

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



**COVID-19: DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA EN TIEMPO REAL, EN EL  
SALVADOR, EN EL MES DE JULIO DE 2023**

Presentado por:

VANESSA LISSETTE ARRIAGA PAREDES.

Para optar al grado de:

LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO.

Asesor.

LICDA. YENI ELIZABETH PAZ ROMERO.

Ciudad Universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, agosto, 2023.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.**

**Rector.**

Msc. Roger Armando Arias.

**Vicerrector Académico.**

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López.

**Vicerrector Administrativo.**

Ing. Juan Rosa Quintanilla.

**Secretario/a General.**

Ing. Francisco Antonio Alarcón.

**AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA.**

**Decana.**

MsC. Josefina Sibrián de Rodríguez.

**Vicedecano.**

Dr. Saúl Díaz Peña.

**Secretaria.**

MsC. Aura Marina Miranda de Arce.

**Director de Escuela.**

MsC. José Eduardo Zepeda Avelino.

**Directora de Carrera.**

MsC. Miriam Cecilia Recinos De Barrera.

## CONTENIDO

<b>AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.</b> .....	ii
<b>AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA.</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>INTRODUCCIÓN.</b> .....	viii
<b>DESARROLLO</b> .....	1
<b>CONCLUSIONES</b> .....	16
<b>FUENTES DE INFORMACIÓN</b> .....	18

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios,**

Por darme la fortaleza y sabiduría para poder culminar esta carrera.

### **A mis padres,**

Por apoyarme siempre en cada momento durante este largo camino y enseñarme que todo proceso implica un gran esfuerzo.

### **A mis hermanos,**

Por enseñarme siempre que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos y que solo aquel que se esfuerza más logra salir adelante.

### **A mis docentes,**

Por tener la paciencia y el carisma para poder enseñarme de la mejor manera, siempre recordaré a cada uno de ellos.

### **A mis compañeros y amigos.**

En esta carrera aprendí el verdadero valor de la amistad y que todo es más fácil si te rodeas de personas que te motiven para seguir luchando cada día. Gracias a cada uno de ellos, ahora formar parte de mi vida.

*Vanessa Lissette Arriaga Paredes.*

## RESUMEN

En diciembre de 2019 han sido descritos los primeros casos de infección respiratoria de coronavirus (CoV) con centro epidemiológico en el mercado público de Huanan, en Wuhan, provincia de Hubei, en China. Desde entonces, los casos se multiplicaron exponencialmente diseminándose por el mundo. El SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario del género betacoronavirus, de sentido positivo, familia Coronaviridae; poseen envoltura, son altamente diversos y causan trastornos respiratorios, digestivos, hepáticos y neurológicos de severidad variable. El genoma del virus SARS-CoV-2 codifica 5 proteínas estructurales: glucoproteína S, proteína E, proteína M, proteína N, Hemaglutinina-esterasa (HE). El virus es altamente contagioso y se propaga por vía de gotitas, contacto directo y aerosoles. Para dar respuesta oportuna a la nueva enfermedad según la OPS/OMS la confirmación habitual de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR inmediata; siendo esta una técnica de Biología Molecular. El virus SARS-CoV-2 por ser ARN necesita una conversión a ADN; esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. La técnica de PCR es un proceso largo de múltiples pasos para lo que se usa un equipo llamado Termociclador en el que se realizan todas las etapas de la PCR (desnaturalización, amplificación y elongación final); previo a estas etapas es necesario extraer los ácidos nucleicos de las células, esto se hace a través de un proceso conocido como extracción. Para el diagnóstico de COVID-19 a través de RT-PCR se detectan genes específicos, pero además se debe tener en cuenta el periodo de incubación del virus para obtener un diagnóstico eficaz de la enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** COVID-19, SARS-CoV-2, Biología Molecular, PCR, RT-PCR.

## **ABSTRACT.**

In December 2019 have been described the first cases of respiratory infection by coronavirus (CoV) with epidemiological center in the public market from Huanan, of Wuhan, in Hubei province, China. Since then, cases multiplied exponentially, spreading around the world. SARS-CoV2 is a single stranded ARN virus of the beta coronavirus genus, with positive sense, of the Coronaviridae family; they are enveloped, highly diverse and causes respiratory, digestive, hepatic and neurological disorders with variable severity. The SARS-CoV2 virus genome encodes 5 structural proteins: S glycoprotein, E protein, M protein, N protein and hemagglutinin-esterase (HE). The virus is highly contagious and spreads via droplets, direct contact and aerosol sprays. To give timely response to the new disease according to OPS/OMS, the usual confirmation of COVID-19 cases are based on the detection of the viral nucleic acid (ARN) through immediate RT-PCR assays, a molecular biology technique. The SARS-CoV2 virus, because is ARN, needs a conversion into ADN, this conversion is achieved through a reaction known as reverse transcription and controlled by the reverse transcriptase enzyme, wich is capable to convert ARNm into a molecule of ADNc. The PCR technique is a long process of multiple steps that uses an equipment called Termal cycler in wich all the steps of PCR are performed (denaturation, annealing and final extention). Prior to these stages, to extract the nucleic acid from the cells is needed, this is made in a process known as extraction. For the COVID-19 diagnosis through RT-PCR specific genes are detected, but also should consider the virus incubation period, to get an effective diagnosis of the disease.

**KEYWORDS:** COVID-19, SARS-CoV2, molecular biology, PCR, RT-PCR

## INTRODUCCIÓN.

El COVID-19 es una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario del género beta-coronavirus, de sentido positivo, familia Coronaviridae; poseen envoltura, son altamente diversos y causan trastornos respiratorios, digestivos, hepáticos y neurológicos de severidad variable en un amplio rango de especies animales, incluyendo al ser humano, en quien pueden causar enfermedades graves. El virus es altamente contagioso y se propaga por vía de gotitas, contacto directo y aerosoles. En la transmisión ambiental y fómites se ha encontrado que la vida media del SARS-CoV-2 puede ser de 1.2 horas en gotas, 3 horas en aerosol, hasta 24 horas en cartón y hasta 72 horas en plástico y acero inoxidable; esto debe llevar a adoptar medidas estrictas de higiene de manos y manejo de fómites.

En diciembre de 2019 han sido descritos los primeros casos de infección respiratoria por una nueva estirpe de coronavirus (CoV) con centro epidemiológico en el mercado público de Huanan, en Wuhan, provincia de Hubei, en China. Desde entonces, los casos se multiplicaron exponencialmente diseminándose por el mundo. A 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de Salud ha declarado estado de pandemia mundial, con casos documentados en casi todos los países del mundo. El manejo de la pandemia por COVID-19 involucró un enorme esfuerzo de los equipos de salud en todo el mundo, que han visto sobrepasada sus capacidades, obligando a los gobiernos a promover un trabajo coordinado entre las instituciones públicas y privadas para afrontar la pandemia. Para dar respuesta oportuna a la nueva enfermedad según la OPS/OMS “la confirmación habitual de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR inmediata”.

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la



secuencia blanco es copiada fielmente. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $Mg^{+}$ ), una solución amortiguadora o buffer y  $H_2O$  (libre de nucleasas). Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. El diagnóstico de laboratorio de COVID-19 se basa en un resultado positivo de una RT-PCR que puede involucrar uno o más genes virales y un gen de referencia humano. Las muestras recomendadas para el diagnóstico son muestras del tracto respiratorio tales como hisopados nasofaríngeo y/u orofaríngeo. Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARSCoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. El gen E es el más utilizado para el cribado y para el diagnóstico de certeza, el gen RdRp (estudio de confirmación) y el gen N (estudio adicional de confirmación). La estrategia más eficiente para confirmar la COVID-19 en pacientes sospechosos debe combinar los resultados de la RT-PCR en tiempo real con los datos clínicos y epidemiológicos, que incluyan la probabilidad de exposición, los síntomas y signos, y los hallazgos de laboratorio.

## **DESARROLLO.**

### **INICIO DE LA PANDEMIA DE COVID-19**

En diciembre de 2019 han sido descritos los primeros casos de infección respiratoria por una nueva estirpe de coronavirus (CoV) con centro epidemiológico en el mercado público de Huanan, en Wuhan, provincia de Hubei, en China. Desde entonces, los casos se multiplicaron exponencialmente diseminándose por el mundo. Fue el 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de Salud ha declarado estado de pandemia, con casos documentados en casi todos los países del mundo.

El virus recibió el nombre de SARS-CoV-2 por su homología genética con el coronavirus del síndrome respiratorio aguda severo (SARS-CoV) responsable por una epidemia de grande escala en Asia en 2003. Y fue así como se llamó tras la sigla inglesa COVID-19 (CoronaVirus Disease identificado el año 2019).

### **GENERALIDADES DEL VIRUS QUE CAUSA EL COVID-19**

Se sabe que el SARS-CoV-2, es origen zoonótico; se deriva probablemente de un coronavirus de murciélago, cuyo reservorio principal podría ser las serpientes de la zona de Wuhan, China.

Este virus es altamente contagioso y se propaga por vía de gotitas, contacto directo y aerosoles, puesto que la transmisión es ambiental y fómites en estos la vida media del SARS-CoV-2 puede ser de 1.2 horas en gotas, 3 horas en aerosol, hasta 24 horas en cartón y hasta 72 horas en plástico y acero inoxidable; esto debe llevar a adoptar medidas estrictas de higiene de manos y manejo de fómites.

¿Entonces que características tiene esta enfermedad? presenta características inherentes que le otorgan su alto potencial de infección, transmisibilidad y desenlaces desfavorables ocasionando una pandemia de alto impacto mundial. Según la OMS la mayoría de las personas infectadas

desarrollarán una enfermedad de leve a moderada y se recuperarán sin necesidad de hospitalización y los síntomas se pueden clasificar como: síntomas más comunes: siendo estos la fiebre, tos, cansancio, pérdida del gusto o el olfato; síntomas menos comunes: dolor de garganta, dolor de cabeza, dolores y molestias, diarrea, erupción en la piel o decoloración de los dedos de las manos o pies, ojos rojos o irritados y Síntomas graves: dificultad para respirar o falta de aire, pérdida del habla o la movilidad, o confusión, dolor en el pecho. OMS,2023.

### **ESTRUCTURA, REPLICACIÓN Y FISIOPATOLOGÍA DEL VIRUS.**

En lo que a la estructura del virus se refiere, el SARS-CoV2 es un virus ARN monocatenario del género beta-coronavirus, de sentido positivo, familia Coronaviridae; poseen envoltura. Se conocen siete especies de esta familia que pueden causar infecciones en humanos, de las cuales cuatro causan principalmente síntomas respiratorios leves y tres pueden desencadenar una enfermedad potencialmente fatal, como el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), el síndrome respiratorio del Oriente medio (MERS) y COVID-19.

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 con una longitud de entre 27 y 30 kilobases. Gracias a las proteínas de superficies que observadas al microscopio electrónico son semejantes a una corona solar (con proyecciones de superficie) es que se les atribuyó el nombre a los virus. 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. La glucoproteína S es escindido por una proteasa similar a la furina de la célula huésped en dos polipéptidos separados denominados S1 y S2. S1 constituye el gran dominio de unión al receptor de la proteína S, mientras que S2 forma el tallo de la molécula espiga.
- **Proteína E (envoltura):** La proteína E transmembranal tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal, 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. La proteína N también está muy fosforilada, y se ha sugerido que la fosforilación desencadena un cambio estructural que mejora la afinidad por el ARN viral versus el no viral. La proteína N se une al genoma viral en una conformación de tipo perlas en una cuerda.
- **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. Entre estas cinco proteínas, las más importantes son la proteína N y la proteína S, debido a que 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.

En cuanto a la replicación del virus, una vez que ha ingresado a la célula huésped, este inicia el proceso de replicación; el genoma del virus contiene un gran gen replicasa que dará lugar a proteínas no estructurales (Nsps), seguido de genes estructurales y accesorios. Este gen replicasa codifica dos marcos de lectura abiertos (ORF), rep1a y rep1b, que se traducen en dos poliproteínas (pp1a y pp1ab); estos polipéptidos son procesados por dos proteasas virales: la proteasa tipo 3C (3CLpro) y la proteasa tipo papaina. La escisión produce 15 o 16 Nsps virales que se ensamblan en un gran complejo unido a membrana y exhiben múltiples actividades enzimáticas.

El genoma de ARN de cadena positiva se usa como plantilla para producir la cadena negativa. Las enzimas codificadas por el gen replicasa usan el ARN negativo como plantilla para desarrollar segmentos de ARN mensajero (ARNm) superpuestos que se traducen en las proteínas estructurales. Se cree que la fabricación de estas moléculas individuales de ARN podría favorecer sucesos de recombinación entre genomas víricos y diversidad genética.

Y es así como en el proceso de replicación dentro del huésped humano, la proteína N del virus se une al genoma, mientras que la proteína M se asocia con las membranas del retículo endoplásmico (RE). Posteriormente el ARN mensajero y las proteínas de nucleocápside se combinan para formar los viriones. Las partículas virales se dirigen al complejo intermediario retículo endoplásmico-aparato de Golgi y desde este compartimiento las vesículas que contienen

los viriones se dirigen a fusionarse con la membrana plasmática, armando así las partículas virales completas que al ser liberadas pasan a infectar nuevas células.

Cuando hablamos de la fisiopatología es importante tener en cuenta que un número de enfermedades o condiciones pre-existentes son consideradas comorbilidades de la enfermedad COVID-19, primordialmente porque comparten aspectos fisiopatológicos con el cuadro clínico desarrollado por el virus.

Dado que el SARS-CoV-2 se transmite por el aire en forma de aerosoles o gotas microscópicas es de esperar que tenga tropismo por tejidos de la cavidad nasofaríngea y las vías respiratorias, tropismo dado por la expresión de ECA2 (enzimas convertidoras de angiotensina 2) en estos tejidos. La infección del sistema respiratorio por SARS-CoV-2 ocurre en tres fases. La primera sucede en la cavidad nasofaríngea, infectando algunos tipos celulares, pero no genera una respuesta inmune muy vigorosa, y es generalmente el tipo de infección que cursan los asintomáticos. La segunda fase implica la infección de las vías respiratorias mayores, bronquios y bronquiolos; que se manifiesta con síntomas de inflamación pulmonar y puede cursar con o sin hipoxia. Y la tercera fase implica la infección de las estructuras de intercambio gaseoso, los alvéolos, los cuales están formados principalmente por dos tipos celulares de origen epitelial llamados neumocitos tipo I y II. La homeostasis pulmonar se mantiene mediante una red de células residentes que incluyen células epiteliales, endoteliales y leucocitos. Las macrófagos alveolares residentes y las células epiteliales forman una barrera crítica en el pulmón. La infección de un neumocito tipo II determina un cambio en el perfil de expresión génica, incluyendo un aumento en la expresión de genes asociados a la respuesta antiviral como son interferones y ciertas interleuquinas, y disminución en la expresión de genes encargados de la producción del surfactante. Estas señales activan células del sistema inmune residentes en los

alvéolos, como son los macrófagos, y reclutan otras, como son neutrófilos, que trasvasan desde la circulación. Una característica de la infección por SARS-CoV-2 es que las células infectadas pueden desarrollar una alta carga viral y desencadenar un programa de muerte celular llamado piroptosis, que involucra la liberación masiva de mediadores inflamatorios, lo cual aumenta exponencialmente el daño de los neumocitos tipo I, con la consiguiente rotura de la barrera alveolar y la infiltración de componentes proteicos y celulares del plasma. El alveolo dañado por la respuesta inmune comienza a llenarse de una mezcla de exudado del vaso, células muertas, partículas virales, células inflamatorias, fibrina, entre otros, aumentando el volumen del intersticio entre vaso y alveolo. Como consecuencia, se compromete la capacidad de intercambio gaseoso, generando en última instancia la disfunción respiratoria asociada que da nombre al cuadro clínica “SARS”, síndrome respiratorio agudo grave.

#### **DIAGNÓSTICO POR MEDIO DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

El manejo de la pandemia por COVID-19 involucró un enorme esfuerzo de los equipos de salud en todo el mundo, que han visto sobrepasada sus capacidades, obligando a los gobiernos a promover un trabajo coordinado entre las instituciones públicas y privadas. Para dar respuesta oportuna a la nueva enfermedad según la OPS/OMS “la confirmación habitual de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR inmediata”.

#### **GENERALIDADES DE LA PCR.**

Antes de iniciar con la descripción de la técnica RT-PCR es importante recordar las generalidades de la PCR; comenzando con los orígenes la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que fue descrita en el año 1986 por Kary Mullis como una amplificación enzimática específica de ADN realizada in vitro, es decir, que amplifica millones de veces una secuencia

específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés).

Antes de iniciar los ciclos de la PCR, se debe aislar el ADN de la muestra tomada, de una forma manual o automatizada. Esto dependerá del laboratorio y sus recursos. Por lo general, este es un proceso largo de múltiples pasos.

Este proceso consiste en tres etapas consecutivas: disgregación de las células o tejidos (lisis celular), inactivación de las nucleasas intracelulares y en separación de los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares.

Detallando un poco más las etapas de extracción, durante la lisis celular se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos del núcleo celular. La lisis se lleva a cabo mediante una solución salina que suele contener detergentes que desnaturalizan las proteínas y/o proteasas. Una vez separados los ácidos nucleicos de las proteínas y lípidos se lleva a cabo su purificación.

Los métodos de purificación presentan una gran variabilidad y están desarrollados en función de las propiedades físico-químicas de las moléculas de ADN y ARN, algunos de estos métodos son:

- Adsorción en columna de sílice: En presencia de ciertas sales los ácidos nucleicos quedan retenidos por adsorción en columnas de sílice. Posteriormente las columnas se lavan con soluciones salinas que eliminan las partículas que no se han unido y finalmente los ácidos nucleicos son eluidos con agua o una solución con una baja concentración de sales.



- Separación magnética: En este método las muestras lisadas se mezclan con esferas magnéticas con capacidad de unirse a los ácidos nucleicos. Tras una serie de lavados para conseguir la máxima purificación del material genético las esferas son retiradas de la solución mediante un separador magnético.

Para una mejor comprensión de la técnica de PCR primero se detallarán los elementos y componentes para llevar a cabo la reacción como son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $Mg^{+}$ ), una solución amortiguadora o buffer y  $H_2O$  (libre de nucleasas). Todos estos elementos interactúan en las tres etapas principales de las que se compone la PCR.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Recordemos que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. Para que la enzima

funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg<sup>+</sup>, buffer y H<sub>2</sub>O.

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia; si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente).

Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

Una vez aislado el ADN diana, se inician los ciclos de PCR. En cada ciclo de la PCR se duplica al ADN diana, se trata de una reacción exponencial donde se generan más de mil millones de copias del ADN original en de 30 a 40 ciclos de PCR. Esta técnica se realiza en un equipo termociclador (los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las

condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos) y consta, generalmente, de tres etapas:

**Desnaturalización.** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T.

**Hibridación de los partidores** (y la sonda si es PCR de tiempo real) a una temperatura que oscila entre 45°C-65°C (que depende del contenido y proporción de nucleótidos de los partidores). En esta etapa ocurre la hibridación de los partidores específicos con su región complementaria en el templado. La temperatura de esta etapa es variable, y es dependiente de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los partidores. En el caso de la PCR de tiempo real realizada con sondas TaqMan (las más comunes), esta etapa generalmente se realiza a 60°C e incluye la hibridación y elongación junto con la lectura de la fluorescencia.

**Elongación.** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Una vez finalizada la reacción en el termociclador, se obtienen millones de copias de amplicones. Si ha ocurrido contaminación durante la preparación de la PCR, podrían obtenerse amplicones

inespecíficos, es decir, que no correspondan al ADN diana requerido, o bien falsos positivos por contaminación con templado o amplicones, alterándose la confiabilidad de los resultados.

En el caso de la PCR en tiempo real; el término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. A diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados es los sistemas basados en reporteros fluorescentes. Este sigue el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o «quencher»; en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia.

No es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra, el análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación génica. Para ello, los termocicladores están proveídos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos

necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva melting que muestra información sobre la especificidad de la reacción.

La PCR es una técnica rápida y versátil, convirtiéndose hasta la fecha en una técnica comúnmente utilizada en diversos laboratorios. Tiene ventajas tales como requerir una cantidad mínima de templado en la reacción, el cual no necesariamente debe estar puro, permitiendo una fácil y rápida obtención de resultados. Sin embargo, la experiencia ha permitido identificar una gran limitante, como es la alta susceptibilidad de contaminación en alguna de las etapas de la técnica: la extracción del templado, la preparación de reactivos, la dispensación o carga del templado.

Para minimizar este problema existen ciertas condiciones que deben ser controladas, tales como: separar áreas de trabajo contaminadas con templado de aquellas áreas libres de él con sets independientes de equipamiento que no se deben compartir entre áreas (micropipetas, gradillas, delantales, guantes, toalla absorbente, alcohol, lápices marcadores, microtubos, minicentrífugas, refrigeradores, etc) y mantener un flujo unidireccional de trabajo desde las áreas más limpias hacia las más sucias.

### **DIAGNÓSTICO USANDO RT-PCR.**

En El Salvador el Laboratorio Nacional de Salud Pública con capacidad de diagnóstico molecular implementó para la detección del virus SARS-CoV-2 causante de COVID-19, mediante la detección de ácido nucleico viral RT-PCR en tiempo real en muestras de hisopos de nariz y / o garganta. El diagnóstico de laboratorio de COVID-19 se basa en un resultado positivo de una RT-PCR que puede involucrar uno o más genes virales y un gen de referencia humano. Las muestras más usadas y recomendadas por los Centers for Disease Control and Prevention

(CDC) por su rentabilidad diagnóstica son las nasofaríngeas seguidas de las orofaríngeas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda recoger ambas muestras en el mismo tubo con el fin de aumentar la carga viral. Se han obtenido resultados positivos de la RT-PCR en infectados tanto en muestras respiratorias

El proceso de diagnóstico comienza con el traslado de las muestras que deben estar en triple envase en contenedores homologados bajo normativa de “Sustancia biológica clase B (UN3373)” y se transportan a 4 °C; las áreas de trabajo que aseguran el correcto manejo de las muestras, está el área sucia para recepción, registro, desembalaje e inactivación de las muestras y el área limpia, para la extracción del ARN y realización de RT-PCR. Los envases de las muestras deben ser abiertos dentro de cabinas de seguridad biológica tipo 2 (CSB-II). Independientemente del protocolo de extracción a utilizar, las muestras deben ser mantenidas refrigeradas hasta la extracción.

La técnica de RT-PCR, también conocida como PCR con transcriptasa inversa, esta es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa que normalmente mide los niveles de expresión del ARN. En RT-PCR, el ADN complementario (ADNc) se produce mediante la transcripción inversa de las plantillas de ARN con la enzima transcriptasa inversa. Esta técnica se utiliza para estudiar cualitativamente la expresión génica y se puede combinar con la PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de ARN. La RT-PCR requiere una plantilla de ARN, una enzima, nucleótidos, tampones y termociclador para producir productos de RT-PCR. El aumento exponencial en las copias de ADN se ve reflejado en la aparición de fluorescencia cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ARN en la muestra, haciendo que esta reacción sea altamente sensible a bajas concentraciones de ácidos nucleicos virales.

En cuanto al proceso de extracción cuantitativa de ácidos nucleicos con alta pureza a partir de muestras complejas es el requisito previo para ensayos de RT-PCR eficientes y es un paso crucial en el uso de técnicas moleculares para la detección eficiente de virus en muestras clínicas. Actualmente se utilizan dos métodos principales de extracción de ARN previo a la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2: la cromatografía de columna y la aplicación de partículas magnéticas.

Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARSCoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. El gen E es el más utilizado para el cribado, el gen RdRp (estudio de confirmación) y el gen N (estudio adicional de confirmación). En la reacción también se incluyen cebadores que amplifican el gen de alguna proteína humana, que sirva como control de la calidad de la toma de muestra y del proceso de aislamiento del material genético.

La sensibilidad de la RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2 depende de la carga viral, del día de la infección en que se toma la muestra y de que esta sea de vías respiratorias altas o bajas. También influyen otros factores como el correcto hisopado, su conservación y transporte al laboratorio en condiciones adecuadas. A toda persona con sospecha de infección por el SARS-CoV-2 se le debe realizar una RT-PCR en las primeras 24 horas. Si la prueba resultara negativa y hubiera alta sospecha clínica de COVID-19 se repetiría a las 48 horas con una nueva muestra del tracto respiratorio, con lo que se consigue un aumento de la sensibilidad diagnóstica de hasta el 29 %. El ARN viral en el hisopado nasofaríngeo se vuelve detectable por RT-PCR desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo dentro de la primera semana. En una RT-PCR en tiempo real la amplificación del material genético se detecta en el mismo momento en que esta va ocurriendo gracias a la cuantificación de la fluorescencia que se emite en cada ciclo.

El ciclo umbral (Ct, del inglés threshold cycle) es el número de ciclos de replicación necesarios para los valores de Ct más bajos representan mayores cargas de ARN viral, por lo que los valores de Ct que se obtienen en pacientes gravemente enfermos suelen ser inferiores a los valores de los casos leves.

A pesar de que es la técnica gold standard, no está exenta de presentar falsos negativos y positivos: Falsos negativos (<5-40%): Muestra insuficiente, poca carga viral según el estadio (asintomático, presintomático o postsintomático), transporte inadecuado o con retraso (interrupción cadena de frío), error en etiquetaje. Falsos positivos (infrecuentes): contaminaciones cruzadas entre muestras, error en etiquetaje.

La estrategia más eficiente para confirmar la COVID-19 en pacientes sospechosos debe combinar los resultados de la RT-PCR en tiempo real con los datos clínicos y epidemiológicos, que incluyan la probabilidad de exposición, síntomas, signos, y los hallazgos de laboratorio.



## CONCLUSIONES.

La pandemia causada por COVID-19 involucró un enorme esfuerzo para todos los equipos de salud pues el virus que causa esta enfermedad era poco conocido, a un inicio solo se sabía que este virus es ARN monocatenario del género Beta-coronaviridae, de sentido positivo, perteneciente a la familia Coronaviridae, además que posee envoltura. Se sabe que el SARS-CoV-2 el virus causante de COVID-19 es de origen zoonótico y que se deriva probablemente de un coronavirus de murciélago. Los primeros contagios tuvieron centro epidemiológico en el mercado de Huanan, en Wahan, provincia de Huber, en China. Este virus es altamente contagioso, se propaga vía de gotitas de saliva, contacto directo y aerosoles, esto provocó que los casos se multiplicaran exponencialmente hasta diseminarse a todo el mundo y fue el 11 de marzo de 2020 que la OMS declaró estado de pandemia.

Para dar respuesta oportuna a la nueva enfermedad la OPS/OMS informó que la confirmación habitual de los casos de COVID-19 se basaría en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR inmediata, esta prueba detecta la presencia del material genético del virus SARS-CoV-2 en muestras de secreciones respiratorias. El proceso de RT-PCR implica la toma de una muestra de la nariz y la garganta del paciente, generalmente a través de un hisopo nasal. Esta muestra se envía a un laboratorio donde se realiza el análisis. Esta técnica de biología molecular tiene la ventaja de ser rápida y versátil; es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN mediante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiado fielmente, previo a este proceso se realiza un proceso de retrotranscripción donde se convierte el ARN del virus en ADN para luego hacer un proceso de extracción de ácidos nucleicos, luego la técnica se realiza en un equipo llamado termociclador y todo este proceso consta de tres etapas: desnaturalización, amplificación y elongación final. Las

dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARSCoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. El ARN viral en el hisopado nasofaríngeo se vuelve detectable por RT-PCR desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo dentro de la primera semana. Si el material genético del virus está presente en la muestra, se producirá una amplificación específica y se detectará mediante técnicas como la fluorescencia. Es importante tener en cuenta que la RT-PCR puede dar resultados falsos negativos en muestra insuficiente, poca carga viral según el estadio (asintomático, presintomático o postsintomático), transporte inadecuado o con retraso (interrupción cadena de frío), error en etiquetaje y falsos positivos cuando se da contaminaciones cruzadas entre muestras, error en etiquetaje. Por lo que se considera que la estrategia más eficiente para confirmar la COVID-19 en pacientes sospechosos debe combinar los resultados de la RT-PCR en tiempo real con los datos clínicos y epidemiológicos, que incluyan la probabilidad de exposición, síntomas, signos, y los hallazgos de laboratorio.

## FUENTES DE INFORMACIÓN.

1. Alves Cunha, AL, Quispe Cornejo, AA, Ávila Hilari, A., Valdivia Cayoja, A., Chino Mendoza, JM, & Vera Carrasco, O. (2020). Breve historia y fisiopatología del covid-19. Cuadernos Hospital de Clínicas, 61 (1), 130–143. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1652-67762020000100011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1652-67762020000100011&script=sci_arttext)
2. OMS. corona *virus* Quién.int. Recuperado el 30 de mayo de 2023, de <https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus>
3. López-Ponce de León, JD, Cárdenas-Marín, PA, Giraldo-González, GC, & Herrera-Escandón, Á. (2020). Coronavirus – COVID 19: Más allá de la enfermedad pulmonar, qué es y qué sabemos del vínculo con el sistema cardiovascular. Revista colombiana de cardiología, 27 (3), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2020.04.006>
4. Arandia-Guzmán, J., & Antezana-Llaveta, G. (2020). SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta médica boliviana*, 43 (2), 170–178. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662020000200009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662020000200009&script=sci_arttext)
5. Cortés, ME (2020). Coronavirus como amenaza a la salud pública. Revista Médica de Chile, 148 (1), 124–126. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872020000100124>
6. Bruno Manta, Armen G. Sarkisian, Barbara García-Fontana, Vanesa Pereira-Prado. (2022). Vista de Fisiopatología de la enfermedad COVID-19. Edu.uy. <https://odon.edu.uy/ojs/index.php/ode/article/view/379/493>
7. De muestras, T. (2022). Toma de muestras y envío adecuado. Paho.org. [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID-19200038\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID-19200038_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
8. Instituto de Salud Pública, G. de C. Recomendaciones para laboratorios que realizan la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Áreas y Flujos de trabajo. Ispch.cl. Recuperado el 12 de julio de 2023, de <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20lab.%20que%20realizan%20la%20t%C3%A9cnica%20de%20PCR%20%C3%A1reas%20y%20flujos%20v1.pdf>
9. En, M., Lenin, C., De, T., Avenida, D., & Núm, M.-X. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic.com. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

10. National, Spanish, & Network, Biobank. (2011). Red Nacional de Biobancos. Redbiobancos.es. <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>
11. Revista, R. (20d. C., mayo). Vista de La PCR como prueba para confirmar casos vigentes de COVID  
19. Recimundo.com. <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/824/1460>
12. Gladys Pinilla, Claudia Andrea Cruz, Jeannette Navarrete. (7d. C., invierno). Diagnóstico Molecular de SARS-CoV-2 . org.co. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v18nspe35/1794-2470-nova-18-spe35-35.pdf>
13. Cuadra, T. E., Guadrón Meléndez, A. A., Cruz Aguilar, R. D. J., & Vásquez Rodríguez, E. A. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud, 4(1), 31–39. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
14. García, NG y Monteagudo, AC (2020). RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y seguimiento de la infección por el virus SARS-CoV-2. Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia, 36 (0).
15. Langa, LS, Sallent, LV y Díez, SR (2021). Interpretación de las pruebas diagnósticas de la COVID-19. FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria, 28 (3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2021.01.005>