

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO



**COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS RT-PCR Y RT-LAMP DE BIOLOGÍA
MOLECULAR PARA EL DIGNÓSTICO DE COVID-19 EN EL MES DE JULIO DE 2023.**

Presentado:

ABEL DAGOBERTO AYALA AYALA

Para optar al grado de:

LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

Asesor:

LICDA. DELMY PATRICIA PINEDA DE SORIANO

CIUDAD UNIVERSITARIA "DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA", EL SALVADOR,

AGOSTO, 2023

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Msc. Roger Armand Arias

Vicerrector Académico

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López

Vicerrector Administrativo

Ing. Juan Rosa Quintanilla

Secretario/a General

Ing. Francisco Alarcón

Fiscal general

Licdo. Rafael Humberto Peña Marín

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Decana

Msc. Josefina Sibrián De Rodríguez

Vicedecano

Dr. Saúl Díaz Peña

Secretaria

Licda. Aura Marina Miranda De Arce

Director De Escuela

Msc. José Eduardo Zepeda Avelino

Directora De Carrera

Licda. Miriam Cecilia Recinos De Barrera

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por la sabiduría que me otorgo durante todos estos años y la perseverancia necesaria para poder culminar la carrera.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional que me han brindado, principalmente a mi padre; José Andrés Ayala Menjívar, y a mi madre; Ana Vilma Ayala de Ayala por todo el amor, apoyo, esfuerzo, sacrificio, tiempo, paciencia, ánimo y sobre todo la ayuda económica que me brindaron desde hasta este momento. Gracias a ellos por el claro ejemplo de superación y dedicación, gracias a ellos porque nunca me dejaron solo, nunca permitieron que me rindiera en ningún momento de mi vida y siempre apoyaron cada una de mis decisiones y sueños. Los admiro y amo con todo mi corazón.

A mi asesora, Licenciada Delmy Patricia Pineda de Soriano, por brindar su tiempo en apoyar y guiar este ensayo que sin el conocimiento, paciencia y dedicación al trabajo no sería posible haber realizado el trabajo.

Finalmente agradecer a todos mi amigos, familiares y docentes que de una u otra manera formaron parte de este proceso gracias a los que están y a los que estuvieron. Los que aportaron a mi crecimiento como persona y como profesional.

Abel Dagoberto Ayala Ayala.

RESUMEN

Los coronavirus son una familia de virus que pueden causar enfermedades como el resfriado común, el SARS y el MERS. Estos virus se caracterizan por tener proteínas esenciales que les dan su nombre específico, como el SARS-CoV-2. Estructuralmente, los coronavirus son virus esféricos con una envoltura de bicapa lipídica y un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. Se cree que la proteína M existe como un dímero en el virión y puede promover la curvatura de la membrana y unirse a la nucleocápside, lo que facilita la entrada de células y la propagación del virus.

El hisopado nasofaríngeo es una de la muestra más comunes, que consiste en tomar una muestra de la parte media de la garganta. El diagnóstico molecular es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular para detectar y cuantificar secuencias genéticas específicas de ADN, ARN o proteínas. La PCR es una técnica importante en biología molecular que permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. En el caso del covid-19, se utiliza la PCR con retrotranscripción o RT-PCR para diagnosticar la enfermedad. En este método, el ARN viral se purifica a partir de una fracción de la muestra utilizando kits de extracción y purificación de ARN.

La extracción de ácidos nucleicos, ya sea ARN o ADN, se puede realizar mediante el método de perlas magnéticas. Este método se basa en la hibridación complementaria entre el ácido nucleico y las perlas, y luego se aísla mediante campos magnéticos. Las muestras tomadas e inactivadas con el medio de transporte se dispensan en una placa con pocillos que contiene los compuestos encargados de realizar la lisis y extracción de ácidos nucleicos. Este método permite obtener un rendimiento de ARN mayor y más rápido. Otro método utilizado para el diagnóstico es LAMP, La reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP),

ya sea a partir de ADN o RT-LAMP usando RNA es una técnica de amplificación rápida de una secuencia target de un ácido nucleico utilizando oligos o cebadores específicos, y dos enzimas: una RT y una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de cadena. En las pruebas de diagnóstico de LAMP el producto amplificado se detecta por turbidez o por fluorescencia, a través de una lectura visual de su RT-LAMP utilizaron rojo fenol, que cambia el color de rosa (pH 8.8) a amarillo (pH <8.0) para indicar la aparición de amplificación, logrando la detección de 200 copias de ARN de SARS-CoV-2 extraído de muestras de pacientes con COVID-19.

En resumen, El diagnóstico molecular, especialmente mediante la PCR, es fundamental para detectar y cuantificar el material genético del virus. La extracción de ácidos nucleicos, utilizando perlas magnéticas, es un método eficiente para obtener muestras de ARN o ADN.

PALABRAS CLAVES

Retrotranscripción de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, amplificación isotérmica en RT-LAMP

ABSTRACT

Coronaviruses are a family of viruses that can cause illnesses like the common cold, SARS, and MERS. These viruses are characterized by having essential proteins that give them their specific name, such as SARS-CoV-2. Structurally, coronaviruses are spherical viruses with a lipid bilayer envelope and a positive-sense, single-stranded RNA genome. The M protein is believed to exist as a dimer in the virion and can promote membrane curvature and bind to the nucleocapsid, facilitating cell entry and virus propagation.

The nasopharyngeal swab is one of the most common samples, which consists of taking a sample from the middle part of the throat. Molecular diagnostics is a broad term that includes molecular biology techniques to detect and quantify specific genetic sequences of DNA, RNA, or proteins. PCR is an important technique in molecular biology that makes it possible to obtain millions of copies of a DNA fragment from a single molecule. In the case of covid-19, reverse transcription PCR or RT-PCR is used to diagnose the disease. In this method, viral RNA is purified from a fraction of the sample using RNA extraction and purification kits.

Extraction of nucleic acids, either RNA or DNA, can be performed using the magnetic bead method. This method is based on complementary hybridization between the nucleic acid and the beads, and is then isolated by magnetic fields. The samples taken and inactivated with the transport medium are dispensed into a well plate containing the compounds responsible for lysis and extraction of nucleic acids. This method allows a higher and faster RNA yield to be obtained. Another method used for diagnosis is LAMP, The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction, either from DNA or RT-LAMP using RNA is a rapid amplification technique of a target nucleic acid sequence using oligos or specific primers,

and two enzymes: an RT and a DNA polymerase with strand displacement capability. In LAMP diagnostic tests, the amplified product is detected by turbidity or by fluorescence, through a visual reading of its RT-LAMP using phenol red, which changes the color from pink (pH 8.8) to yellow (pH <8.0). to indicate the appearance of amplification, achieving the detection of 200 copies of SARS-CoV-2 RNA extracted from samples of patients with COVID-19.

In summary, Molecular diagnosis, especially through PCR, is essential to detect and quantify the genetic material of the virus. Nucleic acid extraction, using magnetic beads, is an efficient method for obtaining RNA or DNA samples.

keywords

Real-time polymerase chain reaction reverse transcription, isothermal amplification in RT-LAMP

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus (COVID-19) se define como una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2. Muchas personas infectadas por el virus experimentarán una enfermedad respiratoria de leve a moderada y se recuperarán sin requerir un tratamiento especial. Sin embargo, algunas personas enfermarán gravemente y requerirán atención médica. Esto conlleva a la necesidad de hacer diferentes estudios analíticos y comparativos entre pruebas de detección de ácidos nucleicos viral, para hacer un diagnóstico rápido, preciso y confiable, para aquellas personas que puedan estar infectadas con el virus de dicha enfermedad.

Las pruebas de ácidos nucleico extraen directamente el ARN del virus de interés, a través de diferentes muestras obtenida directamente del paciente, algunos tipos de muestras pueden ser de la garganta o del conducto nasal. Durante los primeros días de infección, las cargas virales de los pacientes son altos y un solo hisopo nasofaríngeo puede albergar cerca de 1 millón de partículas virales de SARS-CoV-2.

Por lo tanto, existen diferentes pruebas de ácido nucleico que ofrecen la detección más temprana y más sensible de la presencia de SARS-COV-2. En la que podemos encontrar la prueba molecular como RT-PCR que se ha considerado el "estándar de oro" para el diagnóstico clínico, pero requiere reactivos, equipos y personal especializados, con lo cual han surgido otras técnicas de poco renombre para el diagnóstico de COVID 19, pero que también son muy útiles.

Por lo antes mencionado el objetivo de este ensayo es analizar las diferentes técnicas RT-PCR y la técnica de RT-LAMP y así mismo, los fundamentos de dichas pruebas de detección

de ácidos nucleicos para el COVID 19, así también conocer las ventajas y desventajas que se encuentre en cada una de las pruebas descritas.

Así mismo, la importancia del ensayo es hacer un énfasis en esas diferencias que hay entre las pruebas diagnósticas molecular de la enfermedad, ayudando así, al profesional a escoger la técnica diagnóstica más específica y confiable que puede encontrar en el mercado. Y darle una guía del porque una prueba puede ser mejor que otra en cuestión de costo y beneficio tanto para el usuario como al profesional de laboratorio principalmente.

CONTENIDO

AUTORIDADES DE UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.....	ii
AUTORIDADES DE FACULTAD DE MEDICINA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCION.....	ix
DESARROLLO.....	1
CONCLUSIONES.....	19
FUENTES DE INFORMACION.....	22
ANEXOS.....	26

DESARROLLO

Los coronavirus son una familia de virus que pueden causar enfermedades como el resfriado común, el síndrome respiratorio agudo grave (SARS, por sus siglas en inglés) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS, por sus siglas en inglés). En 2019 se identificó un nuevo coronavirus como la causa del brote de una enfermedad que se originó en China (Sandhya Pruthi, 2023).

La OMS declaró pandemia mundial a causa por el coronavirus (SARS-CoV-2) a finales de marzo del 2020, siendo una noticia grave para el área de la salud y para todas las personas del mundo, llevándose de paso a la económica, donde la pandemia terminó de agravar y afectar la bolsa económica de cientos de familias, de tal manera, la pandemia por COVID-19 afectó la salud de muchas personas. Con el pasar de las semanas y meses, tras la pandemia muchas organizaciones fueron creando métodos y recursos para poder sobrellevar la pandemia por coronavirus. Esta pandemia (por COVID-19) nos ha demostrado claramente que se necesitan sistemas de salud más sólidos que promuevan y protejan la salud, esto ha incitado a que los países inviertan en insumos ya que lo actual fue insuficiente para poder responder a los desafíos que la pandemia trajo consigo, así mismo los países desarrollados como subdesarrollados puedan velar por su población y estar al tanto sobre cualquier situación que se pueda presentar y a su vez se afectada la salud pública.

Estructura general de SARS-CoV-2

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*. Son virus encapsulados con un diámetro entre 60-140 nm, tienen un ARN no segmentado, positivo y largo (27,9 kb y 30,1 kb).

El nombre de este virus fue dado debido a su alta correlación con otros coronavirus, relacionándolo con sus características perteneciente a la familia, se dice que su forma es semejante a una corona solar, con proyecciones de superficie, es de allí de donde proviene el nombre coronavirus. Existen otras características propias que hacen definir el tipo de virus, las proteínas son esenciales para poder definir la especie, dándole así el nombre propio *SARS-CoV-2*, esto debido a que sería una de tantas especies de la familia coronavirus.

El virus está formado por peplómeros con espigas virales que están relacionadas con su tropismo. Adicionalmente, los coronavirus presentan las proteínas de la cápsula, membrana y nucleocápside que constituyen sus estructuras básicas, como se observa en la Figura 1 (ver anexo).

Este es el séptimo coronavirus capaz de infectar a los humanos. Estos virus afectan al tracto respiratorio superior e inferior de niños y adultos donde ocasionan cuadros clínicos por distintas especies de coronavirus las cuales pueden ser leves (HKU1, NL63, OC43 y 229E) o muy severos (*SARS-CoV*, *MERS-CoV* y *SARS-CoV-2*).

Se reconocen cuatro géneros de coronavirus: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*

y *Deltacoronavirus*. El examen genealógico del SARS-CoV-2 reveló que pertenece al coronavirus del género betacoronavirus.

Estructuralmente los coronavirus son virus esféricos que miden entre 80 a 160 nanómetros de diámetro, con una envoltura de bicapa lipídica y que contienen genoma de ARN monocatenario (ssRNA) de polaridad positiva de entre 27 y 30 kilobases de longitud. El genoma del virus SARS-CoV-2 codifica 5 proteínas estructurales, las cuales están codificadas dentro del extremo 3' del genoma viral:

Glucoproteína S (espiga): La glucoproteína S trimérica es una proteína de fusión de clase I y media la unión al receptor del huésped.

Proteína E (envoltura): La proteína E transmembranal tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal y tiene actividad de canal iónico. La actividad del canal iónico en la proteína E del SARS-CoV no es necesaria para la replicación viral, pero sí podría serlo para la patogénesis. Facilita el ensamblaje y la liberación del virus.

Proteína M (membrana): Es la proteína estructural más abundante en el virión. Es una proteína pequeña con tres dominios transmembrana. Se sugirió que la proteína M existe como un dímero en el virión, y puede adoptar dos conformaciones diferentes, lo que le permite promover la curvatura de la membrana y unirse a la nucleocápside. Se cree que esta proteína le otorga la forma al virión.

Proteína N (nucleocápside): Se compone de dos dominios separados, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal, ambos capaces de unirse al ARN in vitro, pero cada dominio utiliza diferentes mecanismos para unirse al ARN.

Hemaglutinina-esterasa (HE): Está presente en un subconjunto de betacoronavirus. La proteína actúa como una hemaglutinina, se une a los ácidos siálicos en las glucoproteínas de superficie y contiene actividad acetil-esterasa. Se cree que estas actividades mejoran la entrada de células mediadas por la proteína S y la propagación del virus a través de la mucosa (Arandia Guzmán & Antezana Llaveta, 2020).

Entre estas cinco proteínas, las más importantes son la proteína N y la proteína S, donde la primera ayuda al virus a desarrollar la cápside y la estructura viral completa de manera apropiada y la última ayuda a la unión del virus a las células del huésped (Ver figura 2).

MANIFESTACIONES CLINICAS

El perfil clínico de la COVID-19 es variado, los casos leves y asintomáticos son los más frecuentes. En mayor grado se pueden encontrar infiltraciones pulmonares, y en los casos más severos se observa disnea a los cinco días. Los síntomas más frecuentes en el momento del internamiento son dolor de cabeza, faringalgia, neumonía, fiebre (88,7-91 %), tos seca (67,8 %), fatiga (51 %), náuseas y vómitos (5 %) y diarrea (3,8 %). Tales síntomas pueden incluir, posteriormente, linfocitopenia (83,2 %), trombocitopenia (36,2 %), leucopenia (33,7 %), aumento de la proteína C reactiva (PCR) y aceleraciones respiratorias repentinas originadas por la neumonía intersticial. A nivel local, la autoridad sanitaria ha señalado como principales síntomas la tos seca, fiebre y dificultad respiratoria.

En los casos más severos, la disnea (30 %) puede causar daño alveolar, insuficiencia renal y finalmente, la muerte. El tiempo de incubación del virus es 5 días en promedio, y su pico epidémico ocurre a los 7 días. La recuperación se da después de 13 días, pero se puede prolongar hasta 17 en pacientes con síntomas respiratorios. Sin embargo, la letalidad de la

enfermedad tiene una relación directa con la edad del infectado y con la presencia de comorbilidades como hipertensión (presente en el 17 %), diabetes (8 %), enfermedades cardíacas (5 %), especialmente las que se tratan con drogas promotoras de ACE2, y enfermedades respiratorias (2 %) o tuberculosis (Quiroz Carrillo, Pareja Cruz, & Valencia Ayala, 2020).

TIPO DE MUESTRAS.

Si bien sabemos el COVID 19 afecta vías respiratorias, causando diferentes síntomas que a su vez puede generar secreciones, unas de las tomas de muestra más significante serán a nivel de vías respiratoria superior, para el pronto diagnóstico, también va a varias de los días que el paciente tenga de estar enfermo. Además, varía el tipo de toma de muestra dependiendo de la presentación de la prueba que se esté usando y según las indicaciones del fabricante del kit.

Los tipos de muestra más comunes, donde se obtiene una mejor recolección y calidad de muestra para el diagnóstico es:

- Hisopado Nasofaríngea: toma una muestra del interior de la nariz hasta la parte posterior de la garganta, y sólo debe ser recolectada por un profesional de la salud capacitado
- Hisopado Orofaringea: toma una muestra de la parte media de la garganta (faringe) un poco más adentro de la boca, y sólo debe ser recolectada por un profesional de la salud capacitado (FDA de Estados Unidos, 2023) .

Sin embargo, el tipo de muestra de primera elección serán las muestras tomadas del tracto respiratorio superior. Lo cual debe colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral o universal (MTV) (INS de El Salvador, 2020).

TIPO DE PRUEBAS

Las pruebas virales han sido fabricadas para confirmar o descartar si una persona puede parecer de infección por el virus SARS-CoV-2. Se analizan muestras extraídas de nariz o boca de pacientes sospechosos. Todas las pruebas se deben realizar siguiendo los requisitos de la FDA.

Hay dos tipos principales de pruebas virales, según su origen:

- Las pruebas de Biología molecular: como las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y otras pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés), que detectan material genético llamado ARN del virus.
- Las pruebas de antígenos: Las pruebas de antígeno* son pruebas rápidas que suelen producir resultados en 15 a 30 minutos. Los resultados positivos son muy precisos y confiables. Sin embargo, en general, las pruebas de antígeno tienen menos probabilidades de detectar el virus que las pruebas de biología molecular, especialmente cuando no hay síntomas (CDC, 2023).

Después de conocer las diferentes clasificaciones de pruebas disponibles para el diagnóstico de covid-19. Nos centraremos en conocer sobre algunas de las pruebas diagnósticas de biología molecular más destacadas

DIAGNOSTICO DE COVID-19 BASADO EN BIOLOGIA MOLECULAR

El término “diagnóstico molecular” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular en beneficio de la salud humana, detectando y/o cuantificando secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o proteínas.

La detección y cuantificación específica de material genético en una muestra biológica ha mostrado un significativo impacto en todas las áreas de la salud, sobre todo en las áreas de las enfermedades infecciosas. El desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas, ha transformado al diagnóstico molecular en una herramienta clave para el equipo clínico en directo beneficio del paciente (Farfán PhD, 2015).

ENSAYOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES

RT-PCR en tiempo real (Retrotranscripción seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula (Vasquez Cordova, 2023).

Desde la creación del PCR, esta ha evolucionado para dar paso a otras modalidades existentes de PCR. Dentro de los tipos de PCR tenemos una muy importante utilizada para el diagnóstico de covid-19, llamada reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

o también conocida como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

La RT-PCR en tiempo real es un método nuclear que detecta la presencia de material genético específico de patógenos, como los virus. Inicialmente, el método utilizaba marcadores de isótopos radiactivos para detectar materiales genéticos específicos, pero, tras la incorporación de mejoras, el marcado isotópico se ha sustituido por marcadores especiales, que suelen ser colorantes fluorescentes. A diferencia de la RT-PCR convencional, que solo arroja los resultados al final, esta técnica RT-PCR EN TIEMPO REAL permite a los científicos observar los resultados de manera casi inmediata mientras el proceso sigue en curso (Jawerth, 2020).

Ensayo molecular de RT-PCR tiempo real.

El proceso de diseño de una prueba de ácido nucleico para SARS-CoV-2 implicó dos pasos principales:

1. Elección de la región a amplificar y diseño del cebador
2. Optimización y prueba del ensayo.

Corman y col. analizaron varias secuencias del genoma viral relacionadas con el SARS y descubrieron tres regiones que tenían secuencias conservadas: el gen RdRP, el gen E y el gen N. Los genes RdRP y E tenían una alta sensibilidad analítica para la detección (límite técnico de detección de 3,6 y 3,9 copias por reacción), mientras que el gen N presentaba una sensibilidad analítica más baja (8,3 copias por reacción).

Las etapas para las pruebas de RT-PCR, como el aprobado por los CDC y la OMS incluyen tres pasos principales: recolección y transporte de muestras, lisis y purificación del ARN y amplificación. Por lo general, se recolecta la muestra con hisopo nasofaríngeo-orofaríngeo y se las transfiere a un vial conteniendo unos pocos mililitros de medio de transporte viral, lo cual inactiva al virus, y de igual forma elimina ciertas sustancias como grasas y proteínas. De esta manera se transporta al laboratorio para su análisis. Luego, el ARN viral se purifica a partir de una fracción de la muestra usando kits de extracción y purificación de ARN basados ya sea en columnas o perlas magnética (Ayesa & Gómez Nidia, 2020, pág. 11).

De acuerdo a kbDNA, la extracción de ARN basada en columnas es una de las mejores técnicas entre las opciones disponibles y desempeña un papel vital en los métodos de intercambio iónico ya que proporciona una fase estacionaria robusta para un intercambio de buffer rápido y confiable y, por lo tanto, la extracción de ácidos nucleicos. Este método es rápido y reproducible y requiere de una centrífuga para su realización. Los sistemas basados en vacío también se pueden utilizar en lugar de la centrifugación para separar las impurezas. Los investigadores también pueden combinar el método de extracción orgánica con el método de columna giratoria para obtener un rendimiento de ARN mayor y más rápido. Este método es rápido (20 minutos) y apto para el procesamiento a gran escala y de alto rendimiento, incluidos los métodos automatizados. La contaminación por proteínas o ADN es posible si la cantidad de muestra es grande o permanece homogeneizada o lisada de manera incompleta. La lisis incompleta también puede conducir a bajos rendimientos de ARN viral. La automatización puede ser compleja y costosa debido a la necesidad de configurar sistemas de centrifugación o separación por vacío (AllSCIENCE , 2021)

Por otra parte, tenemos la extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN), mediante el método de perlas magnéticas se basa principalmente en hibridación complementaria entre el ácido nucleico y las perlas, para su posterior aislamiento medido por campos magnéticos. El proceso consta de 3 fases: unión, lavado y elución. A través de la unión selectiva de ADN en medios saturados con sales y su recuperación es fácilmente llevada a cabo por un imán. ¿Cómo funciona este proceso? Las muestras tomadas e inactivadas con el Medio de transporte, son dispensadas dentro de la placa con pocillos previamente llenado con los compuestos encargados de realizar la lisis y extracción de ácidos nucleicos.

La posterior separación requiere pasos de precipitación selectiva con aislamiento específico libre de nucleasas con tiocianato de guanidinio, combinado con etanol y como paso final enjuague con agua libre de RNAsas.

El traspaso entre pocillos de reacción es medido por un soporte que obtiene un momento magnético cuando se expone a un campo magnético, permitiendo su desplazamiento y su eliminación fácilmente utilizando un imán permanente. Esta es una forma rápida, simple y eficiente de separar las partículas después del paso de elución o unión nucleica y un método mucho menos riguroso que las técnicas tradicionales.

Las perlas magnéticas son la clave para desarrollar este método, su tamaño aproximadamente es entre 0.5 y 10 μm , sintetizadas a partir de biopolímeros, vidrio poroso o materiales magnéticos inorgánicos como el óxido de hierro. Son especialmente adecuadas para su afinidad con las moléculas de ácidos nucleicos. Además, son capaces de no retener magnetismo una vez el campo magnético haya sido eliminado, evitando así su aglutinamiento

entre ellas para asegurar una fácil suspensión de las partículas y una extracción uniforme de ácido nucleico (LABOMERSA, 2022).

Una vez que hemos purificado el ARN viral, el siguiente paso a seguir es la amplificación del ARN, lo cual es una técnica utilizada para amplificar los ácidos nucleicos empleando cantidades muy pequeñas de DNA o RNA y su finalidad es replicar múltiples veces al ácido nucleico de interés, lo que permite entonces detectar al microorganismo que se encuentra en cantidad de escasas o bajas en una muestra.

El ARN purificado eluído se amplifica utilizando una mezcla de un solo paso que contiene RT y ADN polimerasa, con tres cebadores dirigidos a regiones específicas del genoma viral, entonces, la RT-PCR crea una copia de ADNc de un segmento específico del ARN viral, que se convierte en ADN doble cadena que se amplifica exponencialmente. Los cebadores dirigidos a un gen humano, como RNaseP, también se incluyen como un control positivo para los pasos del hisopado, extracción de RNA y amplificación. Los productos amplificados se pueden detectar utilizando sonda TaqMan o colorantes que se intercalan con el ADN y se establece un ciclo umbral de amplificación para distinguir los resultados positivos de los negativos. El resultado de una prueba generalmente se considera positivo si se observa amplificación para dos o más targets virales, mientras que se considera negativo si se observa amplificación para el ARN control, pero no para ninguno de los target virales.

Las pruebas de diagnóstico molecular que utilizan la tecnología RT-PCR en tiempo real avalada por la OMS, van dirigidas a amplificar y detectar diferentes regiones genómicas de SARSCoV-2. En general, los laboratorios de referencias de varios países, están determinando los genes E, RdRP y RNAsaP por esta metodología. La RT-PCR se ha llevado a cabo

tradicionalmente como un procedimiento de uno o dos pasos. La RT-PCR en tiempo real, cuando usa el procedimiento de un paso, utiliza un solo tubo que contiene los cebadores necesarios para ejecutar toda la reacción de RT-PCR y es, generalmente, el enfoque preferido para la detección de SARS-CoV2; por ser rápido de configurar e implica un manejo limitado de la muestra, disminuyendo las posibilidades de errores de pipeteo y contaminación cruzada entre la RT y los pasos de PCR (Ayesa & Gómez Nidia, 2020, págs. 11-12).

La prueba diagnóstica más sensible y específica disponible por el momento con una sensibilidad del 85-90% y una especificidad de casi el 100% (99.5%), por lo que ha sido considerada la técnica de elección y referencia para el diagnóstico de la COVID-19 (Langa Laura, Valerio Sallent, & Roure Díez, 2021) .

Amplificación Isotérmica de ácidos nucleicos

La amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos es una alternativa que permite la amplificación a una temperatura constante y elimina la necesidad de un termociclador. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos basados en este principio, incluyen: amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Ayesa & Gómez Nidia, 2020, pág. 12).

Retrotranscripción seguida de reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP):

Varios laboratorios y empresas han desarrollado y probado clínicamente pruebas de RT-LAMP para SARS-CoV-2. La reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle

(LAMP), ya sea a partir de ADN o RT-LAMP usando RNA es una técnica de amplificación rápida de una secuencia target de un ácido nucleico utilizando oligos o cebadores específicos, y dos enzimas: una RT y una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de cadena, como la Bst pol. En las pruebas de diagnóstico de LAMP el producto amplificado se detecta por turbidez (detectando un subproducto de la reacción), por color (adición de un colorante sensible al cambio del pH) o por fluorescencia (adición de un marcador fluorescente).

Proceso de Amplificación

La amplificación de los ADN se realiza a través de repeticiones de reacciones de elongación que ocurren a través de las regiones de asa que se forman en la estructura original para la amplificación de LAMP. En la primera etapa de la reacción se utilizan los cebadores internos (FIP y BIP) y externos (F3 y B3).

Cada uno de los cebadores internos tiene una secuencia complementaria a una de las cadenas de amplificación de la región terminal 3' idénticos a la región interna de la misma cadena en el extremo 5'-terminal. La reacción de LAMP comienza cuando la secuencia F2 del primer FIP se alinea y se une a la secuencia blanco, la secuencia F1c del primer no es una secuencia complementaria y queda sin hibridar, entonces, la DNA polimerasa Bst sintetiza una primera cadena. En el espacio que quedó entre la secuencia blanco y F1c, la Bst desplaza la cadena y el primer F3 se alinea en su secuencia complementaria y a partir de aquí se sintetiza una nueva cadena, liberando la primera cadena sintetizada. En el extremo 3' de la cadena recién liberada, el primer BIP sigue el mismo proceso que FIP, la secuencia B2 del primer BIP alinea en la primera cadena liberada, la polimerasa sintetiza la cadena y B3 se alinea e inicia la copia de la cadena, liberando una segunda cadena, que contiene las regiones antisentido

en los extremos, por lo que se alinean entre ellos formando la estructura que posee los bucles o asas en ambos extremos (forma de pesas). De esta forma, los primers continúan alineándose con las regiones complementarias con reacciones de elongación que se repiten secuencialmente por la actividad de desplazamiento de cadena a una temperatura constante, formando diferentes estructuras de manera azarosa.

Proceso de Detección

Se han desarrollado varios ensayos de RT-LAMP para apuntar a diferentes regiones de genes de SARS-CoV-2 con fluorescencia o lecturas colorimétricas. Una estrategia para producir fluorescencia es usar Calceína, un complejo de fluoresceína. La fluorescencia de la Calceína se inhibe inicialmente cuando se une al manganeso. Los pirofosfatos generados a partir de las reacciones de amplificación de ADN secuestran el manganeso y liberan la calceína. La calceína libre puede unirse a los iones de magnesio, aumentando la intensidad de su emisión de fluorescencia. Usando Calceína, Yan et al. Desarrollaron un ensayo RT-LAMP para la detección visual de SARS-CoV-2. Identificaron correctamente 58/58 pacientes positivos y 72/72 negativos, confirmados con pruebas de RT-PCR paralelas. Este ensayo de RT-LAMP de los extractos de muestras de ARN de los pacientes solo requirió una incubación de 60 minutos a 63 ° C.

Las lecturas colorimétricas para técnicas de amplificación que utilizan polimerización enzimática también se pueden lograr utilizando indicadores de pH. Durante la síntesis de ADN, cada adición de un dNTP (desoxirribonucleósido trifosfato) libera un ión de hidrógeno que disminuye el pH de la solución. La disminución del pH es proporcional a la síntesis del ADN. Para la lectura visual de RT-LAMP, se utiliza rojo fenol, que cambia el color de rosa

(pH 8.8) a amarillo (pH <8.0) para indicar la aparición de amplificación. Después de una amplificación de 30 minutos a 65°C, RT-LAMP logró la detección de 200 copias de ARN de SARS-CoV-2 extraído de muestras de pacientes con COVID-19. El kit COVID 19-Neokit usa una RT-LAMP. La reacción de LAMP da como resultado, grandes cantidades de subproducto de iones pirofosfato que reaccionan con los iones Mg para formar el producto insoluble pirofosfato de magnesio. Dado que la concentración de iones Mg disminuyen a medida que avanza la reacción de LAMP se mide la concentración de iones de Mg como medida del progreso de la reacción. Para ello se utiliza azul de hidroxinaftol, en donde una reacción positiva se indica mediante un cambio de color de violeta a azul cielo (Ayesa & Gómez Nidia, 2020, págs. 15-18).

La sensibilidad y especificidad de la técnica RT-LAMP para detectar el gen N del SARS-CoV-2 mediante un set de cebadores previamente reportados (set de Broughton), arrojó valores de 0,97 (0,85-1,00) y 0,81 (0,65-0,92), respectivamente, con un intervalo de confianza del 95% (Biomedica, 2022).

Ventajas y desventajas de RT-LAMP Y RT-PCR con respecto al procedimiento analítico.

Ventajas de RT-PCR en tiempo real

- Amplificación simultánea y la detección durante exponencial amplificación
- Nos ayuda a monitorear desde una perspectiva diferente en tiempo real de la amplificación.
- Nos da un resultado cuantitativo, por tanto, son útiles, principalmente para el seguimiento de la carga viral.

- Aumento de la sensibilidad debido a la química fluorescente, de tal manera nos hace que los procedimientos sean más viables, siendo así útil para un mejor diagnóstico de ciertas espécimen.
- Nos otorga un alto rendimiento analítico debido al software de operación impulsada.
- El uso adecuado de esta prueba nos permite obtener resultados con características que son importantes para el diagnóstico, y esta son:
 - Nos permite obtener una alta reproducibilidad
 - El proceso es confiable.
 - El procedimiento nos permite obtener resultados con un buen margen de exactitud y precisión.

Desventajas de RT-PCR en tiempo real

- Requiere de muchos procesos, que puede llegar a ser tedioso.
- Requiere de personal extremadamente capacitado para el uso adecuado de los equipos y su operación, y del buen manejo de las técnicas a emplear.
- Tiempo del proceso, largo donde se requiere en ocasiones de un día o más para obtener un resultado.
- Se requiere de infraestructura adecuada para poder operar de equipos de biología molecular.
- Equipos e insumos, muy costosos.
- Se restringe el uso de estas pruebas para aquellos laboratorios que no tienen un apoyo financiero adecuado.
- Existe alta probabilidad de falsos positivo, debido al error humano provocado por la mayor manipulación de procesos manuales.

Ventajas de RT-LAMP

- Unas de las principales ventajas es que la amplificación del gen se da sin requerir termociclador.
- La amplificación puede ser logrado con baño de maría / bloque de calentamiento
- Es una prueba altamente sensible y específico debido a que usa un mayor número de cebadores.
- Bajo costo.
- Reacción rápida de 1-2 horas.
- El enfoque es simple de operar, fácil de visualizar para la detección
- Su lectura es simple a la vista, y se monitorea ya sea a través de la turbidez o cambio de color por intercalante fluorescente colorante (SYBR Green I)
- No requiere de un personal extremadamente capacitado a comparación con el método RT-PCR.
- En ocasiones pueden ser útiles para trabajo de campo debido a su fácil manejo de equipo.

Desventajas de RT-LAMP

- Diseño complicado de cebadores (requisito para seis cebadores).
- Dos largos cebadores de Pureza de grado HPLC
- Restringido a la disponibilidad de reactivos y equipos en algunos países.

- Pueden existir falsos positivos debido a impurezas de las muestras que no han sido extraídas.
- Es una prueba cualitativa, por lo que solo nos indica resultados positivos o negativo (Biomedica, 2022).

CONCLUSIONES

El virus SARS-CoV-2 corresponde a un nuevo betacoronavirus que se considera un virus emergente en la población mundial. Conocer la estructura y replicación del virus resulta esencial para conocer los aspectos patológicos del mismo. Hasta la fecha, el SARS-CoV-2 ha infectado a millones de personas y ha afectado miles de millones de vidas. La comprensión de la enfermedad y su fisiopatología en pacientes con COVID-19 ha evolucionado, y los científicos deben continuar realizando investigaciones para siempre estar al día con respecto a cualquier cambio que pueda perjudicar el correcto diagnóstico a través de las pruebas ejecutadas hasta ahora.

Al día de hoy el diagnóstico de COVID-19 se debe realizar a través de métodos moleculares, vigilando el cumplimiento de la de cada etapa analítica con la finalidad de minimizar los falsos negativos. Sin embargo, las técnicas que detectan antígenos son prometedoras, pero falta evaluación local. Las pruebas serológicas que lograrán un desempeño satisfactorio serán de utilidad para pacientes con síntomas respiratorios pero que no consultan en la fase inicial o aguda. Y, en un futuro, van a ser fundamentales para conocer el estatus inmunitario de la población. Por lo tanto, surge la necesidad de poder establecer un diagnóstico preciso que nos indique fiabilidad, confianza, sin importar la presencia de sintomatología del paciente para dicha detección del microorganismo de interés, así mismo de conocer el estado actual o evolución e incluso la carga viral que puede estar presentando el usuario que consulta, ahora bien, los análisis de biología molecular nos dan mucha más información del usuario, más allá de solo conocer el estatus inmunológico.

El área de la medicina clínica, a lo largo de estos últimos años, desde la pandemia por Covid-19 junto al sector de la biología molecular se han encontrado en una encrucijada con el objeto de encontrar una forma diagnóstica confiable, rápida y precisa, a través de pruebas moleculares. En gran medida se han desarrollado diferentes pruebas para el diagnóstico para Covid-19.

Tomando en cuenta que existen diferentes técnicas para dar diagnóstico de Covid-19, podemos encontrar entre las pruebas que existen, que hay ciertas pruebas de biología molecular más destacada una que otra, esto debido al nivel de confianza, al nivel de sensibilidad, y así mismo al nivel de especificidad que cada una de las pruebas no dan, en base a esto podemos observar dos tipos de pruebas sobresalientes e importantes a nivel molecular para hacer diagnóstico, entre ellas están, RT-PCR Y RT-LAMP.

Como lo descrito en este ensayo, existe un método de amplificación (RT-LAMP) que a evolucionado a lo largo de estos últimos años lo cual es competitivo con la RT-PCR y que se ha beneficiado de la simplificación proporcionada por el enfoque isotérmico. Los métodos isotérmicos son pruebas de la nueva era donde son particularmente adecuados para el desarrollo de una nueva generación de dispositivos de diagnóstico para aplicaciones de medicina de precisión, como también en entornos con recursos limitados. Es decir que han sido elaborados con el objetivo de ser aplicados en esos lugares donde los recursos económicos han sido limitados para el establecimiento de salud, ya que por su fácil aplicación y fácil manejo no necesita áreas especializadas ni infraestructura ideada únicamente para el laboratorio de biología molecular, ya que son pruebas muy prácticas, a esto podemos agregar que el personal solo necesita una capacitación simple a comparación de los equipos utilizados para el área diagnóstica a través RT-PCR.

La implementación de estas técnicas para diagnóstico han tenido un auge mayor de lo esperado, se observa un gran potencial con el desarrollo de técnicas y dispositivos aplicados a nuevos test de diagnósticos de uso en laboratorios de biología molecular, La técnica RT-LAMP se ha considerado una prueba diagnóstica rápida, de fácil ejecución, libre de equipos sofisticados, sensible y específica, para el diagnóstico del SARS-CoV-2 principalmente en muestras de hisopados nasofaríngeos. Sin embargo, seguirá siendo de mayor importancia y aun llamado estándar de oro el RT-PCR, por el simple hecho de la cantidad de información que esta prueba nos arroja sobre un diagnóstico específico, aparte del nivel de confianza, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad que nos da a la hora de hacer un diagnóstico certero para covid-19.

FUENTES DE INFORMACION

1. AllSCIENCE . (23 de Agosto de 2021). Extracción de arn mediante columnas giratorias (spin columns) de sílice. Recuperado de AllSCIENCE Ciencia, Tecnología y Ambiente: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/como-encontrar-un-metodo-de-extraccion-de-arn-que-funcione-para-tu-laboratorio>
2. Arandia Guzmán, J., & Antezana Llaveta, G. (16 de Septiembre de 2020). ARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. Recuperado de Scielo: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009
3. Ayesa, M. F., & Gómez Nidia, N. &. (Septiembre de 2020). Pruebas moleculares diagnósticas de SARS-COV-2: fundamentos. Recuperado de Revista Bioanálisis: <http://revistabioanálisis.com/images/flippingbook/Rev%20105n/nota%201.pdf>
4. Biomedica. (31 de Octubre de 2022). Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2. Recuperado de National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9683688/>
5. CDC. (25 de Septiembre de 2023). Pruebas de detección del COVID-19: información importante. Recuperado de Centros para el Control y Prevención de Enfermedades: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html>
6. Farfán PhD, B. M. (2015). BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. Recuperado de REV. MED. CLIN. CONDES (ScienceDirect): <https://pdf.sciencedirectassets.com/312299/1-s2.0->

- Peru, Horizonte medico (Lima):
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2020000200011
13. Vargas Acuña, G. (Octubre de 2004). *Escuela de Ciencias del Lenguaje, ITCR* .
 Recuperado de Redacción de Documentos Científicos, Informes Técnicos, :
<http://www.cientec.or.cr/concurso2/concepto.html>.
14. Sandhya Pruthi, M. y. (23 de Julio de 2023). Enfermedad del coronavirus (COVID-19). Recuperado de MAyo Clinic: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/coronavirus/symptoms-causes/syc-20479963>
15. Valdecilla. (21 de Mayo de 2021). Servicio de Microbiología. Recuperada de Guia para una correcta interpretacion de las pruebas de diagnostico de covid-19 :
https://www.scsalud.es/documents/2162705/9267191/guia_para_la_interpretacion_de_pruebas_microbiologicas_covid19_v2_2152020-Wcy5s66L.pdf/b7459900-e382-2f60-9297-c915b2e86c56
16. Vasquez Cordova, R. C. (Mayo de 2023). Generalidades de la PCR. Recuperado de Laboratorio de Vigilancia en Salud Pública:
https://campus.ues.edu.sv/pluginfile.php/8070914/mod_resource/content/1/CLASE%204%20GENERALIDADES%20PCR%20MOD%203.2023%20Ruth%20Vasquez.
17. Instituto Nacional del Cáncer . (mayo de 2020). *NIH*. Recuperada de Retrotranscripción:

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/retrotranscripcion>

18. Martínez, V. M. (Mayo de 2006). *Revista del Centro de Investigación*. Recuperada de Guía para la elaboración de ensayos de Investigación:

<https://www.redalyc.org/pdf/342/34202605.pdf>

ANEXOS

Figura 1: Estructura de un coronavirus

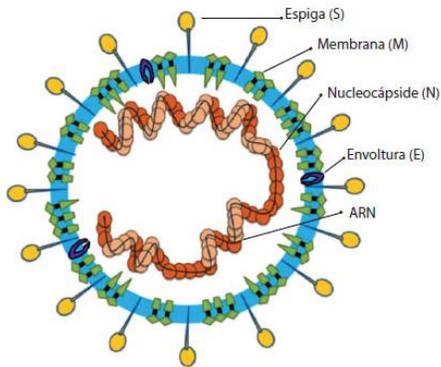


Figura 2: Estructura de SARS-CoV-2, virus causante de COVID-19 con sus proteínas estructurales correspondientes

