

**DOI:** 10.26820/recimundo/7.(1).enero.2023.87-98

**URL:** <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/1920>

**EDITORIAL:** Saberes del Conocimiento

**REVISTA:** RECIMUNDO

**ISSN:** 2588-073X

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Artículo de revisión

**CÓDIGO UNESCO:** 32 Ciencias Médicas

**PAGINAS:** 87-98



## Técnicas genéticas y moleculares para el diagnóstico de SARS – Cov-2

Genetic and molecular techniques for the diagnosis of SARS – Cov-2

Técnicas genéticas e moleculares para o diagnóstico da SRA - Cov-2

**Diana Carolina Sandoval Benalcázar<sup>1</sup>; Edwin Geovanny Socasi Dioses<sup>2</sup>; Erika Janeth Medina Jadan<sup>3</sup>**

**RECIBIDO:** 02/12/2022 **ACEPTADO:** 26/01/2023 **PUBLICADO:** 25/02/2023

1. Especialista Gerencia en Salud; Médica; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; diana.sandovalb@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0009-0008-3580-2165>
2. Máster Universitario en Dirección y Gestión Sanitaria; Médico; Universidad de Guayaquil; Guayaquil, Ecuador; edwin.socasid@ug.edu.ec;  <https://orcid.org/0009-0007-9195-3868>
3. Médica Especialista en Enfermedades Infecciosas; Médico; Investigadora Independiente; Guayaquil, Ecuador; erika-medina\_12@hotmail.com;  <https://orcid.org/0009-0002-3425-8707>

### CORRESPONDENCIA

**Diana Carolina Sandoval Benalcázar**

diana.sandovalb@ug.edu.ec

**Guayaquil, Ecuador**

## RESUMEN

Debido a su condición de pandemia, es imprescindible contar con métodos de diagnóstico confiables para la determinación de esta infección viral, lo que contribuye a su diagnóstico oportuno, y además reduce la posibilidad de clasificar a individuos como falsos negativos, los que podrían propagar la enfermedad. La metodología utilizada para el presente trabajo de investigación, se enmarca dentro de una revisión bibliográfica de tipo documental. La técnica para la recolección de datos está constituida por materiales electrónicos, estos últimos como Google Académico, PubMed, Science direct, entre otros, apoyándose para ello en el uso de descriptores en ciencias de la salud o terminología MESH. La información aquí obtenida será revisada para su posterior análisis. Tanto los métodos diagnósticos como moleculares han demostrado tener altos niveles de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del Covid 19, sin embargo, las pruebas moleculares como la prueba de reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR), a pesar de ser el estándar de oro para el diagnóstico presenta ciertas fallas como altos costos, tiempo de confirmación y confirmación positiva después de la recuperación del paciente, nuevas técnicas genéticas como SHERLOCK y DETECTR mediante el sistema de edición genética CRISPR/Cas, han demostrado altos niveles de sensibilidad, especificidad y rapidez y menores costos en el diagnóstico del Covid 19.

**Palabras clave:** Diagnóstico, PCR, Covid, Genética, Molecular.

## ABSTRACT

Due to its pandemic status, it is essential to have reliable diagnostic methods to determine this viral infection, which contributes to its timely diagnosis, and also reduces the possibility of classifying individuals as false negatives, which could spread the disease. The methodology used for this research work is part of a documentary bibliographic review. The data collection technique is made up of electronic materials, the latter such as Google Scholar, PubMed, Science Direct, among others, relying on the use of descriptors in health sciences or MESH terminology. The information obtained here will be reviewed for further analysis. Both diagnostic and molecular methods have been shown to have high levels of sensitivity and specificity in the diagnosis of Covid 19, however, molecular tests such as the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) test, Despite being the gold standard for diagnosis, it has certain flaws such as high costs, confirmation time and positive confirmation after patient recovery, new genetic techniques such as SHERLOCK and DETECTR through the CRISPR/Cas gene editing system have shown high levels of sensitivity, specificity and speed and lower costs in the diagnosis of Covid 19.

**Keywords:** Diagnostic, PCR, Covid, Genetics, Molecular.

## RESUMO

Devido ao seu estatuto pandémico, é essencial ter métodos de diagnóstico fiáveis para determinar esta infecção viral, o que contribui para o seu diagnóstico atempado, e também reduz a possibilidade de classificar os indivíduos como falsos negativos, o que poderia propagar a doença. A metodologia utilizada para este trabalho de investigação faz parte de uma revisão bibliográfica documental. A técnica de recolha de dados é composta por materiais electrónicos, estes últimos como Google Scholar, PubMed, Science Direct, entre outros, apoiando-se na utilização de descritores em ciências da saúde ou terminologia MESH. A informação aqui obtida será revista para uma análise mais aprofundada. Tanto o diagnóstico como os métodos moleculares demonstraram ter elevados níveis de sensibilidade e especificidade no diagnóstico do Covid 19, no entanto, testes moleculares como o teste da reacção de transcrição inversa em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), apesar de ser o padrão de ouro para o diagnóstico, tem certas falhas, tais como custos elevados, tempo de confirmação e confirmação positiva após a recuperação do paciente, novas técnicas genéticas como SHERLOCK e DETECTR através do sistema de edição genética CRISPR/Cas mostraram elevados níveis de sensibilidade, especificidade e rapidez e custos mais baixos no diagnóstico do Covid 19.

**Palavras-chave:** Diagnóstico, PCR, Covid, Genética, Molecular.

## Introducción

El Secretario General de la OMS Tedros Adhanom Ghebreyesus en la rueda de prensa celebrada el 16 de marzo del 2020, recomendaba “hacer pruebas, pruebas y más pruebas”, es la mejor estrategia de lucha contra la COVID-19. En esos momentos, las incógnitas sobre cuál de todas, y qué convenía medir, eran para resolverse de inmediato dada la urgencia que suponía la pandemia. (Carranza et al., 2020)

Debido a su condición de pandemia, es imprescindible contar con métodos de diagnóstico confiables para la determinación de esta infección viral, lo que contribuye a su diagnóstico oportuno, y además reduce la posibilidad de clasificar a individuos como falsos negativos, los que podrían propagar la enfermedad. (Aguilar Ramírez et al., 2020)

Las pruebas diagnósticas para detectar el SARS-CoV-2 aún están evolucionando y es importante comprender sus particularidades para la interpretación correcta de los resultados. (García & Monteagudo, 2020) La realización de pruebas moleculares requiere considerable inversión financiera y logística, en comparación con otras herramientas de diagnóstico. La prueba de referencia sugerida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la detección del SARS-CoV-2 es la prueba de reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR), la cual requiere de un laboratorio molecular, con infraestructura, equipos y reactivos costosos, así como personal especializado. (Escalante-Maldonado et al., 2021)

En concordancia con la aparición de nuevas variantes del virus con un potencial de diseminación mucho mayor a la cepa original del SARS-CoV-2, la Organización Mundial de la Salud (OMS) está incentivando el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico molecular que soslayan las dificultades antes mencionadas de la RT-qPCR, y que mantengan su buen grado de sensibilidad y especificidad. Algunas metodologías

de diagnóstico molecular han surgido en los últimos tiempos, como RT-LAMP, DETECTR y SHERLOCK (basado en el sistema CRISPR/Cas), y amplificación por polimerasas y recombinasas (RPA), entre otras, todas con sensibilidad y especificidad variables. De todas las metodologías anteriormente mencionadas, la técnica RT-LAMP ha demostrado un enorme potencial en el diagnóstico de SARS-CoV-2 y podría ser una metodología útil para complementar el diagnóstico de COVID-19 en centros de salud con bajos recursos. (Hurtado et al., 2022)

## Metodología

La metodología utilizada para el presente trabajo de investigación, se enmarca dentro de una revisión bibliográfica de tipo documental, ya que nos vamos a ocupar de temas planteados a nivel teórico como es Técnicas genéticas y moleculares para el diagnóstico de SARS – Cov-2. La técnica para la recolección de datos está constituida por materiales electrónicos, estos últimos como Google Académico, PubMed, Science direct, entre otros, apoyándose para ello en el uso de descriptores en ciencias de la salud o terminología MESH. La información aquí obtenida será revisada para su posterior análisis.

## Resultados

### Pruebas rápidas

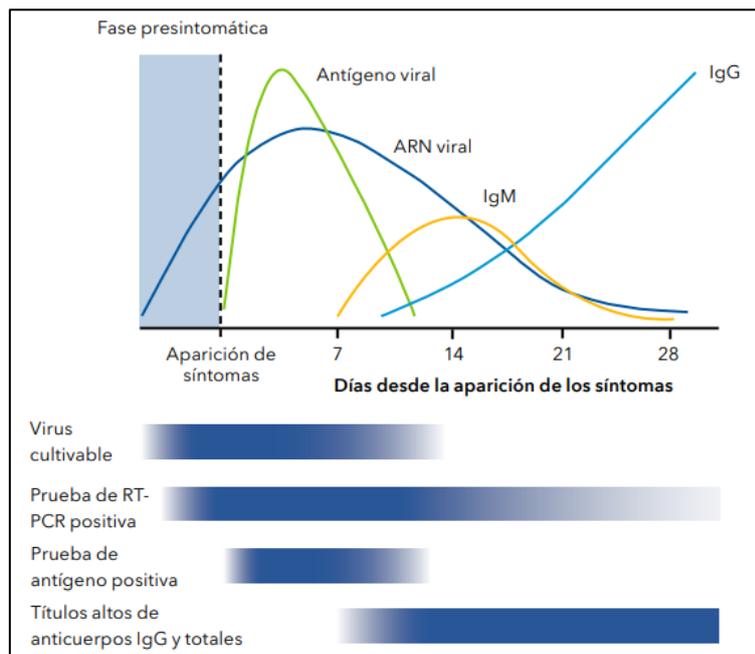
Las pruebas rápidas son técnicas que detectan la presencia de la infección por diversas metodologías, usualmente a través de la detección de antígenos virales. Todas ellas tienen una característica común, su tiempo de lectura es inferior a 30 minutos. Estas pruebas requieren un equipamiento mínimo y pueden realizarse por fuera del laboratorio clínico. Debido a que la detección depende de la carga viral o de los niveles de antígenos o anticuerpos, tienen menos sensibilidad que otras pruebas. Sin embargo, debido a sus resultados rápidos, son una alternativa importante para el análisis masivo inicial de pacientes.

Pueden ocurrir casos de falsos negativos por una muestra inadecuada o insuficiente, fallos en los kits de prueba y baja carga viral en estadios iniciales. Los falsos positivos se pueden presentar por reactividad cruzada con otros virus respiratorios. Teniendo en cuenta lo anterior, es valioso el uso de pruebas rápidas en casos de brotes, sin dejar de considerar las posibles limitaciones en relación a la sensibilidad diagnóstica, cuyo factor decisivo es la carga viral. (Rivera et al., 2022)

**Pruebas serológicas**

Se basan en la detección de las inmunoglobulinas M (IgM) y G (IgG) contra SARS-CoV-2. Los anticuerpos IgM comienzan a ser detectables en sangre después de la primera semana de inicio de la infección, y

perduran alrededor de 3 o 4 semanas, en tanto que los anticuerpos IgG aparecen poco después, y perduran en el tiempo. El punto óptimo para la detección de anticuerpos tipo IgM es entre los 8 a 14 días después del inicio de síntomas. La sensibilidad en la detección de la IgG parece depender del momento de la toma de muestra y puede ser mayor al 90% a partir de la segunda semana del inicio de los síntomas. Aunque poseen una limitada capacidad para discriminar entre infección actual e infección pasada, su uso podría contribuir de manera significativa al diagnóstico clínico, particularmente en pacientes hospitalizados, en quienes las pruebas moleculares hayan resultado negativas o no se hayan realizado. (Rivera et al., 2022)



**Imagen 1.** Detección de la viremia, antigenemia y anticuerpos durante la infección aguda por SARS-CoV-2

**Fuente:** Adaptado de Características del SARS-CoV-2, COVID-19 y su diagnóstico en el laboratorio, por Rivera et al., 2022, Medicina & Laboratorio.

**Reacción en cadena de la polimerasa**

Conocida como PCR, es una técnica genética utilizada para copiar y sintetizar ADN de un organismo objetivo en grandes

cantidades. Por su parte, en la RT-PCR, la transcriptasa inversa sintetiza ADNc a partir de una molécula de ARN antes de iniciarse el proceso de amplificación del material genético. Esta prueba se considera el es-

tándar de oro para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2. Una de las variantes de la RT-PCR es la RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), en la cual se utiliza un marcador fluorescente que permite monitorizar la amplificación del material genético viral en tiempo real. También debe tenerse presente que los pacientes en fase de recuperación

de COVID-19 pueden tener una RT-PCR positiva, ya que la prueba no permite discriminar entre partículas virales intactas de ARN viral. Por su parte, la PCR múltiple utiliza la amplificación simultánea de distintos genes en un único tubo de reacción, lo cual aumenta la sensibilidad de la prueba, evitando los falsos negativos. (Rivera et al., 2022)

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de las pruebas diagnósticas para covid-19

	RT- PCR	TAC de Tórax	IGG E IGM-AC
<b>Ventajas</b>	<p>Método de diagnóstico estándar para Covid-19 según OMS y CDC.</p> <p>Permite estudiar un gran número de pacientes por la posible automatización de los procedimientos.</p> <p>Detecta y amplifica secuencias de ADN o la presencia del virus en muestras nasofaríngeas desde los primeros momentos de la infección.</p> <p>Más sensible y específica que los otros métodos hasta ahora disponibles</p> <p>Según el Instituto Charité de Virología posee especificidad del 95%.</p>	<p>La sensibilidad, especificidad y precisión de la TC de tórax para determinar la infección por COVID-19 es de 97% y 98%.</p> <p>Resultados rápidos.</p> <p>Evalúa progresión de la enfermedad.</p> <p>Manejo ciertas complicaciones causadas por Covid-19 TEP.</p> <p>Accesible, menor costo.</p> <p>No invasiva</p>	<p>Sensibilidad del 88,66%, especificidad del 90, 63%. (1).</p> <p>Resultado rápido en 15 minutos.</p> <p>No requiere un equipo específico ni complejo, simple de realizar y solo requería un entrenamiento mínimo.</p> <p>Complementan a los estudios de RT-PCR</p> <p>Económica</p> <p>Uso a gran escala</p>
<b>Desventajas</b>	<p>Tiempos de respuesta largos (1-7 días)</p> <p>Funcionamiento es complicado, con personal experto en biología molecular.</p> <p>Requieren laboratorios certificados e infraestructura adecuada.</p> <p>Equipo costoso y técnicos capacitados para realizarlos</p> <p>Hay un porcentaje considerable de falsos negativos para el COVID-19</p>	<p>Podía ser negativa para la neumonía viral por COVID-19 como presentación inicial.</p> <p>Subjetivo de acuerdo a los especialistas</p>	<p>Tiempos de respuesta después la primer semana.</p> <p>IgG e IgM contra el SARS-CoV-2 será una indicación de infección (que no discrimina si es activa o pasada), reactividad cruzada con otros coronavirus y con el virus de la gripe errores diagnósticos</p> <p>Insuficiente sensibilidad y especificidad</p> <p>El resultado negativo de IgM y de IgG no excluya que el paciente esté infectado por SARS-CoV-2.</p>
<b>Observaciones /Razones</b>	<p>Período de ventana de 4 o 5 días post infección.</p> <p>Puede haber falsos negativos y falsos positivos</p> <p>Baja carga viral del paciente, muestreo clínico incorrecto;</p> <p>Variación en la tasa de detección de diferentes fabricantes.</p>		<p>Los resultados dependen de las casas comerciales.</p>

**Fuente:** Adaptado de Utilidad de Pruebas de cadena de polimerasa, pruebas rápidas y Tomografías en pacientes con Covid-19, Calvache et al., 2020, Journal of American Health.

### La técnica PCR

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. Una vez aislado el ADN diana, se inician los ciclos de PCR.

**Tabla 2.** Ciclos de PCR

<b>Desnaturalización</b>	Se calienta a más de 90 grados Celsius (194 grados Fahrenheit), el tubo que contiene la muestra de ADN. Esto logra separar el ADN bicatenario en dos cadenas. La temperatura elevada rompe las uniones relativamente débiles entre los nucleótidos que componen el código del ADN.
<b>Hibridación</b>	Se aparean los cebadores u oligos al DNA molde. La PCR no copia todo el ADN en la muestra, sino solo una secuencia muy específica de código genético, el objetivo al cual se dirigen los cebadores de la PCR.
<b>Extensión</b>	Copia de las cadenas delimitadas. Se eleva la temperatura aproximadamente 72 grados Celsius (161,5 grados Fahrenheit). “Cada uno de los extremos 3’-OH de los oligos apareados a las cadenas directa y reversa serán extendidos, generándose las cadenas hijas correspondientes.
Una vez hecha dos copias del ADN por medio de la PCR, el ciclo comienza de nuevo, esta vez utilizando el nuevo ADN duplicado. Cada duplicado crea dos nuevas copias, y después de aproximadamente 30 o 40 ciclos de PCR, se crean más de mil millones de copias del segmento de ADN original de forma automática, en cuestión de horas	

**Fuente:** Adaptado de La PCR como prueba para confirmar casos vigentes de COVID-19, por Carranza et al., 2020, Recimundo.

### Protocolos estandarizados y precisión en el diagnóstico molecular

Según la OMS, en el caso del SARS-CoV-2, la detección del gen de la proteína E se emplea como primera prueba confirmatoria, seguida de la expresión del gen RdRp. La expresión del gen N solo se usa si se requiere un ensayo confirmatorio adicional. Para los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), la primera prueba confirmatoria sería la expresión y secuenciamiento del gen N

diseñado para la detección universal de los coronavirus SARS y del SARS-CoV-2, para lo cual se utilizan dos cebadores diferentes.

**Tabla 3.** Comparación del ensayo de diagnóstico molecular por RT-PCR realizado por la OMS y por los CDC para diagnosticar el SARS-CoV-2

Ensayo	Gen	Alcance	Limite inferior detectable	Muestras	Condiciones de almacenamiento
OMS	E	Primer ensayo	3,9 copias x reacción	Hisopo nasofaríngeo y orofaríngeo o muestras de tracto respiratorio inferior (esputo, aspirado endotraqueal y/o lavado broncoalveolar)	≤5 días (2 a 8 °C)
	RdRp	1.º ensayo confirmatorio	3,6 copias x reacción		>5 días (≤70 °C; hielo seco)
	N	2.º ensayo confirmatorio	N/A		
CDC	N1/2/3	Ensayo combinado	1,0-3,2 copias/µL	Hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos, esputo, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado broncoalveolar y lavado nasofaríngeo o aspirado nasal	≤4 días (4 °C)
	RNase P	Ensayo control	N/A		>4 días (≤70 °C)

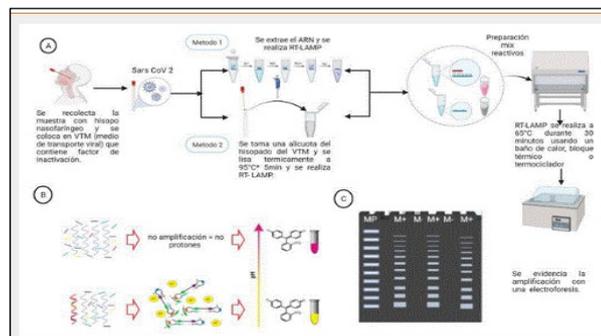
E: gen de envoltura  
 N: gen del nucleocápside  
 RdRp: RNA dependiente de la RNA polimerasa  
 RNase P: gen humano RNase P

**Fuente:** Adaptado de Pruebas diagnósticas para la COVID-19: la importancia del antes y el después, por Aguilar Ramírez et al., 2020, Horizonte Médico (Lima).

La sensibilidad analítica de la RT-PCR se ve influida por la baja carga viral en pacientes asintomáticos o levemente sintomáticos, lo que ocurre, fundamentalmente, en dos momentos: 1) la fase inicial de la infección, cuando el paciente todavía es completamente asintomático o solo levemente sintomático, y 2) cuando la infección por SARS-CoV-2 es controlada por el sistema inmune,

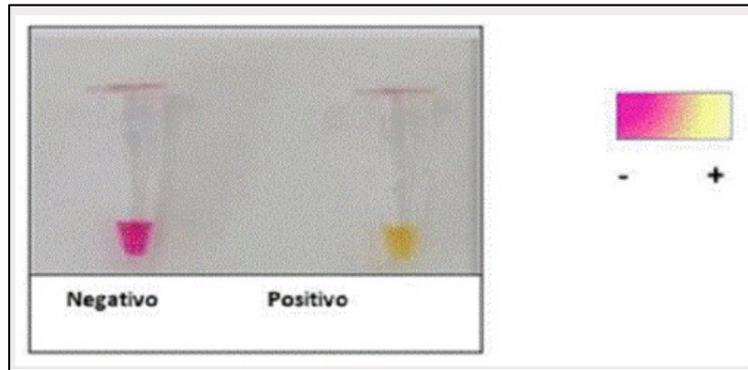
y los síntomas se alivian, con la consecuente eliminación de virus aún persistentes. Otro problema es la aparición de mutaciones que son atribuibles a las ARN polimerasas dependientes de ARN propensas a errores de coronavirus. (Aguilar Ramírez et al., 2020)

**Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)**



**Imagen 2.** Flujograma conceptual de la prueba LAMP para detectar SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasal. A) La reacción de RT-LAMP a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo de individuos con sospecha de Covid-19 se ejecuta a partir de: i) ARN extraído o ii) directamente de las muestras sin extracción de ARN, con un previo paso de inactivación a 95 °C por 5 minutos. B) La RT-LAMP hace uso de 6 cebadores (marcados aquí en colores) que, en presencia del ARN diana (espiral de color rojo), inician la amplificación isotérmica, generando protones que inducen un cambio de pH en la reacción, con la subsecuente virada de color de rosa a amarillo. C) La reacción de amplificación en RT-LAMP genera productos de diferentes masas moleculares en forma de concatámeros que pueden observarse fácilmente en un gel de agarosa

**Fuente:** Adaptado de Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2, por Hurtado et al., 2022, Biomédica.



**Imagen 3.** Resultado colorimétrico de RT-LAMP. Reacción color rosa: muestra negativa para SARS-CoV-2. Reacción color amarillo: resultado positivo para el gen N del SARS-CoV-2

**Fuente:** Adaptado de Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2, por Hurtado et al., 2022, Biomédica.

Esta prueba utiliza entre 4 a 6 primers o cebadores, diseñados para unirse a diferentes regiones del genoma viral, permitiendo la identificación de secuencias de ARN de interés. A mayor número de primers utilizados, mayor especificidad de la prueba. Entre las ventajas de LAMP, está que la amplificación se realiza a una temperatura constante, la exclusión de un termociclador, un resultado de prueba más rápido y mayor capacidad de diagnóstico, mientras mantiene una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%. El uso conjunto de las pruebas serológicas y la detección del ARN viral aumenta la sensibilidad diagnóstica en pacientes con COVID-19, así lo demostró Zhao en su investigación, donde la presencia de anticuerpos IgM e IgG fue menor al 40% en la primera semana desde el inicio de la infección, y aumentó rápidamente hasta el 100% para el día 15 con una presencia de IgM e IgG en el 94,3% y el 79,8% de los casos, respectivamente; por otra parte, la detección del ARN disminuyó del 66,7% en las muestras recolectadas antes del día 7, al 45,5% durante los demás días. Esto sugiere que la combinación de detección del ARN y anticuerpos influye positivamente en la sensibilidad diagnóstica, incluso en las fases tempranas de la infección. (Rivera et al., 2022)

#### **Técnica o proceso en base a estudio de Hurtado et al (2022) de 177 muestras**

- **Extracción de ARN:** 117 muestras se sometieron a extracción de ARN a partir de 200  $\mu$ I de hisopado nasofaríngeo contenido en medio de transporte viral con el kit de extracción) que emplea perlas magnéticas de sílice para la purificación del ARN total. En seguida, se adicionaron 400  $\mu$ I de solución tampón de ARN viral a cada 200  $\mu$ I de muestra (2:1) y se mezcló suavemente. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos para, finalmente, eluir el ARN en 15  $\mu$ l de agua libre de ADNasa/RNasa.
- **RT-qPCR:** Se emplearon 8  $\mu$ l de solución tampón de reacción 2X que contenía 0,4 mM de cada dNTP, 3,2 mM de  $MgSO_4$ , 0,3  $\mu$ l de transcriptasa inversa (SuperScript III RT/Platinum Taq Mix), 200 nM de cada cebador dirigido contra el gen E del SARS-CoV-2 y 100 nM de sonda TaqMan conjugada al fluoróforo CAL Red 610. Además, se introdujo un control endógeno a la reacción (gen RNase P humano), 100 nM de cada cebador y 100 nM de sonda TaqMan-Hex, para su amplificación. Los cebadores empleados para amplificar un fragmento del gen E que codifica para la envoltura

del virus (específico del subgénero Sarbecovirus) fueron proporcionados por Biosearch Technologies™.

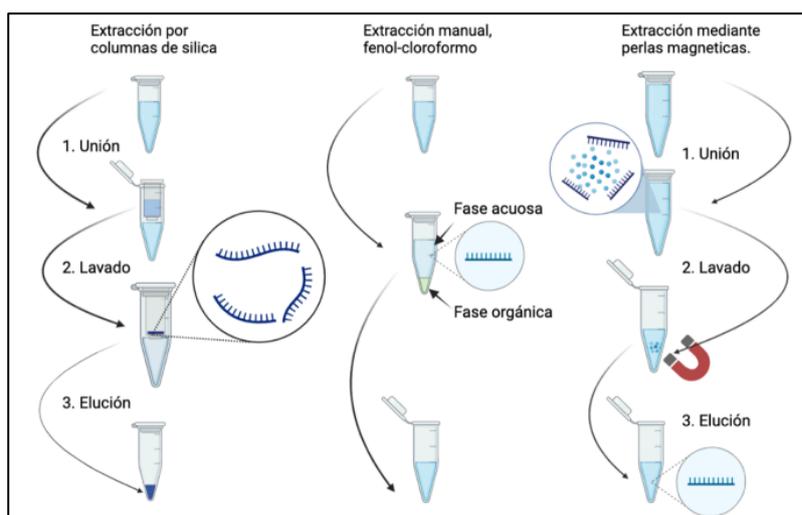
- **RT-LAMP:** Esta técnica de amplificación isotérmica se preparó con el kit Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. En ella, se emplea un conjunto de seis cebadores para lograr la amplificación mediada por lazos. Ambos juegos de cebadores amplifican un segmento del gen N del SARS-CoV-2, con 229 pares de bases para el primero y con 217 pares para el segundo. Como control positivo, en las reacciones de RT-LAMP se incluyó un plásmido que tiene clonado un fragmento del gen N del SARS-CoV-2, adquirido de la casa comercial New England Biolabs (NEB, Germany).

Antes de cada reacción LAMP, se preparó una mezcla 10X de cebadores de único uso y se procedió a realizar una corta incubación a 95 °C por 5 minutos, para eliminar cualquier formación de estructuras secundarias que pudieran afectar el cambio de color de la reacción. La concentración final de los cebadores en la reacción, después

de agregar los demás reactivos, fue de 1X. La reacción LAMP se preparó empleando 10 µl del reactivo colorimétrico Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA), 5 µl de agua, 3 µl del ARN previamente extraído y 2 µl de la mezcla maestra 10X del respectivo set de cebadores que anteriormente había sido incubado a 95 °C. La mezcla de cebadores 10X se adicionaba siempre en la tapa del tubo de la reacción, con la finalidad de evitar su degradación, así como amplificaciones inespecíficas que pudiesen empezar antes de la temperatura óptima de amplificación.

La reacción se iniciaba con un spin de los tubos a 65 °C por 30 minutos, en un termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler™, Thermo Fisher Scientific). Transcurrido el tiempo de incubación, se visualizaba el resultado por colorimetría y se registraba fotográficamente con la cámara de un teléfono celular. El cambio de color de rosa a amarillo era indicativo de una reacción positiva, mientras que, si el color rosa se mantenía en la reacción, era señal de un resultado negativo para SARS-CoV-2 (Imagen 3). (Hurtado et al., 2022)

**Extracción de ácidos nucleicos (ARN)**



**Imagen 4.** Los tres métodos de extracción de ARN más utilizados en la actualidad

**Fuente:** Adaptado de Comparación de técnicas moleculares para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 o COVID 19, por Santamaria Celin, 2021, Universidad de los Andes.

Entre las técnicas disponibles están aquellas que se hacen de forma manual. Las extracciones manuales más comunes son las que involucran fenol-cloroformo. Gracias a la separación en dos fases de estos componentes, se permite dividir las moléculas orgánicas en sus solventes con mayor afinidad. Esta técnica de extracción tiene la ventaja de tener un muy alto rendimiento de la extracción de RNA y un bajo costo, sin embargo, estas extracciones suelen tener la limitante de que la calidad de la extracción no suele ser óptima.

Otra forma de extracción del ARN más adecuada para centros de procesamiento masivo puede ser un robot de extracción de ARN. Estos sistemas se basan en el uso perlas magnéticas afines a los ácidos nucleicos, las cuales pueden ser recuperadas usando un imán. Cuando el imán está activo se pueden hacer múltiples lavados que permiten remover los contaminantes de la muestra tales como carbohidratos y proteínas. Luego de estos lavados se puede desactivar el imán, lo que permite recuperar los ácidos nucleicos en un buffer de elución. Aunque estas técnicas de extracción suelen ofrecer un volumen relativamente alto de procesamiento de muestras por día, sus ventajas se ven contrastadas por el hecho de ser tediosas y requerir de personal entrenado, por lo cual no son óptimas para ser utilizadas como técnicas POC (point of care), las cuales son aplicables en centros de salud, directamente por el personal médico. (Santamaria Celin, 2021)

### **Sistema de edición genética CRISPR/Cas**

Las herramientas CRISPR de edición genética son capaces de editar ADN. Esta es su aplicación más común y se la conoce con el nombre de aplicaciones CRISPR 1.0. Sin embargo, algunas variantes de las herramientas CRISPR pueden también editar ARN, y son conocidas como las aplicaciones CRISPR 2.0. Existen dos aproximaciones principales para utilizar las tijeras programables CRISPR en la detección del coronavi-

rus SARS-CoV-2. La base metodológica de ambas tecnologías fue desarrollada para detectar moléculas de ARN y ADN de forma específica. Recientemente, la pandemia de COVID-19 ha impulsado su adaptación a la detección de SARS-CoV-2, una vez se conoció el genoma de este coronavirus.

Las ventajas de la tecnología basada en CRISPR/Cas sobre RT-qPCR incluyen: especificidad de un solo objetivo, tiempo de respuesta reducido, costo relativamente bajo, amplificación de señal isotérmica sin necesidad de una configuración de laboratorio compleja e informes de fácil acceso con tiras de flujo lateral. La primera aplicación del sistema CRISPR/Cas en el diagnóstico molecular del coronavirus SARS-CoV-2, fue la implementación del método SHERLOCK, el cual está basado en la sustitución en la plataforma CRISPR de la nucleasa Cas9 por la Cas 13a, cuya actividad es capaz de cortar RNA (una actividad de RNAsa) en lugar de DNA. La prueba está dirigida a detectar el gen de la proteína S (proteína de pico) que interviene en la entrada del virus a las células humanas, y el gen ORF1ab que codifica una replicasa del virus. SHERLOCK es una plataforma de detección rápida, ultrasensible, precisa y de bajo costo que utiliza como elemento efector la enzima Cas13a. Esta tiene como característica principal que al ser activada con la unión del ARN guía al fragmento complementario de ARN (es decir, cuando detecta la presencia del ARN diana), degrada los fragmentos de ARN presentes.

La segunda tecnología de detección del coronavirus SARS-CoV-2 basada en CRISPR es el ensayo de flujo lateral DETECTR (pronunciado en inglés como “detector” de coronavirus). Esta fue desarrollada inicialmente en el laboratorio de Jennifer Doudna de la Universidad de California en Berkeley. El sistema de diagnóstico DETECTR es un poco más complejo, pues para poder aplicarlo en la detección de coronavirus, cuyo genoma es una molécula de ARN, lo primero que hay que hacer es convertirlo a ADN mediante un ciclo de transcriptasa inversa.

Una vez ya en formato ADN, el genoma del virus puede ser detectado con su guía de ARN correspondiente y, tras la activación específica de la nucleasa Cas12a, se produce la respuesta inespecífica que origina luz u otra reacción química fácilmente detectable. El método DETECTR es 90% sensible y 100% específico para identificar el nuevo coronavirus en hisopos respiratorios, y es económico porque no requiere instrumentación de laboratorio costosa.

El ensayo SHERLOCK como DETECTR tienen varias ventajas respecto al ensayo de RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2, entre ellas se tienen:

- Sensibilidad comparable con la prueba estándar RT-qPCR.
- Menor tiempo del ensayo y obtención de resultados económicos, ya que no requieren de termociclador.
- Ambos métodos han sido validados en muestras clínicas con resultados prometedores. (Perón & Izquierdo, 2021)

### **Conclusión**

La pandemia del Covid 19 demostró que tanto las pruebas genéticas como las pruebas moleculares para el diagnóstico del Covid no están exentas de fallas en cuanto a los niveles de sensibilidad, especificidad y tiempo de tardanza en el resultado. La prueba de reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR), recomendada por la OMS y ampliamente utilizada en un tiempo importante de la pandemia, fue objetada por los altos costos en su aplicación por la cantidad de equipos y personal que se requiere para su análisis, a la par del tiempo que se necesita para poder realizar su análisis, ya que se recomienda su aplicación a la segunda semana de iniciados los síntomas y por que después de aliviado los síntomas o en fase de recuperación el paciente puede seguir siendo positivo al virus. La Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) tiene

una mayor sensibilidad y especificidad en conjunto con pruebas serológicas en fases tempranas de la infección.

El Sistema de edición genética CRISPR/Cas, mediante el método SHERLOCK, tiene ventajas en los resultados, análisis y especificidad, ya que son más rápidos, menor costo, ya que no se requiere de grandes equipos ni laboratorios al igual que el método DETECTR que, aunque requiere de un proceso adicional tiene 90% de sensibilidad y 100% especificidad. En este contexto se puede concluir que la prueba que resulte de mayores niveles de sensibilidad, especificidad, rapidez y menor costo es la indicada para el diagnóstico del Covid 19, siendo mejor las pruebas genéticas.

### **Bibliografía**

- Aguilar Ramírez, P., Enriquez Valencia, Y., Quiroz Carrillo, C., Valencia Ayala, E., de León Delgado, J., & Pareja Cruz, A. (2020). Pruebas diagnósticas para la COVID-19: la importancia del antes y el después. *Horizonte Médico (Lima)*, 20(2), e1231. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n2.14>
- Calvache, J. M. M., Rodríguez, A. D. E., Martínez, C. B. C., & Paucar, V. A. V. (2020). Utilidad de Pruebas de cadena de polimerasa, pruebas rápidas y Tomografías en pacientes con Covid-19. *Journal of American Health*, 3(2), 32–39.
- Carranza, L. A. S., Santacruz, F. E. M., & Villegas, J. A. C. (2020). La PCR como prueba para confirmar casos vigentes de COVID-19. *Recimundo*, 4(2), 64–74. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(2\).mayo.2020.64-74](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(2).mayo.2020.64-74)
- Escalante-Maldonado, O., Vidal-Anzardo, M., Donaires, F., Solis-Sanchez, G., Gallesi, I., Pampa-Espinoza, L., Huaranga, M., Rojas-Serrano, N., García, C., Angles-Yanqui, E., Gavilán, R. G., Durães-Carvalho, R., Mendez-Rico, J., Cabezas, C., & Marques-Simas, P. V. (2021). Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in house para el diagnóstico de SARS-CoV-2. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(1), 7–16. <https://doi.org/10.17843/rp-mesp.2021.381.7154>
- García, N. G., & Monteagudo, A. C. (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.

Hurtado, L., Díaz, D., Escorcía, K., Flórez, L., Bello, Y., Díaz, Y., Navarro, E., Pacheco, L. C., Galán, N., Maestre, R., Acosta, A., & Pacheco, L. A. (2022). Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2. *Biomédica*, 42(Sp. 2), 59–72. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6523>

Perón, J. M. R., & Izquierdo, M. M. R. (2021). Tecnología de detección del coronavirus SARS-CoV-2 basada en el sistema de edición genética CRISPR/Cas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 37.

Rivera, Z. M., Bravo, A. X. M., CASTRILLO, J. S., & Rave, L. J. G. (2022). Características del SARS-CoV-2, COVID-19 y su diagnóstico en el laboratorio. *Medicina & Laboratorio*, 26(3), 237–259.

Santamaria Celin, P. S. (2021). Comparación de técnicas moleculares para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 o COVID 19. Universidad de los Andes.



CREATIVE COMMONS RECONOCIMIENTO-NOCOMERCIAL-COMPARTIRIGUAL 4.0.

### CITAR ESTE ARTICULO:

Sandoval Benalcázar, D. C., Socasi Dioses, E. G., & Medina Jadan, E. J. (2023). Técnicas genéticas y moleculares para el diagnóstico de SARS – Cov-2. *RECIMUNDO*, 7(1), 87-98. [https://doi.org/10.26820/recimundo/7.\(1\).enero.2023.87-98](https://doi.org/10.26820/recimundo/7.(1).enero.2023.87-98)