



# UNIVERSIDAD DEL SURESTE

## ESCUELA DE MEDICINA

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

**Materia: BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CLINICA**

Presenta: Melanny Guadalupe Román Salazar

Dr. Hugo Najera Mijangos

Semestre: 8°

Grupo: “A”

Comitán de Domínguez, Chiapas a 14 de mayo del 2021

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

Las pruebas diagnósticas para detectar el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 aún están evolucionando y es importante comprender sus particularidades para la interpretación correcta de los resultados. La técnica de elección para su diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR, del inglés reverse transcription - polymerase chain reaction), en tiempo real.

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. Las muestras recomendadas para el diagnóstico del SARS-CoV-2 por RT-PCR son las del tracto respiratorio superior como el exudado nasofaríngeo. 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.

### **Muestras utilizadas para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR**

Los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos son las muestras típicamente usadas para confirmar la presencia de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR<sup>2</sup>. Sin embargo, el virus también se ha detectado en especímenes de otros sitios, a través de los cuales se han alcanzado diferentes eficiencias de detección<sup>3</sup>. Por la facilidad de su recolección en pacientes y bajo riesgo infeccioso para proveedores de salud, la saliva es una muestra potencial en la detección de SARS-CoV-2 y virus similares.

Diferentes estudios confirman la utilidad de la saliva proveniente de la garganta para el diagnóstico precoz y monitoreo rutinario de COVID-19, especialmente en situaciones en las que la recolección de muestras nasofaríngeas puede estar contraindicada<sup>4,5</sup>. Los centros de investigación y agencias de salud podrían utilizar esta metodología de recolección ya que requiere de la utilización de un equipo mínimo<sup>6</sup>. Por otro lado, resultados sobre la efectividad en el caso de saliva procedente de glándulas salivales todavía no son los esperados<sup>7</sup>.

Las secreciones conjuntivales también han sido evaluadas, encontrándose que solo los pacientes con manifestaciones clínicas de conjuntivitis evidencian la presencia de SARS-CoV-2 en sus muestras<sup>8</sup>. Uno de los estudios más completos sobre la eficiencia de detección de este virus mediante la prueba RT-PCR, evaluó diferentes tipos de muestra de pacientes con diagnóstico clínico de COVID-19, e indicó que el fluido de lavado broncoalveolar y esputo produjeron la mayor cantidad de resultados positivos, seguidos de los hisopados nasales, biopsias con cepillo de fibrobroncoscopio e hisopados faríngeos, y con menor porcentaje de hallazgo en muestras de heces y sangre. No fue posible detectar el virus en muestras de orina.

Lo anterior es consistente con la alta expresión génica de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (receptor celular del virus) en células del tracto respiratorio, especialmente en células caliciformes y ciliadas de los epitelios nasales, células alveolares y en células de córnea, esófago, íleon, colon, hígado, vesícula, riñones y testículos<sup>9</sup>.

Los sobrenadantes de cultivos celulares también han mostrado su utilidad como muestras de estudio de SARS-CoV-2 y otros virus, además de muestras fecales de reservorios animales posiblemente transmisores de estos tipos de coronavirus.

### **Métodos de extracción de ARN para detectar coronavirus**

La extracción cuantitativa de ácidos nucleicos con alta pureza a partir de muestras complejas es el requisito previo para ensayos de RT-PCR eficientes y es un paso crucial en el uso de técnicas moleculares para la detección eficiente de virus en muestras clínicas. Tanto las concentraciones virales absolutas como relativas determinarán el éxito de los ensayos moleculares posteriores.

En el caso de trabajar muestras con niveles bajos de virus, se deberán aplicar estrategias especiales para tener mayores probabilidades de detección tales como: homogeneización o digestión enzimática de muestras sólidas o viscosas; técnicas de filtración y centrifugación diferencial. Además, se necesitará el uso de endonucleasas para liberar genomas de las partículas virales protegidos por nucleocápsides. Todos estos pasos aumentarán la concentración absoluta y relativa de los ácidos nucleicos virales antes de su extracción.

Una baja eficiencia de extracción puede dar señales pobres durante la amplificación exponencial y, por lo tanto, dar resultados falso-negativos. La baja calidad de extracción, por otro lado, puede contener una variedad de inhibidores de la PCR, lo que proporciona lecturas poco confiables durante la amplificación. Por estas razones, la selección de un método de extracción será un paso fundamental para el éxito en la detección de SARS-CoV-2.

Actualmente se utilizan dos métodos principales de extracción de ARN previo a la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2: la cromatografía de columna y la aplicación de partículas magnéticas.

La extracción utilizando cromatografía por columna se basa en la adsorción reversible del ácido nucleico a un soporte de sílice (membrana) bajo condiciones determinadas de pH y fuerza iónica que permite su limpieza y posterior recuperación. Por otro lado, el uso de partículas construidas con componentes de naturaleza magnética se fundamenta en la unión rápida y reversible del ácido nucleico a estas, seguida de la aplicación de un campo magnético externo que permite la separación del complejo partícula-ARN de la fase líquida de la muestra, logrando así su aislamiento y purificación.

Una evaluación de la extracción de ARN de SARS-CoV-2 a partir de muestras del tracto respiratorio superior (hisopados nasofaríngeos) utilizando un kit de extracción por columnas (como control) y uno con perlas magnéticas, demostró resultados equivalentes con un 100 % de sensibilidad y especificidad.

### **Ensayo RT-PCR para detectar SARS-CoV-2**

La RT-PCR es una técnica de laboratorio que permite la identificación, detección y cuantificación de ARN, utilizando este como molde para sintetizar ADN complementario (ADNc), el cual a su vez constituye la plantilla para una reacción de PCR en tiempo real. El aumento exponencial en las copias de ADN se ve reflejado en la aparición de fluorescencia cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ARN en la muestra, haciendo que esta reacción sea altamente sensible aun a bajas concentraciones de ácidos nucleicos virales.

La selección de la muestra y el método de extracción de sus ácidos nucleicos son factores importantes que influirán sobre el éxito de ensayos moleculares de RT-PCR para la detección de virus. De los cuatro ensayos para la confirmación de COVID-19 analizados en este artículo, todos muestran niveles de especificidad de altos a medios para distinguir entre SARS-CoV-2 de otros virus causantes de afecciones respiratorias en diferentes muestras.

La sensibilidad y el límite de detección muestran ser muy buenos pudiéndose detectar, en algunos casos, desde menos de una copia de ARN blanco por microlitro, lo que avala este tipo de prueba como un ensayo de elección para confirmar la presencia del virus. La diversidad de genes blanco y de control propuestos, han permitido distinguir entre SARS-CoV-2, otros coronavirus y el ARN de hospederos infectados, lo cual es indispensable ante la perspectiva de la aparición de nuevas especies de betacoronavirus patógenos para la humanidad.

### **Referencias bibliográficas**

- García, N. G. (2020). RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y seguimiento de la infección por el virus SARS-CoV-2. *Revista cubana, hematología, inmunología, inmoterapia*, 14.
- rodriguez, E. v. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta, revista científica del instituto nacional de* , 8.