

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA


PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

“PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN MUESTRAS NASOFARÍNGEAS Y OROFARÍNGEAS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE RT-PCR EN TIEMPO REAL”


ALUMNA: FERNANDA JACINTO ÁVALOS
MATRÍCULA: 2172033833

LUGAR DE SERVICIO SOCIAL:
CENTRO MÉDICO NAVAL

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOSEGURIDAD NIVEL 3



DR. HUGO CÉSAR RAMÍREZ SAAD
Aseor interno
Depto. Sistemas Biológicos
No. Económico 8642



Dra. Margarita Rubio Ortiz
Asesora externa
cédula Prof. 11188674

CONTENIDO

1	ANTECEDENTES.....	2
2	JUSTIFICACIÓN.....	2
3	OBJETIVO GENERAL.....	2
4	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
5	MARCO TEÓRICO	3
6	METODOLOGÍA.....	8
7	DESARROLLO	8
8	DISCUSIÓN.....	15
9	CONCLUSIÓN.....	16
10	BIBLIOGRAFÍA.....	17

1 ANTECEDENTES

Para llevar a cabo la detección de SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real, se requiere de una muestra biológica del paciente con sospecha a la COVID-19. Wenling Wang y cols. (2020), realizaron una valoración de diferentes muestras biológicas en relación a la carga viral, para determinar el mejor tipo de muestra para la detección de SARS-CoV-2 por la tecnología de RT-PCR en tiempo real. Obteniendo resultados positivos para SARS-CoV-2, tanto en muestras respiratorias, como no respiratorias (orina, heces e incluso en sangre). Dicha validación se realizó con 1070 muestras de 205 pacientes con COVID-19, demostrando que las muestras con tasas positivas más altas se obtuvieron de hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos; adicionalmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda muestras nasofaríngea y orofaríngea en el mismo tubo para aumentar la carga viral (Mamiko & Martinez, 2020; Wang, et al., 2020).

2 JUSTIFICACIÓN

La detección correcta de SARS-CoV-2, es importante para el manejo, tratamiento, monitorización de los pacientes, aplicación de medidas de prevención y control de la expansión y la vigilancia epidemiológica. La tecnología de RT-PCR en tiempo real es la técnica de elección para la detección de SARS-CoV-2, sin embargo, es necesario que todos los pasos del procesamiento de las muestras (obtención, transporte, almacenamiento, procesamiento e interpretación del resultado) sean correctos, para no perder precisión en el diagnóstico (Mamiko & Martínez, 2020). Es por ello que este informe proporciona una descripción de los procedimientos aplicados para el diagnóstico de SARS-CoV-2 por la tecnología de RT-PCR en tiempo real.

3 OBJETIVO GENERAL

Describir los procedimientos utilizados para la detección de SARS-CoV-2 mediante la tecnología de RT-PCR en tiempo real.

4 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Describir el procedimiento de obtención de muestras nasofaríngeas y orofaríngeas para la detección de SARS-CoV-2.
2. Describir el procedimiento para la extracción del material genético del virus de SARS-CoV-2 a partir de muestras nasofaríngeas y orofaríngeas, basándose en el protocolo estandarizado del *kit* QIAamp Viral RNA Mini.
3. Describir el procedimiento para la detección y amplificación de genes del SARS-CoV-2 mediante la tecnología de RT-PCR en tiempo real en base al protocolo de Logix Smart ABC (influenza A/B, SARS-CoV-2).

5 MARCO TEÓRICO

5.1 La COVID-19

De acuerdo a la explicación de la OMS, el nuevo nombre “COVID-19”, se toma de las palabras "corona", "virus" y *disease* (enfermedad en inglés). Como su nombre lo indica, la COVID-19 es la enfermedad causada por el nuevo coronavirus conocido como SARS-CoV-2. La OMS tuvo noticia por primera vez de la existencia de este nuevo virus el 31 de diciembre de 2019, al ser informada por un grupo de casos de “neumonía vírica” en Wuhan, República Popular China (González, 2020).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad generalmente consisten en fiebre, tos, congestión nasal, fatiga y otros signos de infección del tracto respiratorio superior. La infección puede progresar a una enfermedad grave con disnea y síntomas torácicos severos correspondientes a neumonía, que ocurre en la mayoría de los casos entre la segunda o la tercera semana de una infección sintomática; también se han detectado otros signos característicos de la enfermedad, como son la desaparición brusca del olfato y el gusto. Estos síntomas pueden presentarse como únicos signos de la infección y/o aparecer antes que los otros síntomas típicos (Morales & Raquel, 2020).

La COVID-19 se propaga principalmente a través del tracto respiratorio, por gotitas, secreciones respiratorias y contacto directo, producidas por una persona infectada al toser, respirar o hablar, y que se depositan rápidamente sobre los objetos del entorno. Las personas pueden entrar en contacto con estos objetos y

pueden contagiarse cuando se tocan los ojos, la nariz o la boca (Morales & Raquel, 2020).

5.2 Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Severo Agudo (SARS-CoV-2)

El virus SARS-CoV-2, tiene cuatro proteínas estructurales: la espícula (S, *spike*), la de envoltura (E), la de membrana (M) y la nucleoproteína (N) (Figura1); mientras que las proteínas no estructurales son al menos 16 y son conocidas como nsp1 a la nsp16. El material genético de este virus consiste en una cadena de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 30 mil nucleótidos. El genoma viral contiene una estructura tipo *cap* (caperuza o casquete) en el extremo 5´ y una cola poli-A en el extremo 3´, por lo que funciona como ARN mensajero. Este ARN es traducido para generar proteínas no estructurales (nsp) que tienen funciones en la replicación y maduración de las proteínas. No obstante, el ARN genómico da origen a otros ARN mensajeros, denominados subgenómicos, que generarán otras proteínas virales. Dicho virus, se conforma de 29,903 nucleótidos (nt). El ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) se procesa a partir de ORF1ab ubicada entre 266-13,483 nt y a partir de nt 26,245-26,472 se encuentra la región codificante para la proteína E (Hu, et al., 2020; Santos, et al; 2021).

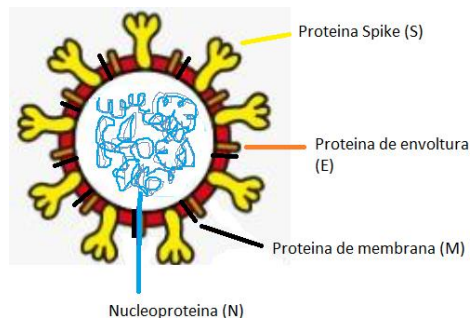


Figura 1. Esquema del virus SARS-CoV-2. Creado con información de Hu, et al., 2020; Santos, et al., 2021 (2022)

5.3 Ciclo replicativo del virus SARS-CoV-2

El primer paso de la infección viral a las células diana, consiste en la unión de las proteínas S de la superficie del coronavirus a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2, por sus siglas en inglés); Posteriormente (paso 2), la serina proteasa transmembrana de tipo II (TMPRSS2, por sus siglas en

inglés) se une y escinde el receptor ACE-2. En el proceso, la proteína ACE-2 escindida, la proteína S activada y TMPRSS2, facilitan el proceso de unión y fusión del virus a la membrana de la célula diana. Al finalizar la fusión virus/membrana celular, el ARN genómico viral se libera en el citoplasma (paso 3). El ARN, se transcribe directamente en el ribosoma para permitir la formación de las poliproteínas (pp) 1a y 1ab, la transcripción de los ARNs subgenómicos y la replicación del genoma viral (paso 4). Posteriormente, las glucoproteínas recién formadas (paso 5) se insertan en el retículo endoplásmico rugoso (paso 6) o en las membranas del aparato de Golgi (paso 7). Seguidamente, el ARN mensajero y las proteínas de nucleocápside se combinan para formar los viriones. Las partículas virales recién formadas, brotan dentro del compartimento intermedio del Retículo Endoplásmico-Golgi (ERGIC, por sus siglas en inglés). De este compartimento, las vesículas que contienen los viriones emergen y migran hacia la membrana plasmática celular con la cual se fusionan (paso 8). Una vez estructurados, los virus son liberadas por la célula y proceden a infectar nuevas células (paso 9), como se muestra en la figura 3 (Oliva, 2020; Santos, et al., 2021).

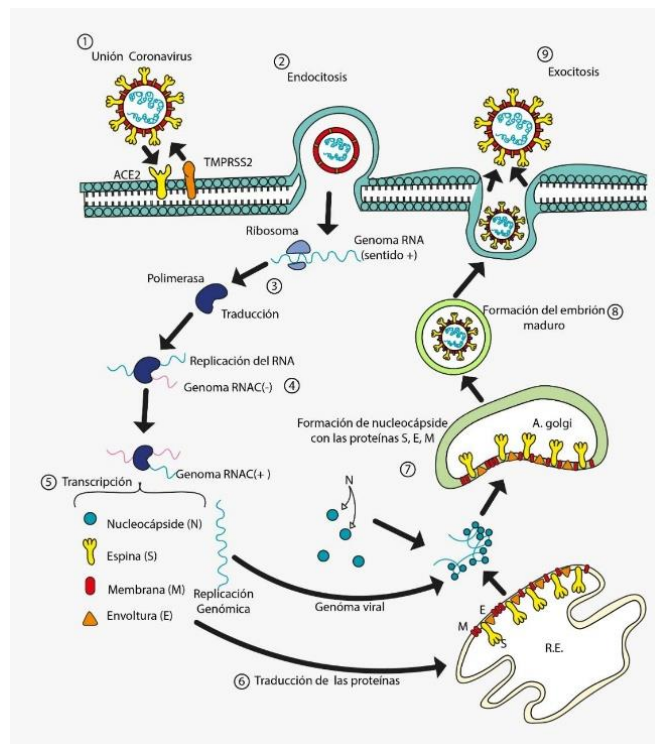


Figura 3. Ciclo replicativo del virus SARS-CoV-2. Creado con información de Oliva, 2020; Santos, et al., 2021(2022).

5.4 QIAamp Viral RNA Mini Kit

El *kit* QIAamp Viral RNA Mini de la casa comercial QIAGEN, tiene como principio, la capacidad de adsorción de los ácidos nucleicos en una columna de sílice, ante la presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Los contaminantes de la muestra son eliminados con posteriores lavados de la columna y finalmente los ácidos nucleicos son eluidos con un tampón de resuspensión de baja fuerza iónica a pH neutro o ligeramente alcalino. Dicho *kit* se compone de 5 soluciones; un buffer de lisis (AVL), 2 soluciones de lavado (AW1 y AW2), un buffer de elución (AVE) y un acarreador de ARN (*Carrier*). Para que se lleve a cabo la extracción de ácidos nucleicos, en primer lugar, la muestra se lisa en condiciones altamente desnaturalizantes que proporciona el Buffer AVL para inactivar las ARNasas y garantizar el aislamiento del ARN vírico intacto. El *Carrier*, se añade al Buffer AVL para potenciar la unión de los ácidos nucleicos víricos a la columna de sílice, especialmente si en la muestra hay pocas moléculas diana. Además, la adición de grandes cantidades de *Carrier*, reduce las posibilidades de degradación del ARN vírico. Si no se añade *Carrier* al Buffer AVL, la recuperación del ARN vírico puede ser menor. Las sales y el pH de lisado garantizan que las proteínas y otros contaminantes que pueden inhibir las reacciones enzimáticas no se retengan en la columna de sílice. Además, los tampones de lavado AW1 y AW2 eliminan los agentes contaminantes del ARN vírico que están unidos a la membrana de sílice durante dos breves pasos de centrifugación o vacío. El Buffer AVE consta de agua sin ARNasas que contiene un 0,04 % de azida sódica para prevenir el crecimiento microbiano y la contaminación posterior con ARNasas (QIAamp, 2021; Orfao & Morent, 2011).

5.5 Transcripción Reversa con Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR en tiempo real, es un método que detecta la presencia de material genético del virus del SARS-CoV-2. Esta técnica permite observar los resultados de manera casi inmediata, mientras el proceso sigue en curso. Para ello se requiere de un equipo denominado termociclador, el cual tiene la capacidad de

aumentar y disminuir la temperatura rápidamente de forma repetida en varias ocasiones y cada vez que lo hace se le conoce como un ciclo (Jawerth, 2020).

En una reacción específica de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, se seleccionan blancos genómicos o regiones persistentes de los coronavirus; como el gen RdRP y gen E. Se diseñan cebadores con una secuencia complementaria a una sola región de ARNm. De tal manera que se tendrán cebadores para una región codificante al gen RdRP y para otra región codificante al gen E (Jalali, et al., 2019; Serrano-Cumplido, et al., 2021).

La muestra de ARN obtenida del material celular, se mezcla con la transcriptasa inversa, un par de cebadores específicos, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), un tampón de reacción adecuado y una polimerasa de ADN termoestable para obtener cadenas de ADN (Jawerth, 2020).

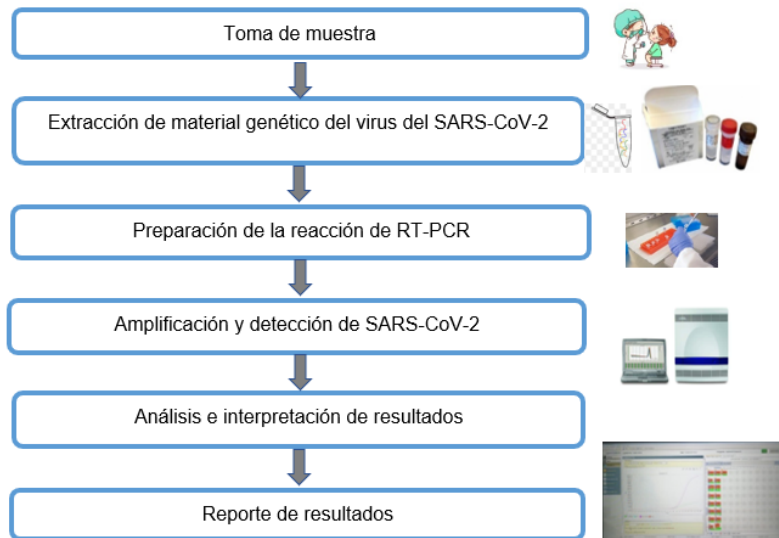
La primera reacción en la RT-PCR se lleva a cabo a 45° C, donde se rompen los enlaces de las cadenas de ARN, convirtiendo su estructura secundaria a una cadena libre, que posteriormente se le unirán *primers* específicos o cebadores, y una transcriptasa inversa; la cual comenzará a tomar los dNTP's del medio, formando ADNc. Una vez obtenidos los ADNc, se comenzará una PCR, mediante ciclos repetitivos de tres reacciones simples de amplificación, incluyendo la desnaturalización a 95 °C, donde, la plantilla de ADN de doble hebra se separa en dos hebras simples. A continuación, la temperatura se reduce a 55 °C y dos cebadores oligonucleotídicos específicos se unen al molde de ADN de forma complementaria. Posteriormente la temperatura se eleva nuevamente, pero esta vez a 95 °C, lo que facilita que la polimerasa de ADN sintetice hebras complementarias de cada ADN molde, usando desoxinucleótidos contenidos en los medios. Los productos de PCR se duplicarán en cada ciclo (Dwivedi, et al., 2017).

5.5.1 Logix Smart ABC (influenza A/B, SARS-CoV-2)

El *kit* Logix Smart ABC es una prueba de PCR de transcripción inversa en tiempo real multiplexada de un solo paso. El ensayo también incluye un control positivo interno (IPC) que actúa como control de extracción para confirmar el rendimiento de la extracción. Dicho *kit* utiliza la tecnología CoPrimer (patentada por

Co-diagnostics) que tiene como principio, evitar la formación de dímeros de cebadores. Este *kit* detecta SARS-CoV-2 (gen RdRp y E-gen) (Satterfield, 2014).

6 METODOLOGÍA



7 DESARROLLO

🚦 Toma de muestra nasofaríngea y orofaríngea

Material y reactivos

- Equipo de protección personal:
 - Bata desechable
 - Guantes de látex (libre de talco) o guantes de nitrilo
 - Mascarilla N95
 - Careta
- Hisopos flexibles de dacrón y rayón
- Toallas de papel
- Marcador permanente
- Tijeras
- Medio de transporte viral
- Alcohol etílico 70%
- Hipoclorito al 10 %

- Gradilla para los medios de transporte viral

Procedimiento

- 1.- Realizar limpieza y desinfección de la mesa de trabajo, con alcohol etílico al 70%.
- 2.- Descontaminar con alcohol al 70%, la protección ocular o facial.
- 3.- Realizar un estricto lavado de manos.
- 4.- Colocarse el equipo de protección. Mascarilla N95, bata quirúrgica desechable, guantes y protección facial.
- 5.- Identificar los tubos del paciente al cual se le tomara la muestra, con sus datos personales y folio correspondiente.
- 6.- Preparar al paciente, dando indicación que tome asiento cómodamente y dar conocimiento acerca del procedimiento que se le realizará.
- 7.- Indicar al paciente que incline la cabeza hacia atrás (70 °).
- 8.- Tomar un hisopo (dacrón o rayón) para toma de muestra nasofaríngeo e introducir el hisopo por la fosa nasal, hasta la nasofaringe.
- 9.- Detener el hisopo allí por unos segundos y retíralo con movimientos rotatorios presionando contra el tabique nasal.
- 10.- Una vez tomada la muestra, introducir el hisopo en un tubo conteniendo 2 - 3 ml de medio de transporte viral, romper el extremo del hisopo y cerrar el tubo.
- 11.- Tomar un hisopo para toma de muestra orofaríngea (dacrón o rayón) y pedirle al paciente que abra la boca, pronunciando la letra “a” con la finalidad de mantener la faringe cerrada.
- 12.- Bajo visión directa, introducir el hisopo en la cavidad oral hasta la faringe posterior y rotar el hisopo en faringe posterior, girando el hisopo para obtener una buena calidad de muestra, evitando el contacto con la lengua.
- 13.- Una vez tomada la muestra, introducir el hisopo en el mismo tubo de medio de transporte viral, romper el extremo del hisopo y cerrar el tubo herméticamente.
- 14.- Almacenar de 2-8 °C (Se recomienda que todos los tipos de muestras se procesen dentro de las 48 horas posteriores a la recolección; si es necesario almacenarlas después de 48 horas, se recomienda que las muestras se almacenen

congeladas, preferiblemente a -70 °C (debe evitarse la congelación y descongelación repetida de una muestra).

Extracción de material genético del virus del SARS-CoV-2 con kit QIAamp Viral RNA Mini

➤ **Extracción manual**

Material y reactivos

- Gradilla para microtubos de 1.5 mL
- Micropipeta de 20-200 µL
- Micropipeta de 100-1000 µL
- Puntas con filtro de 200 µL
- Puntas con filtro de 1000 µL
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL
- *Kit* QIAamp Viral RNA Mini
- Alcohol etílico 70°
- Toallas de papel
- Columna de sílice QIAcube
- Tubos de recolección QIAcube
- Tubo cónico de 15 mL
- Microtubos de 1.5 mL QIAcube
- Guantes de nitrilo
- Agitador vórtex
- Microcentrífuga
- Campana de flujo laminar
- Alcohol de grado biología molecular

Procedimiento

- 1.- Realizar sepsia en campana de flujo laminar con alcohol al 70%.
- 2.- Preparar los reactivos AW1 (130 mL de etanol) Y AW2 (160 mL de etanol), colocando la cantidad de etanol indicada en las indicaciones de uso.
- 3.- Hidratar el *Carrier* con 310 µL de AVE.

- 4.- Vortexear las muestras.
- 5.- Prepara el buffer de lisis, colocando AVL y *Carrier* 1:10 y vortexear 10 seg.
- 6.- Rotular los tubos de 1.5 mL que contiene el kit con el folio correspondiente a cada muestra de paciente.
- 7.- En los tubos; colocar 250 μ L de buffer de lisis y 140 μ L de la muestra homogenizando con la pipeta.
- 8.- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 9.- Añadir 250 μ L de etanol y homogenizar.
- 10.- Trasvasar todo el volumen obtenido de la mezcla de los reactivos anteriores a una columna con tubo recolector.
- 11.- Centrifugar a 8,000 r.p.m. por 1 min.
- 12.- Separar la columna y reemplazar el tubo recolector, desechando el anterior.
- 13.- Colocar 500 μ L de AW1 en la columna, sin tocar el fondo.
- 14.- Centrifugar a 8,000 r.p.m. durante 1 min.
- 15.- Desechar el tubo recolector y reemplazarlo por otro nuevo.
- 16.- Colocar 500 μ L de AW2 y centrifugar a 6,000 r.p.m.
- 17.- Reemplazar el tubo recolector por un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.
- 18.- Colocar 60 μ L de AVE y centrifugar a 8,000 r.p.m por 1 min.
- 19.- Desechar la columna y tapan el tubo que contiene el material genético en el diluyente.

Preparación de la reacción de RT-PCR con kit Logix Smart ABC (Influenza A/B, SARS-CoV-2)

Material y reactivos

- Alcohol etílico 70°
- Hipoclorito al 1 %
- Toallas de papel
- Puntas con filtro de 10 μ L
- Gradilla refrigerante para microtubos de PCR
- Tubos o placa (96 pocillos) para PCR de 0.1 mL
- Micropipeta de 1-10 μ L

- *Kit* de amplificación Logix Smart ABC
- Film Óptico para Placas PCR de 96 pocillos
- Microtubos para reacción de PCR de 0.1 mL
- Tapas para Microtubos
- Guantes de nitrilo
- Centrifuga de placas
- Agitador vórtex

Procedimiento

- 1.-Dejar descongelar los reactivos para amplificación del *kit* Logix Smart ABC en un bloque frío.
- 2.-Limpiar todas las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de alcohol de grado molecular.
- 3.-Una vez descongelados los reactivos del *kit* Logix Smart ABC, agitar con vórtex durante 3 segundos y centrifugar brevemente antes de usarlos para garantizar que los reactivos se mezclen correctamente.
- 4.-Colocar la placa o tubos para reacción apropiado al termociclador PCR en tiempo real 7500 FAST de 0.1 mL en un bloque frío.
- 5.-Preparar la placa de reacción incluyendo suficientes pocillos para el número de muestras más 2 pocillos para el control negativo y positivo.
- 6.-Pipetear 10 μ L de mezcla maestra del *kit* Logix Smart ABC en cada pocillo de una placa o tubo de reacción.
- 7.-Pipetear 10 μ L de material genético extraído de cada paciente en su pocillo correspondiente, cambiando de punta en cada pipeteo y homogenizar la mezcla con la misma pipeta.
- 8.-Pipetear 10 μ L de control negativo en el pocillo correspondiente.
- 9.-Pipetear 10 μ L de control positivo en el pocillo correspondiente.
- 10.-Sellar la placa de reacción con una película adhesiva óptica o bien tapar los tubos de reacción con las tapas.
- 11.-Verificar que no haya presencia de burbujas en cada pozo; si es así, centrifugar dando un *speed* de 10 seg en una centrifuga para placas.

- 12.-Colocar la placa o los tubos en orientación correspondiente en el termociclador PCR en tiempo real 7500 FAST.
- 13.-Configuración del software 7500 v2.3 para el termociclador PCR en tiempo real 7500 FAST para la amplificación y detección de SARS-CoV-2.
- 14.-Encender el termociclador PCR en tiempo real 7500 FAST y el hardware del equipo.
- 15.-Abrir el 7500 software v2.3 y seleccionar “*New Experiment*” y posteriormente “*From Template*”.
- 16.-En el apartado de “*Experiment Menu*”. Seleccionar “*Setup*” y “*Template*”.
- 17.-Seleccionar el “*Template*” para Logix Smart ABC.
- 18.-Nombrar el nuevo experimento con el día, mes, año y turno en curso.
- 19.-Seleccionar “*Plate Setup*” e ir al apartado “*Define Targets and Samples*”, e indicar el tipo de indicador por cada *Target*, para SARS-CoV-2 FAM y para el control interno (IPC RNasaP) ROX.
- 20.-En el apartado “*Define Samples*”, colocar los folios de las muestras de cada paciente.
- 21.-Seleccionar “*Assign Targets and Samples*” y asignar los folios correspondientes a cada paciente y en orden, de acuerdo a su colocación en la placa o tubos anteriormente preparados para la reacción.
- 22.-Seleccionar, de acuerdo a cada muestra o control si es un estándar (S), una muestra desconocida (U) o un control negativo (N).
- 23.-Configurar el método de corrida en “*Run Method*” con las siguientes condiciones:

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	45° C	15 min
Desnaturalización inicial	1	95° C	2 min
Amplificación	45	95° C	3 s
		55° C	32 s

- 24.-Seleccionar el apartado “*Run*” y seleccionar “*Star Run*” esperando el tiempo de finalización del experimento.

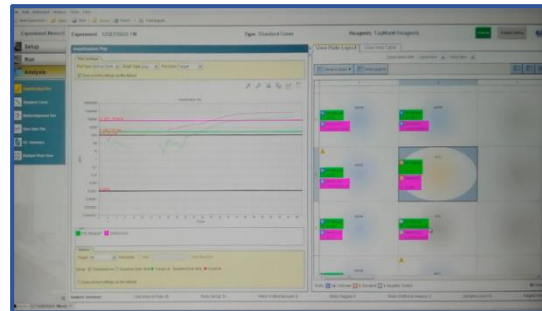
🚦 Análisis e interpretación de resultados con 7500 software v2.3 para la detección de SARS-CoV-2

Procedimiento

- 1.-Seleccionar el apartado de “*Analysis*” y “*Amplification Plot*”.
- 2.-Ajustar el *threshold* con referencia a la fluorescencia basal.

El umbral de ciclos (*cycle threshold (Ct)*), es el número de ciclos en el que la señal fluorescente cruza este umbral. Para valorar la presencia del virus en la muestra, se determina el número de ciclos Ct de RT-PCR necesarios para que la prueba resulte positiva, es decir, indica el momento preciso de la amplificación en el que la prueba es capaz de identificar la presencia de la diana molecular, sin indicar la cantidad presente.

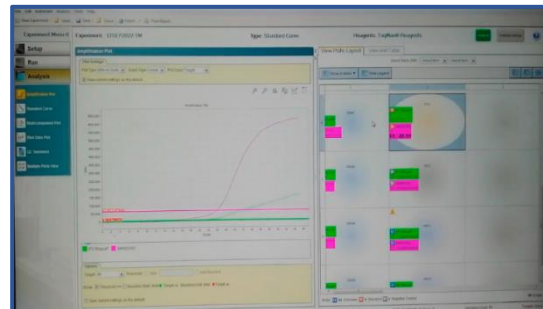
El software permite la interpretación de los resultados, en el momento en que se comienza a detectar la intensidad de la señal fluorescente que identifica la presencia de la secuencia genética correspondiente al virus. Para ello, es preciso determinar una lectura basal utilizada como referencia, que se establece con los primeros ciclos (habitualmente entre el 3 y el 15), en los que los cambios de la señal fluorescente suelen ser mínimos. A partir de aquí, hay que calcular el umbral entendido como el nivel de la señal fluorescente que representa un incremento estadísticamente significativo respecto al nivel basal.



- 3.-Seleccionar en “*Graph Type*”, la opción “*Linear*” y Seleccionar en “*Target*” a “*All*”, para SARSCOV2, IPC y RNAsa P.

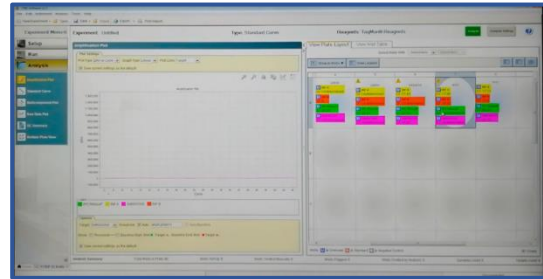
➤ Control positivo

Cada control positivo debe mostrar una curva de amplificación; tanto para SARS-CoV-2, como para RNAsaP con un valor de Ct inferior a 40 ciclos.



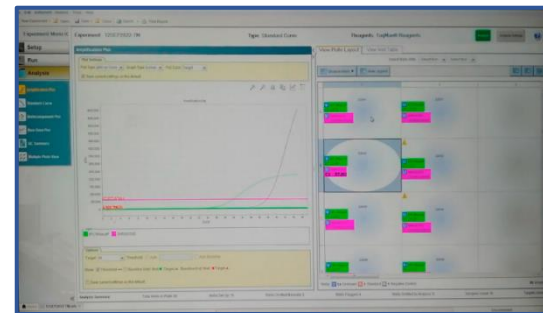
➤ Control negativo

El resultado del control negativo, no debe mostrar ninguna amplificación, específicamente con un valor de Ct inferior a 40 ciclos.



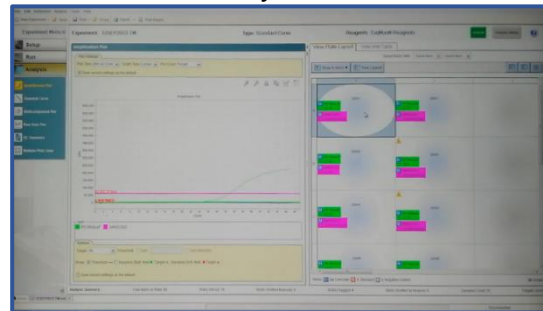
➤ Resultado de un paciente positivo a SARS-CoV-2

La presencia de una curva igual o menor a 40 ciclos para SARS-CoV-2, indica un resultado positivo, siempre y cuando exista la amplificación de la RNAasa P; lo cual indica presencia de material genético de la muestra del paciente.



➤ Resultado de un paciente negativo a SARS-CoV-2

La ausencia de una curva de amplificación, indica un resultado negativo a SARS-CoV-2; si existe una amplificación con un valor de Ct mayor a 40, también se considera negativo; ya que se encuentran dentro de una zona de incertidumbre, siempre y cuando exista la amplificación de la RNAasa P; lo cual indica presencia de material genético de la muestra del paciente.



8 DISCUSIÓN

El CDC, autoriza el uso de diferentes kits de extracción de ARN, disponibles comercialmente para la recuperación de ARN del virus del SARS-CoV-2. Entre los kits mencionados, se encuentra el kit QIAamp Viral RNA mini, el cual proporciona una alta recuperación de material genético y cuyo uso ha mostrado ser exitoso en diferentes publicaciones donde evalúan la sensibilidad y especificidad de

la tecnología RT-PCR en tiempo real para la detección del virus del SARS-CoV-2 (Vásquez-Rodríguez, et al., 2021; González, Ernesto & Martin, Ivelisse., 2021; Rojas-Serrano, et al., 2021).

Existen a la fecha 19 kits de pruebas moleculares por RT-PCR multiplexado, útiles para el diagnóstico de SARS-CoV-2, aprobados por el InDRE; entre los cuales, se encuentra el kit comercial Logix Smart ABC. Este kit detecta dos regiones con secuencias conservadas del virus del SARS-CoV-2, el gen RdRP y el gen E. Los genes RdRP y E tienen una alta sensibilidad analítica para la detección de 3,6 y 3,9 copias por reacción. Lo cual le confiere ventaja en comparación con otros kits convencionales que tienen como principio la detección del gen N, el cual tiene una sensibilidad analítica más baja (8,3 copias por reacción), de acuerdo con un estudio realizado por Corman y colaboradores en 2020, nombrado “Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR”. Así mismo, en el listado de pruebas moleculares por RT-PCR multiplexado, útiles para el diagnóstico de SARS-CoV-2 durante la contingencia de COVID-19 en México; muestra que dicho kit posee la mayor sensibilidad analítica entre los kits convencionales, con un límite de detección de 8.3 copias por reacción (Jason, et al.,2020; Corman, et al.,2020; InDRE, 2022; Rosales, 2020).

9 CONCLUSIÓN

Para que se lleve a cabo la detección de SARS-CoV-2 por la tecnología de RT-PCR en tiempo real, se requiere seguir protocolos estandarizados. En el presente trabajo se describen los procedimientos con información ordenada y sistemática de las distintas actividades que se llevan a cabo para la detección de SARS-CoV-2; además, se puede tener con certeza la obtención de resultados confiables, ya que los procedimientos descritos, se basan en la utilización de kits comerciales autorizados por organismos nacionales, como el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) e internacionales, como el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC, por sus siglas en inglés).

10 BIBLIOGRAFÍA

- Corman, Victor M; Landt, Olfert; Kaiser, Marco; Molenkamp, Richard; Meijer, Adam; Chu, Daniel KW; Bleicker, Tobias; Brünink, Sebastian; Schneider, Julia; Schmidt, Marie Luisa; Mulders, Daphne GJC; Haagmans, Bart L; van der Veer, Bas; van den, Brink Sharon; Wijsman, Lisa; Goderski, Gabriel; Romette, Jean-Louis; Ellis, Joanna Maria; Peiris, Malik; Goossens, Herman; Reusken, Chantal; Koopmans, Marion PG; Drosten, Christian (2020). *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. Euro Surveill ;25 (3) : [https:// doi.org/ 10. 2807/ 1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045)
- Dwivedi, S., Purohit, P., Misra, R., & Pareek, P. (2017). *Diseases and Molecular Diagnostics: A Step Closer to Precision Medicine*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 374–398.
- González, Ernesto C & Martin, Ivelisse. (2021) Desarrollo y validación de un ensayo RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en Puerto Rico y Estados Unidos: Investigación y metría de la información sobre COVID-19: diversos enfoques de la pandemia, 4-23.
- González, N. (2020). Coronavirus: por qué covid-19 se llama así y cómo se nombran los. Recuperado el 09 de agosto de 2022, de https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/cts/concursos/adju_resultados/material-didactico-espacio-colaborativo-CTS-N%C2%B05.pdf
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. (2020). *Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19*. *Nature Reviews*, 1-3.
- InDRE (2020). Listado de Pruebas Moleculares por RT-PCR Multiplexado, útiles para el diagnóstico de SARS-CoV-2 durante la contingencia de COVID-19 en México. Secretaria de Salud. Recuperado el 13 de octubre de 2022, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/756494/Listado_de_pruebas_moleculares_por_RTPCR_Multiplexado_evaluadas_para_el_diagnstico_de_SARS-CoV-2.pdf

- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2019). *Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR*. *sciencedirect*, 1-18.
- Jason, Chin-Huat YAP; Ian Yi Han, ANG; Sharon Hui Xuan, TAN; Jacinta I-Pei, CHEN; Ruth Frances, LEWIS; Qian, YANG; Rowena Kah Sin, YAP; Bob Xian, Yi NG; Hao, Yi TAN (2020). COVID-19 *Science Report: Diagnostics*. ScholarBank@NUS : <https://doi.org/10.25540/e3y2-aqye>
- Jawerth, N. (Junio de 2020). Enfermedades infecciosas. Obtenido de Detección del virus de la COVID-19 : <https://www.iaea.org/sites/default/files/6120811es.pdf>
- Kirsebom, L. A., Svärd, S. G., & Kikowska, E. (2007). *Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein*. Recuperado el 17 de septiembre de 2022, de <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0607326104>
- Mamiko, O., & Matinez, M. J. (Abril de 2020). *AEPap*. Obtenido de PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO DE COVID-19: https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/pruebas_diagnosticas_de_laboratorio_de_covid_vfinal.pdf
- Morales, M., & Raquel, M. (1 de Abril de 2020). *UNED*. Obtenido de El enemigo de la humanidad: COVID-19: http://portal.uned.es/portal/page?_pageid=93,70656737&_dad=portal&_schema=PORTAL
- Oliva, J., 2020. SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta*, Volumen 2, p. 3. <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- Orfao, A., & Morent, M. (2011). *red biobancos Instituto de Salud Carlos III*. Recuperado el 18 de agosto de 2022, de <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>
- QIAamp, V. (2021). *Instrucciones de uso del QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit (manual de uso)*. Recuperado el 25 de agosto de 2022, de <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=46638e95-df58-4874-9015-732e75587524&lang=es-ES>

- Rojas-Serrano, Nancy; Lope-Pari, Priscila; Huaranga-Nuñez, Maribel; Marquez, Paulo; Palacios-Salvatierra, Rosa; Balbuena-Torres, Johanna; Caceres, Omar & Padilla-Rojas, Carlos (2021). Validación y evaluación de una prueba de RT-PCR en tiempo real in house para la detección de SARS-CoV-2 usando un gen específico RdRp y control endógeno GAPDH. REV. PERU. MED. EXP. SALUD PUBLICA. 38(4):595-600. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.384.7596>
- Rosales, Evelina. (2020) Pruebas Moleculares Diagnosticas de SARS-CoV-2: Fundamentos. Bioanálisis, Volumen 105. P. 4 – 17. <http://revistabioanalisis.com/images/pdf/rev105.pdf>
- Santos, G., Cortés, P., Vallejo, V., & Reyes, J. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *SciELO*, 157(1), 88-93.
- Satterfield, B. (2014). *Cooperative Primers 2.5 Million-Fold Improvement in the Reduction of Nonspecific Amplification*. *ELSEVIER*, 16(2), 163-173. Recuperado el 29 de agosto de 2022, de [https://www.jmdjournal.org/article/S1525-1578\(13\)00249-3/fulltext](https://www.jmdjournal.org/article/S1525-1578(13)00249-3/fulltext)
- Serrano-Cumplido, A., Ruiz, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó, R., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). *National Library of Medicine*. Recuperado el 07 de septiembre de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8156904/>
- Vásquez Rodríguez EP, Guadrón Meléndez AA, Cruz Aguilar RJ, Cuadra Zelaya TE. Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta* 2021;4(1):31-39. DOI 10.5377/alerta.v4i1.10060
- Wang, W., Xu, Y., Ruqin, G., & Lu, R. (2020). *Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens*. *American Medical Association*, 1843-1844.