y la seroconversión puede variar en niños y otros grupos como los pacientes inmunocomprometidos, incluida la gran población de individuos asintomáticos. Todavía quedan muchos temas por dilucidar, particularmente cuánto tiempo dura la inmunidad potencial en los individuos infectados con SARS-CoV-2.

Estudios recientes han informado pacientes positivos por RT-PCR días o semanas después de la recuperación y de haber tenido resultados negativos. No está claro si este fenómeno se trata de un error de la prueba, de una reinfección o de una reactivación. La detección del ARN del SARS-CoV-2 en cualquier muestra, no implica con certeza la viabilidad del virus, ni una infección activa, porque la infectividad depende de la presencia de todo el virus, no solo de su ARN. Entonces, el "desprendimiento" prolongado del ARN del SARS-CoV-2 puede reflejar simplemente la falta de eliminación del ácido nucleico de los tejidos.

Wölfel et al., demostraron que el éxito del aislamiento del virus depende de la carga viral y del día de la toma muestra después del inicio de los síntomas. A pesar de la positividad de la RT-PCR, el virus no se aisló después del octavo día posterior al inicio de los síntomas. En muchas otras enfermedades virales bien caracterizadas, como el Zika, está demostrado que

el ARN puede detectarse mucho después de la eliminación de la infección activa, porque la RT-PCR no puede diferenciar el ARN de un virus infeccioso del que no lo es.

En los casos que una RT-PCR nuevamente vuelva a ser positiva, es importante la evaluación de la carga viral, la respuesta de anticuerpos y el análisis de los resultados de laboratorio en un contexto clínico detallado. Los centros con condiciones para ello, deberían demostrar la infectividad por la inoculación en líneas celulares Vero / hSLAM o Vero / E6, a partir del material de hisopado nasofaríngeo de los pacientes.

Aun así, el éxito del aislamiento del SARS-CoV-2 también depende de la carga viral, que no se logra cuando existen menos de 10<sup>6</sup> copias/mL. Entonces, para dilucidar si es o no posible una reinfección, será necesario también el uso de la microscopía electrónica, la secuenciación del genoma completo y el análisis filogenético.

La estrategia más eficiente para confirmar la COVID-19 en pacientes sospechosos debe combinar los resultados de la RT-PCR en tiempo real con los datos clínicos y epidemiológicos, que incluyan la probabilidad de exposición, los síntomas y signos, y los hallazgos de laboratorio. Por lo tanto, la aplicación del método clínico es el eslabón fundamental del diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 aún en los tiempos de la biología molecular.

## Bibliografías:

Nadezhda González García, & Arturo Chang Monteagudo. (2020). RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y seguimiento de la infección por el virus SARS-CoV-2. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 36(0).  
<http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1262>