Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 26 - No. 2 *Año 2023*

Órgano Oficial de la SVBE

CONTENIDO

EDITORIAL

María Fátima Garcés..... 37

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real en individuos referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Valerie Ross, Génesis Caraballo, Pierina D'Angelo, Cristina Gutiérrez..... 38

Estudio piloto del efecto del tipo y conservacion de la muestra y método, en la medición de la concentracion de las fracciones C3 y C4 del complemento.

Soriuska Mayora Hernandez, Wendy Martínez Vazquez, Francis Crespo Serrano, Inirida Belisario Gomez, Christian Medina García, Juan Bautista De Sanctis , Alexis García Piñero..... 45

Polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen del receptor CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen de la APO-E en individuos obesos

Angélica Fernándes, María Victoria Atencio, Gustavo Benítez Pérez, Maria Fatima Garces..... 51

Detección directa de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR en pacientes referidos al Instituto Nacional De Higiene "Rafael Rangel"

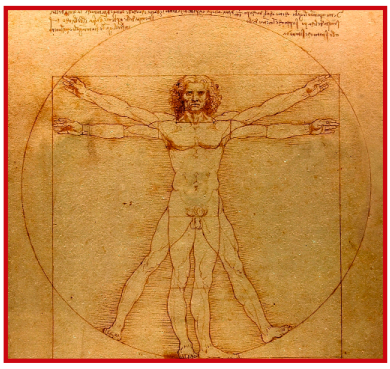
Giulianna Antonelli, Aleiram Chaurio, Marwan Aguilar..... 60

INFORMACIÓN PARA AUTORES..... 67

ÍNDICE POR AUTORES..... 68

ÍNDICE POR TITULOS..... 71

ÍNDICE PALABRAS CLAVE..... 72



Revista arbitrada e indizada
LILACS (BIREME)
Depósito Legal 199202DF899
ISSN 1315-1746
Miembro ASEREME

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Vol. 26 - No 2 2023

EDITORIAL
María Fátima Garcés..... 37

ARTÍCULOS ORIGINALES:
Cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real en individuos referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Valerie Ross, Génesis Caraballo, Pierina D'Angelo, Cristina Gutiérrez..... 38

Estudio piloto del efecto del tipo y conservacion de la muestra y método, en la medición de la concentracion de las fracciones C3 y C4 del complemento.
Soriuska Mayora Hernandez, Wendy Martínez Vazquez, Francis Crespo Serrano, Inirida Belisario Gomez, Christian Medina García, Juan Bautista De Sanctis , Alexis García Piñero..... 45

Polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen del receptor CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen de la APO-E en individuos obesos
Angélica Fernándes, María Victoria Atencio, Gustavo Benítez Pérez, Maria Fatima Garces..... 51

Detección directa de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR en pacientes referidos al Instituto Nacional De Higiene "Rafael Rangel"
Giulianna Antonelli, Aleiram Chaurio, Marwan Aguilar..... 60

INFORMACIÓN PARA AUTORES..... 67

ÍNDICE POR AUTORES..... 68

ÍNDICE POR TITULOS..... 71

ÍNDICE PALABRAS CLAVE..... 72

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 26 - No 2 2023

EDITORIAL
María Fátima Garcés..... 37

ORIGINAL ARTICLE:
Quantification of SARS-CoV-2 viral load levels by time-time pcr real in individuals referred to the National Institute Of Hygiene "Rafael Rangel"
Valerie Ross, Génesis Caraballo, Pierina D'Angelo, Cristina Gutiérrez..... 38

Pilot study of the effect of sample type, sample conservation and method on the measurement of C3 and C4 complement fractions concentration.
Soriuska Mayora Hernandez, Wendy Martínez Vazquez, Francis Crespo Serrano, Inirida Belisario Gomez, Christian Medina García, Juan Bautista De Sanctis , Alexis García Piñero..... 45

Polymorphism -31118 G/A (*rs1761667*) of the CD36 receptor gene and the variants 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*) of the APO-E gene in obese individuals
Angélica Fernándes, María Victoria Atencio, Gustavo Benítez Pérez, Maria Fatima Garces..... 51

Direct detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR in patients referred to the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel"
Giulianna Antonelli, Aleiram Chaurio, Marwan Aguilar..... 60

INFORMATION FOR THE AUTORS...... 67

INDEX BY AUTORS..... 68

INDEX BY TITLE..... 71

KEYWORD INDEX..... 72

EDITORIAL

La Revista ***Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas***, finaliza exitosamente el año 2023, con el número dos del volumen 26 de nuestra revista. Este volumen es fruto del trabajo del increible equipo del Comité Organizador del XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis 2023, nuestro máximo evento científico donde pasamos 4 días actualizando nuestros conocimientos, compartiendo con los amigos y haciendo nuevas amistades.

Esta revista presenta los trabajos premiados en nuestro magno evento, con dos trabajos que fueron el Premio Científico de la Sociedad, otorgado a profesionales del Bioanálisis y dos trabajos del premio "Franca Billi" para estudiantes de Bioanálisis, destacando de esta manera la importancia de esta actividad científica, lo cual redunda en promoción de la misma y así en el cumplimiento de nuestro objetivo, la divulgación de los conocimientos científicos

Abrimos la edición de esta revista, con el artículo ganador del Premio SVBE XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis 2023, titulado: Cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-Cov-2 por PCR en tiempo real en individuos referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", seguido del trabajo ganador de la mención honorifica titulado: Estudio piloto del efecto del tipo y conservación de la muestra y método, en la medición de la concentración de las fracciones C3 y C4 del complemento. Seguimos con el trabajo ganador del Premio "Franca Billi" para estudiantes de Bioanálisis titulado: Polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen del receptor CD36 y las variantes 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen de la APO-E en individuos obesos y finalizamos este número con la mención honorifica titulado: Detección directa de SARS-Cov-2 mediante RT-qPCR en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Queremos destacar las actividades realizadas por la Junta Directiva de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas y al Comité Organizador del XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis 2023, celebrado en el Gran Hotel Meliá Caracas, Venezuela del 19 al 22 de julio del 2023, en especial a su Presidente MSc. Valmore Rodríguez, la Dra. Juvic Goncalves (Secretaría General), la Dra. María Fátima Garcés (Secretaría de Asuntos Científicos y Educativos), la Lcda. Ana Maio (Subsecretaría de Asuntos Científicos y Educativos), la Esp. Doryanna Correa (Secretaría de Finanzas), la Lcda. Carolina Uzcategui (Subsecretaría de Finanzas) y la Lcda. Ana María Vivas (Secretaría de relaciones públicas y sociales), además queremos felicitar a los coordinadores de área que hicieron un programa científico de excelente calidad, con las mejores conferencias dictadas por especialistas de cada área, el cual fue disfrutado por más de 1100 profesionales, quienes aprovecharon este espacio científico no solo para actualizarse sino además como reencuentro con colegas de diferentes partes del país. Gracias por el éxito alcanzado que permitió resaltar nuestra Sociedad y gremio.

Nuestros más cordiales saludos y afectos.

Dra. María Fátima Garcés
Editora.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CARGA VIRAL DE SARS-COV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL EN INDIVIDUOS REFERIDOS AL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"

Valerie Ross[1], Génesis Caraballo[2], Pierina D'Angelo[3], Cristina Gutiérrez[4].

[1]Bioanalista, Centro Clínico de Maternidad Leopoldo Aguerrevere, [2]Docente Instructor Cátedra de Parasitología, Universidad Central de Venezuela, [3]Jefe Departamento de Virología-Dirección de Diagnóstico y Enfermedades Transmisibles-Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", [4]Docente Asistente Cátedra de Virología, Universidad Central de Venezuela.

Premio SVBE XVII Congreso Venezolano de Bioanalisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 15 septiembre 2023

RESUMEN:

Introducción: COVID-19, infección viral altamente transmisible y patógena causada por el SARS-CoV-2, surgió en China y se extendió por el mundo creando una pandemia. Se ha demostrado que la dinámica viral tiene influencia en el progreso de la enfermedad. Es importante contar con herramientas que permitan evaluar su curso. Por ello, se propone estandarizar la técnica de qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2. **Objetivo:** Estandarizar la técnica de qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR). **Metodología:** Se realizó una curva de calibración a partir de un estándar del gen E del SARS-CoV-2 con 10^8 copias virales/µL, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se establecieron 8 puntos para obtener la función lineal necesaria mediante los métodos estadísticos adecuados. Se cuantificó la carga viral de 230 muestras provenientes del tracto respiratorio superior mediante qRT-PCR, extraídas previamente con el método de perlas magnéticas y/o columnas de sílica gel. **Resultados:** Se obtuvo una curva estándar de calibración con un coeficiente de correlación (r^2) de 0,9959 y Eficiencia (E) de 79%. Se correlacionó el Ct obtenido de las muestras con el número de copias virales presentes en ellas, obteniéndose un promedio de carga viral que oscila en el orden de 10^4 copias virales/µL en sintomáticos y 10^3 copias virales/µL en asintomáticos. **Conclusión:** Este trabajo representa el primer reporte de estandarización de una metodología para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en muestras del tracto respiratorio superior en Venezuela, para la implementación y uso de una herramienta útil en el monitoreo de los casos de COVID-19. Se observó que los niveles de carga viral en las muestras de estudio presentaban un promedio de carga viral que oscila en el orden de 10^3 - 10^4 copias virales/µL

Palabras clave: carga viral, SARS-CoV-2, COVID-19, qRT-PCR.

QUANTIFICATION OF SARS-COV-2 VIRAL LOAD LEVELS BY TIME-TIME PCR REAL IN INDIVIDUALS REFERRED TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE "RAFAEL RANGEL"

ABSTRACT

Introduction: COVID-19, a highly transmissible and pathogenic viral infection caused by SARS-CoV-2, emerged in China and spread worldwide, creating a pandemic. Viral dynamics have been shown to influence disease progression. It is important to have tools to evaluate its course. Therefore, it is proposed to standardize the qRT-PCR technique for the quantification of SARS-CoV-2 viral load levels. **Objective:** To standardize the qRT-PCR technique for the quantification of SARS-CoV-2 viral load levels in patients referred to the INHRR. **Methodology:** A calibration curve was generated from a SARS-CoV-2 gene E standard with 10^8 viral copies/µL, serial 1:10 dilutions were performed, and 8 points were established to obtain the necessary linear function using appropriate statistical methods. The viral load of 230 upper respiratory tract samples was quantified by qRT-PCR, previously extracted with the magnetic bead and/or silica gel column methods. **Results:** A standard calibration curve with r^2 of 0.9959 and Efficiency of 79% was obtained. The Ct obtained from the samples was correlated with the number of viral copies present in them, obtaining an average viral load that ranges in the order of 10^4 viral copies/µL in symptomatic patients and 10^3 viral copies/µL in asymptomatic patients. **Conclusion:** This work represents the first report of the standardization of a methodology for the quantification of SARS-CoV-2 viral load levels in upper respiratory tract samples in Venezuela, for the implementation and use of a useful tool in the monitoring of COVID-19 cases. It was observed that the viral load levels in the study samples presented an average viral load that ranges in the order of 10^3 - 10^4 viral copies/µL.

Keywords: viral load, SARS-CoV-2, COVID-19, qRT-PCR.

Introducción

La COVID-19 es una infección viral altamente transmisible y patógena causada por el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), que surgió en Wuhan, China y se extendió por todo el mundo (1). El agente infeccioso fue identificado el

Solicitar copia a: Valerie Ross (valerieross97@gmail.com)

7 de enero de 2020 como un nuevo Coronavirus y se denominó provisionalmente 2019-nCoV, que se cree que se originó en el mercado de mariscos de Huanan (2,3). Debido a su marcada similitud en términos de síntomas clínicos y naturaleza biológica con el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, el SARS-CoV, el nuevo coronavirus fue nombrado SARS-CoV-2 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (2,4). El virus se informó por primera vez en diciembre de 2019 y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificó como pandemia el 11 de marzo de 2020 (5).

Tan pronto como se identificó el patógeno causal y se determinó su secuencia genómica, se estableció rápidamente un diagnóstico de laboratorio basado en tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos, lo cual ha permitido un abordaje clínico oportuno. Se necesitan con urgencia estrategias que puedan detectar eficazmente la progresión de la enfermedad para estratificar a los pacientes para una atención adecuada y que, por lo tanto, puedan prevenir la exacerbación de la enfermedad (6).

Los Coronavirus (CoV) son un grupo de virus envueltos con genomas de ARN no segmentados, monocatenarios y de sentido positivo. Además de infectar una variedad de vertebrados importantes, pudiendo afectar el sistema nervioso central, hepático, gastrointestinal y respiratorio de vacas, aves, murciélagos, ratones y muchos otros animales salvajes. El SARS-CoV-2 es un virus nuevo perteneciente a la subfamilia Orthocoronavirinae género Betacoronavirus y al subgénero Sarbecovirus y dentro de ellos al linaje 2. Infecta y se replica de forma eficiente en los neumocitos, macrófagos y células dendríticas de las partes más profundas del parénquima pulmonar en las que reside el receptor celular ACE2 (Enzima Convertidora de Angiotensina II, por sus siglas en inglés) que es utilizado por este virus para unirse a dichas células e iniciar el proceso infeccioso (4,7).

La secuencia de SARS-CoV-2 compartida en la plataforma GISAID (Iniciativa Mundial para Compartir Datos sobre la Influenza Aviar, por sus siglas en inglés), permitió el desarrollo de varias pruebas de diagnóstico molecular a través del diseño de cebadores y sondas específicas para la detección rápida mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR) (8,9).

A lo largo del curso pandémico se ha demostrado que la dinámica viral tiene influencia en la evolución de la enfermedad, asociada a la sintomatología que presentan los pacientes infectados por el SARS-CoV-2. Es de suma importancia contar con herramientas que permitan evaluar el curso y progreso de la enfermedad. Por ello, se propone estandarizar la técnica de qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", con la finalidad de correlacionar los valores de copias virales con el valor umbral o Ct obtenido. Estos valores serán de utilidad para poder investigar a futuro la dinámica de la infección viral en los pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como evaluar el comportamiento de las variantes emergentes, resistencia a medicamentos, cuasiespecies y fitness vitral, entre otros. (10,11).

Materiales y métodos

Tipo y toma de muestras:

Las muestras del tracto respiratorio superior corresponden al tipo de muestra empleado en este Trabajo Especial de Investigación (230 muestras), debido a que en el epitelio respiratorio superior el virus tiene una tasa de replicación importante y es de fácil obtención. Dentro de estas muestras se incluyen hisopado nasofaríngeo, orofaríngeo y nasal (12).

Preparación de la muestra:

Todas las muestras se consideran potencialmente infecciosas. Es recomendable que se incuben a 56 °C en un termobloque durante 30 minutos para inactivarlas antes de la extracción de ácidos nucleicos con la finalidad de asegurar una pérdida total de la infectividad mientras se conserva la integridad de los ácidos nucleicos (13). Posterior a esto, se procede a extraer los hisopos contenidos en el medio de transporte viral que se utilizaron para la obtención de la muestra, luego de someterse a un paso de centrifugado de ser necesario (si la muestra es muy viscosa) y mezclado con vortex.

Extracción de ácidos nucleicos:

Para la extracción de ácidos nucleicos se emplearon dos metodologías diferentes de acuerdo a la disponibilidad de reactivos y consumibles, las cuales son: método de extracción manual por adsorción en columnas de sílica gel y método automatizado por separación con perlas magnéticas con la utilización del equipo MGISP-960.

Detección y amplificación del gen E mediante técnicas de RT-PCR en tiempo real:

Para la amplificación del material genómico de cada muestra se siguen las instrucciones del protocolo desarrollado por el Instituto de Virología Charité – Universitätsmedizin Berlín en Alemania, utilizando cebadores altamente conservados de la región genómica de la envoltura E del SARS-CoV-2 (14). Cada ensayo de PCR es llevado a cabo en un volumen final de 25 µL, en presencia de Buffer 10X, los cebadores y la sonda FAM (ver Tabla 1); 5 U/µL de la enzima One Step transcriptasa reversa CWBIO. En cuanto al volumen de muestra o controles, se utilizan 5 µL de extracto de ARN.

Diseño de una curva estándar de calibración para la cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-CoV-2.

Para la cuantificación de los niveles de carga viral, se requiere realizar una curva estándar de calibración a partir de un control positivo (estándar) del gen E del SARS-CoV-2 con un número conocido de copias virales. Dicho control contiene 10^8 copias, a partir del cual se harán diluciones seriadas 1:10 del mismo y se establecerán al menos 8 puntos para obtener la función lineal necesaria para construir la curva de calibración mediante el uso del método de los "mínimos cuadrados" con la finalidad de que se tenga exactitud y confiabilidad estadística al obtener los parámetros para la función de la curva de calibración.

Validación de los resultados:

Para la validación de cada placa de reacción se incluyeron controles tanto positivo (PTC) como negativo (NTC), así como una dilución del estándar SARS-CoV-2 iv-RNA E-gene de 10^8 copias liofilizado, correspondiente a un punto de la curva de calibración realizada, y un control del agua libre de nucleasas empleada en la extracción de los ácidos nucleicos, para la obtención de resultados validados adecuadamente.

Por otra parte, de manera de poder validar y controlar el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, para demostrar la recuperación exitosa del ARN del SARS-CoV-2 de las células del epitelio respiratorio, así como la integridad del reactivo de extracción, se realiza la identificación mediante qRT-PCR del gen de RNasa P (RP) humana. Esto se realiza para cada muestra ensayada en otra placa de reacción diferente, ya que el kit empleado utiliza la misma sonda que para la detección del gen E (sonda FAM).

Tabla 1. Cebadores y sonda empleados para la qRT-PCR para la detección del gen E

Ensayo	Oligonucleótido	Secuencia
Gen E	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATA-GCGT
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACT-GCGCTTCG-BBQ
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA

FAM: 6-carboxifluoresceína; BBQ: blackberry quencher (67).

Resultados

Curva estándar de calibración (Número de copias virales/µL vs Ct):

En la Tabla 2, se pueden observar los valores de Ct obtenidos para cada punto de la curva de calibración; así mismo, los valores de cada una de las réplicas de los puntos de dilución establecidos 1:10.

Tabla 2. Valores de Ct para la obtención de la curva estándar de calibración

Número de copias virales/µL	Valores de Ct	Media ($\bar{X}$) Ct
10^8	14,8 14,9 15,1	14,9
10^7	18,0 18,3 18,3	18,2
10^6	22,1 22,2 22,9	22,4
10^5	28,0 25,3 25,1	26,1
10^4	33,2 24,8* 30,0	31,6
10^3	35,6 38,1* 32,6	34,1
10^2	37,1 39,4 ≥40	38,3
10^1	≥40 ≥40 ≥40	≥40

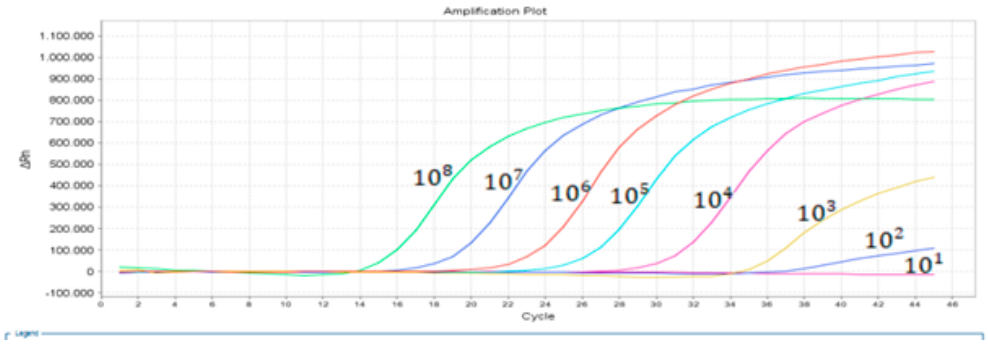


Figura 1. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas correspondientes a la curva estándar de calibración.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, aquellas diluciones que presentan mayor número de copias virales arrojan valores de Ct más bajos, por lo que se establece una relación inversamente proporcional en la que a menor valor de Ct, se estiman valores de carga viral elevados.

En líneas generales, en cada réplica de las diluciones del estándar de calibración hubo buena reproducibilidad y baja dispersión entre ellas, demostrando que para las diluciones 10^7 y 10^8, todas las réplicas se encontraron dentro del rango ±1DS, mientras que para las diluciones 10^6 y 10^5, solo una réplica de cada uno de ellos se alejó muy ligeramente de dicho rango. En las diluciones 10^3 y 10^4 una réplica de cada dilución se encontró muy alejada de la primera desviación estándar para cada grupo de réplicas, por lo que se excluyeron del estudio.

A continuación, en la Figura 1, se pueden contemplar las curvas de amplificación obtenidas y sus diluciones respectivas.

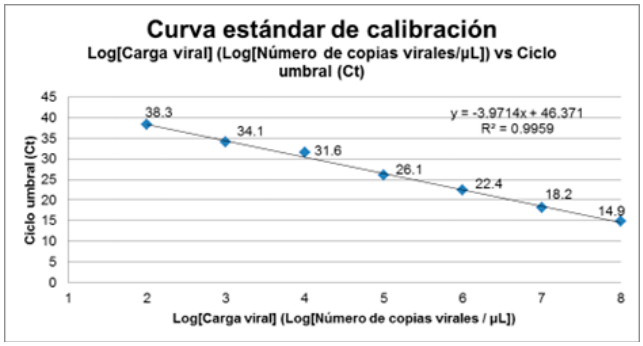
Para la construcción de la curva de calibración, fueron tomados en consideración la media de los valores de Ct obtenidos de las tres réplicas para cada dilución, exceptuando una de las réplicas para la dilución 10^4 y 10^3, respectivamente. En el Gráfico 1, se puede detallar la curva estándar de calibración obtenida.

En el gráfico se detalla la función de la recta con sus respectivos valores de pendiente (m) de -3,9714 y punto de corte en el eje "y" (b) de 46,371, así como el valor de coeficiente de correlación lineal (r^2) de 0,9959, lo cual es indicativo de la calidad de la curva para replicar los resultados. La eficiencia (E) de la amplificación resultó ser de 79% (15,16).

Detección y amplificación del gen E mediante técnicas de RT-PCR en tiempo real:

Todas las muestras procesadas amplificaron para la detección del control interno (RNAsa P) y se encontró un 100% de positividad para la detección del gen E del SARS-CoV-2.

Gráfico 1. Curva estándar de calibración: Log[Carga viral] (Log[Número de copias virales/µL]) vs Ciclo umbral (Ct):



En relación a la sintomatología presentada, un total de 120 pacientes (52,2%) corresponde a pacientes sintomáticos; de los cuales 10 de ellos (4,3%) tuvieron una evolución de la enfermedad que culminó con su fallecimiento. Por otra parte, un total de 110 individuos (47,8%) cursaron la infección de forma asintomática. Estos datos se corresponden con los obtenidos a nivel mundial, donde se señala que la mayoría de los individuos padecen cuadros respiratorios leves y se recuperan sin tratamiento especial (17,18).

Aquellos individuos que presentaron sintomatología, fueron clasificados de acuerdo a la severidad de su padecimiento en cuatro categorías: enfermedad leve, enfermedad moderada, enfermedad grave y enfermedad crítica, como fue detallado en el marco teórico. Un total de 120 pacientes (52,2%) presentaron sintomatología, dentro de los cuales destacan 49 pacientes con enfermedad leve (21,3%), 45 pacientes con enfermedad moderada (19,6%), 16 pacientes con enfermedad grave (6,9%) y, por último, 10 pacientes con enfermedad crítica (4,4%).

Correlación de los Ct de las muestras con el número de copias virales:

Para correlacionar los valores de Ct de cada una de las muestras con el número de copias virales/µL, se realizó la extrapolación de dichos valores a la curva estándar de calibración, mediante el uso de la función de la recta obtenida y = -3,9724x + 46,371 para así obtener los niveles de carga viral en estos individuos.

Estos valores se pueden evidenciar en la Tabla 3, donde se observa que se agruparon las muestras en estudio en grupos de acuerdo a sus valores de Ct obtenidos, entendiendo que la relación entre el Ct y la carga viral es inversamente proporcional.

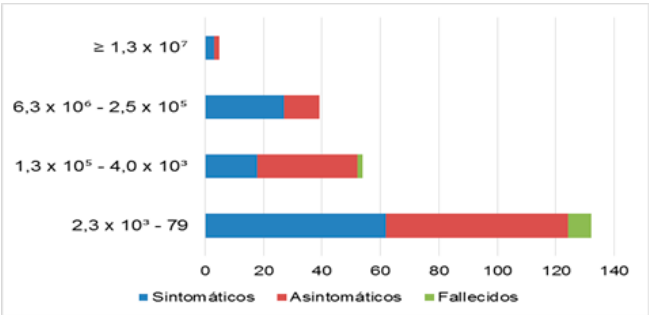
En el Gráfico 2 se demuestra una representación de los valores de carga viral obtenidos de acuerdo a la clasificación de los individuos sintomáticos, asintomáticos y fallecidos.

Tabla 3. Extrapolación de valores de Ct con el número de copias virales/µL

Valores de Ct	Número de copias virales/µL
≤ 18	≥ $1,3 \times 10^7$
19 - 25	$6,3 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^5$
26 - 32	$1,3 \times 10^5$ - $4,0 \times 10^3$
33 - 39	$2,3 \times 10^3$ – 79

Como se puede observar, la mayor parte de los individuos estudiados, tanto sintomáticos, como asintomáticos, arrojaron valores de carga viral bajos, encontrándose que el rango de valores de carga viral más frecuente fue el de $2,3 \times 10^3$ – 79 copias virales/µL. Pero también es importante destacar que en el caso de los grupos de cargas virales elevadas (≥ $1,3 \times 10^7$ y $6,3 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^5$) los individuos más frecuentemente encontrados con dichos valores fueron los sintomáticos, por encima de los asintomáticos.

Gráfico 2. Rango de valores de carga viral en la muestra estudiada.



Se encontró que el comportamiento en líneas generales entre el grupo de pacientes sintomáticos y asintomáticos fue bastante similar. Ambos grupos mostraron valores promedios de carga viral en el orden de 10^4 y 10^3, respectivamente.

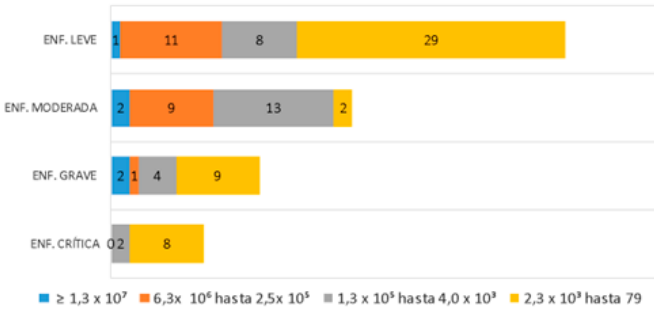
Por otra parte, los asintomáticos siguen demostrando ser un grupo de interés de estudio puesto que un 13% (14/110 individuos) presentaron también cargas virales elevadas (> 1×10^5 copias virales/µL). Estos datos se correlacionan con resultados expuestos en otros estudios en los cuales resumen la evidencia que destaca la transmisión por individuos asintomáticos y pre-sintomáticos, resaltando que la carga viral de casos asintomáticos y sintomáticos es comparable y que la excreción viral es mayor antes de la aparición de los síntomas, lo que sugiere una alta transmisibilidad antes de los síntomas (19).

En cuanto a la severidad de la enfermedad, se pudo observar que los pacientes fallecidos, que corresponden a aquellos con enfermedad crítica, reflejaron cargas virales bajas, pudiendo obedecer esto a diversos factores tales como el momento de la toma de la muestra, ya que es importante que la toma se realice en la fase aguda de la enfermedad, es decir, en el momento que existe replicación viral activa, y no como ha ocurrido en ocasiones que se realiza de forma post mortem. Además, diversos estudios han señalado que, si bien las muestras provenientes del tracto respiratorio superior son adecuadas para el diagnóstico de los pacientes infectados con el virus, en caso de pacientes críticos las muestras de elección y más idóneas son las provenientes del tracto respiratorio inferior, tales como lavado broncoalveolar, esputo y/o aspirado endotraqueal (7,19). Incluso, es de señalarse también que aquellos pacientes críticos corresponden a pacientes que han requerido hospitalización, y que probablemente hayan sido tratados con fármacos antivirales como lo es el Remdesivir, por lo que esto pudiera subestimar también los valores de carga viral obtenidos en el análisis.

Correlación de la carga viral con la severidad y/o progresión de la enfermedad:

En el Gráfico 3, se evidencian los valores de carga viral que manejaron los individuos según el grado de enfermedad que desarrollaron, bien sea enfermedad

Gráfico 3. Valores de carga viral vs. Progresión de la enfermedad.



leve, enfermedad moderada, enfermedad grave o enfermedad crítica.

Como se puede observar, los individuos que desarrollaron enfermedad leve (49 individuos) obtuvieron un promedio de carga viral igual a 1,0 x 10^4 copias virales/µL. En cuanto a aquellos que desarrollaron enfermedad moderada (45 individuos) se tiene que el promedio de carga viral obtenido fue igual a 1,3 x 10^4 copias virales/µL. Por otra parte, los individuos que padecieron enfermedad grave (16 individuos) tuvieron un promedio de carga viral igual a 1,8 x 10^4 de copias virales/µL. Por último, aquellos individuos que desarrollaron enfermedad crítica (10 individuos) obtuvieron un promedio de carga viral igual a 2,5 x 10^3 copias virales/µL.

El presente estudio proporciona una herramienta útil en el laboratorio de biología molecular para el seguimiento clínico del paciente, que permita evaluar progresión de la enfermedad a través de la cuantificación de la carga viral, lo que, a su vez, permita implementar terapias de acuerdo a la severidad y pronóstico de la patología en curso, pero que, además, sirva de base para futuras líneas de investigación donde se pueda correlacionar la carga viral con la transmisibilidad del virus.

Referencias

1. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. J Adv Res [Internet]. 2020;24:91-98. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005
2. Abduljalil JM, Abduljalil BM. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. New Microbes New Infect [Internet]. 2020;35(100672):1-8. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.10067
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med [Internet]. 2020;382(8):727-733. Disponible en: https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol [Internet]. 2020;5:536-544. Disponible en: https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z
5. World Health Organization (WHO). Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation Report – 51. Data as reported by national authorities by 10 AM CET 11 March 2020 [Internet]. 2020. [actualizado 11 mar 2020; citado 12 abr 2023]. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf
6. Fang B, Meng QH. The laboratory's role in combating COVID-19. Crit Rev Clin Lab Sci [Internet]. 2020;57(6):400-414. Disponible en: https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1776675
7. Gutiérrez C. SARS-CoV-2: Aspectos biológicos, epidemiológicos y diagnósticos de un coronavirus emergente. Acta Científ Soc Venez Bioanalistas Espec [Internet]. 2020;23(1):3-13. [citado 8 may 2023]. Disponible en:http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/19189/144814485571
8. Mancini F, Barbanti F, Scaturro M, Errico G, Iacobino A, Bella A, *et al.* Laboratory management for SARS-CoV-2 detection: a user-friendly combination of the heat treatment approach and rt-Real-time PCR testing. 2020;9(1):1393-1396. Disponible en: https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1775500.
9. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. J Med Virol 2020;92(6):538-539. Disponible en: https://doi.org/10.1002/jmv.25721.
10. Wargo AR, Kurath G. Viral fitness: Definitions, measurement, and current insights. Curr Opin Virol 2012;2(5):538-545. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.007.
11. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. Lancet Infect Dis 2020;20(4):411-412. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4.
12. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Directrices de laboratorio para la 138 detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID19 [Internet]. 2020. p. 1-11. [actualizado 8 jul 2020; citado 6 may 2023]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID19200038_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
13. OPS/OMS. Procedimientos generales para inactivación de muestras potencialmente infecciosas con el virus ebola y otros agentes virales altamente

patógenos [Internet]. 2014. [actualizado 23 oct 2014; citado 6 may 2023]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedimientosinactivacion-ebola.pdf

14. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, *et al*. Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. Euro Surveill [Internet]. 2020;25(3):1-8. Disponible en: https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
15. CIBERehd. PLATAFORMA BIOINFORMÁTICA [Internet]. Real-time RT-PCR: Cálculo de la eficiencia. [citado 18 abr 2023]. Disponible en: http://bioinfo.ciberehd.org/effy.es.html
16. de Alba Aguayo DR, Rueda A. Determinacion del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. Rev educ bioquim 2013;32(1):36-39. [citado 12 may 2023]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n1/v32n1a6.pdf
17. Maguiña C, Gastelo R, Tequen A. El nuevo Coronavirus y la pandemia del Covid19. Rev Med Hered [Internet]. 2020;31:125-131. Disponible en: https://doi.org/10.20453/rmh.v31i2.3776
18. Organización Mundial de la Salud (OMS). Coronavirus [Internet]. 2020. [actualizado 28 mar 2023; citado 12 may 2023]. Disponible en: https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_1
19. Huff HV, Singh A. Asymptomatic Transmission During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Implications for Public Health Strategies. Clin Infect Dis 2020;71(10):2752-2756 Disponible en:. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa654.

ESTUDIO PILOTO DEL EFECTO DEL TIPO Y CONSERVACION DE LA MUESTRA Y MÉTODO, EN LA MEDICION DE LA CONCENTRACION DE LAS FRACCIONES C3 Y C4 DEL COMPLEMENTO.

Soriuska Mayora Hernandez[1], Wendy Martínez Vazquez[1], Francis Crespo Serrano[1], Inirida Belisario Gomez[1], Christian Medina García[1], Juan Bautista De Sanctis[2], Alexis García Piñero[1].

[1]Instituto de Inmunología Dr. Nicolás Enrique Bianco Colmenares, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Caracas-Venezuela.
[2]Instituto de Medicina Molecular y Translacional, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Palacky, 779 00 Olomouc, República Checa.
Mención Honorifica Premio SVBE XVII Congreso Venezolano de Bioanalisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 30 septiembre 2023

RESUMEN:
La determinación del complemento juega un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias y de origen autoinmune, es por ello que a lo largo del tiempo los laboratorios han intensificado esfuerzos en desarrollar e implementar técnicas que permitan evaluar de manera eficiente estos biomarcadores. Recientemente se ha propuesto que, para el análisis de componentes individuales del complemento, debe usarse el plasma anticoagulado con ácido etilendiaminotetracético (EDTA), especialmente cuando se miden productos de activación, y que además la conservación de las muestras debe hacerse a -80ºC. Sin embargo, en Venezuela la mayoría de los laboratorios siguen utilizando muestras de suero y solo tienen disponibilidad de congeladores de -20°C. Es por ello que nos planteamos los siguientes objetivos: Comparar las concentraciones obtenidas para la determinación de C3 y C4 utilizando muestras de suero y plasma, evaluar el desempeño de las técnicas de nefelometría e inmunodifusión radial (IDR) para la determinación de las fracciones C3 y C4 del complemento y, por último, determinar el grado de afectación de la muestra, posterior al primer ciclo de congelación a -20°C y descongelación de las mismas. Para ello se evaluaron muestras de suero y plasma obtenidas de 12 individuos. Se evidenció que las muestras de plasma-EDTA mostraron mejor correlación entre ambas técnicas evaluadas, se confirmó la superioridad de la técnica de nefelometría sobre la IDR y se demostró que la prueba de C3 es menos sensible a la descongelación de las muestras que la determinación del C4.

Palabras clave: laboratorio, complemento, suero, plasma, nefelometría, inmunodifusión radial.

PILOT STUDY OF THE EFFECT OF SAMPLE TYPE, SAMPLE CONSERVATION AND METHOD ON THE MEASUREMENT OF C3 AND C4 COMPLEMENT FRACTIONS CONCENTRATION.

ABSTRACT
The determination of complement plays an important role in the diagnosis and follow-up of inflammatory and autoimmune diseases, which is why over time laboratories have intensified efforts to develop and implement techniques that allow efficient evaluation of these biomarkers. Recently, it has been proposed that for the analysis of individual complement components, plasma anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) should be used, especially when measuring activation products, and that samples should be stored at -80ºC. However, in Venezuela most laboratories still use serum samples and only have -20ºC freezers available. Therefore, we set the following objectives: to compare the concentrations obtained for the determination of C3 and C4 using serum and plasma samples, to evaluate the performance of nephelometry and radial immunodiffusion (RID) techniques for the determination of complement C3 and C4 fractions and, finally, to determine the degree of sample affectation after the first cycle of freezing at -20ºC and thawing of the samples. For this purpose, serum and plasma samples obtained from 12 individuals were evaluated. It was evidenced that the plasma-EDTA samples showed better correlation between both techniques evaluated, the superiority of the nephelometry technique over RID was confirmed and it was demonstrated that the C3 test is less sensitive to the thawing of the samples than the determination of C4.

Keywords: laboratory, complement, serum, plasma, nephelometry, radial immunodiffusion.

Introducción

La determinación del complemento juega un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias y de origen autoinmune, es por ello que a lo largo del tiempo los laboratorios han intensificado esfuerzos en desarrollar e implementar

Solicitar copia a: Soriuska Mayora Hernandez (soriuskamayora@gmail.com)

técnicas que permitan evaluar de manera eficiente estos biomarcadores (1).

El complemento (C) es un sistema complejo que comprende más de 30 proteínas que incluyen activación y regulación (2). Tradicionalmente se ha tratado de vincular estrechamente las respuestas fisiológicas y fisiopatológicas del complemento a vías s y/o funciones efectoras individuales. Mientras tanto, sin embargo, emerge una imagen más refinada y dinámica de las funciones del complemento, en la que la suma de todas las firmas y estímulos activadores y reguladores dan forma a una respuesta general que típicamente involucra varias vías y efectores y activa varios mecanismos de diafonía (3).

Durante décadas, el uso principal y casi exclusivo de la determinación del complemento era detectar inmunodeficiencias primarias o para definir la actividad de enfermedades autoinmunes sistémicas, centrándose en un número limitado de trastornos reumatológicos o nefrológicos. Básicamente se utilizaron una serie de métodos para determinar las fracciones C3 y C4, mientras que la especificidad era importante no se prestaba especial atención a la sensibilidad de la técnica (4). Actualmente existen diferentes métodos comercialmente disponibles para medir la concentración de los componentes de las vías del complemento (clásica y alterna) y los factores reguladores. La inmunoelectroforesis de cohete y la inmunodifusión radial (IDR) permanecen en uso para la cuantificación de algunas proteínas del complemento; sin embargo, las técnicas de nefelometría, turbidimetría y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son ahora más comunes para la cuantificación de proteínas del complemento (5). Hasta ahora, en Venezuela la muestra convencional para estos ensayos se trata de la muestra de suero, sin embargo, para su obtención es necesario esperar la retracción del coagulo para luego proceder a la centrifugación y separación de la muestra. La muestra pasa un tiempo indeterminado expuesta a la temperatura ambiente lo cual puede generar degradación o activación de las proteínas del complemento. Por otro lado, hay individuos en los que resulta difícil obtener un gran volumen de muestra en diferentes tubos de extracción, como es el caso de los pacientes pediátricos y los casos de personas cuya extracción sanguínea sea traumática.

Recientemente se ha propuesto que, para el análisis de componentes individuales del complemento, debe usarse el plasma anticoagulado con ácido etilendiaminotetracético (EDTA), especialmente cuando se miden productos de activación. Usando el plasma-EDTA, cualquier activación adicional del complemento es minimizado (pero no completamente excluido) ya que el EDTA quela Ca^{2+} y Mg^{2+} bloqueando así la función del complejo C1 y las convertasas C3 (6).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue comparar las concentraciones obtenidas para la determinación de C3 y C4 utilizando muestras de suero y plasma, así como determinar el grado de afectación de la muestra posterior al primer ciclo de congelación a -20°C y descongelación de las mismas.

Metodología:

Se evaluaron 12 muestras obtenidas de pacientes quienes de manera voluntaria acudieron al servicio de laboratorio clínico del Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco C" para la determinación de las fracciones C3 y C4 solicitados como parte del plan diagnóstico de sus respectivos médicos tratantes. A cada paciente se le extrajo una muestra en un tubo seco (tapa roja) además de una muestra anticoagulada con EDTA (tubo tapa morada). Los tubos fueron centrifugados en frio para la separación de suero y plasma respectivamente.

Una vez obtenidas las muestras, estas fueron analizadas para la determinación de C3 y C4 mediante las técnicas de nefelometría e inmunodifusión radial. Para la determinación por nefelometría se utilizó el Analizador de proteínas semiautomático PA54 de la casa comercial Genrui (China), mientras que para el ensayo de inmunodifusión radial se emplearon placas de la marca LTA (Milano, Italia), ambas técnicas permiten el uso de muestras tanto de suero como de plasma.

Adicionalmente posterior a este primer ensayo las muestras fueron congeladas a -20°C por un tiempo de una semana, para luego ser descongeladas y realizar una segunda determinación.

Para realizar el análisis estadístico se determinó la correlación de Pearson para cada una de las comparaciones realizadas en la evaluación de las concentraciones de C3 y C4, empleando el *software* Graph Pad Prism versión 5. Se graficaron las correlaciones entre las variables estudiadas, la línea solida representa los valores promedio, mientras que las líneas punteadas son reflejo del rango desviación permitido.

Resultados

Comparación de las muestras analizadas.

Al comparar la concentración de C3 se puede observar un bajo grado de correlación entre ambas técnicas cuando la muestra analizada se trata de suero (ver figura 1), mientras que esta correlación mejora de manera considerable cuando la muestra estudiada es plasma. En el caso de la determinación de C4 se observó que ambas muestras tienen buena correlación con los métodos estudiados, sin embargo, la muestra de plasma muestra un aumento discreto en el coeficiente de correlación con respecto a la muestra de suero.

Comparación del desempeño de las técnicas de nefelometría de IDR para la determinación de las fracciones C3 y C4 del complemento.

El segundo objetivo de la investigación se trató de comparar el desempeño de los métodos de nefelometría e IDR al estudiar dos tipos de muestra, suero y plasma obtenido con EDTA. De forma similar a lo anterior se encontró que en el caso de la determinación por la técnica de nefelometría este mostro una correlación positiva entre ambos tipos de muestra para la determinación de C3, mientras que para la medición por IDR mostró una mejor correlación al usar muestras de plasma en vez de suero. La medición de concentraciones de C4 ambos tipos de muestras se comportan de manera similar al ser evaluadas tanto por nefelometría como por IDR. La técnica de nefelometría permite el uso de plasma para evaluar C3 y C4, al igual que la determinación de C4 por IDR (ver figura 2).

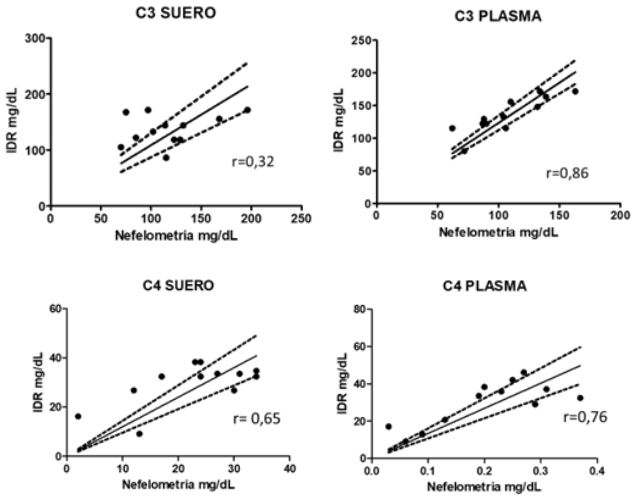


Figura 1: Correlación de los valores de concentración de las fracciones C3 y C4 del complemento evaluadas en muestras de suero y plasma, analizadas bajo las técnicas de nefelometría e IDR. n=12

Comparación del efecto de la descongelación de la muestra.

Por último, quisimos estudiar el efecto de un ciclo de descongelación en la medición de las concentraciones de C3 y C4 al evaluar muestras de suero y plasma bajo los métodos disponibles. Para ello, después de la

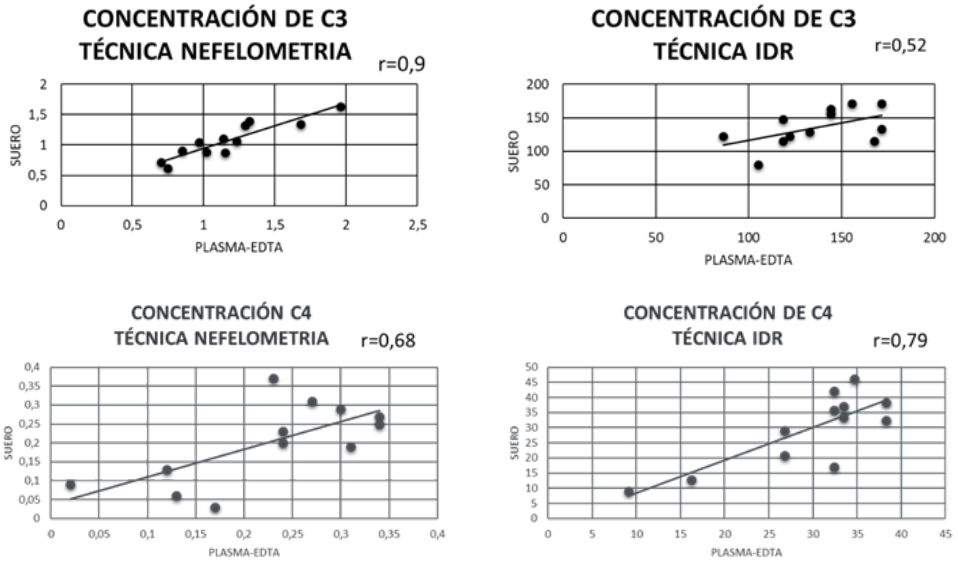


Figura 2: Comparación del desempeño de las técnicas de nefelometría de IDR para la evaluación de C3 y C4, al evaluar muestras de suero y plasma obtenido con EDTA n=12.

evaluación inicial, las muestras fueron congeladas a -20°C por un lapso de una semana y transcurrido este tiempo se repitió la medición en una segunda corrida de las muestras. Al evaluar los resultados obtenidos encontramos que para C3 la muestra de plasma se comporta de manera similar a la original, mientras que para el C4 se observa una disminución de los valores de correlación entre la muestra original y la descongelada, sin embargo, es importante señalar que esta disminución ocurre en menor grado en la muestra de plasma. Por lo que se puede inferir que la muestra de plasma obtenido con EDTA resiste mejore el primer ciclo de descongelación de la muestra (ver figura 3). En cuanto a la comparación de técnicas se observó que la técnica de nefelometría guarda mejor correlación entre los resultados obtenidos de las muestras frescas versus las muestras descongeladas (ver figura 4).

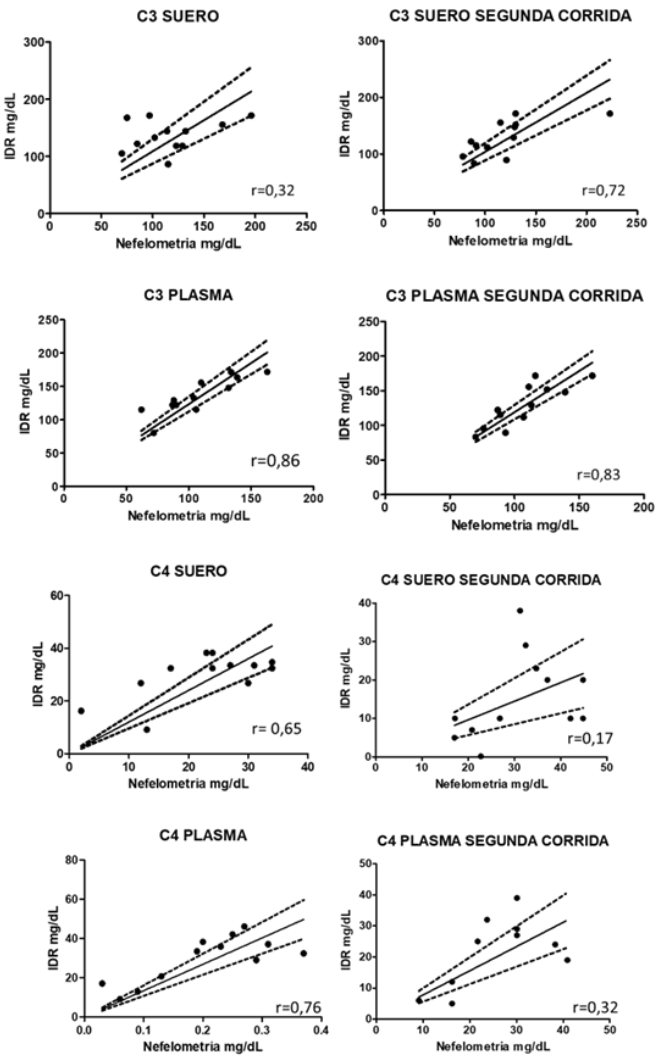


Figura 3. Comparación de los resultados de concentración obtenidos para las fracciones C3 y C4 del complemento medias antes y después de la congelación a -20°C. n=12

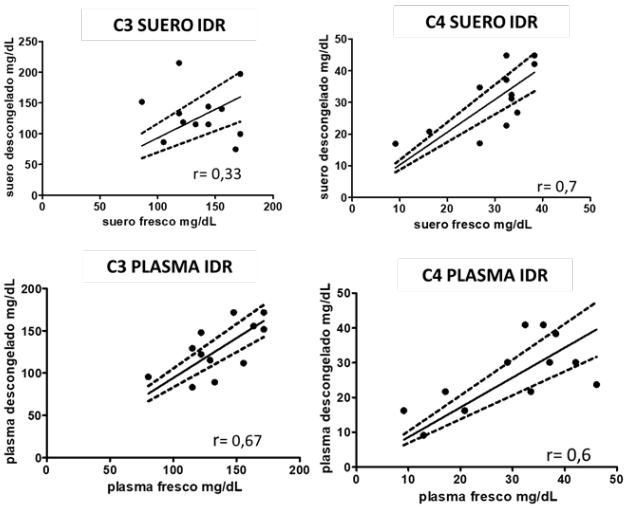


Figura 4. Comparación de las concentraciones obtenidas para la determinación del fragmento C3 del complemento mediante el análisis de muestras frescas y descongeladas por las técnicas de nefelometría e IDR. n=12

Discusión

El estado del complemento de un paciente debe controlarse para evaluar diagnóstico en la deficiencia hereditaria o adquirida del complemento, para investigar la etiología de enfermedades con activación del complemento y para controlar los efectos de los fármacos reguladores del complemento.

Las enfermedades en las que más frecuentemente se indican pruebas del complemento son las siguientes: en el Síndrome Hemolítico Urémico atípico, la glomerulopatía C3, la glomerulonefritis postestreptocócica, para evaluar la gravedad y la posible inhibición del complemento en Lupus Eritematoso Sistémico y en el rechazo mediado por anticuerpos (7). Con el advenimiento de nuevas tecnologías se hace necesario mantener la revisión y actualización constante de las variables pre analíticas en el servicio de laboratorio clínico, varios factores relacionados con la muestra, el método, la plataforma o la calibración que, en conjunto, determinan las tasas de éxito; el campo de las pruebas de diagnóstico del complemento es especialmente sensible a varios de esos factores (8).

Aunque la temperatura recomendada para la conservación de muestras es la de -80°C, este tipo de ultracongeladores no se encuentran disponibles en los laboratorios que practican la prueba, es por ello que la temperatura utilizada más comúnmente es la de -20°C, a pesar de que algunos autores proponen que este tipo de conservación podría causar degradación del complemento (9). En nuestro estudio pudimos observar que la relación entre los valores obtenidos entre las muestras frescas y descongeladas se mantiene de mejor forma cuando la muestra analizada es plasma y la metodología usada es nefelometría. La concentración de proteínas individuales se determina mediante diversos tipos de inmunoensayos. El enfoque más común en la práctica clínica es utilizar ensayos de inmunoprecipitación, hoy en día principalmente nefelometría y turbidimetría. En estas últimas técnicas, se añaden a la muestra anticuerpos policlonales contra la proteína elegida (por ejemplo, C1q, C1INH, C4, C3 o factor B), formando complejos que distorsionarán un haz de luz detector que se hace pasar a través de la muestra (10). En Venezuela aún se sigue empleando la técnica de inmunodifusión radial, al ser una técnica más económica y sencilla ya que no necesita de equipos para su lectura e interpretación. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que, aunque la IDR mantiene cierto nivel de correlación entre los parámetros estudiados la nefelometría se impone como una técnica superior. En cuanto a la muestra de elección para este este análisis quedo demostrado que el plasma tiene un mejor desempeño que las muestras de suero, especialmente en la determinación de C3, en cuanto a este particular Vercauteren y col (2019) señalan que el proceso de degradación del C3 se produce rápidamente en el suero y se retrasa drásticamente en hielo y en presencia de EDTA (11). De forma similar a lo encontrado en nuestro estudio Yang y col en el año 2015 encontraron que cuando se recolectó sangre en tubos con EDTA, los factores del complemento, incluyendo C4d y C3a, fueron generalmente más estable durante el almacenamiento (12).

Esta investigación permitió examinar y actualizar algunas de las pautas para la fase pre analítica de una de las pruebas más solicitadas y sensibles en los laboratorios de inmunodiagnóstico, como lo es la determinación de las proteínas del complemento C3 y C4. Abre la puerta para un posible cambio de paradigma y ratifica la importancia de revisar constantemente los procesos del laboratorio clínico y de investigación en pro de ofrecer resultados que sean un reflejo de la verdadera condición del paciente, especialmente hoy en día con el aumento vertiginoso del uso de muestras referidas desde laboratorio pequeños a laboratorios con mayor capacidad de servicio, en donde muchas de las veces no se toma en cuenta la temperatura y condiciones de conservación y transporte de las muestras hasta el momento final de su análisis.

Conclusiones

Los resultados obtenidos con las técnicas evaluadas demostraron que la determinación de C3 y C4 en el plasma favorece una evaluación más eficiente de dichos parámetros, dado correspondencia de valores con mayor exactitud en relación a la medición por IDR. demostró un mejor desempeño a la muestra de plasma demostró un mejor desempeño en cuanto estabilidad de los resultados obtenidos en las determinaciones de C3 y C4.

La técnica de nefelometría demostró mejor desempeño en la relación a otras técnicas, observándose resultados equivalentes independientemente del tipo de muestra evaluada.

Se evidenció la muestra de suero es más sensible al proceso de congelación a -20°C y descongelación, en relación a la muestra de plasma, observándose la perdida de correlación entre los resultados obtenidos.

La proteína C4 independientemente de la técnica y tipo de muestra evaluado presenta mayor afectación con el proceso de congelación y descongelación. Este factor debe considerado como punto critico en la determinación de los niveles de C4.

Se recomienda continuar este estudio con un mayor número de muestras que incluyan, muestras de voluntarios sanos y pacientes con diversas patologías que permitan determinar el comportamiento de las variables evaluadas en condiciones normales y cuando existe consumo del complemento.

Referencias

1. Skattum L. Clinical Complement Analysis-An Overview. Transfus Med Rev 2019;33(4):207-216. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2019.09.001.
2. Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. Mol

Immunol 2009;46(14):2774-2783. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.029.

3. Pouw RB, Ricklin D. Tipping the balance: intricate roles of the complement system in disease and therapy. Semin Immunopathol 2021;43(6):757-771. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s00281-021-00892-7.
4. Prohászka Z, Kirschfink M, Frazer-Abel A. Complement analysis in the era of targeted therapeutics. Mol Immunol 2018;102:84-88. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.06.001.
5. Willrich MAV, Braun KMP, Moyer AM, Jeffrey DH, Frazer-Abel A. Complement testing in the clinical laboratory. Crit Rev Clin Lab Sci 2021;58(7):447-478. Disponible en: https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1907297.
6. Kirschfink M, Mollnes TE. Modern complement analysis. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10(6):982-989. Disponible en: https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.982-989.2003.
7. Lubka T. Roumenina. The Complement System. Innovative Diagnostic and Research Protocols. (electronic) Primera edición. Methods in Molecular Biology (eBook). Series Editor John M. Walker, Springer Protocols. Switzerland AG 2021, 279p. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1016-9 .
8. Frazer-Abel A, Kirschfink M and Prohaszka Z. Expanding Horizons in Complement Analysis and Quality Control. Front Immunol 2021;12:697313. Disponible en: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.697313
9. Ekdahl KN, Persson B, Mohlin C, Sandholm K, Skattum L, Nilsson B. Interpretation of Serological Complement Biomarkers in Disease. Front Immunol 2018;9:2237. Disponible en: https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02237.
10. Nilsson B, Ekdahl KN. Complement diagnostics: concepts, indications, and practical guidelines. Clin Dev Immunol 2012;2012:962702. Disponible en: https://doi.org/10.1155/2012/962702.
11. Vercauteren KOA, Lambrecht S, Delanghe J. Preanalytical classical and alternative complement pathway activity loss. Biochem Med (Zagreb) 2019;29(3):030701. Disponible en: https://doi.org/10.11613/BM.2019.030701.
12. Yang S, McGookey M, Wang Y, Cataland SR, Wu HM. Effect of Blood Sampling, Processing, and Storage on the Measurement of Complement Activation Biomarkers. Am J Clin Pathol 2015;143(4):558-565. Disponible en: https://doi.org/10.1309/AJCPXPD7ZQXNTIAL

POLIMORFISMO -31118 G/A (*rs1761667*) DEL GEN DEL RECEPTOR CD36 Y LAS VARIANTES 388 T/C (*rs429358*) Y 526 C/T (*rs7412*) DEL GEN DE LA APO-E EN INDIVIDUOS OBESOS

Angélica Fernándes [1], María Victoria Atencio [2], Gustavo Benítez Pérez [3], Maria Fatima Garces [4].

[1]Licenciada en Bioanálisis. Profesor Instructor de la Cátedra de pasantias hospitalias de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. [2]Licenciada en Bioanálisis, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela. [3]Médico Cirujano, Dr. en Gerencia, Profesor Titular, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina. Jefe del Departamento de Cirugía HUC-UCV. [4]Licenciada en Bioanálisis, Doctor en Bioquímica. Profesor Titular, Cátedra de Bioquímica "A". Coordinadora del Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis. Vicerrectoraora Académica de la Universidad Central de Venezuela.

Premio "Franca Billi" XVII Congreso Venezolano de Bioanalisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 15 septiembre 2023

RESUMEN:

Introducción: La obesidad es una patología compleja en donde el ambiente y la genética del individuo participan en la regulación del peso y la grasa corporal. Estudios relacionados con el gen CD36, polimorfismo *rs1761667* y el gen APOE, variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) han sido asociados con variaciones en la concentración de las lipoproteínas séricas, sin embargo, estos han sido muy contradictorios. **Objetivo:** Evaluar la asociación del polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE con el riesgo a desarrollar obesidad. **Metodología:** La muestra en estudio comprende un grupo de individuos obesos (n=110) y un grupo control de individuos normopeso (n=114). La extracción del ADN genómico se realizó por el método de Bunce modificado, para la identificación de los polimorfismos se realizó la metodología de PCR-RFLP. **Resultados y conclusiones:** Los individuos con obesidad presentaron concentraciones significativamente incrementadas de colesterol total, LDL-c, VLDL-c, triglicéridos basales y postprandiales a las 2 y 4 horas, insulina basal, y HOMA con respecto a las concentraciones del grupo control. No se observó asociación entre los polimorfismos -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36, 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE y el riesgo a desarrollar obesidad, intolerancia a las grasas ni resistencia a la insulina.

Palabras clave: Obesidad, Lípidos, Polimorfismo, PCR-RFLP, APOE, CD36, *rs1761667, rs429358, rs7412.*

POLYMORPHISM -31118 G/A (*rs1761667*) OF THE CD36 RECEPTOR GENE AND THE VARIANTS 388 T/C (*rs429358*) AND 526 C/T (*rs7412*) OF THE APO-E GENE IN OBESE INDIVIDUALS

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a complex pathology where the environment and the individual's genetics play roles in regulating body weight and fat. Studies related to the CD36 gene, polymorphism *rs1761667*, and the APOE gene, variants 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*), have been associated with variations in serum lipoprotein concentrations; however, these results have been highly contradictory. **Objective:** To evaluate the association of the -31118 G/A (*rs1761667*) polymorphism of the CD36 gene and the 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*) variants of the APOE gene with the risk of developing obesity. **Methodology:** The study sample comprises a group of obese individuals (n=110) and a control group of normal-weight individuals (n=114). Genomic DNA extraction was performed using the modified Bunce method. The identification of the polymorphisms was carried out using the PCR-RFLP methodology. **Results and Conclusions:** Obese individuals showed significantly increased concentrations of total cholesterol, LDL-c, VLDL-c, fasting and postprandial triglycerides at 2 and 4 hours, fasting insulin and HOMA compared to the control group's concentrations. No association was observed between the -31118 G/A (*rs1761667*) polymorphisms of the CD36 gene, 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*) of the APOE gene and the risk of developing obesity, fat intolerance, or insulin resistance.

Keywords: Obesity, Lipids, Polymorphism, PCR-RFLP, APOE, CD36, *rs1761667, rs429358, rs7412.*

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una enfermedad crónica de alta prevalencia, que se caracteriza por un aumento desmesurado de la grasa corporal y un mayor riesgo para la salud. Asimismo, es considerada una pandemia, las cifras señalan que desde 1975 hasta el 2016 se ha triplicado el número de individuos que la padecen

Solicitar copia a: Maria Fatima Garces (mariafatimagarcesdasilva@gmail.com)

a nivel mundial (1), este incremento ha sido ligado con la llegada de la urbanización, lo que demuestra el papel decisivo que poseen los factores ambientales a la hora de estudiar esta patología.

Ahora bien, la obesidad se considera una enfermedad multifactorial, es decir, puede ser provocada por distintos factores, entre los cuales destacan, los factores genéticos, ambientales, metabólicos y endocrinos (2). En los últimos años y debido a los avances tecnológicos se ha podido comprobar la importancia de la genética en el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo la obesidad. Muchos han sido los genes asociados a esta condición, y la interacción entre los mismos puede tener la capacidad de propiciar, o por el contrario proteger a los individuos portadores del desarrollo de dicha patología. Entre muchas funciones, el receptor *scavenger* clase B tipo I, CD36, juega un papel importante facilitando el consumo y utilización de los ácidos grasos celulares. Las investigaciones sobre este receptor son relativamente nuevas, sin embargo, estudios de los polimorfismos en dicho gen demuestran la influencia de estos en los lípidos plasmáticos (3).

Por otra parte, el gen codificante de la apoliproteína E (APOE) es catalogado como uno de los genes más estudiados del genoma (4), su función es el "aclaramiento" de lipoproteínas remanentes sirviendo como ligando para LDL y los receptores de Apo E (5). Existen tres alelos APOE diferentes (ε2, ε3 y ε4), que dan lugar a las isoformas de la proteína en plasma (6). Las alteraciones en proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico influyen en el fenotipo de obesidad, y las concentraciones de dichas proteínas estarán determinadas por los polimorfismos de los genes que las codifican (7).

Por lo anteriormente expuesto, se propone evaluar la asociación del polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 y los polimorfismos 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE con el riesgo a desarrollar obesidad y con los perfiles glucémico y lipídico, en pacientes obesos venezolanos pertenecientes a la Unidad de Cirugía Bariátrica y Metabólica (UNIBAROS), adscrita al Departamento de Cirugía del Hospital Universitario de Caracas.

Materiales y métodos

Tipo y nivel de la investigación

El presente es un estudio descriptivo-correlacional, de cohorte de casos y controles. Los individuos participantes fueron pacientes atendidos en la Unidad de cirugía bariátrica y metabólica (UNIBAROS), del Hospital Universitario de Caracas.

Aspectos éticos y administrativos

El protocolo de estudio cuenta con el aval del Comité de Bioética de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, se realiza bajo las normas de ética de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en humanos y cuenta con el consentimiento informado escrito y firmado de los participantes en estudio.

Población

La población estudiada fue parte de la Unidad de Cirugía Bariátrica y Metabólica (UNIBAROS), adscrita al Departamento de Cirugía del Hospital Universitario de Caracas. De igual forma, se cuenta con una población control conformada por individuos voluntarios normopeso y aparentemente sanos, que acudieron al Laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Recolección y procesamiento de muestras sanguíneas

A cada individuo en estudio se le extrajeron 10 ml de sangre venosa en ayunas. Posteriormente, se les proporcionó un desayuno, el cual consistió en una empanada de queso y un café con leche, lo que contiene una carga aproximada de 26,3 g de grasa. Luego de la ingesta, se extrajeron dos muestras sanguíneas más, correspondientes a las 2 horas y 4 horas después de comer, denominadas muestras postprandiales.

Determinación de los parámetros bioquímicos

Las muestras se procesaron con el equipo KONELAB prime 60i de THERMOS *Scientific*, para la determinación de los parámetros de glucosa, colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos. La determinación de insulina se realizó mediante la técnica de ELISA, empleando el kit comercial Insulin ELISA de DRG *Diagnostics*.

Genotipificación

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Bunce modificado (8). La cuantificación de ADN

se determinó en un biofotómetro (Eppendorf) a 260 nm. Así mismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,75% para determinar la calidad del ADN.

El ADN genómico se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Labcycler SensoQuest.

a.Polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen CD 36

Se realizó PCR con los oligómeros y mezcla de reacción descrita por Banerjee *et al.* (9), con ligeras modificaciones. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Primer Forward:
5' - CAAAATCACAATCTATTCAAGACCA - 3'

Primer Reverse:
5' - TTTTGGGAGAAATTCTGAAGAG - 3'

Las condiciones utilizadas para la PCR fueron las descritas por Salim *et al.* (10). Se preparó un volumen final de reacción de 25 µl, que contuvo 100 - 150 ng de ADN genómico, 25 pmol/µl de cada oligómero, 100 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl2 y 5 U/µm de Taq DNA Polimerasa, junto con su respectivo buffer. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 54°C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizados en el equipo Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Los productos amplificados se sometieron a una digestión con la enzima de restricción *HhaI*, como lo indicado por Banerjee *et al.* (9) para la determinación del polimorfismo -31118G/A (*rs1761667*) del gen CD36, separándose posteriormente por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10% en Buffer TAE 1X y coloreado con Bromuro de Etidio.

b.Polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE

La PCR se realizó con los oligómeros y la mezcla de reacción descrita por Hixon *et al.* (11), con ligeras modificaciones. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Primer Forward:
5' - ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC - 3'

Primer Reverse:
5' - TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A - 3'

Las condiciones de la PCR fueron las utilizadas en el estudio de Srivastava *et al.* (7). Se preparó un volumen final de reacción de 25 µl, que contuvo 100 - 150 ng de ADN genómico, 25 pmol/µl de cada oligómero, 100 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl2, 100% de dimetil sulfóxido y 5 U/µm de Taq DNA Polimerasa, junto con su respectivo buffer. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos con fases de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación o alineamiento a 58°C por 1 minuto, y extensión a 70°C por 1:30 minutos, seguidos por una extensión final a 70°C por 10 min Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, y visualizados en el equipo Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

Los productos amplificados se sometieron a una digestión con la enzima *HhaI*, indicado por Srivastava *et al.* (7) para la determinación de las variantes del gen *APOE*, separándose posteriormente por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10% en Buffer TAE 1X coloreado con Bromuro de Etidio.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva, la cual incluye; media, desviación estándar y se aplicó la prueba ANOVA (análisis de la varianza) para establecer la diferencia entre los grupos. La significancia estadística de las diferencias de frecuencias de los polimorfismos del gen *CD36* y del gen *APOE* entre el grupo de pacientes y controles, fue estimada por la prueba de Ji cuadrado (X^2) usando tablas de contingencia. Para estimar la posible asociación de los diferentes polimorfismos de los genes *CD36* y *APOE* y obesidad se calculó la razón de probabilidades (Odds Ratio: OR), con el correspondiente intervalo de confianza (95%). Para determinar las relaciones entre alelos y/o genotipos de los genes a estudiar y los parámetros bioquímicos se realizaron pruebas de ANOVA. De igual forma se realizó la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para determinar si la distribución genotípica en los individuos en estudio se encuentra en equilibrio.

Resultados y discusión

Características de la población estudiada

La población estudiada quedó conformada por 110 individuos obesos, 75,45% (n= 83) de sexo biológico femenino y 24,55% (n= 27) de sexo biológico masculino, con una edad promedio de 47 años ± 11,99 (20 - 80). Por otra parte, el grupo control quedó conformado por 114 individuos normopeso, 69,30% (n= 79) de sexo biológico femenino y 30,70% (n= 35) de sexo biológico masculino, con una edad promedio de 30 años ± 11,16 (18 - 65).

En la tabla 1 se presenta la media aritmética ± desviación estándar, tanto para los individuos obesos como para los controles de los parámetros antropométricos y bioquímicos de cada grupo en estudio. Los individuos obesos presentaron un perfil lipídico alterado en comparación con los individuos normopeso, donde las concentraciones de triglicéridos basales y postprandiales (2 horas y 4 horas), VLDL-c, LDL-c poseen un incremento estadísticamente significativo y las HDL-c una disminución igualmente significativa. En cuanto al perfil glucémico, los individuos obesos presentaron concentraciones de glucosa, insulina y HOMA-IR significativamente incrementadas en comparación con el grupo control. Estos resultados son comparables con los encontrados por Luz E. Ramos Arellanos *et al.* (12), quienes describieron que las concentraciones de colesterol total, LDL-c y TG en los individuos obesos se encontraban significativamente elevados en comparación con el grupo control de individuos normopeso ($p < 0,05$).

Tipificación del polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen del receptor CD36

En la Figura N° 1, se visualizan los productos amplificados correspondientes a la región -31118 G/A del gen del receptor CD36.

Tabla 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos en estudio

Parámetros	Individuos normopeso (controles) n = 114	Individuos obesos (casos) n = 110	Valores de referencia
IMC (Kg/m^2)	22,56 ± 2,27	36,77 ± 9,06***	20,0-24.99
Talla (m)	1,66 ± 0,08	1,62 ± 0,09	-
Peso (Kg)	62,50 ± 9,43	96,16 ± 21,11	-
Glicemia Basal (mg/dL)	86,94 ± 10,80	91,13 ± 29,82***	70 - 100
Colesterol total (mg/dL)	183,92 ± 45,80	162,33 ± 51,01	< 200
Triglicéridos basales (mg/dL)	99,27 ± 33,11	105,91 ± 58,07*	30 - 150
Triglicéridos 2h (mg/dL)	111,32 ± 36,96	140,24 ± 62,97***	< 30% TG basal
Triglicéridos 4h (mg/dL)	107,41 ± 34,43	129,34 ± 57,36**	< 30% TG basal
HDL-c (mg/dL)	52,07 ± 16,76	28,31 ± 13,48**	40 - 60
LDL-c (mg/dL)	112,01 ± 40,25	112,83 ± 48,27	< 159
VLDL-c (mg/dL)	19,84 ± 6,58	21,18 ± 11,62*	15 - 44
TG basal/ HDL-c	2,13 ± 1,08	5,59 ± 7,19***	< 3
TG 2H/ HDL-c	2,40 ± 1,18	5,75 ± 4,51***	< 3
TG 4H/ HDL-c	2,32 ± 1,17	5,32 ± 4,31***	< 3
Col/ HDL-c	3,78 ± 1,23	8,37 ± 10,67***	< 5
LDL-Col/ HDL-c	2,35 ± 1,10	6,25 ± 9,55***	< 3,6
Insulina (mUI/mL)	8,61 ± 4,09	19,81 ± 8,98**	2 - 25
HOMA	1,85 ± 0,91	4,67 ± 3,85**	

HDL: Lipoproteína de alta densidad. LDL: Lipoproteína de baja densidad. VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad. c: Colesterol. HOMA: Modelo de registro homeostático.
*** $p < 0,001$ con respecto al grupo control
** $p < 0,005$ con respecto al grupo control
* $p < 0,05$ con respecto al grupo control

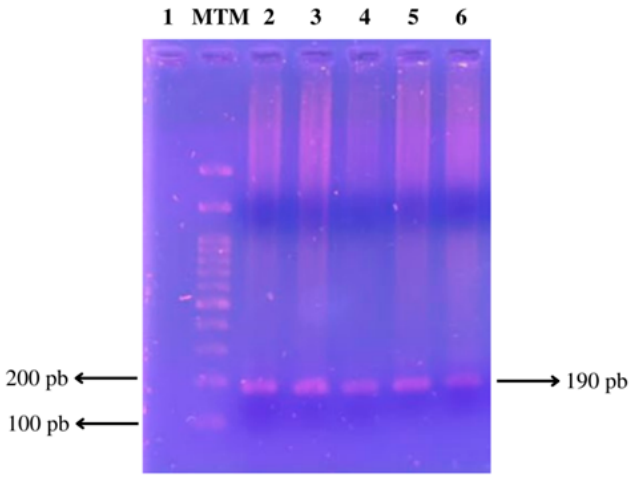


Figura N° 1. Productos amplificados por PCR del gen del receptor CD36. El carril 1 corresponde al control negativo. MTM (Marcador de tamaño molecular) de 100 pb (Promega). En los carriles 2, 3, 4, 5 y 6 se observa la amplificación del gen del receptor CD36 (190 pb).

En la Figura N° 2 se visualiza el producto de digestión de los fragmentos amplificados por PCR del gen del receptor *CD36.*

Se asignó el genotipo homocigoto A/A, cuando se evidencia una banda de 190 pb (carril 1), indicando que la enzima no realizó ningún corte; el genotipo heterocigoto G/A, cuando se evidencian tres bandas de 190 pb, 138 pb y 52 pb (carriles 2, 3 y 4); el genotipo homocigoto G/G cuando se evidencian dos bandas de 138 pb y 52 pb (carriles 5 y 6) y en el carril 7 se encuentra el control negativo.

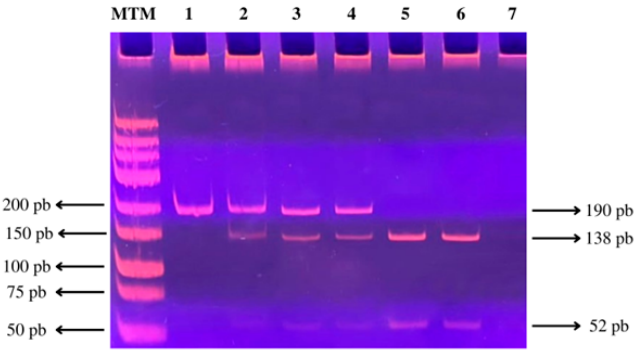


Figura N° 2. Producto de digestión del fragmento amplificado por PCR del gen del receptor CD36. MTM (marcador de tamaño molecular) de 25 pb (Promega). En el carril 1 se observa el genotipo homocigoto A/A, en los carriles 2, 3 y 4 se observa el genotipo heterocigoto G/A, en los carriles 5 y 6 se observa el genotipo homocigoto G/G, y en el carril 7 se encuentra el control negativo.

Tabla 2. Distribución de la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo *rs1761667* del gen CD36 en individuos obesos e individuos aparentemente sanos

	Individuos obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114
	Genotipo	
A/A	27,2 (30)	26,3 (30)
G/A	56,4 (62)	55,3 (63)
G/G	16,4 (18)	18,4 (21)
	Alelo	
A	55,5 (122)	53,9 (123)
G	44,5 (98)	46,1 (105)

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

En la tabla 2 se pueden observar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen del receptor CD36. Como se puede apreciar, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto G/A para ambos grupos de estudio, seguido por el genotipo homocigoto A/A y el homocigoto G/G. Estos resultados son consistentes con los descritos por Ramos-Arellano *et al.* (13) en el año 2013, y Ramos-López *et al.* (14) en el año 2015.

En la tabla 3, se muestra el modelo de herencia entre individuos obesos e individuos normopeso, observándose que el modelo de herencia más ajustado es el dominante. No se observó asociación entre el desarrollo de obesidad y la frecuencia genotípica del polimorfismo *rs1761667* del gen del receptor CD36 (OR = 0,952, IC95% = 0,527 - 1,721). Es importante destacar que tampoco se observaron diferencias

Tabla 3. Modelo de herencia dominante del polimorfismo *rs1761667* del gen del receptor CD36 de pacientes obesos y controles en estudio

	Individuos obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114	OR (IC: 95%)	*P*
	Genotipo			
G/G - G/A	72,8 (80)	73,7 (84)	0,952 (0,527 - 1,721)	> 0,05
A/A	27,2 (30)	26,3 (30)		

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

significativas al comparar la frecuencia alélica entre obesos y normopesos (OR = 0,941, IC 95% = 0,649 - 1,305).

No se encontraron estudios donde se relacionara directamente el riesgo a desarrollar obesidad con los diferentes genotipos del polimorfismo *rs1761667* del gen del receptor CD36, sin embargo Latisha Love-Gregory y Nada A. Abumrad (15), realizaron una revisión que resume la comprensión actual de la función de CD36 en el metabolismo de los lípidos, con énfasis en la influencia de las variantes genéticas del gen CD36 y su posible contribución a las complicaciones relacionadas con la obesidad.

Al clasificar los individuos en obesos tolerantes e intolerantes a las grasas, basados en el modelo de herencia dominante, no se observaron diferencias significativas (OR = 1,045, IC95% = 0,546 - 2,002, $p > 0,05$).

Como bien se sabe, el receptor CD36 actúa en la captación de ácidos grasos (AG) y lipoproteínas oxidadas. Además, se ha descrito que la ausencia de CD36 está asociada con lípidos séricos altos y con un perfil metabólico deficiente (16). Se ha observado que el alelo A del polimorfismo *rs1761667* reduce la expresión del receptor CD36 (13,14).

Al clasificar los individuos obesos en resistentes y no resistentes a la insulina, considerando valores de HOMA superiores a 3 como resistencia a la insulina (tabla 4), siguiendo un modelo de herencia recesivo, no se observaron diferencias significativas al comparar la frecuencia genotípica entre ambos grupos ($p > 0,05$). Sin embargo, los portadores de los genotipo A/A y G/A poseen 2 veces mayor posibilidad de desarrollar resistencia a la insulina con respecto a los individuos con el genotipo G/G (OR = 2,151, IC95% = 0,741 - 6,244, $p > 0,05$).

Durante los períodos de ayuno y ejercicio, la movilización de ácidos grasos (AG) aumenta desde los adipocitos y depósitos de AG hacia los tejidos, particularmente al músculo esquelético, para su absorción y oxidación. No obstante, la disponibilidad excesiva de ácidos grasos en plasma puede resultar en flujos de ácidos grasos que exceden la capacidad de los tejidos para utilizarlos, lo que lleva a resistencia a la insulina en el hígado y el músculo esquelético (3).

Al comparar los parámetros bioquímicos de los individuos obesos agrupados por el genotipo del gen del receptor CD36, se observó que los individuos obesos con el genotipo homocigoto A/A presentaban un IMC mayor en comparación a los individuos obesos con los genotipos G/A y G/G. A su vez, el genotipo A/A se pudo asociar con mayores valores de insulina, lo cual concuerda con lo descrito por Terri A. Pietka *et al.* (3), en donde enfatizan la importancia de la molécula de CD36 como regulador de las vías implicadas en el metabolismo de la glucosa.

Tabla 4. Distribución de la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo *rs1761667* del gen CD36 en individuos obesos resistentes y no resistentes a la insulina

	Obesos resistentes a la insulina n = 82	Obesos no resistentes a la insulina n = 28	OR (IC: 95%)	*P*
		Genotipo		
A/A - G/A	86,6 (71)	75,0 (21)	2,151 (0,741 - 6,244)	> 0,05
G/G	13,4 (11)	25,0 (7)		
		Alelo		
A	57,3 (94)	50,0 (28)	1,343 (0,731 - 2,467)	> 0,05
G	42,7 (70)	50,0 (28)		

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

Polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE

En la Figura N° 3, se visualizan los productos amplificados correspondientes a la variante 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen *APOE*.

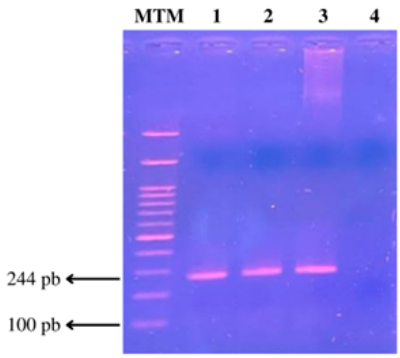


Figura N° 3. Productos amplificados por PCR de la variante 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen *APOE*. MTM (Marcador de tamaño molecular). En los carriles 1, 2 y 3 se observa la amplificación del gen *APOE* (244 pb) y en el carril 4 se observa el control negativo.

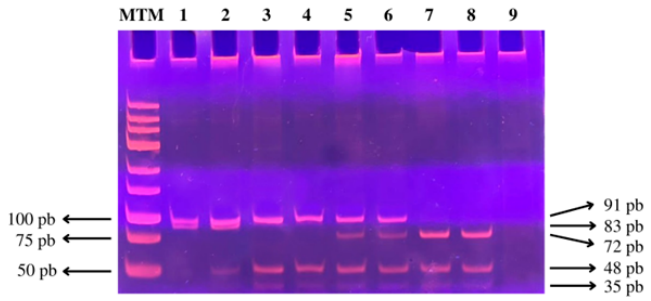


Figura N° 4. Producto de digestión del fragmento amplificado por PCR del gen de la variante 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE. MTM (marcador de tamaño molecular) de 25 pb (Promega). En el carril 1 se observa el genotipo homocigoto E2/E2, en el carril 2 se observa el genotipo heterocigoto E3/E2, en los carriles 3 y 4 se observa el genotipo homocigoto E3/E3, en los carriles 5 y 6 se observa el genotipo heterocigoto E3/E4, en los carriles 7 y 8 se observa el genotipo homocigoto E4/E4, y en el carril 9 se encuentra el control negativo.

En la Figura N° 4 se visualiza el producto de digestión de los fragmentos amplificados por PCR de la variante 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen *APOE*.

Se asignaron los genotipos de la siguiente manera: genotipo homocigoto E2/E2: dos bandas: 91 pb y 83 pb (carril 1); genotipo heterocigoto E3/E2: cuatro bandas: 91 pb, 83 pb, 48 pb y 35 pb (carril 2); genotipo homocigoto E3/E3: tres bandas: 91 pb, 48 pb y 35 pb (carriles 3 y 4); genotipo heterocigoto E3/E4: cuatro bandas: 91 pb, 72 pb, 48 pb y 35 pb (carriles 5 y 6); genotipo homocigoto E4/E4: tres bandas: 72 pb, 48 pb y 35 pb (carriles 7 y 8); y genotipo heterocigoto E2/E4: cuatro bandas: 91 pb, 83 pb, 72 pb y 48 pb (no se observó el genotipo) (Figura 4) (11).

Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para el polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen receptor CD36 y polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE

Se pudo constatar la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg tanto para el grupo de individuos controles (normopeso) como para el grupo de individuos obesos, en la distribución genotípica del sitio polimórfico estudiado en el gen del receptor CD36, al igual que en el gen APOE.

Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas alélica de los polimorfismos 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen APOE en los dos grupos de adultos estudiados

Como se puede observar en la tabla 5 el alelo ε3 del gen *APOE* es el más frecuente tanto para los individuos obesos (82,3%) como para los individuos normopeso (82%), en concordancia con Fernández-Mestre *et al.* (17) quienes indican que el alelo más común es el alelo ε3, seguido por el alelo ε2. Sin embargo, en el presente estudio el alelo ε2 presentó una menor frecuencia en los individuos obesos y normopeso (3,6% y 5,7%, respectivamente), de igual forma los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los encontrados por Garcés *et al.* en adultos (18) y en niños con obesidad (19).

Tabla 5. Distribución de la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen *APOE* en individuos obesos e individuos aparentemente sanos

	Individuos obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114
	Genotipo	
ε2/ε2	0,9 (1)	0
ε3/ ε2	5,5 (6)	11,4 (13)
ε3/ ε3	68,2 (75)	65,8 (75)
ε3/ ε4	22,7 (25)	21,0 (24)
ε4/ε4	2,7 (3)	1,8 (2)
	Alelo	
ε2	3,6 (8)	5,7 (13)
ε3	82,3 (181)	82 (187)
ε4	14,1 (31)	12,3 (28)

Nota. La frecuencia se muestra en porcentaje y entre paréntesis el número de individuos

En los individuos obesos los genotipos E2/E2 + E3/3 + E3/E2 representan un 74,6% y los genotipos E4/E4 + E3/E4 un 25,4%, en los normopesos los genotipos E2/E2 + E3/3 + E3/E2 representan un 77,2% y los genotipos E4/E4 + E3/E4 un 22,8%.

No se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas entre los grupos en estudio (OR = 1,156, IC95% = 0,626 - 2,133, $p > 0,05$) ni en las frecuencias alélicas (OR = 0,941, IC95% = 0,649 - 1,365, $p > 0,05$) entre los grupos en estudio (tabla 6), lo que concuerda con lo notificado por Zarkesh *et al.* (20).

Al comparar los individuos obesos tolerantes e intolerantes a las grasas, no se observó asociación entre la frecuencia genotípica (OR = 1,120, IC95% = 0,328 - 3,404, $p > 0,05$) y alélica (OR = 1,667, IC95% = 0,636 - 4,371, $p > 0,05$) con el riesgo a desarrollar intolerancia a las grasas. No se encontró ninguna investigación que relacione directamente el riesgo a desarrollarla. No

Tabla 6. Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen APOE en individuos obesos y normopesos aparentemente sanos

	Individuos Obesos (casos) n = 110	Individuos normopeso (controles) n = 114	OR (IC: 95%)	*p*
		Genotipo		
E2/E2 + E3/E3 + E3/E2	82 (74,6%)	88 (77,2%)	1,156 (0,626-2,133)	> 0,05
E4/E4 + E3/E4	28 (25,4%)	26 (22,8%)		
		Alelo		
ε2 + ε3	189 (85,9%)	200 (87,7%)	0,941 (0,649-1,365)	> 0,05
ε4	31 (14,1%)	28 (12,3%)		

obstante, Das *et al.* (21) describieron que los individuos con el alelo ε4 (tanto genotipo heterocigoto ε3/ε4 como homocigoto ε4/ ε4) poseían concentraciones significativamente mayores de triglicéridos basales, colesterol total y LDL-c, correspondientes con mayor ocurrencia de dislipidemia. En este estudio no se observó esta tendencia para los portadores obesos del alelo ε4.

En cuanto a las comparaciones entre los individuos obsesos resistentes y no resistentes a la insulina, no se observó asociación entre la frecuencia genotípica (OR = 1,344, IC95% = 0,482 - 3,752) y alélica (OR = 1,498, IC95% = 0,581 - 3,867) y el riesgo a desarrollar resistencia a la insulina, en concordancia con Meigs *et al.* (22), quienes no encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo del gen APOE y la resistencia a la insulina; sin embargo, Garces *et al* encontraron que los niños con resistencia a la insulina portadores del genotipo ε3/ε4 presentaban un OR igual a 5,6 con un IC 95%= 1,2 – 29,5 concluyendo que tienen riesgo de padecer la enfermedad (19). Todo lo anteriormente expuesto se puede explicar debido a que el tejido adiposo en los obesos es insulino-resistente, lo que eleva los ácidos grasos libres en plasma. A su vez, éstos tienen un efecto directo en los órganos diana de la insulina (por ejemplo, el hígado), mediante acciones específicas que bloquean la señalización intracelular del receptor de insulina. Este fenómeno, bien conocido como lipotoxicidad, podría ser el responsable de la RI en el órgano y la falta de regulación pancreática a la glicemia elevada (23).

Al comparar los parámetros bioquímicos de los individuos obesos agrupados según los polimorfismos del gen *APOE*, se puede observar que los pacientes obesos que poseen el genotipo homocigoto ε4/ε4 presentan un IMC mayor en comparación con los demás genotipos, al igual que para los valores de glicemia basal. Los parámetros de colesterol total y LDL-c, se observaron incrementados en los individuos con genotipo homocigoto ε3/ε3 en comparación a los individuos con otros genotipos. Con respecto al valor de insulina y triglicéridos basales, 2 horas y 4 horas posprandiales se encontraron incrementados en los portadores del genotipo homocigoto ε2/ε2 + heterocigoto ε3/ε2.

Finalmente, Hagberg *et al.* (24) mostraron que el alelo ε4 está asociado con concentraciones elevadas de colesterol y LDL-c, en comparación con el alelo ε2 que se asocia con concentraciones disminuidas de los mismos. Lo anteriormente expuesto, se correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio, donde se observa que los portadores del genotipo ε4/ε4 poseen valores incrementados de colesterol y LDL-c en comparación con los portadores del genotipo ε2/ε2.

Conclusiones

Los individuos obesos presentan alteraciones en sus índices aterogénicos, lo que incrementa su riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Entre los genes estudiados, se observó que el genotipo G/A del polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 es el más frecuente en individuos tanto obesos como normopeso, mientras que el genotipo G/G es el menos común. En cuanto al gen *APOE*, el genotipo ε3/ ε3 de las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) es el más frecuente en ambos grupos, y el genotipo ε4/ ε4 es el menos común. En cuanto a la frecuencia alélica, el alelo ε3 es el más común para ambos grupos.

No se encontró asociación significativa entre el polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen *APOE* con el desarrollo de obesidad, intolerancia a las grasas o resistencia a la insulina. Es posible que otros polimorfismos de estos genes estén involucrados en estos trastornos metabólicos. Por lo

tanto, se recomienda realizar estudios adicionales que incluyan otros polimorfismos genéticos y un mayor tamaño de muestra para obtener conclusiones más definitivas. Determinar si existe una asociación entre estos polimorfismos y las enfermedades mencionadas permitiría tomar medidas tempranas en individuos con mayor riesgo para prevenir su desarrollo y sus consecuencias.

Referencias

1. World Health Organization (WHO). Obesidad y sobrepeso [Internet]. [citado 24 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
2. Manuel Moreno G. Definición y clasificación de la obesidad. Rev médica Clín Las Condes 2012;23(2):124-128. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70288-2
3. Pietka TA, Schappe T, Conte C, Fabbrini E, Patterson BW, Klein S, *et al.* Adipose and muscle tissue profile of CD36 transcripts in obese subjects highlights the role of CD36 in fatty acid homeostasis and insulin resistance. Diabetes Care 2014;37(7):1990-1997. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2337/dc13-2835
4. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. Pathology 2019;51(2):165-176. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.002
5. Dixit M, Bhattacharya S, Mittal B. Association of CETP TaqI and APOE polymorphisms with type II diabetes mellitus in North Indians: a case control study. BMC Endocr Disord 2005; 5(1):7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/1472-6823-5-7
6. Xu CF, Talmud PJ, Angelico F, Del Ben M, Savill J, Humphries SE. Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in Italian children: Apo E Polymorphism in Children. Genet Epidemiol 1991;8(6):389-398. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/gepi.1370080605
7. Srivastava N, Achyut BR, Prakash J, Agarwal CG, Pant DC, Mittal B. Association of cholesteryl ester transfer protein (TaqIB) and apolipoprotein E (HhaI) gene variants with obesity. Mol Cell Biochem 2008;314(1-2):171-177. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s11010-008-9778-5
8. Welsh K, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. Rev Immunogenet 1999;1(2):157-176. [citado 24 de marzo de 2023]. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11253945/
9. Banerjee M, Gautam S, Saxena M, Bid HK, Agrawal CG. Association of CD36 gene variants rs1761667 (G>A) and rs1527483 (C>T) with Type 2 diabetes in North Indian population. Int J Diabetes Mellit 2010;2(3):179-183. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdm.2010.08.002
10. Salim S, Kartawidjajaputra F, Suwanto A. Association of FTO rs9939609 and CD36 rs1761667 with visceral obesity. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2020;66(Supplement):S329-335. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.66.S329
11. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J Lipid Res 1990;31(3):545-548. [citado 24 de marzo 2023]; Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2341813/
12. Ramos Arellano LE, Muñoz-Valle JF, de la Cruz Mosso U, Salgado Bernabe AB, Castro Alarcon N, Rojas IP. Circulating CD36 oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects: a case- control study. BMC Cardiovasc Disord 2014;14:54. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2261-14-54.
13. Ramos-Arellano LE, Salgado-Bernabé AB, Guzmán-Guzmán IP, Salgado-Goytia L, Muñoz-Valle JF, Parra-Rojas I. CD36 haplotypes are associated with lipid profile in normal-weight subjects. Lipids Health Dis 2013;12(1):167. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-12-167
14. Ramos O, Panduro A. Genetic variant in the CD36 gene (rs1761667) is associated with higher fat intake and high serum cholesterol among the population of west Mexico. J Nutr Food Sci 2015;05(02). Disponible en: http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000353
15. Love-Gregory L, Abumrad NA. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2011;14(6):527-534. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834bbac9
16. Love-Gregory L, Sherva R, Schappe T, Qi J-S, McCrea J, Klein S, *et al.* Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile. Hum Mol Genet 2011;20(1):193-201. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq449
17. Fernández-Mestre MT, Yehirobi C, Montagnani S, Balbas O, Layrisse Z. Genetic variability of Apolipoprotein E in different populations from Venezuela. Dis Markers 2005;21(1):15-19. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1155/2005/625182
18. Garcés MF, Cerviño M, Recio D, Révai E, Piedra I. Polimorfismo Pro12Ala del gen PPARγ2, Ala54Thr del gen FABP2 y polimorfismos del gen de la Apolipoproteína E en habitantes del sector "Los Eucaliptos" de la parroquia San Juan, municipio Libertador. Acta Científ Soc Venez Bioanalistas Espec 2013;16(1):28-40. [citado 08 de Abril 2023]; Disponible en: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/18613
19. Garcés María Fátima, Najm Cristina, Figueroa Daniela, López Ana, De Abreu Jorge, Dini Elizabeth et al . Polimorfismos del gen de apolipoproteína E y polimorfismo Pro12Ala del gen PPARγ-2 en niños pre-puberes con factores de riesgo cardiometabólicos. Arch Venez Puer Ped [Internet]. 2012;75(3):75-83. [citado 08 de Abril 2023]; Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sciγarttext&pid=S0004-06492012000300005&lng=es.
20. Zarkesh M, Daneshpour MS, Faam B, Hedayati M, Azizi F. Is there any association of apolipoprotein E gene polymorphism with obesity status and lipid profiles? Tehran Lipid and Glucose Study (TLGS). Gene 2012;509(2):282-285. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.048
21. Das M, Pal S, Ghosh A. Apolipoprotein E gene polymorphism and dyslipidaemia in adult Asian Indians: A population based study from Calcutta, India. Indian J Hum Genet 2008;14(3):87-91. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4103/0971-6866.45000
22. Meigs JB, Ordovas JM, Cupples LA, Singer DE, Nathan DM, Schaefer EJ, *et al.* Apolipoprotein E isoform polymorphisms are not associated with insulin resistance: the Framingham Offspring Study. Diabetes Care 2000;23(5):669-674. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2337/diacare.23.5.669
23. Martínez R G, Alonso K R, Novik A V. Síndrome metabólico: Bases clínicas y fisiopatológicas para un enfoque terapéutico racional. Rev Med Chil 2009;137(5). Disponible en: http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872009000500014
24. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. Physiol Genomics 2000;4(2):101-108. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.4.2.101

DETECCIÓN DIRECTA DE SARS-COV-2 MEDIANTE RT-qPCR EN PACIENTES REFERIDOS AL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"

Giulianna Antonelli[1,2], Aleiram Chaurio[1,2], Marwan Aguilar[1].

[1]Escuela de Bioanalisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas. [2]Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela.
Mención Honorifica Premio "Franca Billi" XVII Congreso Venezolano de Bioanalisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 30 septiembre 2023

RESUMEN:
El método *gold*-estándar para la detección del SARS-CoV-2 es la RT-qPCR, sin embargo, ésta requiere de un paso de extracción y purificación previo que retrasa la entrega de resultados, especialmente en los momentos de mayor demanda diagnóstica. Con el fin de reducir el tiempo de procesamiento fueron evaluados tres métodos de extracción directa sin purificación de la muestra: buffer de lisis, calentamiento a 70°C por 10 min y 95°C por 5 minutos. Para ello, fueron seleccionadas 134 muestras conservadas de individuos con sospecha de Covid-19, referidos al INHRR durante el periodo Junio 2021-Febrero 2022, las cuales fueron procesadas por cada uno de los métodos planteados y seguidamente llevadas a RT-qPCR; los resultados obtenidos fueron comparados con el método gold estándar. En este estudio fue posible la detección directa del SARS-CoV-2 con una sensibilidad superior al 80% en los tres métodos evaluados, conservando un buen grado de concordancia con el método de referencia (k=0,79 para buffer de lisis, k=0,85 y k=0,84 para calentamiento a 70°C y 95°C respectivamente), y sin mostrar diferencias significativas (p=0,92, α=0,05) entre las variaciones de Ct obtenidos por las diferentes metodologías. La detección directa a partir de calentamiento a 70°C por 10 min es la metodología que mostró mayor sensibilidad (86,30%), estos resultados representan un hallazgo valioso para la comunidad científica del país ya que ofrece una alternativa diagnóstica que permite reducir el tiempo de entrega de resultados, contribuyendo con la contención de contagios en los puntos de mayor demanda.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-qPCR, Extracción, Buffer de lisis, Calentamiento.

DIRECT DETECTION OF SARS-COV-2 BY RT-qPCR IN PATIENTS REFERRED TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE "RAFAEL RANGEL"

ABSTRACT
RT-qPCR is the gold standard method for detecting SARS-CoV-2, however, it requires a prior extraction and purification step that delays result delivery, especially during times of high diagnostic demand. In order to reduce processing time, three direct extraction methods without purification were evaluated: lysis buffer, heating at 70°C for 10 minutes, and at 95°C for 5 minutes. A total of 134 preserved samples from individuals suspected of Covid-19, referred to the INHRR between June 2021 and February 2022, were processed using each method and then subjected to RT-qPCR; the results were compared with the gold standard method. Direct detection of SARS-CoV-2 was achieved with a sensitivity exceeding 80% in all three methods, maintaining a good level of agreement with the reference method (k=0.79 for lysis buffer, k=0.85 and k=0.84 for heating at 70°C and 95°C respectively), and without significant differences (p=0.92, α=0.05) in the Ct variations obtained. Direct detection using heating at 70°C for 10 minutes showed the highest sensitivity (86.30%). These findings are valuable as they offer a diagnostic alternative that speeds up the delivery of results, contributing to containing virus spread during periods of high demand.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-qPCR, Extraction, Lysis buffer, Heating.

Introducción

A lo largo de la historia, la humanidad ha tenido que enfrentarse a diversas pandemias las cuales han tenido repercusiones importantes a nivel económico, social y cultural. Para el primer trimestre de 2020 el mundo experimentó la más reciente: la pandemia de la COVID-19, con la aparición de un nuevo virus, el SARS-CoV-2, que ha marcado la historia de la humanidad en los últimos tiempos. Con ella se han registrado más de 6 millones de muertes y 450 millones de contagios, lo que conllevó en sus inicios a un colapso total en todos los sectores, entre ellos el

Solicitar copia a: Giulianna Antonelli (giuantonelliv@gmail.com)

sistema sanitario donde se sobrepasó la demanda a la capacidad de respuesta de los centros y el personal de salud en el mundo (1).

El SARS-CoV-2, forma parte de un grupo de coronavirus de origen zoonótico junto a SARS-CoV y MERS-CoV-, de hecho, estudios genómicos informan que posee una similitud de un 79% con el SARS-CoV, además, se ha hallado concordancia del 96% entre el genoma de este nuevo coronavirus con el virus de los murciélagos (RaTG13), por lo cual se cree que éste sea uno de los posibles hospedadores del virus SARS-CoV-2 (2).

Tras su identificación y con el aumento exponencial de casos de contagio, el 30 de enero la OMS declaró el brote por el nuevo coronavirus como emergencia de salud pública de preocupación internacional(3), y posteriormente el 11 de marzo de ese mismo año, fue declarada la COVID-19 como pandemia(4). Desde entonces, la comunidad científica ha hecho un esfuerzo a gran escala para conocer a fondo todo lo relacionado con la COVID-19, lo cual ha representado un desafío no sólo para la atención y vigilancia de los pacientes, sino también para garantizar la calidad y disponibilidad de las herramientas de diagnóstico relacionadas con el SARS-CoV-2. El método gold estándar para el diagnóstico ha sido la prueba RT-qPCR, la cual ofrece una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, de hecho, los CDC y la OMS aún recomiendan estrictos protocolos de diagnóstico molecular RT-qPCR SARS-CoV-2 con especificaciones para la recolección de muestras y la extracción de ARN (1).

Sin embargo, con el desarrollo de la pandemia, la alta demanda y consecuente escasez de insumos para el diagnóstico, muchos investigadores se han dedicado a desarrollar alternativas que permitan agilizar el proceso diagnóstico, reduciendo el tiempo de respuesta y por supuesto, el alto costo que representan los métodos tradicionales de extracción y purificación del ARN, sin afectar la calidad de los resultados. Por lo anteriormente expuesto, se propone el estudio la aplicación de dos metodologías que evaden el paso de extracción y purificación convencional del ARN viral para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, las cuales podrían reducir de manera importante los tiempos de entrega de resultados, permitiendo un diagnóstico rápido y oportuno ante momentos de alta demanda diagnóstica.

Metodología:

Se analizaron 134 muestras de hisopados nasofaríngeos referidas al INHRR, las cuales fueron procesadas mediante tres métodos diferentes de extracción: 1) Extracción y purificación del ARN viral mediante perlas magnéticas; 2) Tratamiento con buffer de lisis y 3) Calentamiento de la muestra a 70°C por 10 min y a 95°C por 5 min. Posteriormente todos esos productos de extracción fueron llevados a RT-qPCR.

Para la amplificación del material genómico de las muestras purificadas se empleó el Kit "*Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)*" (Sansure Biotech, China) el cual evalúa los genes N y ORF1ab, tomado como método de referencia. Y paralelamente, el kit "*Covid-RT-qPCR Detection Kit Bio-Speedy*" (Bioeksen, Turquía), el cual evalúa el gen RdRp. En el caso de las muestras que fueron tratadas mediante los métodos directos de buffer de lisis y calentamiento, la detección mediante RT-qPCR se realizó empleando el Kit Bio-*Speedy*.

En la Figura 1 se observa un esquema general del procedimiento realizado en esta investigación.

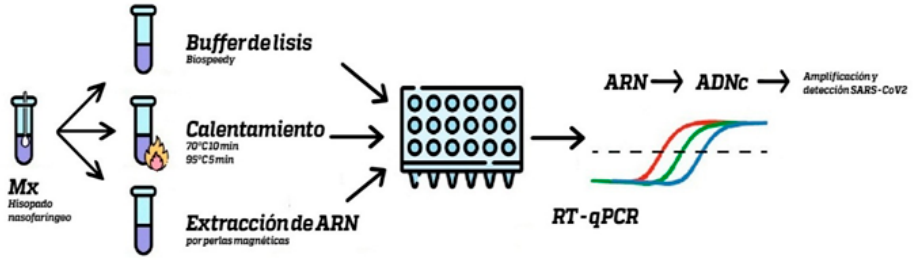


Figura 1: Esquematización general de procedimiento. Fuente: Elaboración propia, 2022.

Resultados

La población de estudio estuvo conformada por 134 muestras, de las cuales 73 (54.4%) se determinaron como muestras positivas y 61 (45.5%) muestras negativas. Esta clasificación se obtuvo a partir de la detección convencional empleando el Kit "Covid-RT-qPCR Detection Kit" (Bioeksen, Turquía).

Comparación entre la detección directa mediante el método de buffer de lisis vs Método de detección con muestras purificadas.

Para la detección directa del SARS-CoV-2 mediante el método de buffer de lisis fue empleado el kit comercial "Viral Nucleic Acid Isolation Kit" (Bioeksen, Turquía), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En este ensayo se obtuvieron 59 muestras positivas (44,03%) y 75 muestras negativas (55,97%). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el método convencional con muestras purificadas. El análisis de concordancia entre ambos métodos demostró una similitud considerable entre ambos, con un índice Kappa de 0,79, el cual es considerado como "Bueno" (5), demostrándose que existe una buena correlación entre ambos. Y se obtuvo una sensibilidad de 80.82%, especificidad del 100%.

Comparación entre la detección directa mediante el método por calentamiento vs Método de detección con muestras purificadas.

En este ensayo se realizó el calentamiento de todas las muestras a 70°C durante 10 minutos en un termobloque, las cuales posteriormente fueron llevadas directamente a RT-qPCR. Con este método se obtuvieron de un total de 134 muestras, 63 (47.01%) positivas y 71 (52,99%) negativas. Estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos mediante el método convencional, observándose un índice Kappa de 0,85, siendo considerado como "Muy bueno" (5), lo cual demuestra un importante grado de concordancia entre ambos métodos. Además, se obtuvo un porcentaje de sensibilidad del 86,30% y de especificidad del 100%.

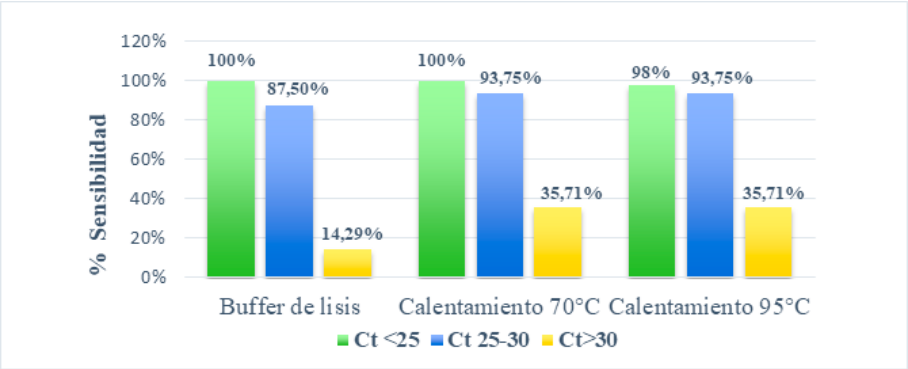
Al igual que en el método por calentamiento a 70°C, para este ensayo se trasladaron las alícuotas de las muestras a un termobloque a una temperatura de 95°C durante 5 minutos y posteriormente fueron llevadas directamente a RT-qPCR para la detección del SARS-CoV-2. En este ensayo se obtuvieron 62 (46,27%) muestras positivas y 72 (55,22%) muestras negativas. Al realizar la comparación con el método de referencia, se pudo observar un grado de concordancia considerado como "Muy bueno" (5), con un índice Kappa de 0,84, el cual demuestra la fuerza de concordancia entre ambos métodos. En cuanto a la sensibilidad y especificidad, se obtuvieron porcentajes de 84,93% y 100% respectivamente.

Comparación de los métodos directos según los valores de Ct y sensibilidad.

Ampliando el análisis, evaluamos la sensibilidad de los métodos según los valores de Ct obtenidos de todas las muestras, las cuales se clasificaron, según la tendencia de resultados, en tres grupos: Ct>30, Ct 25- 30 y Ct <25, destacando que las metodologías de detección directa tienen una sensibilidad entre 98 y 100% para las muestras con Ct menores a 25, y mayor al 87,50% para valores de Ct entre 25- 30. Se elaboró un gráfico donde se observa la comparación entre estos tres grupos en cada una de las metodologías (Gráfico 1).

En el Gráfico 1, se puede observar que el tratamiento con buffer de lisis presentó un menor rendimiento, siendo importante la disminución de la sensibilidad a un 14,29% en muestras con valores de Ct>30; lo mismo se observó en los resultados hallados por calentamiento, con una sensibilidad de detección de tan sólo un 35,71%

Gráfico 1. Sensibilidad de las metodologías de detección directa según los valores de Ct.



en este grupo de muestras. La tasa de falsos negativos fue menor al 20% con los tratamientos evaluados, siendo una constante en muestras de pacientes con Ct>30.

Discusión

Desde sus inicios, la pandemia por la COVID-19 ha representado un desafío para el sector de la salud en materia de diagnóstico, en donde la entrega oportuna de resultados ha sido clave para la contención del número de contagios y por supuesto, para la toma de decisiones en relación al tratamiento de los pacientes. En este contexto, disponer de métodos diagnósticos que permitan realizar la detección del SARS-CoV-2 de forma rápida y confiable se ha convertido en una prioridad, siendo considerados como una alternativa los métodos de detección directa con un paso de extracción sin purificación. En este estudio fueron evaluados tres tratamientos para la detección directa del virus: buffer de lisis, calentamiento a 70°C y 95°C.

En relación a la detección directa, se conoce que el uso de soluciones de buffer de lisis facilita el proceso de extracción del material genético presente en las células, gracias a la presencia de componentes como detergentes y agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular e inactivar las enzimas que degradan el ARN. Bajo este principio, se evaluó la detección directa del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR con un tratamiento de las muestras con buffer de lisis, el cual presentó una sensibilidad diagnóstica del 80,82% y una tasa de concordancia del 79% (k=0.79), resultados que reflejan el buen grado de concordancia entre este tratamiento y el método de referencia. Los resultados obtenidos resultaron similares a los hallados en otras investigaciones en las cuales se considera el uso de buffer de lisis para el tratamiento de la muestra como un método alternativo de detección directa del virus, en las cuales se observó una tasa de concordancia del 94% (6).

El segundo método de extracción simple evaluado fue el tratamiento térmico a diferentes temperaturas, el cual se fundamenta en la degradación de la envoltura lipídica del SARS-CoV-2 al aplicarle calor, permitiendo de esta manera, la liberación del material genético. Esta metodología demostró un excelente rendimiento de la prueba en las dos temperaturas evaluadas (70°C y 95°C), presentando una sensibilidad del 86,30% y 84,93% respectivamente, conservando un fuerte grado de concordancia con el método de referencia, datos muy similares a los hallazgos descritos en otros estudios donde se obtuvieron tasas de detección superiores al 90% (7-9).

Al evaluar la variación de los Ct entre cada método directo con el método de referencia, los tres métodos probados no presentaron diferencias significativas con el gold estándar (p=0,92), por lo tanto, cualquiera de ellos puede ser considerados como alternativas de detección directa del SARS-CoV-2.

Otro aspecto importante a resaltar, es que a medida que aumenta el valor de Ct, la sensibilidad del método disminuye considerablemente. Esta tendencia de disminución de la sensibilidad en muestras con valores de ciclo umbral altos (Ct>30) ha sido descrito en varios estudios donde se aplican técnicas de detección directa (6, 9, 10), y es en este grupo donde se encuentran las muestras clasificadas como falsos negativos. En particular, se observó que el método que presentó una mayor disminución de la sensibilidad en este grupo de muestras fue el tratamiento con buffer de lisis, con una sensibilidad de sólo el 14,29%, seguido de un 35,71% para ambas temperaturas por calentamiento (Gráfico1).

En relación a estos hallazgos, es necesario destacar que estas técnicas al evadir el paso de purificación aumentan el riesgo de obtener falsos negativos en muestras con baja carga viral (11-13), ya que, inicialmente existe una menor disponibilidad de material genético, el cual además se encuentra en un medio rico en inhibidores propios de la muestra (proteínas, RNasas) (14), lo cual dificulta su detección.

En segundo lugar, se somete a tratamientos que pueden aumentar la degradación del ARN presente e incluso inhibir la reacción de amplificación; el buffer de lisis contiene sustancias altamente inhibidoras como el Tiocianato de guanidina y detergentes como Tween-20, los cuales afectan la actividad de la ADN polimerasa impactando en la calidad de la reacción (15). Por otra parte, se ha evidenciado que la inactivación de las muestras mediante calentamiento incide en el rendimiento de la prueba, presentando un aumento en los valores de Ct (16) lo que conlleva a resultados falsos negativos en muestras con baja carga viral. Este hecho se debe a que el ARN es una molécula de simple cadena lo que la hace mucho más lábil y por lo tanto, puede degradarse con mayor facilidad (17).

El valor de ciclo umbral (Ct) es inversamente proporcional a la carga viral presente en la muestra, en donde valores de Ct altos son predictores de una posible carga viral baja y un menor riesgo de infectividad (12,

17) por lo tanto, pudiera creerse que aquellos pacientes con resultandos falsamente negativos observados en este estudio no son necesariamente infecciosos, ya que en diversas investigaciones a lo largo de la pandemia han reportado la ausencia de replicación viral in vitro en muestras con baja carga viral (18). Sin embargo, hay que ser cuidadoso al realizar esta interpretación ya que deben ser considerados varios aspectos: primeramente, el valor de ciclo umbral por sí solo no puede ser interpretado directamente como carga viral sin una curva estándar que utilice materiales de referencia (19), y, en segundo lugar, su valor se ve afectado por una compleja diversidad de factores relacionados con las fases pre-analíticas y analíticas principalmente.

Uno de los primeros aspectos a considerar y que forman parte de la etapa pre-analítica es la técnica de recolección y almacenamiento de la muestra, si la toma de muestra ha sido deficiente, con poca área de superficie recorrida por el hisopo, seguramente se recolectará una menor carga viral (20), y si no es almacenada adecuadamente se favorece la degradación del ARN. El tiempo de muestreo y la cinética de carga viral también deben tomarse en cuenta, si la muestra es recolectada en la fase temprana de la infección o fase tardía, hay posibilidades de resultados falsamente negativos por una baja carga viral propia de la cinética del virus (14).

Sin embargo, los resultados demuestran que los métodos probados en el presente estudio tienen una excelente capacidad de detección en pacientes con cargas virales moderadas y altas (Ct <30) (21), con una especificidad del 100%, lo cual indica que todo paciente positivo estará verdaderamente infectado con el virus, esto es muy importante, ya que este tipo de pacientes presentan una mayor tasa de transmisión y un mayor riesgo de desarrollar complicaciones por la COVID-19 (22), es por ello que estos métodos pueden ser bastante útiles para controlar los contagios durante una pandemia especialmente en los escenarios donde hay un aumento exponencial de casos. Además de contribuir con el diagnóstico oportuno del paciente y su tratamiento, reduciendo el tiempo de respuesta y por supuesto, el alto costo que representan los métodos tradicionales de extracción y purificación del ARN.

En relación a aquellos pacientes en los cuales no se haya detectado el virus y tengan antecedentes de contacto con personas sintomáticas, viajes y/o con síntomas sospechosos de la enfermedad, se recomienda realizar el paso de extracción y purificación de las muestras para aumentar la sensibilidad de la RT-qPCR, descartándose de esta manera resultados falsamente negativos.

Adicionalmente, se obtuvo como hallazgo relevante en esta investigación, el impacto que tienen los componentes de los medios de transporte viral en los métodos de detección directa, encontrándose que, de los cuatro medios seleccionados, en sólo uno, ITM-Bioteke, no se observó amplificación ni de la muestra ni del control interno en ninguno de los tres métodos directos probados, lo que indica inhibición de la reacción (23).

Este medio (ITM-Bioteke) se caracteriza por su capacidad de inactivar directamente la muestra gracias a la presencia de diversos agentes como buffer Tris-HCL, EDTA y sales de guanidina, sin embargo, todos ellos son potentes inhibidores de la reacción de PCR (14,15), por lo tanto, aquellas muestras recolectadas en medios de transporte de inactivación no son aptos para ninguno de los métodos de detección directa aplicados en esta investigación ya que se requiere de su purificación para eliminar estos componentes inhibidores. Este hallazgo coindice con reseñas de otros estudios en los cuales destacan la importancia de identificar el poder inhibitorio de diversos medios de transporte en las pruebas libres de purificación (24), ya que sería una limitación en aquellos laboratorios donde se deseen aplicar estos métodos y las muestras estén conservadas en dichos medios.

Esta investigación reporta por primera vez en Venezuela la utilidad de la detección directa a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos, en el diagnostico en menor tiempo y en menor costo de COVID-19, mediante RT-qPCR.

Conclusiones

1. La detección directa de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo es posible por las metodologías de extracción de buffer de lisis y calentamiento (75°C y 95°C), siendo una estrategia para obtener un resultado confiable en menor tiempo y a menor costo.
2. La detección directa de SARS-CoV-2 por RT-qPCR por calentamiento (70°C y 95°C) es una metodología más sensible que la detección por buffer de lisis para muestras con valores de Ct altos.
3. Los resultados obtenidos sugieren que son metodologías ideales como método de detección rápida, las cuales pueden ser implementadas en:

a) Laboratorios que tengan difícil acceso a equipos automatizados para la extracción de ARN viral.

b) Panoramas de alta demanda en los que exista escasez de materiales para el diagnóstico y contención de casos infecciosos con alta carga viral, lo cual ayudaría a agilizar la toma de decisión médica y clínica de los pacientes.

4. Los componentes de inactivación que contienen algunos medios de transporte inhiben la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR directa con los métodos probados.

5. Este estudio reitera la importancia de búsqueda de metodologías alternativas que se traduce en la implementación y uso de herramientas útiles para el monitoreo de los casos de COVID-19.

Referencias

1. Bruno A, de Mora D, Freire-Paspuel B, Rodriguez AS, Paredes-Espinosa MB, Olmedo M, *et al.* Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. Int J Infect Dis [Internet]. 2021;109:315-320. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038.
2. Li X, Zai J, Zhao Q, Nie Q, Li Y, Foley BT, *et al.* Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. J Med Virol 2020;92(6):602-611. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25731.
3. Organización Panamericana de la Salud. La OMS declara que el nuevo brote de coronavirus es una emergencia de salud pública de importancia internacional. 2020. Disponible en: https://www.paho.org/es/noticias/30-1-2020-oms-declara-que-nuevo-brote-coronavirus-es-emergencia-salud-publica-importancia-
4. Organización Panamericana de la Salud. La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia. 2020. Disponible en: https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia.
5. Altman DG. Practical statistics for medical research. Primera edición. Chapman and Hall. New York, Washington D.C. 1991, 624p. Disponible en: https://doi.org/10.1201/9780429258589.
6. Israeli O, Beth-Din A, Paran N, Stein D, Lazar S, Weiss S, *et al.* Evaluating the efficacy of RT-qPCR SARS-CoV-2 direct approaches in comparison to RNA extraction. Int J Infect Dis [Internet]. 2020;99:352-354. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32791207/.
7. Fomsgaard AS, Rosenstierne MW. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 – escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. Euro Surveill [Internet]. 2020;25(14):2000398. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.14.2000398.
8. Calvez R, Taylor A, Calvo-Bado L, Fraser D, Fink CG. Molecular detection of SARS-CoV-2 using a reagent-free approach. PLoS One [Internet]. 2020;15(12):e0243266. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0243266.
9. Domnich A, De Pace V, Pennati BM, Caligiuri P, Varesano S, Bruzzone B, *et al.* Evaluation of extraction-free RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 diagnostics. Arch Virol 2021;166(10):2825-2828. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00705-021-05165-0.
10. Pearson JD, Trcka D, Lu S, Hyduk S, Jen M, Aynaud M, *et al.* "Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct RT-qPCR detection methods." Virol J 2021;18:99. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12985-021-01574-4.
11. Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. Viral cultures for Coronavirus disease 2019 infectivity assessment: A systematic review. Clin Infect Dis [Internet]. 2021;73(11):e3884-3899. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa1764.
12. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, *et al.* Predicting infectious severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis [Internet]. 2020;71(10):2663-2666. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa638.
13. Tom MR, Mina MJ. To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value. Clin Infect Dis [Internet]. 2020;71(16):2252-2254. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa619.
14. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. RRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. Clin Chim Acta [Internet]. 2021;516:1-7. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.011.
15. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol [Internet]. 2012;113(5):1014-1026. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
16. Li D, Wang D, Dong J, Wang N, Huang H, Xu H, *et al.* False-negative results of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2: Role of deep-learning-based CT diagnosis and insights from two cases. Korean J Radiol [Internet]. 2020;21(4):505-508. Disponible en: https://dx.doi.org/10.3348/kjr.2020.0146.
17. Sandoval Rodríguez A, Martínez Rizo A, López de la Mora D. Extracción de ácidos nucleicos. En: A.M. Salazar Montes, A.S. Sandoval Rodríguez, J.S.

Armendáriz Borunda (editores). Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Primera edición. McGrawHill Interamericana. México 2013, pp. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473&sectionid=102743658.

18. Basile K, McPhie K, Carter I, Alderson S, Rahman H, Donovan L, *et al*. Cell–based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19. Clin Infect Dis 2021;73(9):e2952-e2959. https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa1579.
19. Al Bayat S, Mundodan J, Hasnain S, Sallam M, Khogali H, Ali D, *et al*. Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? J Infect Public Health [Internet]. 2021;14(9):1201-1205. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.08.013.
20. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation (PUIs) for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). 2020. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html.
21. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, Aldali J, Mutair AA, Alhumaid S, *et al*. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. Diagnostics 2021;11(6):1091. https://doi.org/10.3390/diagnostics11061091.
22. Hiroi S, Kubota-Koketsu R, Sasaki T, Morikawa S, Motomura K, Nakayama EE, *et al*. Infectivity assay for detection of SARS-CoV-2 in samples from patients with COVID-19. J Med Virol [Internet]. 2021;93(10):5917-5923. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/jmv.27145.
23. Kavlick M F. "Development of a universal internal positive control." BioTechniques 2018;65(5):275-280. http://dx.doi.org/10.2144/btn-2018-0034.
24. Merindol N, Pépin G, Marchand C, Rheault M, Peterson C, Poirier A, *et al*. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. J Clin Virol [Internet]. 2020; 128(104423):104423. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104423.

INFORMACION PARA LOS AUTORES

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, publica artículos originales, revisiones, cartas al editor y comunicaciones breves relacionadas con biología humana, bioanálisis y áreas afines, que contribuyan al avance de la investigación y difusión científica.

Envío del Trabajo

El autor debe enviar un original del artículo, con una carta de presentación firmada por todos los autores como constancia escrita que han contribuido en el diseño, ejecución, análisis e interpretación de los datos, redacción del artículo y, en la revisión crítica del contenido del artículo original a ser publicado. Debe dejar constancia que el trabajo no ha sido publicado ni enviado a otra revista. También indicar el orden de los autores y el autor de correspondencia con su dirección y correo electrónico. Los autores cuando presentan el manuscrito, deben revelar todas las entidades financieras y las relaciones personales que puedan haber influido en el trabajo, es decir deben declarar explícitamente si existen o no conflicto de intereses.

La revista utiliza en forma preferencial el sistema electrónico, por lo tanto debe acompañar el envío de un CD, en "Word for Windows®", en cuya etiqueta se indique el nombre del autor principal.

Sistema de Arbitraje

Todos los artículos originales pasan por un proceso de arbitraje externo, realizado por tres árbitros con experticia en el tema específico. Las revisiones igualmente son evaluadas por especialistas. La decisión se tomará de acuerdo a la opinión de los árbitros aprobada por el Comité Editorial. La autoría del artículo y el arbitraje, son del dominio exclusivo del Comité Editorial. Los autores recibiránla opinión de los árbitros con las recomendaciones por parte del Comité en cuanto a modificaciones de forma y redacción. Las respuestas deben enviarse en un lapso prudencial, con una carta donde el autor señale las modificaciones realizadas y argumente aquellas que no considera adecuadas.

Normas Editoriales

Todas las partes del manuscrito deben estar escritas a doble espacio. Cada sección comenzará en página nueva, todas numeradas, con la siguiente secuencia: página del título, nombre completo de los autores (sin títulos profesionales), dirección de la(s) institución(es) donde fue realizado, y señalar con números consecutivos la que corresponde a cada autor.

Los artículos originales deben guardar la siguiente estructura:

Título en español e inglés (corto, no más de 15 palabras, 75 caracteres), Titulillo en español Resumen y Palabras Clave en español e inglés), Introducción, Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias. Cuadros e Ilustraciones. Cada sección debe comenzar en hoja aparte, así como también los cuadros e Ilustraciones con sus respectivos pies o epígrafe.

Resumen debe establecer los objetivos del estudio, los procedimientos básicos (selección, métodos de observación y análisis) los hallazgos más importantes, proporcionar datos específicos y, significación estadística y las conclusiones principales sobre la base de los resultados del estudio.

No debe contener referencias ni siglas que no estén identificadas. El límite máximo son 250 palabras y no debe ser estructurado. Al final del resumen deben estar 3 a 10 palabras clave, que incluyan descriptores en inglés, de la lista del "Medical Subject Headings (MeSH) y en español de la lista de "descriptores en Ciencias de la Salud" (DECS).

Introducción expresa el propósito del artículo, los antecedentes internacionales y nacionales, mediante referencias actualizadas. En el últimopárrafo de la introducción debe aparecer en forma clara y precisa el objetivo del estudio.

Metodología describa claramente como se eleccionaron los sujetos que participaron en el estudio, edad, sexo y otras características importantes. En los manuscritos de revisión se incluirá una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar o extraer los datos.

Los estudios con humanos deben dejar constancia escrita de la aprobación por parte del Comité de Ética de la institución donde se realizó la investigación, así como el consentimiento de los individuos que participaron y, evitar en todo momento que puedan ser identificados, tener especial cuidado con las fotografías. Cuando se trate de experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución acerca del cuidado y uso de animales en el laboratorio.

Describa los métodos estadísticos con detalle suficiente para que puedan verificarse los resultados. Defina los términos, las abreviaturas y los símbolos estadísticos. Cuando sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de medición de error o incertidumbre (como intervalos de confianza).

Resultados. Presente los resultados en el texto, cuadros, ilustraciones y figuras en una secuencia lógica. No repita en el texto la información que contienen los cuadros y figuras, sólo destaque lo más importante. Utilice en esta sección el tiempo pretérito.

Discusión. Destaque los aspectos nuevos e importantes del estudio y las conclusiones que se derivan de los resultados. Cuídese de no repetir la información ya presentada en las secciones anteriores. Relacione las observaciones con la de otros estudios internacionales y nacionales, incorporando en la discusión el análisis de las referencias bibliográficas actualizada relacionadas con el estudio. Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, y cierre la discusión con la conclusión más importante del estudio o con la propuesta de nuevas hipótesis, cuandoestén justificadas.

Las Revisiones pueden ser solicitadas por el Editor preferentemente a especialistas sobre un tema de importancia científica en la actualidad, pero también se aceptan revisiones de autores, las cuales seguirán el proceso de arbitraje externo En la revista también se publican reportes cortos de hallazgos de interés para el ámbito de la revista, así como casos clínicos cuya ocurrencia sea un verdadero hallazgo.

Las cartas al editor, por lo general están referidos a comentarios de artículos recientes publicados en la revista y su extensión no debe ser mayor a dos páginas.

Cuadros. Cada cuadro debe escribirse a doble espacio, sin líneas verticales ni horizontales internas y en hoja aparte. Numérelos consecutivamente con números arábigos y asigne un título breve en minúscula. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en el cuadro. Si incluye datos publicados o inéditos o de otra fuente, obtenga la autorización para reproducirlos y conceda el reconocimiento al autor. No incluya más de 5 cuadros, máximo de 5 columnas y 8 filas.

Ilustraciones (Figuras) Las figuras deben estar dibujadas en forma profesional (archivos electrónicos de las figuras en formato JPEG o GIF). Se numeran en forma consecutiva con números arábigos. Las fotografías deben ser en blanco y negro, con buen contraste, en papel satinado con las siguientes medidas 127x173 mm, sin exceder 203x 254 mm. Ubicar una por página, título breve y una leyenda que facilite la comprensión del contenido.

Agradecimientos Aparecen al final del texto, allí se incluyen las colaboraciones que deben ser reconocidos pero que no justifican la autoría, ayuda técnica, apoyo financiero y material y las relaciones que puedan suscitar conflicto de intereses.

Referencias. Las referencias bibliográficas dan el soporte científicoal estudio realizado, por lo tanto deben ser recientes, preferiblemente de los últimos cinco años. Las referencias internacionales y nacionales constituyen antecedentes del estudio que se está publicando, de esta manera, también reconocemos la labor de los investigadores venezolanos que han aportado al tema en estudio. Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden como se mencionan por primera vez en el texto. Cite cuidadosamente en el texto, cuadros y figuras todas las referencias con un número entre paréntesis. Cuide que la escritura reproduzca fielmente el artículo original y vigile la escritura en inglés, para evitar cometer errores al transcribir la información.

Las referencias bibliográficas en Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, siguen el estilo de las normas de Vancouver. (http://www.icmje.org.). Abrevie los títulos de las revistas de acuerdo con el estilo del Index Medicus y consulte la lista de revistas indizadas en (http://www.nlm.nih.gov). No se aceptan como referencias resúmenes. Los artículos aceptados pero que todavía no se han publicado, se indican como "en prensa", con la información de la revista donde fue aceptado.

Ejemplos de referencias:

Artículos de revista

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión "*et al*"

1. Artículo de revista ordinario

Bremer AA, Byrd RS, Auinger P. Racial trends in sugar sweetened beverage consumption among US adolescents: 1988-2004. Int J Adolesc Med Health 2011; 23(3):279-86.

Libros

2. Individuos como autor:

Casademunt J. Sobrepeso y obesidad infantil. Barcelona: Editorial Océano; 2005.

3. Editores como autor:

Alemán M, Bernabeu-Mestre JB, editores. Bioética y Nutrición. Alicante. Universidad de Alicante: Editorial Agua Clara; 2010.

4. Capítulo de libro:

López de Blanco M, Landaeta-Jiménez M. Los estudios de crecimiento y desarrollo físico en Venezuela. En: Fano V, Del Pino M, Cano S, compiladores.

Ensayo sobre crecimiento y desarrollo presentado al Dr. Horacio Lejarraga por sus colegas y discípulos. Buenos Aires: Paidos; 2011. p. 431-454

Material electrónico

5. Artículo de revista en Internet:

Vázquez de la Torre MJ, Vázquez Castellanos JL, Crocker Sagastume R. Hipertensión arterial en niños escolares con sobrepeso y obesidad. Respyn [Serie en Internet] 2011 Jul-Sep

[citada 5 nov 2011]; 12(3): [6 pantallas]. Se consigue en: URL: http://www.respyn.uanl.mx/xii/3/articulos/Hipertension_arterial.htm.

Para otros ejemplos de formato de referencias bibliográficas, los autores deberían consultar la página web: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Para cualquier otro tipo de información se sugiere consultar: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication Updated April 2010. http://www.icmje.org.

Antes de enviar el artículo, revise cuidadosamente las instrucciones a los autores y verifique si el artículo cumple con los requisitos editoriales de la revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas.

Artículo de revisión:

El artículo de revisión facilita la actualización y revisión de un aspecto científico, realizado por especialistas en el tema: ofrece al lector interesado una información condensada sobre un tema, realiza interpretaciones y adelanta explicaciones en tópicos específicos relacionados al área del Bioanálisis.

El número máximo de autores es cuatro. El artículo requiere de, al menos, 40 referencias con prioridad de los últimos cinco (5) años. En caso de que esto no sea posible, deben especificarse las razones (tópicos muy poco frecuentes o muy poco investigados previamente). El texto deberá expresar con claridad las ideas a ser desarrolladas, y tratara de transmitir un mensaje útil para la comprensión del tema central del artículo de revisión.

Las secciones básicas del artículo de revisión son: página inicial, resumen, (en español y en inglés), introducción, texto, referencias bibliográficas. El cuerpo de las revisiones es libre, aunque es conveniente subdividirlo en secciones.

El autor o los autores de un artículo de revisión deben plasmar su interpretación crítica de los resultados de la revisión bibliográfica con claridad y precisión, y dejar siempre la inquietud sobre aquellos tópicos del tema que requieren una mayor o más profunda investigación. La extensión de los artículos de revisión no debe ser mayor de 6000 palabras, excluyendo las referencias.

ÍNDICE POR AUTORES

A

Acosta Pérez, Leonardo
véase Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11

Aguilar, Marwan
véase Antonelli, Giulianna 2023;26(2):60-66

Antonelli, Giulianna 2023;26(2):60-66
Detección directa de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Atencio, Maria Victoria
véase Fernándes, Angélica 2023;26(2):51-59

B

Bustamante Siberio, Yacelli
véase Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11

Belisario Gómez, Inirida
véase Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50

Benítez Pérez, Gustavo
véase Fernándes, Angélica 2023;26(2):51-59
véase Rangel, Hellen 2023;26(1):12-21

Brito de González, Sara 2023;26(1):22-28
Biosimilares de insulina ¿Qué deben saber los médicos y pacientes?

C

Caraballo, Génesis
véase Ross, Valerie 2023;26(2):38-44

Chaurio Aleiram
véase Antonelli, Giulianna 2023;26(2):60-66

Crespo Serrano Francis
véase Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50

D

D'Angelo, Pierina
véase Ross, Valerie 2023;26(2):38-44

De Sanctis, Juan Bautista
véase Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50

Duarte, Luis
véase Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11

F

Fernándes, Angélica 2023;26(2):51-59
Polimorfismo -31118 G/A (rs1761667) del gen del receptor CD36 y las variantes 388 T/C (rs429358) y 526 C/T (rs7412) del gen de la APO-E en individuos obesos

Fernández, Gleinys
véase Rangel, Hellen 2023;26(1):12-21

G

Garcés, María Fatima
Editorial 2023;26(1):1
Editorial 2020;26(2):37
véase Fernándes, Angélica 2023;26(2):51-59
véase Rangel, Hellen 2023;26(1):12-21

Gutiérrez, Cristina
véase Ross, Valerie 2023;26(2):38-44

García Piñero, Alexis
véase Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50

M

Martínez Vázquez, Wendy
véase Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50

Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50
Estudio piloto del efecto del tipo y conservación de la muestra y método, en la medición de la concentración de las fracciones C3 Y C4 del complemento.
Medina García, Christian
véase Mayora Hernández, Soriuska 2023;26(2):45-50

P
Pestana, José
véase Rangel, Hellen 2023;26(1):12-21

R
Rangel, Hellen 2023;26(1):12-21
Polimorfismo GLY972ARG del gen IRS1 en pacientes con obesidad mórbida
Rodríguez, Jesús Manuel 2023;26(1):29-34
Bioquímica Aplicada para diagnósticos comunes
Ross, Valerie 2023;26(2):38-44
Cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real en individuos referidos al instituto nacional de higiene "Rafael Rangel"

U
Uribe Padrón, José
véase Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11

V
Villamizar Aldana, Blanca
véase Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11
Villasmil Bastidas, Miriam
véase Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11
Villasmil Bastidas, Saúl 2023;26(1):2-11
Comportamiento de parámetros inflamatorios en pacientes con infección por SARS-CoV-2 en el período 2020-2021

ÍNDICE POR TITULOS 2023

B

Bioquímica Aplicada para diagnósticos comunes 2023;26(1):2-11

Biosimilares de insulina ¿Qué deben saber los médicos y pacientes? 2023;26(1):22-28

C

Comportamiento de parámetros inflamatorios en pacientes con infección por SARS-CoV-2 en el período 2020-2021 2023;26(1):2-11

Cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real en individuos referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" 2023;26(2):38-44

D

Detección directa de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" 2023;26(2):60-66

E

Estudio piloto del efecto del tipo y conservación de la muestra y método, en la medición de la concentración de las fracciones C3 Y C4 del complemento. 2023;26(2):45-50

P

Polimorfismo -31118 G/A (*rs1761667*) del gen del receptor CD36 y las variantes 388 T/C (*rs429358*) y 526 C/T (*rs7412*) del gen de la APO-E en individuos obesos 2023;26(2):51-59

Polimorfismo GLY972ARG del gen IRS1 en pacientes con obesidad mórbida 2023;26(1):12-21

ÍNDICE PALABRAS CLAVE AÑO 2023

A

Ancho de distribución de los glóbulos rojos 2023;26(1):2-11

APOE 2023;26(2):51-59

B

Biológicos 2023;26(1):22-28

Bioquímica 2023;26(1):29-34

Biosimilares 2023;26(1):22-28

Buffer de lisis 2023;26(2):60-66

C

Calentamiento 2023;26(2):60-66

Carga viral 2023;26(2):38-44

CD36 2023;26(2):51-59

Ciencias básicas 2023;26(1):29-34

Cirugía bariátrica 2023;26(1):12-21

Complemento 2023;26(2):45-50

Covid-19 2023;26(1):2-11
2023;26(2):38-44
2023;26(2):60-66

D

Dímero D 2023;26(1):2-11

Docencia en salud 2023;26(1):29-34

E

Extracción 2023;26(2):60-66

I

Inmunodifusión radial 2023;26(2):45-50

Insulinas 2023;26(1):22-28

IRS1 2023;26(1):12-21

L

Laboratorio 2023;26(2):45-50

Lactato Deshidrogenasa 2023;26(1):2-11

Lípidos 2023;26(2):51-59

N

Nefelometría 2023;26(2):45-50

O

Obesidad 2023;26(1):12-21
2023;26(2):51-59

P

PCR-RFLP 2023;26(2):51-59

Plasma 2023;26(2):45-50

Polimorfismo 2023;26(1):12-21
2023;26(2):51-59

Proteína C reactiva 2023;26(1):2-11

Q

qRT-PCR 2023;26(2):38-44

R

resistencia a la insulina 2023;26(1):12-21

rs1761667 2023;26(2):51-59

rs429358 2023;26(2):51-59

rs7412 2023;26(2):51-59

RT-qPCR 2023;26(2):60-66

S

SARS-CoV-2 2023;26(1):2-11
2023;26(2):38-44
2023;26(2):60-66

Suero 2023;26(2):45-50

AGRADECIMIENTO PARA LOS ÁRBITROS DE 2023

La contribución de los árbitros es esencial para mantener y mejorar la calidad de los trabajos publicados en la Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Por esta razón queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a los colegas quienes han dedicado tiempo y esfuerzo para el arbitraje de los trabajos publicados en nuestra revista durante el año 2023.

Aura Palencia
Maria Luisa Núñez
Mercedes Fernandes-Mestre
Elizabeth Ferrer
Daría Camacho
Ángel Fernández
Martha Bravo
Yarlenis Castro
Adriana Pedreañez
Eva Adriana Velásquez Bolívar
Carmen Zulay Labrador
German González
Diana Graterol
María Elena Castellanos

ESPECIALISTAS
SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 26 - No 2 2023

EDITORIAL
María Fátima Garcés..... 37

ORIGINAL ARTICLE:
Quantification of SARS-CoV-2 viral load levels by time-time pcr real in individuals referred to the National Institute Of Hygiene "Rafael Rangel"
Valerie Ross, Génesis Caraballo, Pierina D'Angelo, Cristina Gutiérrez..... 38

Pilot study of the effect of sample type, sample conservation and method on the measurement of C3 and C4 complement fractions concentration.
Soriuska Mayora Hernandez, Wendy Martínez Vazquez, Francis Crespo Serrano, Inirida Belisario Gomez, Christian Medina García, Juan Bautista De Sanctis , Alexis García Piñero..... 45

Polymorphism -31118 G/A (*rs1761667*) of the CD36 receptor gene and the variants 388 T/C (*rs429358*) and 526 C/T (*rs7412*) of the APO-E gene in obese individuals
Angélica Fernándes, María Victoria Atencio, Gustavo Benítez Pérez, Maria Fatima Garces..... 51

Direct detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR in patients referred to the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel"
Giulianna Antonelli, Aleiram Chaurio, Marwan Aguilar..... 60

INFORMATION FOR THE AUTORS..... 67

INDEX BY AUTORS..... 68

INDEX BY TITLE..... 71

KEYWORD INDEX..... 72

Diseño y diagramación: Ana María Reyes, digivi@gmail.com
Soporte Web: Nexus Radical, Altemar Pérez, aperez@estudiopro.com