



Universidad del Sureste
Escuela de Medicina

BIOLOGÍA MOLECULAR

"Resumen"

Q.F.B. Nájera Mijangos Hugo

Grado: 8 semestre Grupo: "A"

Estudiante:

Eduardo Ernesto Zavala Barco

14 de mayo del 2021

Comitán de Domínguez, Chiapas



Los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos son las muestras típicamente usadas para confirmar la presencia de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR². 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. 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. Los centros de investigación y agencias de salud podrían utilizar esta metodología de recolección ya que requiere de la utilización de un equipo mínimo. Por otro lado, resultados sobre la efectividad en el caso de saliva procedente de glándulas salivales todavía no son los esperados. 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. 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. 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. 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 recuperación¹⁷. 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 paratúbulo-ARN de la fase líquida de la muestra, logrando así su aislamiento y purificación¹⁸. 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 especificidad¹⁹ en la actualidad. 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 recuperación¹⁷. 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 paratúbulo-ARN de la fase líquida de la muestra, logrando así su aislamiento y purificación¹⁸. 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 especificidad¹⁹.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América²¹ (CDC por sus siglas en inglés) autoriza el uso de diferentes kits disponibles comercialmente y además reporta pruebas que califican el desempeño de estos en la recuperación de ARN del virus a partir de las muestras y su utilidad en los ensayos moleculares subsecuentes. Entre los kits mencionados en la tabla hay algunos como el mini kit QIAamp® Viral RNA cuyo uso ha mostrado ser exitoso en diferentes publicaciones. Además, aunque de menor uso también se ha demostrado la utilidad de metodologías de extracción por solventes en el aislamiento de ácidos nucleicos virales. Estos métodos se basan en el uso de soluciones de lisis, separación de solutos por solubilidad y separación de fases líquidas mediante ciclos de centrifugación. En los momentos actuales, la carencia de soluciones de lisis es un problema común en los laboratorios y parte esencial para lograr la extracción de ARN de SARS-CoV-2 de alta calidad y pureza. A través de un estudio multicéntrico se evaluaron diferentes formulaciones de soluciones de lisis verificando el desempeño de los ácidos nucleicos obtenidos a través de RT-PCR. Los ensayos demostraron la adecuabilidad de los ácidos nucleicos obtenidos a través del uso de un tampón de lisis con GITC (tiocianato de guanidina) 4 M y Tritón X-100 al 3 % (v/v) comparando incluso con otras soluciones de extracción comerciales. Este tampón de lisis además incluye un detergente que ayuda a desintegrar el virus durante la extracción y azul de bromofenol como ayuda visual para la adición de este reactivo a las muestras clínicas. Composición: GITC 4M, Tris-HCl 55mM, EDTA 25mM, Tritón X-100 3 % (v/v), Azul de bromofenol 0.01 % (p/v). Dada la importancia de evaluar la eficiencia de extracción de muestras heterogéneas y con resultados de detección viral variables, se realizó un estudio

que evaluó 8 métodos entre manuales y automatizados para la detección óptima de ARN de SARS-CoV por RT-PCR en muestras de heces. Los métodos automáticos evidenciaron una sensibilidad del 100 % mientras que los métodos manuales evidenciaron sensibilidades entre el 50 y 91,7. La investigación resalta la importancia de aplicar el conocimiento sobre carga viral en los pacientes y muestras, el uso de procedimientos estándar pero también la capacidad de cada método ya que es lo que llevará a obtener los mejores resultados en la detección de ARN viral. 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. Los genes de coronavirus anotados hasta ahora incluyen: ORF1 (marco de lectura abierta que comúnmente es representado en secciones a y b), N (nucleocápside), membrana, E (envoltura viral), S (espiga viral) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP - por sus siglas en inglés presente en el ORF1b). Los científicos enfatizan que la selección de estos blancos genómicos para pruebas RT-PCR se debe a que son regiones persistentes en los coronavirus pero con ciertas porciones específicas para SARS-CoV-2; lo que permite entregar resultados consistentes a medida que la pandemia progresa e intrínsecamente mientras el virus sufre mutaciones. En toda metodología analítica especialmente en estos casos de detección de patógenos relevantes es importante considerar aspectos como la sensibilidad, especificidad y límite de detección (LD). En la tabla 2 se describen las características generales y los parámetros de desempeño mencionados de diferentes protocolos para la confirmación de COVID-19 utilizadas en la actualidad.

