

TODOS LOS DETALLES SOBRE LA PCR PARA ENTENDER SU UTILIDAD EN LA LUCHA FRENTE A LA COVID-19

Esta técnica aporta gran cantidad de información de forma rápida y con una alta sensibilidad. Sin embargo, tanto la toma de muestras como su procesamiento e interpretación de los resultados debe ser realizado por personal cualificado.

Idoya Martínez Mayo

Responsable Dpto. de Biología Molecular
Laboratorio de Diagnósticos y
Alimentación, 2008 SLU (Labdial)
Correo electrónico: pcr@labdial.com
Imágenes cedidas por Labdial

Si hay una técnica analítica que recientemente ha cobrado fama entre la población es la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica es muy conocida por los especialistas en el campo de la sanidad animal y por ello el reclamo de esta comunidad para su utilización cuando se empezaba a hablar de coronavirus en Europa.

Implantada en la rutina del diagnóstico precoz, la PCR es una técnica que permite obtener información del entorno, en el que animales y humanos conviven con millones de microorganismos: virus y bacterias de distinta índole que, como cualquier especie, sufren transformaciones aleatorias dentro de un medio natural.

Hablar de bioseguridad implica contemplar todas las posibles fuentes de contaminación, y por ello la necesidad de disponer de técnicas versátiles que permitan tener una descripción lo más ampliada posible del entorno. Hoy en día se habla mucho de la PCR para la detección de coronavirus en humanos, pero también se emplea esta técnica para detectarlo en superficies, aguas y, por supuesto, en animales.

En este artículo se pretende acercar esta técnica analítica al lector para ayudar a entender qué información aporta y qué utilidad puede tener en la lucha contra la COVID-19.

La PCR es una técnica de biología molecular que permite amplificar exponencialmente fragmentos de ADN. Eso le confiere una gran sensibilidad ya que, de una pequeña cantidad de muestra, se pueden obtener millones de copias de material genético.

TOMA DE MUESTRAS

Como en el resto de técnicas analíticas, el punto crítico para obtener un buen resultado, fiable y representativo, comienza siempre con una buena toma de muestras. Para el análisis de SARS-CoV-2, la muestra debe tomarse con un hisopo e introducirse inmediatamente en un medio de transporte adecuado para virus que contenga sustancias estabilizantes de proteínas e inhibidores del crecimiento de otros microorganismos como hongos o bacterias. A continuación, debe refrigerarse y enviarse al laboratorio con la mayor brevedad posible (menos de 24 horas). De no ser así, pasadas 72 horas debe congelarse a -70 °C.

La toma de muestras debe realizarse siempre por personal cualificado que debe utilizar una metodología y medidas de protección adecuadas. En la *tabla* se indica la muestra más adecuada para el estudio de los distintos focos.

Tipo de muestra más adecuada en función del foco de estudio	
FOCO DE ESTUDIO	TIPO DE MUESTRA
Humanos	Hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos
Animales	Hisopos nasales y orales profundos Hisopos anales
Superficies	Hisopos pasados por la superficie a controlar
Agua	Colecta de agua residual, previa a tratamiento

PROCESADO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, se debe extraer el material genético y purificarlo mediante columnas de centrifugación.

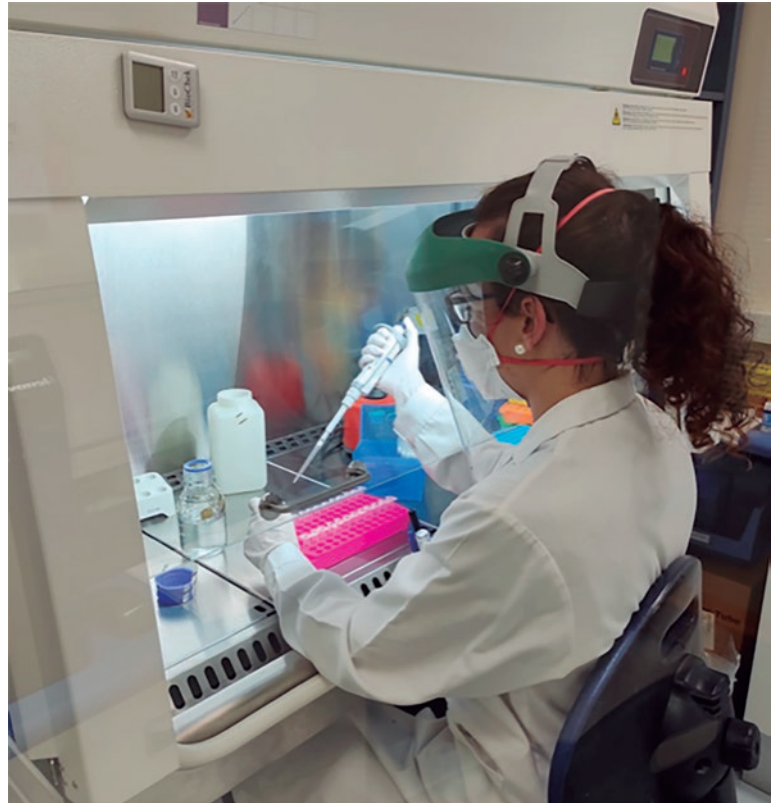
El SARS-CoV-2, como muchos otros virus, tiene ARN como material genético, por lo que es necesario retrotranscribirlo a ADNc para que la enzima ADN-polimerasa pueda realizar su función y amplificarlo. A esta variante de la PCR se le conoce como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

En el proceso de amplificación, los cebadores altamente específicos se unen al ADNc, donde la polimerasa lo amplificará en cada uno de los ciclos, repitiéndose los ciclos n veces. La alta especificidad de la técnica reside precisamente en que los cebadores se unen a regiones muy concretas del genoma. En el caso del SARS-CoV-2 en animales, esa región se encuentra en el gen *RpRd*.

Para el análisis de SARS-CoV-2, el proceso analítico completo tiene una duración de unas 4 horas, por lo que la PCR es una técnica rápida que se convierte en una herramienta esencial en el laboratorio.

La mayoría de los laboratorios de sanidad animal disponen de equipos de medida que permiten obtener la información mientras se produce esa amplificación del ADN; lo que se conoce como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-*Real Time*). Para ello, se utilizan sondas específicas con fluoróforos incorporados, que emiten una señal fluorescente en cada ciclo de amplificación, la cual es detectada en el equipo termociclador. De este modo, se obtiene como resultado una gráfica formada por curvas de amplificación. Esa información debe ser analizada por personal cualificado, con experiencia en PCR, para lograr una correcta interpretación del resultado (*figura*).

Para garantizar la validez del ensayo y el proceso de extracción, se realizan una serie de controles positivos y negativos que aportan información relevante



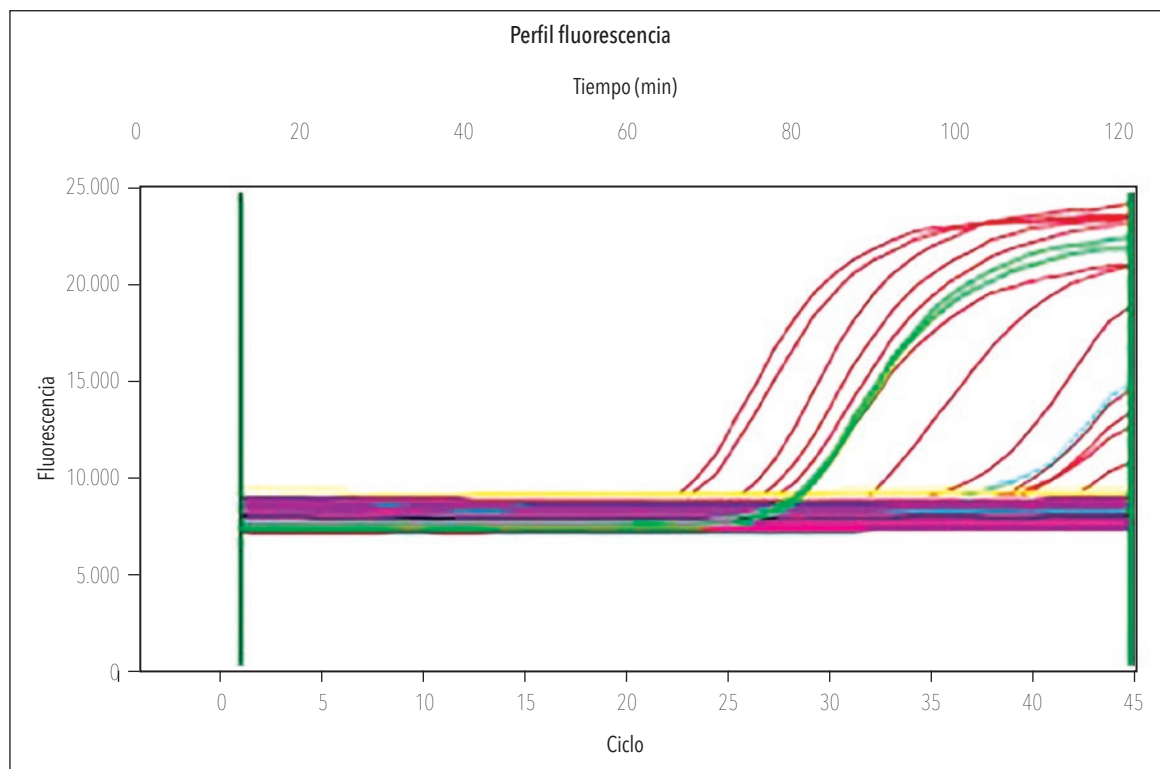
para la interpretación del resultado. Aun así, como cualquier técnica analítica, es susceptible de error, y la PCR puede obtener falsos positivos o negativos. Actualmente ya se dispone de material y protocolos validados que, llevados a cabo por personal cualificado, vienen preparados para minimizar el riesgo de obtener resultados fallidos.

Para el análisis de SARS-CoV-2, el proceso analítico completo tiene una duración de unas 4 horas, por lo que la PCR es una técnica rápida que se convierte en una herramienta esencial en el laboratorio.

No hay que olvidar que, para hacer un diagnóstico adecuado, los resultados analíticos obtenidos en el laboratorio deben ir acompañados de información adicional observada en campo. Un resultado negativo no impide la infección del virus. Por ello, es crítico el proceso de toma de muestras y, sobre todo, el papel fundamental de veterinarios y otros profesionales que, agrupando toda la información, serán capaces de emitir el diagnóstico final.

CONCLUSIÓN

La PCR aporta información sobre la presencia de material genético en una muestra extraída en un momento puntual de una zona por la que se ha pasado un material soporte (en este caso un hisopo) o en una fracción de muestra colectada como puede ser en agua residual. Por su elevada rapidez, sensi-



Señal fluorescente de los ciclos de amplificación para SARS-CoV-2.

bilidad y especificidad, resulta una herramienta muy adecuada para la detección del virus, pero se deben tener en cuenta sus ventajas y limitaciones para elegir el momento óptimo de utilización.

Es crucial controlar la infección en los animales del entorno, ya que pueden constituir un reservorio del virus para futuros brotes.

Conocer la información que proporciona cada técnica analítica permite a los profesionales de distintos ámbitos, con experiencia en el manejo de microorganismos, hacer un uso adecuado de los recursos disponibles, tomar decisiones con criterio para establecer protocolos de actuación rápidos y eficaces en la lucha contra cualquier pandemia.

La pandemia de la COVID-19, como muchas otras, es una zoonosis. Por eso, es crucial controlar la infección en los animales del entorno, ya que pueden constituir un reservorio del virus para futuros brotes. Es conocido el caso de la granja de visones infectada por SARS-CoV-2 en Dinamarca¹, así como las mutaciones procedentes de este reservorio. Este tipo de sucesos, sumado a una gestión poco adecuada de la

información, conlleva no solo el riesgo de infección para los humanos, sino el sacrificio de animales y notables pérdidas económicas.

Por el momento, la infección de mascotas no se ha demostrado que comporte un riesgo para la población. Esto, junto con la competencia por los recursos limitados para la realización de las pruebas, y las consecuencias de abandono o sacrificio que podrían provocar, ha llevado a la Organización Colegial Veterinaria Española a desaconsejar la realización de pruebas de diagnóstico de manera generalizada para SARS-CoV-2 en mascotas².

Queda demostrado que la vigilancia de la salud pública debe ir estrechamente unida al bienestar animal y al conocimiento del medio que nos rodea. Estudiar la persistencia del virus en superficies o el control de aguas residuales proporciona también información sobre la circulación del virus dentro de una población.

En definitiva, tener una visión de conjunto aportará grandes ventajas que permitirán abordar los distintos frentes y un avance más eficaz en la lucha contra la pandemia. ●

REFERENCIAS

¹Organización Mundial de la Salud - Cepa variante del SARS-CoV-2 asociada a visones - Dinamarca.

²Organización Colegial Veterinaria Española - Protocolo para la detección de SARS-CoV-2 en animales domésticos.