

2x1: Diseño e implementación de una estrategia de Pcr dúplex para diagnóstico de COVID-19

Pablo Pérez Díaz¹, Matías Pérez Díaz¹, Eliana Rosales¹, Agustina Lacaze¹, Constanza Buratti¹, Matías Distel¹, Florencia Cabral¹, Julieta Peñalva¹, Francisco Jofre¹ y Juan Manuel Talia¹, Jimena Manzur², Maximiliano Juri Ayub².

¹ Laboratorio de Salud Pública "Dalmiro Pérez Laborda", Ministerio de Salud, Provincia de San Luis.

² Área de Biología Molecular, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.

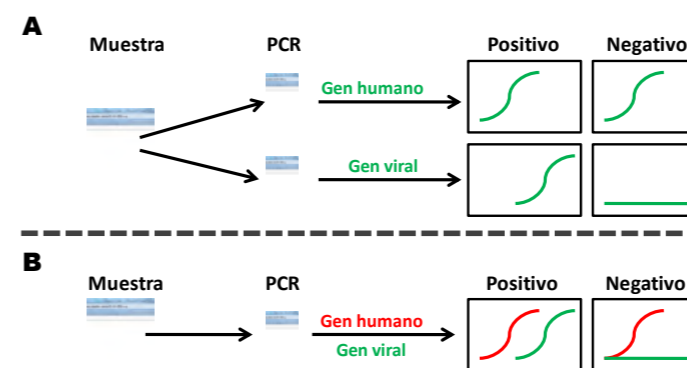
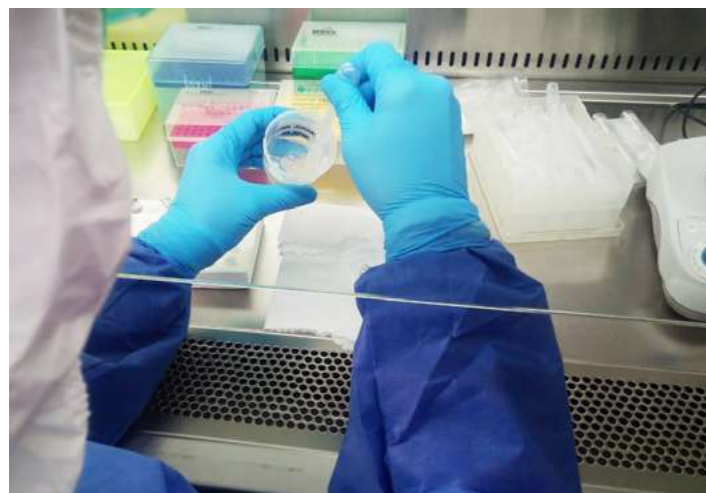
El 11 de marzo de 2020, la OMS concluye que la enfermedad surgida en Whuan, China, en diciembre de 2019 (COVID-19), cuyo responsable es el SARS-CoV-2, reúne los requisitos para ser considerada una pandemia. En cuestión de meses, nuestro estilo de vida contemporáneo, caracterizado por un enorme flujo de personas, bienes y servicios, ha sufrido un impacto sin precedentes. Por otro lado, nunca en la historia de la humanidad se ha conseguido acumular tanto conocimiento científico en tan poco tiempo sobre un tema en particular [1].

El diagnóstico molecular de infección con SARS-Cov-2 mediante la detección del genoma viral por la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) es la principal herramienta para confirmar la infección. Dicho diagnóstico permite detectar rápidamente y aislar a quienes puedan transmitir la enfermedad.

Esto, en el marco de políticas sanitarias integrales y el acatamiento social a las normas de distanciamiento, contribuye a evitar, suprimir o limitar la dispersión de la enfermedad.

El protocolo implementado por la red **Centers for Disease Control and Prevention** (CDC, USA, uno de los centros de referencia a nivel mundial) para la detección de SARS-Cov-2 consiste en dos reacciones de PCR que identifican por un lado material genético humano, y por otro, un fragmento específico del genoma viral [2]. La primera reacción es imprescindible para garantizar la integridad y calidad de la muestra analizada y evitar falsos negativos. En otras palabras, evita que errores o inconvenientes en la toma, transporte, almacenamiento o procesamiento de la muestra sean interpretados erróneamente como ausencia de infección. La presencia de material genético humano y viral es detectada mediante la adición de un componente fluorescente que permite la emisión luz en la región del espectro correspondiente al color verde (520 nm). De este modo, como se observa en la **Figura 1A**, cada muestra debe ser analizada en dos tubos de reacción separados; uno para detectar material genético humano (reacción control), y el segundo para detectar genoma viral (reacción diagnóstica).

Figura 1. A. Protocolo convencional. Representación esquemática de la PCR simple empleando dos reacciones de detección marcadas con un mismo color (verde) para detectar material genético humano y viral. **B. PCR dúplex.** En un mismo tubo de reacción se



detecta material genético humano (rojo) y viral (verde). Los esquemas fueron cedidos por el Dr. Adolfo Zurita.

En el marco de un convenio de colaboración firmado entre el Gobierno de la Provincia de San Luis y la Universidad Nacional de San Luis, profesionales del Laboratorio de Salud Pública Provincial "Dalmiro Pérez Laborda" y docentes



del Área de Biología Molecular de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad, trabajamos de manera conjunta y coordinada para el desarrollo de una metodología de PCR dúplex en el diagnóstico de COVID19. De este modo, ambas reacciones (la detección de material genético humano y viral) son llevadas a cabo en el mismo tubo. Esta estrategia permite:

- Disminuir significativamente (50%) el gasto de insumos.
- Reducir el tiempo y complejidad del proceso.
- Disminuir la probabilidad de falsos negativos; ya que la detección del gen viral y el gen constitutivo ocurren en el mismo tubo simultáneamente.



Para ello, como se esquematiza en la **Figura 1B**, se diseñó y puso en práctica una estrategia en la cual el sistema de detección que evidencia la presencia de material genético humano (gen constitutivo) se reemplazó por una alternativa cuya fluorescencia emite luz en la zona roja del espectro (668 nm). Luego de optimizar las condiciones de reacción y detección, en un mismo tubo de reacción se detecta simultáneamente el material genético humano y viral, sin que una de las reacciones interfiera sobre la otra y sin afectar la sensibilidad de la técnica. La metodología de PCR dúplex ha sido validada y ya se encuentra en funcionamiento en el Laboratorio de Salud Pública provincial.

[1] <https://www.sciencemag.org/news/2020/02/completely-new-culture-doing-research-coronavirus-outbreak-changes-how-scientists>

[2] <https://www.fda.gov/media/134922/download>

FQBF
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO DE SAN LUIS