



Universidad del Sureste

Escuela de Medicina

Título del trabajo:

Resumen PCR para detección de SARS CoV2

Nombre del alumno: Cristian Jonathan Aguilar Ocampo

Nombre de la asignatura: Biología Molecular

Semestre y grupo: 8vo semestre grupo "A"

Nombre del profesor: Q. Hugo Nájera Mijangos

Lugar y fecha

Comitán de Domínguez, Chiapas a 14 de Mayo de 2021

RESUMEN

El diagnóstico microbiológico del SARS-CoV-2, agente de COVID-19 (enfermedad por el nuevo coronavirus de 2019) es importante tanto para el manejo de la enfermedad individual como de la actual pandemia. Si bien el procedimiento de elección es la PCR, también es necesario disponer de pruebas rápidas, simples e idealmente con alta sensibilidad y precisión y que se puedan realizar a gran escala. El objetivo es un diagnóstico precoz, para un mejor manejo (aislamiento y tratamiento si es necesario) y monitorización de los pacientes, la aplicación de medidas de prevención y control de la expansión y la vigilancia epidemiológica. Hay tres tipos de pruebas para el diagnóstico de laboratorio del SARS-CoV-2.

1. Pruebas de detección de ácidos nucleicos (reacción en cadena de la polimerasa o PCR).
2. Pruebas de detección de antígeno.
3. Pruebas de detección de anticuerpos (IgG, IgM).

PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en (RT-PCR o qRT-PCR si es cuantificada en tiempo real) es una técnica molecular de detección y amplificación de ácidos nucleicos, es decir de material genético, ARN, del SARS-CoV-2 en distintas muestras biológicas clínicas. En la actualidad es la técnica de referencia y de elección para el diagnóstico de COVID-19.

Se han obtenido resultados positivos de la RT-PCR para SARS-CoV-2 tanto en muestras respiratorias como no respiratorias: orina, heces, incluso en sangre. Las muestras más utilizadas para el diagnóstico de COVID-19 son las nasofaríngeas y orofaríngeas. Las que ofrecen más rendimiento son las nasofaríngeas (positividad 63% y 32% respectivamente en un estudio con pocas muestras nasofaríngeas) y son las que recomienda el CDC4 aunque las orofaríngeas también son válidas y son las que más se usaron en China. La OMS5 recomienda muestras nasofaríngea y orofaríngea en el mismo tubo para aumentar la carga viral.

La PCR es una técnica utilizada para amplificar secuencias de ADN. Consta de dos fases: extracción y amplificación de los ácidos nucleicos. El ARN es

monocatenario y muy inestable por lo que primero debe transcribirse de forma inversa en ADN complementario (ADNc) utilizando una transcriptasa inversa. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR convencional para amplificar el ADNc. Se utilizan secuencias cortas de ADNc, cebadores o primers, para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la ADN polimerasa a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con esta técnica se producen millones de copias de la secuencia estudiada en unas horas. Lo ideal es que ambos procesos estén automatizados para aumentar la rapidez y evitar errores.

Los genes diana más usados para la detección de SARS-CoV-2 son el gen E (recomendado por la OMS como screening de primera línea), el gen RdRp, para estudio de confirmación y el gen N para estudio adicional de confirmación. Otro gen usado es el Orf1ab. Para el diagnóstico de confirmación en zonas sin circulación del virus COVID19 se necesita la positividad frente a dos genes distintos de COVID-19, uno de ellos específico del mismo, o positividad frente a un betacoronavirus más una identificación al menos parcial del genoma del virus COVID-19. En zonas de transmisión comunitaria como nuestro país en la actualidad, se considera suficiente la positividad de la rRT-PCR para un único gen que sea discriminatorio² de COVID-19.

El periodo de incubación del SARS-CoV-2 es alrededor de 5-6 días (rango intercuartil [RIC] 2-11 días). La mediana del periodo entre el inicio de los síntomas y el ingreso hospitalario son unos 7 días (RIC 4-8 días). La mediana del periodo de duración de los síntomas es alrededor de 13-16 días (RIC 5-24 días), algo más largo en pacientes con enfermedad grave. La carga viral en nariz y faringe va ascendiendo desde el momento de la infección (inicio del periodo de incubación) hasta alrededor del 7º día y va disminuyendo a partir de ese día, pudiendo detectarse ARN viral tras la desaparición de los síntomas por un tiempo aún indeterminado.

Es la prueba más sensible de los métodos disponibles. Es la técnica de referencia y de elección para el diagnóstico de COVID-19.

¿Cómo debe interpretarse?

Como se ha comentado, la PCR es la técnica de referencia para el diagnóstico de COVID-19, pero puede haber falsos negativos y falsos positivos. Un único resultado negativo en una prueba de PCR, especialmente si se ha realizado a partir de una muestra de las vías respiratorias superiores, no excluye la

posibilidad de una infección por SARS-CoV-2. Se recomienda repetir el muestreo, e incluso con una muestra de las vías respiratorias inferiores en caso de enfermedad grave o progresiva.

Falsos negativos: Pueden aparecer si:

- La toma de la muestra es inadecuada (cantidad escasa).
- El transporte es inadecuado (no se mantiene la cadena de frío) o con retraso.
- Hay errores pre-analíticos (mal etiquetado de la muestra).
- Hay poca eliminación de virus por el paciente por el estadio del proceso (asintomático, presintomático o postsintomático) o por la gravedad del mismo.

Falsos positivos: Pueden aparecer si:

- Hay error pre-analítico en el etiquetado de la muestra a lo largo del proceso
- Contaminación cruzada entre muestras durante el procesamiento.

La estrategia más eficiente para diagnosticar el COVID-19 en pacientes sospechosos debe combinar los hallazgos de la RT-PCR con datos clínicos y epidemiológicos (probabilidad de exposición, síntomas y signos) y la radiología torácica (la más sensible es el TAC), ya que las alteraciones radiológicas en el COVID-19 son a veces más precoces que la positividad de la RT-PCR. Como se ha comentado, se debe repetir la RT-PCR en pacientes con uno o más resultados negativos y alta sospecha de COVID-19.

PRUEBA RÁPIDA DE PCR

En la actualidad se encuentran en desarrollo diversos sistemas rápidos de PCR (en menos de una hora). Algunas de estas pruebas ya tienen la aprobación de la FDA y se espera en un futuro inmediato el marcado CE. El Ministerio de Sanidad recientemente ha aprobado un test rápido de PCR que permite realizar en determinados equipos, hasta 1.200 pruebas al día con un procedimiento automatizado. En EEUU el Xpert Xpress SARS-CoV-2® (Cepheid) es el primer test de diagnóstico rápido (TDR) o point-of-care de rRT-PCR que ha obtenido la aprobación EUA (Autorización para Uso en Emergencias) de la FDA. Utiliza muestras nasofaríngeas y ofrece resultados en 45 minutos. Aunque no es necesario enviar las muestras al laboratorio, se ejecuta en máquinas automatizadas de las que no es fácil disponer. Y tiene el inconveniente de que solo puede procesar las muestras de una en una.

BIBLIOGRAFÍA

- Pruebas diagnósticas de laboratorio de Covid-19. Grupo patología infecciosa. Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria.
- https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/pruebas_diagnosticas_de_laboratorio_de_covid_vfinal.pdf