



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Tecnologías de amplificación isotérmica, alternativas a la PCR, para la detección del coronavirus SARS-Cov-2 y otros patógenos microbianos.

Isothermal amplification technologies, alternatives to PCR, for the detection of the SARS-Cov-2 coronavirus and other microbial pathogens.

Autora: D^a. Raquel Obeso Menéndez

Director: D. Jesús Navas Méndez

Santander, Junio 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	Pág. 5
2. INTRODUCCIÓN: TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS BASADAS EN LA AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	Pág. 6
2.1. Métodos diagnósticos.....	Pág. 7
2.2. Técnicas de biología molecular.....	Pág. 8
2.3. Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos.....	Pág. 9
3. TIPOS DE MUESTRAS UTILIZADAS.....	Pág. 9
3.1. Exudado nasofaríngeo.....	Pág. 12
3.2. Saliva.....	Pág. 14
3.3. Sangre.....	Pág. 16
3.4. Heces.....	Pág. 17
4. LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	Pág. 17
4.1. Aplicación al diagnóstico microbiológico.....	Pág. 20
4.2. Aplicación a la detección del coronavirus SARS-cov-2.....	Pág. 23
4.2.1. Genoma.....	Pág. 24
4.2.2. Estructura.....	Pág. 24
4.2.3. Detección.....	Pág. 25
5. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA.....	Pág. 27
5.1. Amplificación mediada por bucle (LAMP).....	Pág. 28
5.2. Amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).....	Pág. 31
5.3. Amplificación mediada por recombinasa y polimerasa (RPA).....	Pág. 32
5.4. Amplificación de círculo rodante (RCA).....	Pág. 34
5.5. Amplificación por desplazamiento de cadena (SDA).....	Pág. 35
5.6. Amplificación dependiente de la actividad helicasa (HDA).....	Pág. 36
6. GESTIÓN DE LA RECOGIDA DE LAS MUESTRAS Y EJECUCIÓN DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA.....	Pág. 38
6.1. Centros hospitalarios.....	Pág. 40
6.2. Centros de Salud.....	Pág. 40
6.3. “Coroautos”	Pág. 40
6.4. Laboratorios privados.....	Pág. 41
6.5. Recogida domiciliaria de muestras.....	Pág. 41
7. EL DIAGNÓSTICO DEL CORONAVIRUS SARS-COV-2 EN LA CCAA DE CANTABRIA.....	Pág. 41

8. CONCLUSIONES.....	Pág. 47
9. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 48
10. AGRADECIMIENTOS.....	Pág. 52

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

– Ilustración 1.....	Pág. 13
– Ilustración 2.....	Pág. 14
– Ilustración 3.....	Pág. 16
– Ilustración 4.....	Pág. 19
– Ilustración 5.....	Pág. 21
– Ilustración 6.....	Pág. 21
– Ilustración 7.....	Pág. 24
– Ilustración 8.....	Pág. 25
– Ilustración 9.....	Pág. 26
– Ilustración 10.....	Pág. 30
– Ilustración 11.....	Pág. 31
– Ilustración 12.....	Pág. 33
– Ilustración 13.....	Pág. 35
– Ilustración 14.....	Pág. 36
– Ilustración 15.....	Pág. 37
– Ilustración 16.....	Pág. 38
– Ilustración 17.....	Pág. 39
– Ilustración 18.....	Pág. 42
– Ilustración 19.....	Pág. 43
– Ilustración 20.....	Pág. 45
– Ilustración 21.....	Pág. 46

1. RESÚMEN

La notificación de una serie de casos de neumonía de etiología desconocida en Wuhan en diciembre de 2019 y la posterior declaración por parte de la Organización Mundial de la Salud el 11 de marzo de 2020, señalaron el comienzo de la actual pandemia por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 en el calendario de la era contemporánea. La nueva pandemia ha supuesto un reto para la comunidad científica y para la asistencia sanitaria a nivel global, ya que el consecuente gran aumento de la demanda asistencial ha evidenciado los fallos del sistema sanitario, pero también la gran capacidad de la ciencia biomédica actual para proporcionar soluciones tecnológicas para hacerla frente a corto plazo y el valor de los profesionales para sobreponerse a la adversidad aportando sus conocimientos sin dosificar el esfuerzo. En un año se ha producido una revolución en la ciencia de las vacunas y del diagnóstico microbiológico. En este trabajo recogemos las últimas aportaciones en este campo, centrándonos en las técnicas moleculares para la detección del SARS-CoV-2, y, en particular, las basadas en la detección de ácidos nucleicos. Entre ellas, algunas técnicas de amplificación isotérmica se proponen como complemento y hasta como alternativa a la PCR en tiempo real, por su sencillez y menor coste. La correcta toma de muestras, el desarrollo de nuevos protocolos y las nuevas técnicas diagnósticas constituyen los pilares fundamentales para mejorar la detección del patógeno, lo que ayudará a controlar la pandemia.

Palabras clave: SARS-Cov-2, diagnóstico molecular, PCR, amplificación isotérmica.

ABSTRACT

The notification of a series of pneumonia cases of unknown etiology in Wuhan in December 2019 and the subsequent declaration by the World Health Organization on March 11, 2020, signaled the beginning of the current pandemic due to the new SARS-CoV-2 coronavirus in the contemporary era calendar. The new pandemic has posed a challenge for the scientific community and for health care at a global level, since the consequent large increase in demand for care has shown the failures of the health system, but also the great capacity of current biomedical science to provide technological solutions to face it in the short term and the courage of professionals to overcome adversity by contributing their knowledge without expending effort. In one year there has been a revolution in the science of vaccines and microbiological diagnostics. In this work we collect the latest contributions in this field, focusing on molecular techniques for the detection of SARS-CoV-2, in particular those based on the detection of nucleic acids. Among them, some isothermal amplification techniques are proposed as a complement and even as an alternative to real-time PCR, due to its simplicity and lower cost. Correct sampling, the development of new protocols and new diagnostic techniques constitute the fundamental pillars to improve the detection of the pathogen, which will help to control the pandemic.

Key words: SARS-Cov-2, molecular diagnosis, PCR, isothermal amplification.

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, las enfermedades infecciosas han sido una de las causas más importantes de morbi-mortalidad. En el siglo XIX con el descubrimiento de sus agentes causales, reservorios, fuentes de infección, mecanismos de transmisión y factores de susceptibilidad, se establecieron una serie de medidas preventivas, que permitieron, junto con el desarrollo socioeconómico, disminuir su incidencia y consecuentemente su mortalidad en los países desarrollados.¹

Fue así como en el siglo XX comenzó la lucha sanitaria contra las enfermedades transmisibles, con la creencia de que en pocos años iban a dejar de suponer un problema para la salud. Muchos esfuerzos se dirigieron al control de las enfermedades infecciosas, y se obtuvieron importantes éxitos, como el descubrimiento de los antibióticos y la erradicación mundial de la viruela. Por estos motivos, las enfermedades infecciosas empezaron a dejar de constituir una amenaza para los países desarrollados y la atención se centró en otras patologías también muy prevalentes: cáncer, cardiopatías, enfermedades degenerativas y accidentes.²

El auge de las enfermedades infecciosas en los últimos 30 años se debe en gran medida a que han surgido enfermedades nuevas y reemergentes, que han reaparecido con mayor virulencia o en el contexto de un nuevo marco epidemiológico.³ Tanto la aparición del VIH en el pasado siglo como la actual situación de pandemia por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, son ejemplos de la gran importancia que las enfermedades infecciosas han cobrado en el panorama de la sanidad global en las últimas décadas.^{1,3}

Esta situación se asocia con diversos factores, entre los que destacan:²

- Factores biológicos:
 - Variabilidad.
 - Adaptación genética.
- Factores sociales:
 - Globalización, auge del comercio y movilidad internacional.
 - Migraciones humanas.
 - Inadecuada manipulación de alimentos.
 - Hacinamiento.
- Factores económicos:
 - Ausencia de servicios básicos de saneamiento.
 - Desnutrición.
 - Falta de agua.
 - Sistemas de depuración de aguas residuales y alcantarillado deficientes.

Estos factores generan situaciones idóneas para la propagación de infecciones y epidemias entre diversos países y regiones. Una vigilancia epidemiológica insuficiente, un número insuficiente de laboratorios de salud pública para la detección y el diagnóstico de las enfermedades, así como la ineficacia de los mecanismos de prevención y de control empleados explican el aumento de la prevalencia y la morbi-mortalidad debidos a las patologías infecciosas, que podrían paliarse en gran medida mediante la elaboración y puesta en marcha de estrategias preventivas y terapéuticas eficaces.⁴

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas juega un papel fundamental en la atención al paciente, ya que permite detectar el agente etiológico causante de la infección. El diagnóstico rápido y preciso de una enfermedad transmisible es fundamental para determinar qué tipo de tratamiento debe administrar el personal sanitario. Al mismo tiempo se pueden establecer sistemas de vigilancia eficaces para controlar su propagación.^{2,4}

2.1. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Durante mucho tiempo, desde la invención del microscopio por Anton van Leeuwenhoek en el siglo XVIII, en los laboratorios de microbiología se han utilizado técnicas fenotípicas para la identificación de los microorganismos, con el objetivo de controlar tanto la evolución clínica de la enfermedad como valorar el tratamiento más adecuado. No obstante, son técnicas que muestran varias limitaciones, sobre todo al aplicarlas a cierto tipo de microorganismos.⁵

Por otro lado, las técnicas inmunológicas son muy específicas, aunque adolecen de falta de sensibilidad, generando con frecuencia resultados negativos falsos, por lo que su utilidad es limitada. Las técnicas de biología molecular en general son más robustas, por su altas especificidad y sensibilidad, por lo que ocupan una posición de preferencia como procedimientos de referencia frente a las inmunológicas. Sin embargo, su implementación no es universal, debido a su elevado coste y la alta especialización requerida del personal que las pone en práctica.⁶ Esta evolución en el diagnóstico ha sido posible gracias a los avances que se han realizado en los últimos años en el estudio y comprensión de diferentes campos científicos, especialmente de la Biología Molecular.⁷

Actualmente el diagnóstico de enfermedades infecciosas se puede realizar a partir de varios tipos de muestras y de diferentes formas:

- Diagnóstico convencional: identificación y antibiograma sobre el cultivo (infecciones bacterianas).
- Diagnóstico rápido: se realiza directamente sobre la muestra clínica.
 - Visualización al microscopio óptico y/o electrónico:
 - Fresco.
 - Tinciones.
 - Detección de componentes:
 - Antígenos estructurales.
 - Ácidos nucleicos.
 - Detección de productos:
 - Toxinas.
 - Ácidos grasos.

- Enzimas.

2.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En sus inicios, el concepto de Biología Molecular se aplicó a los trabajos científicos que se realizaron sobre el ADN, en muchos casos por físicos reconvertidos a estudiar procesos biológicos. Esta molécula fue descubierta por Johan Friedrich Miescher en el año 1869 pero su estructura no se elucidó hasta 1953, gracias a los trabajos de James D. Watson, Francis H. Crick y Rosalind Franklin.⁸

Este descubrimiento abrió un nuevo horizonte para futuras generaciones en diferentes áreas de la ciencia, incluida la investigación biomédica.⁹ El concepto de “diagnóstico molecular” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular en beneficio de la salud humana, detectando y/o cuantificando secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o proteínas.⁷

Una de las principales ventajas que ofrecen las técnicas de biología molecular es que se basan en la detección de genomas o fragmentos de ADN, por lo que no hace falta la presencia de un microorganismo viable en la muestra para generar resultados fidedignos, basta con su material genético.⁷ Actualmente, las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos están teniendo un auge muy importante, que se debe principalmente a 3 motivos:

- Alta especificidad: son capaces de detectar sin equívocos la presencia del microorganismo que se busca.
- Alta sensibilidad: para la detección se requiere la presencia solamente de unas pocas moléculas o copias del microorganismo.
- Rapidez: se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas.

Además, el uso de técnicas moleculares permite estudiar las poblaciones microbianas sin hacer aislamientos, por tanto, se evitan los sesgos que pueden surgir con el método basado en el cultivo de microorganismos.⁶ Esto ha sido determinante para que las técnicas de detección molecular se hayan convertido en muchas ocasiones en las de elección (se denominan “gold estándar”) para el diagnóstico de las patologías infecciosas, desplazando al cultivo como medio de referencia.

Su aplicación masiva en la práctica clínica de rutina requiere personal especializado y muchas horas de trabajo, por lo que tienen un coste muy alto. No obstante, están evolucionando muy rápidamente. La actual pandemia causada por el coronavirus SARS-Cov-2 ha impulsado esta evolución, debido a la implicación de muchos de los mejores científicos y de la industria biotecnológica en la mejora de estas técnicas. No solamente se han desarrollado vacunas en un tiempo record, sino que también se ha producido una mejora revolucionaria en los procedimientos de diagnóstico molecular.

2.3. TÉCNICAS BASADAS EN LA AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos, además de realizar sus funciones biológicas, pueden ser usados como moléculas de reconocimiento de alta afinidad para la detección de iones, pequeñas moléculas, proteínas e incluso de células. Por esta razón, se utilizan como biomarcadores en el diagnóstico médico y en los estudios microbiológicos, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para su detección. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos permiten:

- Detectar genes y microorganismos de interés clínico.
- Monitorizar la carga viral (como ejemplo, los virus de la hepatitis B y C, el VIH, el Citomegalovirus y el virus Ébola).
- Identificar microorganismos no cultivables.

Actualmente existen dos tipos de técnicas moleculares basadas en la amplificación y detección de ácidos nucleicos que se usan en la práctica clínica: aquellas basadas en la PCR y las técnicas basadas en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos:

- Técnicas basadas en la PCR: requieren entre 30 a 40 ciclos de amplificación con calentamientos hasta 72°C. Dichas técnicas necesitan equipos específicos (termocicladores) y consumen bastante energía eléctrica, lo que dificulta su uso en entornos con recursos limitados. Las reacciones tardan entre 20 y 100 minutos, incluida la transcripción inversa para la detección de ARN. La PCR en tiempo real (RT-PCR) es la variante utilizada en las pruebas de en el punto de recogida de las muestras (POC), que conlleva la hibridación de una sonda fluorescente durante cada ciclo de amplificación, lo que aumenta la sensibilidad y la especificidad de la prueba y reduce los tiempos de detección.
- Técnicas de amplificación isotérmica: son una alternativa para amplificar el ADN por medio de una ADN polimerasa que opera a una temperatura constante entre (65°C), por lo que eliminan la necesidad de un termociclador. Aunque algunas requieren un paso inicial de desnaturalización y el consiguiente calentamiento hasta cerca de 100°C, otras se pueden considerar genuinamente isotérmicas, por lo que ahorran energía y son fáciles de realizar en un entorno POC.

3. TIPOS DE MUESTRA UTILIZADAS

El proceso de diagnóstico en el laboratorio de Microbiología Clínica se inicia con la toma de la muestra y finaliza con la emisión de los resultados correspondientes.¹⁰ Consta de 3 fases:

- Fase preanalítica: toma de la muestra, transporte y registro en el sistema informático. Es el momento en el que se producen la mayoría de los errores que se dan en el laboratorio (31-75%), siendo incidencias relacionadas con el volante o con la muestra (insuficiente, inadecuada, contaminada, derramada o transportada de manera inadecuada). Es importante tener en cuenta:
 - La calidad de la muestra: se debe tomar una muestra procedente de la zona adecuada, con el método adecuado y en la cantidad adecuada.
 - El correcto manejo de la muestra: etiquetado, transporte y aceptabilidad.
- Fase analítica: procesamiento y análisis de las muestras.

- Fase postanalítica: obtención y emisión de resultados. Lo más importante es su interpretación, que corresponde al clínico, pero los microbiólogos deben aportar sus comentarios sobre la calidad de la muestra, que pudieran comprometer los resultados del análisis, y sobre la adecuación de la muestra respecto a los criterios de aceptación o rechazo.

Es preciso conocer los agentes etiológicos causantes del cuadro clínico, así como sus mecanismos patogénicos. Además, la muestra debe ser representativa del proceso infeccioso que se quiere diagnosticar y esto condiciona además del tipo de muestra, su procedimiento de obtención y su transporte hasta el laboratorio.^{6,10}

Concretamente, las infecciones respiratorias agudas son las patologías más frecuentes en el ser humano.¹¹ En la situación actual de pandemia por COVID-19, donde cobra especial importancia la toma de muestras biológicas para descartar esta infección, la recolección de la muestra de manera apropiada es crucial para la detección de los casos de COVID-19.¹²

La muestra de elección para detectar el SARS-CoV-2 es el exudado nasofaríngeo recolectado con hisopo nasofaríngeo, preferiblemente obtenido en los tres primeros días después del inicio de los síntomas, dado que contiene abundantes células epiteliales y secreciones infectadas. Para obtener los exudados es recomendable que los hisopos utilizados sean de poliéster o cualquier otro material sintético, nunca de algodón o alginato de calcio, ya que pueden contener sustancias que pueden alterar el resultado del diagnóstico, por ejemplo, inhibidores de las polimerasas, que pueden interferir en la reacción de PCR. A pesar de que es la muestra más frecuentemente usada, en algunos casos es posible que se contamine, por lo que las muestras del tracto respiratorio inferior, como esputo o lavado broncoalveolar, podrían ser buenas alternativas. La saliva se analiza en muchos laboratorios y presenta la ventaja de la facilidad de su recogida, que puede realizarse incluso en el domicilio de los pacientes. El inconveniente principal de este tipo de muestra es la posibilidad de que se recoja mezclada con moco, lo que dificulta enormemente su procesamiento para obtener el ARN viral.^{12,11}

A pesar de las tasas de detección subóptimas, la recolección de secreciones de las vías respiratorias superiores por medio de hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos todavía representa la modalidad de diagnóstico de primera línea para evaluar a los pacientes y a la población asintomática para el COVID-19, siempre que se realice de manera temprana y adecuada después del inicio de los síntomas¹³.

De acuerdo con las recomendaciones del Centro para el Control y Prevención de enfermedades de EE UU (CDC), se deben recolectar correctamente las muestras de vías aéreas superiores para realizar pruebas basadas en RT-PCR, siendo como ya se ha dicho la muestra nasofaríngea la opción más utilizada. En cambio, la Administración de Drogas y Alimentos del mismo país (FDA), recomienda no utilizar una sola muestra, ya que diversos estudios han descrito como tras repetidas pruebas de RT-PCR con resultado negativo en muestras tomadas con hisopo nasofaríngeo, se obtuvieron resultados de RT-PCR positivos cuando se analizó el líquido de lavado bronco-alveolar procedente de los mismos pacientes.^{13,14} Esto podría deberse, al menos en parte, a que el título de ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior alcanza su punto máximo entre los días 7 y 10 después del inicio clínico.¹³

Diversos estudios han descrito que el SARS-CoV-2 puede invadir sobre todo el aparato respiratorio, pero también el aparato digestivo y la sangre, entre otros. Además de tener importancia

en la práctica clínica, resulta beneficioso tener una variedad amplia de posibles muestras de diferente origen para la detección del coronavirus.¹⁴

- En un estudio realizado por Peng et al. en China¹⁵, se recolectaron diferentes tipos de muestras para detección de ARN del SARS-CoV-2. Las tasas de positividad que se obtuvieron, según su origen, fueron las siguientes: frotis faríngeo 78% (la tasa de positividad más alta obtenida), sangre 22%, hisopo anal 22% y orina 11 %.
- En otro estudio en EE UU¹⁶ se reportó que mientras que las muestras recogidas con hisopos orofaríngeo y nasofaríngeo dieron positivo para SARS-CoV-2, las de suero y orina de los mismos pacientes generaron un resultado negativo.
- En un reporte de un caso en Japón¹⁷, los investigadores concluyeron que, a pesar de obtener una PCR negativa en un paciente con alta sospecha clínica, no era suficiente para descartar la infección. Por lo que, en estos casos donde se sigue teniendo una alta sospecha clínica de infección por SARS-CoV-2, se debe realizar un lavado broncoalveolar de vías respiratorias inferiores para confirmar el diagnóstico.

Por lo tanto, en el caso de los pacientes afectados por SARS-CoV-2, se debe considerar la recogida de varios tipos de muestra para reducir así el número de falsos negativos.¹⁸ Esto mejoraría la tasa de detección de este coronavirus, con sus posteriores consecuencias beneficiosas en lo referente a la disminución de su propagación.¹⁴ Además, la recogida de diferentes tipos de muestras para el SARS-CoV-2 resulta de gran ayuda a la hora de monitorizar los cambios, la progresión y el pronóstico de la enfermedad.¹⁹

TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO DEL SARS-CoV-2

CULTIVO

Es una herramienta muy útil para el aislamiento y la caracterización del virus, pero no se recomienda para fines diagnósticos, si no para su análisis y el estudio de su comportamiento. En Wuhan, investigadores realizaron aislamientos de virus inoculando muestras de lavado broncoalveolar en células epiteliales de las vías respiratorias humanas y en las líneas celulares Vero E6 y Huh-7. A este virus aislado se le denominó 2019-nCoV. En otro estudio realizado en la India, se informó del primer aislamiento del SARS-CoV-2 mediante el empleo de células Vero CCL-81. Las células fueron inoculadas con muestras nasofaríngeas y orofaríngeas, para poder observar los efectos citopáticos específicos del SARS-CoV-2. Así, se describieron la morfología específica del coronavirus, su tamaño y los orgánulos intracelulares en los que se puede observar el virus.

ENSAYO INMUNOLÓGICO

A medida que el virus se introduce en el organismo, el sistema inmune genera anticuerpos frente a la infección. Las pruebas de detección de anticuerpos anti-Sars-Cov-2 nos permiten saber si una persona ha estado expuesta a la Covid-19. No obstante, estas pruebas no sirven para la detección de casos activos de infecciones por SARS-CoV-2. Las pruebas inmunológicas tienen limitaciones a la hora

de usarlas durante la fase temprana de la infección, porque durante ese tiempo la respuesta inmune aún se está construyendo. Por este motivo, no se consideran de elección para el diagnóstico de la Covid-19.

En el futuro, estas pruebas inmunológicas pueden tener un papel fundamental en la identificación de personas que se hayan recuperado de la COVID-19 en el pasado. Su resultado también puede ayudarnos a elegir el plasma convaleciente, que puede utilizarse como opción de tratamiento para las personas infectadas por COVID-19.

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La RT-PCR se utiliza en infecciones respiratorias agudas para detectar virus causales, por lo que es uno de los métodos más precisos actualmente para detectar el SARS-CoV-2. Es una herramienta mediante la cual se puede detectar la presencia de material genético específico. Al realizarse la amplificación y análisis de los ácidos nucleicos dentro de un sistema cerrado, las posibilidades de que se produzcan falsos positivos se reducen al mínimo. Por todo ello, las pruebas de diagnóstico molecular para SARS-CoV-2, por RT-PCR se siguen considerando las gold-estándar.

La RT-PCR en tiempo real facilita el análisis del resultado mientras el proceso está aún en curso, lo que hace que sea más útil que la PCR convencional, que proporciona el resultado al final. La mayoría de los sistemas de diagnóstico molecular que se están desarrollando se basan en ensayos de RT-PCR en tiempo real para la infección por Covid-19 y utilizan cebadores de al menos dos de sus genes. LAMP y amplificación isotérmica multiplex, seguida por la detección de microarrays, son otros métodos que han sido desarrollados.

Ante la situación actual, el diagnóstico temprano es crucial para identificar los casos de infección por coronavirus y prevenir la transmisión comunitaria. Por eso resulta imprescindible recolectar la muestra adecuada en el momento adecuado para un diagnóstico adecuado.

3.1. EXUDADO NASOFARÍNGEO

Las muestras que hasta el momento se recomiendan para el diagnóstico microbiológico del SARS-CoV-2 son las del tracto respiratorio superior: frotis nasofaríngeo y/o orofaríngeo. En la población pediátrica de corta edad es posible sustituir los frotis por lavado o aspirado nasofaríngeo. Las muestras del tracto respiratorio inferior como esputo, aspirado endotraqueal, lavado broncoalveolar o broncoaspirado, se tendrán en cuenta especialmente en pacientes con enfermedad respiratoria grave, ya que en estos casos parecen generar mayor rendimiento; especialmente las procedentes de pacientes con neumonía.¹²

- Recolección de frotis nasofaríngeo: con un hisopo fino y flexible de dacrón o poliéster, se realiza la toma de muestras respiratorias por la fosa nasal y paralelo al paladar. Primero se introduce por una de las narinas hasta alcanzar la rinofaringe y después se realiza el mismo procedimiento en la otra. Es preciso que el hisopo alcance una profundidad igual a la distancia desde las fosas nasales hasta la abertura externa de la oreja. Se debe mantener unos segundos en el lugar para que el hisopo absorba las secreciones. Después se debe retirar

lentamente mientras se gira el hisopo: 2-3 rotaciones de 180 ° y se mantiene 5 segundos en contacto con la mucosa.^{12,13}

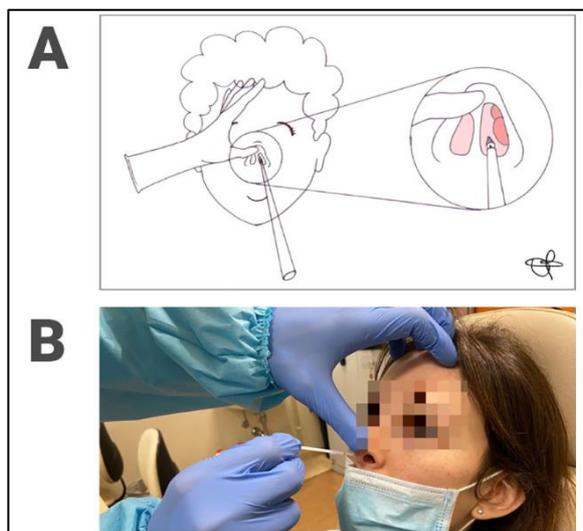


Ilustración 1.

A) Ejecución de hisopado nasofaríngeo. B) Correcta colocación del hisopo en la nasofaringe.¹³

- **Recolección de frotis oro-faríngeo:** en este caso la muestra se toma con un hisopo más grueso y rígido. Con un depresor lingual se sujeta la lengua del paciente y con el hisopo se frota la pared posterior de la garganta, para la obtención de células infectadas por el virus.^{12,13}

En ambos casos, una vez se extraen los hisopos, deben ser introducidos de forma inmediata en tubos estériles con 2-3 mL de medio de transporte viral. Si se toma exudado nasofaríngeo y orofaríngeo al mismo paciente se pueden introducir los dos hisopos juntos en el mismo tubo de medio de transporte. La muestra ha de conservarse en nevera hasta su envío al laboratorio.¹²

Ventajas¹³

- Alcanza su punto máximo de detección durante la etapa inicial de la infección.
- Se realiza el frotis en la zona con mayor carga viral, por lo que tienen una alta efectividad.
- Buena accesibilidad.

Inconvenientes¹³

- Requiere personal capacitado en la recogida de muestras.
- Riesgo de contaminación de la muestra.
- Riesgo de infección nosocomial.
- Métodos dolorosos e incómodos para el paciente (sobre todo en niños).
- Pueden generar complicaciones durante la toma de la muestra como hematomas, erosiones de la mucosa y sangrado (sobre todo en pacientes con alteraciones de la coagulación).
- No se puede utilizar para monitorizar la carga viral.

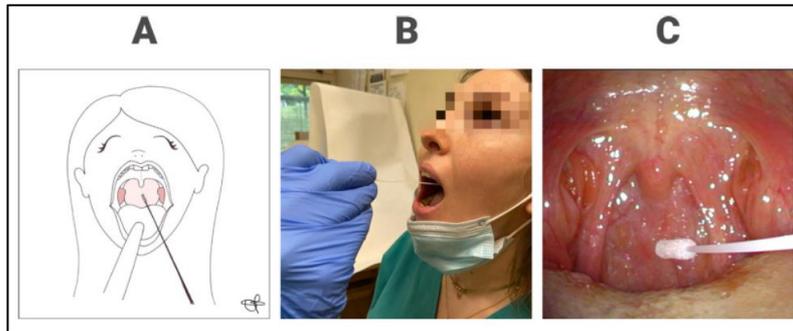


Ilustración 2.

A) Ejecución de hisopado orofaríngeo. B) Colocación del hisopo en la pared orofaríngea posterior. C) Documentación mediante videoendoscopia transnasal.¹³

Según la evidencia reciente, la tasa de detección de ARN del SARS-CoV-2 sobre la base de la RT-PCR realizada tanto en NPS como en OPS sería menor de lo esperado. De hecho, se ha informado que entre el 3% y el 34,7% de los pacientes con hallazgos en la tomografía computarizada (TC) de tórax que sugieren COVID-19 inicialmente tuvieron pruebas de frotis negativas.²⁰ Además, la mayoría de los pacientes con un resultado de RT-PCR precozmente negativo, pero hallazgos consistentes en la TC desarrollaron posteriormente una positividad de RT-PCR en exámenes seriados después de aproximadamente 5 días, como media.²¹

Los resultados falsos negativos se atribuyen principalmente a la reducida carga viral durante los primeros días de la infección en pacientes asintomáticos o con síntomas leves y a la fase final de la infección después de la recuperación clínica, a pesar de la persistencia del virus en el organismo.

Durante la infección temprana, el virus faríngeo alcanza su punto máximo durante la primera semana de síntomas, pero luego disminuye gradualmente y comienza a encontrarse pruebas positivas en fluidos orales. En cambio, en la fase final de la enfermedad encontraríamos positividad sanguínea y gastrointestinal durante la infección tardía.²²

3.2. SALIVA

Hasta ahora se han descrito 3 vías diferentes por las cuales el SARS-CoV-2 puede presentarse en la saliva:²³

- En el tracto respiratorio superior e inferior, de forma que el virus se relaciona con la cavidad oral a través de secreciones de manera bidireccional.
- Circulante en el torrente sanguíneo, de manera que puede acceder a la boca a través del líquido gingival crevicular, un exudado específico de la cavidad oral que contiene proteínas locales derivadas de la matriz extracelular y proteínas derivadas del suero.
- Mediante la colonización e infección de las glándulas salivales mayores y menores, con la posterior liberación de partículas en la saliva a través de los conductos salivales.

El SARS-CoV-2 ingresa a las células al igual que el coronavirus del SARS a través del receptor celular ACE2. En todo el tracto respiratorio hay abundantes células con receptores ACE2, así como las células epiteliales de los conductos de las glándulas salivales.²³

Ventajas:²³

- Procedimiento sencillo
- Económicamente rentable.
- No causa molestias, por lo que el paciente proporciona fácilmente muestras de saliva sin ningún tipo de procedimiento invasivo, a diferencia del hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo.
- Puede ser realizado por los propios pacientes fuera del ámbito hospitalario, por lo que disminuiría el riesgo de infecciones nosocomiales.
- Pueden utilizarse para monitorizar la carga viral.
- Permite la recolección tanto de secreciones nasofaríngeas descendientes como las de fluidos inferiores que ascienden desde el árbol traqueobronquial (aclaramiento de garganta).
- Permite la recolección de muestras fuera de los centros hospitalarios, como en clínicas ambulatorias o en centros de atención primaria, que son lugares donde existe un gran número de pacientes y donde la saliva representaría un tipo de muestra práctica no invasiva, disminuyendo así el riesgo de transmisión nosocomial de la COVID 19.
- Por otro lado, el uso de muestras de saliva permitiría ahorrar el tiempo de espera para la recolección de muestras y, por lo tanto, agilizar la disponibilidad de los resultados.

Las muestras de saliva se pueden proporcionar fácilmente solicitando a los pacientes que escupan en un frasco estéril. De hecho, existen muchos dispositivos de recolección de saliva disponibles en el mercado que permiten una recolección segura y en condiciones de esterilidad sin comprometer la calidad y la cantidad de la muestra. La saliva tiene un papel fundamental en la transmisión de COVID-19 en la población, de hecho, estudios actuales han demostrado que la saliva podría ser una alternativa validada no invasiva para el diagnóstico y el monitoreo de la carga viral de SARS-CoV-2, proporcionando una plataforma rentable y conveniente. Es fundamental que los centros de investigación a nivel mundial consideren los beneficios de este fluido, así como la posibilidad de identificar marcadores que permitan realizar el diagnóstico de manera segura y poco invasiva.

Inconvenientes²³

- Es paciente-dependiente, ya que depende de su capacidad para comprender las instrucciones de uso y el cumplimiento de las condiciones de asepsia. Si no se respetan estas recomendaciones, existe un riesgo de contaminación de la muestra, porque muchos pacientes podrían recoger saliva mezclada con moco, lo que dificulta la extracción del ARN viral con la pureza requerida para evitar la presencia de inhibidores de las polimerasas.
- Hay estudios que han demostrado que el solo 28 % de los pacientes con COVID-19 podrían producir un esputo que sirva para diagnóstico de la enfermedad.²³

	DIAGNÓSTICO SALIVAL	DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL
Toma de muestra	Expulsión de saliva en un recipiente	Hisopos orofaríngeos/oronasales y LBA
Lugar de toma de muestra	Hospitalario y extrahospitalario.	Hospitalario.
Riesgo de contaminación	Bajo	Alto
Riesgo de transmisión nosocomial	Bajo	Alto
Monitorización de carga viral	Adecuado	Inadecuado
Personal de toma de muestra	Autorrecolección	Personal cualificado
Complicaciones	Ninguna	Sangrado, hematoma, desgarro
Tiempo de recolección	Rápido	Lento

Ilustración 3. Resumen comparativo de diagnóstico mediante saliva vs métodos convencionales de diagnóstico de COVID-19.²³

Dos estudios realizados en China obtuvieron los siguientes resultados:

- Estudio 1: incluyó a 12 pacientes con COVID-19. Se demostró que el ARN del SARS-CoV-2 podía detectarse en la saliva de todos menos uno (91,7 %). Además, se realizó una recolección seriada de las muestras donde se demostró que podía utilizarse para monitorizar la carga viral. Cabe destacar que una carga viral más alta se correlacionó con una edad más avanzada, pero no con la gravedad de la infección.²⁴
- Estudio 2: se realizó en 23 pacientes adultos con COVID-19. Descubrieron que, a diferencia de otros síndromes respiratorios agudos graves con patogenia diferente, la carga viral salival fue máxima durante la primera semana desde el inicio de los síntomas y posteriormente disminuyó de forma progresiva, con detección persistente de ARN viral durante más de 20 días después del inicio de los síntomas en un tercio de los pacientes.²⁵

3.3. SANGRE

Según el estudio de Wang et al., se recolectaron 1070 muestras de 205 pacientes con COVID-19 y se encontró que las tasas de positividad fueron: lavado broncoalveolar (93%), esputo (72%), hisopos nasales (63%), biopsia de cepillo de fibrobroncoscopio (46%), frotis faríngeos (32%), heces (29%) y sangre (1%).¹⁸ Ninguna de las 72 muestras de orina dio positivo.¹⁸

Se observó como un pequeño porcentaje de muestras de sangre tuvo resultados positivos en la prueba de PCR, lo que sugiere que la infección a veces puede ser sistémica.^{18,26}

3.4. HECES

En dicho estudio también destaca que se detectó virus vivo en las heces, lo que implica que el SARS-CoV-2 puede transmitirse por vía fecal.¹⁸

Según un estudio realizado por investigadores de la Universidad de Hong Kong, en los pacientes con COVID-19 que tienen una infección viral intestinal activa y prolongada, las pruebas realizadas en muestras de heces podrían ser más seguras, exactas y no invasivas, respecto a los hisopados nasales tradicionales para detectar el coronavirus. Los investigadores analizaron las muestras de heces de 15 pacientes con COVID-19 y encontraron que la infección viral intestinal estaba activa en 7 de los 15, incluso en ausencia de síntomas gastrointestinales. Tres de ellos mostraron una infección viral activa hasta seis días después de la eliminación del virus de sus muestras respiratorias. La carga viral en las heces de bebés y niños es muchas veces más alta que la de los adultos y podría ser equivalente a la de las muestras respiratorias de adultos. La actividad de la infección y la replicación viral también persiste durante más tiempo en el intestino de los bebés y los niños. Las muestras de heces son más convenientes, seguras y no invasivas de recolectar en la población pediátrica y pueden dar resultados exactos. Esto hace que la prueba de heces sea una opción mejor para la detección de COVID-19 en bebés, niños pequeños y aquellos cuyas muestras respiratorias son difíciles de recolectar.²⁷

En conclusión, la detección de muestras virales en sangre y en heces se ha realizado sobre todo en los cuadros más graves de la enfermedad, cuando la infección es sistémica. La transmisión del virus por vías respiratorias y extrarrespiratorias puede ayudar a explicar la rápida propagación de la enfermedad.^{18,26}

4. LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La aparición de la reacción en cadena de la polimerasa supuso un punto de inflexión en el diagnóstico molecular y en la biología en general. Su inventor, Kary Mullis, fue reconocido en 1993 con el Premio Nobel de Química. El proceso, que permite la amplificación de secuencias específicas de ADN, fue descrito originalmente por Kjell Kleppey, y por el Nobel de 1968 Har Gobind Khorana.

Las mejoras introducidas por Mullis permitieron convertir a la PCR en una técnica central en bioquímica y biología molecular. Su impacto social se reflejó en su descripción por el diario The New York Times como “altamente original y significativa, dividiendo virtualmente la biología en dos épocas: antes y después de la PCR”. Es la técnica molecular por excelencia y la que marcó el inicio de la genética molecular.

Supuso un gran avance técnico, ya que permite conseguir una gran cantidad de copias de una secuencia específica de ADN *in vitro* con muy poca cantidad de ADN de partida, para su posterior estudio y caracterización, de manera rápida y sencilla. Se basa en la progresión de varios ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, en cada uno de los cuales la ADN polimerasa va generando copias de una región específica del ADN delimitada por dos cebadores (primers). A partir de una copia de la región a amplificar, se obtienen millones de copias, lo cual permite su detección y de esta forma se evidencia la presencia de la región de ADN en la muestra determinada. Requiere ADN de doble hebra para realizar este proceso.

Con el “boom” de la ingeniería genética en los años 1970 se habían implementado herramientas para editar el ADN e introducirlo en células procariotas y eucariotas mediante clonación. Sin embargo, faltaba disponer de un sistema de copia masiva del ADN, lo que se resolvió con la introducción de la PCR.

Cada ciclo de la reacción de PCR consta de 3 etapas:

DESNATURALIZACIÓN

Consiste en separar las dos hebras del ADN mediante un agente desnaturizante, principalmente calor, por encima de 90 °C, aunque también se puede recurrir a la desnaturización química, tratando el ADN con hidróxido sódico. De esta forma, se separan las dos hebras complementarias del ADN, permitiendo el acceso de los cebadores (sondas de ADN). Este proceso se realiza a 95-98°C durante 30-60 segundos.

HIBRIDACIÓN

Una vez separadas las dos hebras, los cebadores hibridan con las regiones de secuencia complementaria en el molde, correspondientes a zonas concretas conocidas del genoma de cada microorganismo. La hibridación se produce a temperatura en el rango de 50-65ª, dependiendo de la composición de los cebadores. La especificidad de la PCR viene dada por los cebadores, es decir, si hibridan significa que esa muestra de ADN corresponde al microorganismo concreto. Se usan dos cebadores, que son dos pequeñas moléculas de ADN (típicamente 20/30 nucleótidos, que también se denominan oligonucleótidos) de hebra simple que tienen orientación opuesta y que se unirán a los extremos 3´ de las dos hebras complementarias, delimitando así la zona del ADN que se va a amplificar.

El material genético para la hibridación es muy amplio, siendo sus principales dianas: plásmidos de virulencia, fragmentos cromosómicos bacterianos, ARNr, ADN o ARN viral y secuencias repetitivas de ADN eucariota. La hibridación de ácidos nucleicos en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se puede realizar en:

- Muestra clínica: son específicas, pero muy poco sensibles. Por ejemplo, la detección de un microorganismo en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Para que el resultado sea satisfactorio, se necesita partir de gran número de microorganismos y en el LCR nunca los hay, por lo que su aplicación en este caso es escasa.
- Cultivo: supone añadir tiempo al diagnóstico, aunque en algunos tipos de microorganismos resulta útil, como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, porque el cultivo ya está hecho en el tubo de Lowenstein. Permite la identificación de microorganismos y la detección de genes de interés clínico (relacionados con resistencias, virulencia, etc.).

AMPLIFICACIÓN

La polimerasa sintetiza ADN a partir de los cebadores, generando una hebra complementaria al molde, a temperaturas entre 68°C y 72°C (dependiendo de la polimerasa), durante 30-60 segundos/Kb. Se amplifica la región delimitada por los cebadores, incluyendo a los mismos. Hay que destacar que se utilizan polimerasas termoestables, de bacterias termófilas (*Thermus aquaticus* y otras), ya que, en caso contrario, la polimerasa quedaría inactivada por calentamiento en la fase inicial del proceso.

La repetición de este proceso durante varios ciclos genera la producción exponencial de nuestro fragmento de interés. La polimerasa copia siempre en dirección 5'-3'. Las moléculas que están entre los dos primers se multiplican de forma exponencial mientras que el resto lo hace de forma lineal. Esto ocurre porque después del primer ciclo en el que la polimerasa ha copiado a partir de un cebador, se une a esa copia el otro cebador con la secuencia complementaria, por lo que la polimerasa empezará a copiar en el lado contrario y continúa copiando mientras permanece unida al ADN. Las moléculas pequeñas se multiplican de manera exponencial, mientras que las lineales solo se generan dos en cada ciclo. De esta manera solo se amplifica la región comprendida entre los cebadores.

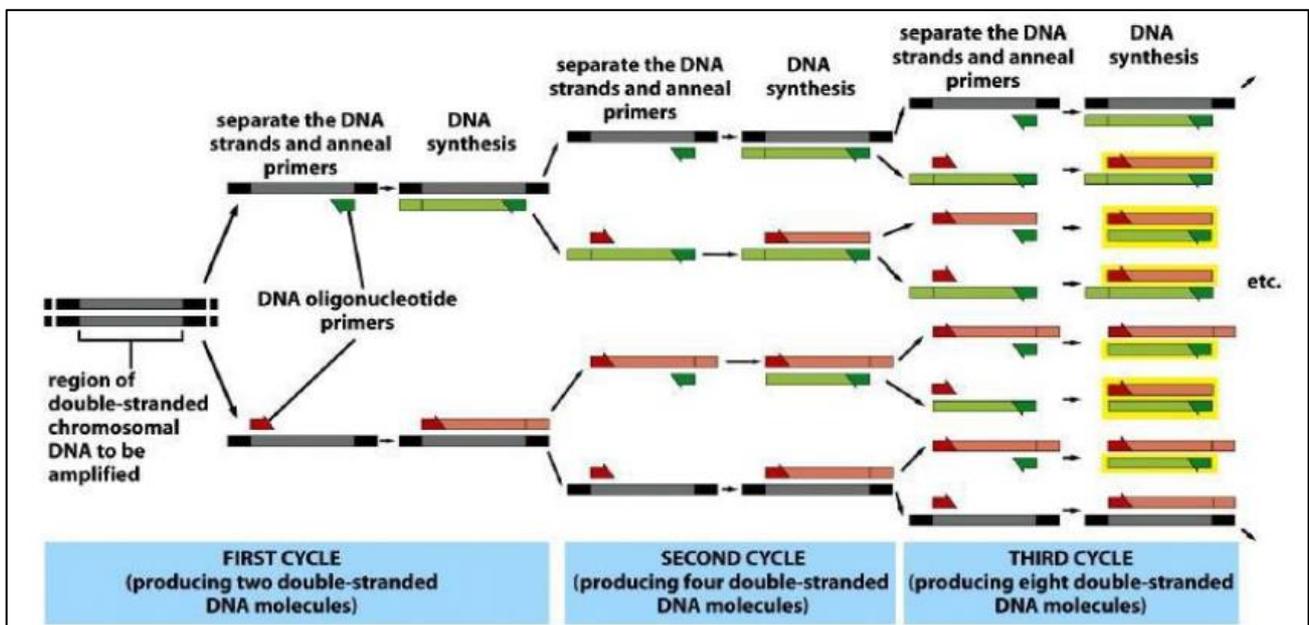


Ilustración 4. Ciclos durante la PCR. Alberts B. Molecular biology of the cell. 6ª ed. Londres, Inglaterra: Garland Science; 2017.

Se realizan múltiples ciclos en los que se usan cebadores para conseguir una amplificación exponencial del mismo fragmento de ADN que interesa de la muestra, el cual se denomina amplicón. Posteriormente, el resultado es sometido a una electroforesis en un gel de agarosa y, en caso de ser positivo, se observarán unas bandas de un peso molecular específico, correspondiente a la región amplificada. La especificidad para un determinado microorganismo la proporcionan los cebadores.

Por su sencillez y rapidez, esta técnica puede aplicarse en el diagnóstico clínico, a diferencia de la hibridación. Además, es una prueba muy específica, ya que los cebadores se diseñan en regiones del genoma específicas de cada microorganismo. Las dianas de amplificación son las mismas que en el caso de la hibridación. Entre ellas, se pueden mencionar los genes o regiones del ADN que más se utilizan en el diagnóstico molecular de microorganismos: *recA*, *rpoB*, 16S, 23S, 16S-23S, etc.

Si bien la técnica de amplificación del ADN más utilizada ha sido la PCR, no es la única. Se pueden mencionar, además:

- Técnicas de amplificación de la diana
 - TMA (amplificación mediada por transcripción).
 - SDA (reacción en cadena con desplazamiento de la polimerasa).
 - LCR (reacción en cadena de la ligasa).
- Técnicas de amplificación de la señal
 - “Branched” DNA (hibridación con ADN ramificado).
 - QB replicasa.
 - Fagos reporter.

Para realizar estas técnicas es necesario colocar en paralelo un control positivo que asegure que la reacción ha funcionado, ya que hay que realizar una serie de procedimientos y procesamientos en los que se puede dañar o perder la muestra. Por este motivo, se buscan siempre las zonas más estables del ADN. El material genético ribosomal bacteriano es 70S y está formado por dos subunidades, la subunidad 50S (con ARNr 23S y ARNr 5S) y la subunidad 30S (con un ARNr 16S). En el ADN se encuentran en forma de operón *rrn* los genes codificantes para todos estos ARNs ribosómicos. El ARNr 16S es el más importante y utilizado hoy en día. Fue propuesto en 1977 por Carl Woese como “reloj molecular” para establecer una nueva división del árbol filogenético de la vida. Su tamaño es de aproximadamente 1500 pares de bases, por lo que se puede secuenciar entero fácilmente. Es un gen que se ha conservado a lo largo de la evolución, común a todos los microorganismos. A lo largo de este gen se encuentran tanto regiones conservadas, comunes a todos los microorganismos, como regiones divergentes específicas de cada tipo de bacteria, incluso a nivel de especie, por lo que se puede utilizar al mismo tiempo como control y como identificador de la especie del microorganismo. Los cebadores que se utilizan como control son complementarios a las regiones conservadas del gen.

4.1. APLICACIÓN AL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Dada la naturaleza de la técnica, la alta especificidad de la PCR viene dada por la hibridación de los cebadores complementarios a la secuencia blanco y su elevada sensibilidad a la baja cantidad de ADN que requiere para iniciar la amplificación. Desde su invención, se han descrito varias variantes de la PCR que han optimizado el diagnóstico clínico.

TIPO DE PCR	CARACTERÍSTICAS	APLICACIONES
PCR ESTÁNDAR	Amplificación de un segmento de ADN utilizando 2 partidores. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de un segmento de ADN
PCR MÚLTIPLE	Amplificación de 2 o más segmentos de ADN utilizando varios partidores en una sola reacción de amplificación. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de PCR.
PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphisms)	PCR estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos genéticos (SNPs).
RT (Reverse transcriptase)-PCR	Síntesis de cADN a partir de ARN mediante transcripción inversa	Expresión de genes. Detección de virus ARN.
PCR-RT (Real time) o qRPC	PCR estándar donde se utilizan tinciones o sondas con fluoróforos para la detección de fragmentos amplificados. Puede ser del tipo multiplex.	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación del ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes (asociada a una reacción de transcriptasa inversa).

Ilustración 5: Tipos de PCR, características y aplicaciones.⁷

GENERACIÓN DE PRODUCTO DURANTE LA PCR

La cantidad de producto que se produce en una reacción de PCR depende de la cantidad de molde que existe al inicio de la reacción. Esta propiedad permite usar la PCR para cuantificar la cantidad de material de partida. La representación de la cantidad de producto de una PCR sigue siempre una curva sigmoidea, al principio apenas detectamos el producto, pero cuando empieza a producirse una amplificación exponencial veremos la curva exponencial, y en un momento determinado se satura, porque no hay ADN suficiente, se acaban los dNTPs y no se genera ya más producto (ilustración 6).

- FASE 1: Cantidad de ADN por debajo del límite de detección.
- FASE 2: Crecimiento exponencial en cada ciclo.
- FASE 3: Saturación de la reacción.

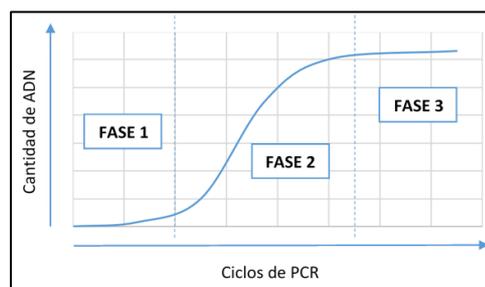


Ilustración 6. Generación de producto de la PCR

PCR SEMICUANTITATIVA

Consiste en realizar un número de ciclos de PCR controlado para identificar diferencias en la cantidad de partida dos ADN molde mediante electroforesis. Para ver las diferencias de la fase exponencial se realiza una electroforesis en un gel de agarosa, que permite apreciar la diferencia entre el grosor de las bandas, visualmente y/o por densitometría.

Primero se extrae y se purifica el ADN del microorganismo de la muestra, seguido de amplificación de un segmento seleccionado del genoma mediante PCR. Por último, se lleva a cabo la detección de fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Una vez teñido se expone a la luz ultravioleta y los electrones del bromuro de etidio se estimulan produciendo fluorescencia, pudiendo así visualizar los fragmentos de la secuencia de ADN amplificados.

Se llama PCR semicuantitativa porque solo es cuantitativa en la parte exponencial. Como ejemplo del uso de la PCR semicuantitativa podemos mencionar la aplicación al diagnóstico del cáncer. En varios tipos de tumores humanos la excesiva proliferación celular está asociada a la amplificación del oncogen *myc*. Mediante una PCR con cebadores específicos del gen *myc* y del gen *max* (control interno) se pueden diferenciar las células tumorales de las normales, ya que en las primeras el aumento en el número de copias de *myc* se refleja en una banda más gruesa que la obtenida cuando se amplifica el ADN obtenido de células sanas.

PCR CUANTITATIVA

En la PCR cuantitativa (PCRq) o PCR a tiempo real, en lugar de medirse la cantidad de producto al final de la reacción, se mide después de cada ciclo de PCR. Para ello se añade un producto fluorescente que hibrida con el ADN de doble cadena, para medir después de cada ciclo de PCR la cantidad de fluorescencia que se produce, por tanto, la cantidad de ADN que se está amplificando. Se marca un nivel determinado de fluorescencia (Ct) y cuando hay suficiente cantidad brilla, lo que nos indica cuántos ciclos se necesitan para llegar al nivel de fluorescencia que hemos determinado. Una muestra que tiene más copias de ADN de partida llegará antes al Ct establecido, precisando un menor número de ciclos.

Los procesos de amplificación y detección, por tanto, se producen de forma simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de realizar una electroforesis posterior, ya que los mismos termocicladores incorporan un lector de fluorescencia. Se ha utilizado para el diagnóstico de la infección por el virus Ébola y en la actual pandemia masivamente para detectar el SARS-Cov-2. Esta técnica de PCR cuantitativa sirve no solo para determinar la presencia del virus, sino que permite conocer también la carga viral, lo que indica la urgencia y el tipo de tratamiento que necesita cada paciente.

RT-PCR

La retro-PCR se basa en el uso de ARN en lugar de ADN como molde. El ARNm solo está compuesto por exones y la PCR utiliza ADN polimerasa, no ARN polimerasa. En primer lugar, se convierte el ARNm mediante una enzima denominada transcriptasa inversa en ADNc (ADN copia, compuesto únicamente por exones). Una vez que tenemos este ADNc hacemos la PCR normal.

Esta RT-PCR sirve sobre todo para detectar virus ARN. Por ejemplo: virus Ébola o el virus VIH.

MODALIDADES ADICIONALES DE LA PCR

PCR anillada (“Nested-PCR”)

Consiste en dos reacciones de PCR en la que el producto de la primera sirve de molde para la segunda. Esto aumenta la sensibilidad. Generalmente se emplea cuando se quiere estudiar una región muy pequeña del genoma, de tal manera que al hacer dos PCR disminuye la distorsión del producto de estudio en la segunda PCR.

PCR múltiple (“multiplex PCR”)

Se usan varias parejas de cebadores en una misma reacción de PCR, que se replican en varias regiones del ADN. Es muy útil en medicina forense para estudiar varias regiones de un individuo, ya que se estudian regiones que son muy variables en diferentes individuos.

4.2. APLICACIÓN A LA DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

El SARS-CoV-2 surgió en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan en la provincia de Hubei (China), y se propagó rápidamente al resto del mundo. El 11 de marzo de ese mismo año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) caracterizó a la infección por SARS-CoV-2 como pandemia.²⁸

Los coronavirus son un grupo diverso de virus que infectan a muchos animales diferentes y pueden causar infecciones respiratorias de leves a graves en los seres humanos. En los últimos años se han descrito 3 brotes epidémicos:

- SARS-CoV: “neumonía asiática” en noviembre del 2002.
- MERS-CoV causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio en el año 2012 en Arabia Saudita.
- El último que ha sido el SARS-CoV-2 cuya infección se ha denominado COVID-19.

En cuanto a las características generales de los coronavirus ²⁹, hay que destacar:

- Son los virus de ácido ribonucleico con los genomas más grandes: alrededor de 30.000 pares de bases, que codifican 9860 aminoácidos.³⁰ Esta capacidad de codificación expansiva parece proporcionar y necesitar una gran cantidad de estrategias de expresión génica.
- Existe una amplia expresión de genes no estructurales por desplazamiento del marco ribosómico.
- Presentan expresión de genes downstream por síntesis de ácido ribonucleico mensajero subgenómico anidado en 3', confiriéndole un gran parecido al ácido ribonucleico mensajero del hospedador.

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia Coronaviridae. El análisis filogenético de todo el genoma muestra que está agrupado con el SARS-CoV y los coronavirus relacionados que se encuentran en los murciélagos, lo que lo coloca en el subgénero Sarbecovirus del género Betacoronavirus.³¹ Cabe destacar que comparte una identidad de secuencia genómica del 79% con el SARS-CoV y el 50% con el MERS-CoV.

Se clasifican según sus características genéticas preponderantes, que se localizan dentro de la poliproteína replicasa ORF1ab (pp1ab). La organización de su genoma la comparte con otros betacoronavirus: los seis marcos de lectura abiertos funcionales (ORF) están ordenados de 5' a 3' en este orden: replicasa (ORF1a / ORF1b), spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). Además, existen siete ORF que codifican proteínas accesorias que se intercalan entre los genes estructurales.

4.2.1. GENOMA DEL SARS-CoV-2 ^{32,33}

Está compuesto por una cadena ARN de sentido positivo.³² Este ARN codifica:

- 2 proteínas de gran tamaño, que se traducen en RdRp (enzima polimerasa vírica):
 - **ORF1a.**
 - **ORF1b.**
- 4 proteínas estructurales:
 - **S** (“Spike”).
 - **E** (Envoltura).
 - **Proteína M** (Membrana).
 - **N** (Nucleocápside).

5'UTR Noncoding Sequence (265nt)	ORF1ab (21290nt)	S (3822nt)	ORF3a (828nt)	E (228nt)	M (669nt)	ORF6a (186nt)	ORF7a (366nt)	ORF7b (132nt)	ORF8 (193nt)	N (908nt)	ORF10 (117nt)	3'UTR Noncoding Sequence (229nt)
	ORF1ab Polyprotein	Surface Glycoprotein	ORF3a protein	Envelope protein	Membrane glycoprotein	ORF6 protein	ORF7a protein	ORF7b protein	ORF8 protein	Nucleocapsid phosphoprotein	ORF10 protein	

Ilustración 7. Estructura del genoma del coronavirus SARS-CoV-2.³³

4.2.2. ESTRUCTURA DEL SARS-CoV-2 ³³

- **Glucoproteína S** (“spike”): tiene 2 subunidades (S1 y S2). Media la unión del receptor y la fusión de la membrana, lo que determina el tropismo del hospedador y las capacidades de transmisión.³²
 - S1: contiene el dominio RBD de unión al receptor celular, por lo tanto es la proteína determinante del tropismo de virus y además constituye uno de los epítomos fundamentales en la respuesta inmune protectora humoral y celular. Asimismo, constituye el principal componente de las vacunas.

- S2 interviene en la fusión de la envoltura vírica con la membrana de la célula diana.
- **Proteína M** (membrana/matriz): mantiene la curvatura de la membrana y la unión de ésta con la cápside.
- **Proteína N** (nucleocápside): está asociada al ARN viral.
- **Proteína E** (envoltura): funciona como canal iónico, interviene en el ensamblaje y la liberación del virus.
- **Hemaglutinina esterasa** (HE): facilita la entrada del virus a la célula huésped.

Cuando el ARN vírico entra en el citoplasma de la célula huésped, una polimerasa dependiente de ARN inicia la replicación.

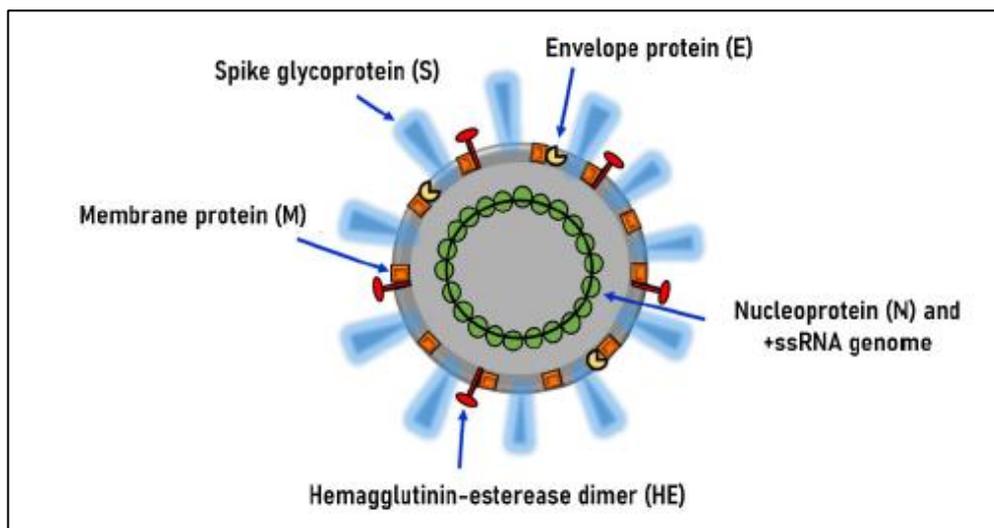


Ilustración 8. Morfología del SARS-CoV-2.³³

Mientras las proteínas ORF1a, ORF1b y las cuatro proteínas estructurales (S, E, M, N) se mantienen invariantes entre las distintas especies de coronavirus, la longitud del genoma vírico varía en gran medida en función del número y tamaño de unas proteínas «accesorias» que codifican. La presencia de estas proteínas accesorias parece ser fundamental para la adaptación del virus a hospedadores específicos.

4.2.3. DETECCIÓN DEL SARS-CoV-2

Para la realización de técnicas de PCR, se han identificado una serie de dianas moleculares a lo largo del ARN del coronavirus: helicasa (Hel), nucleocápside (N), transmembrana (M), envoltura (E) y glicoproteína S (spike). Otros genes que codifican proteínas estructurales que se pueden utilizar para el diagnóstico del SARS-CoV-2 serían: hemaglutinina-esterasa (HE), ORF1a y ORF1b, y ARN-polimerasa.³⁴

Tradicionalmente, los objetivos de los ensayos de RT-PCR de coronavirus incluían los genes conservados y/o expresados abundantemente, como los genes S y N estructurales y los genes RdRp no estructurales y el marco de lectura abierto (ORF) 1a / b de la replicasa.³⁴

Corman et al., analizaron una serie de secuencias del genoma viral relacionadas con el SARS para diseñar un conjunto de cebadores y sondas. Entre los genomas virales relacionados con el SARS, descubrieron tres regiones que tenían secuencias conservadas: el gen RdRp (en la región de ORF1ab), el gen E (envoltura) y el gen N (nucleocápside).³⁵ Los genes RdRp y E proporcionaron una alta sensibilidad analítica para la detección (detección de 3.6 y 3.9 copias por reacción), mientras que el gen N proporcionó una sensibilidad analítica más pobre (detección de 8,3 copias por reacción).

Un estudio publicado en Hong Kong, China³⁴, encontró que el ensayo de detección del gen RdRp/Hel tenía el límite más bajo de detección *in vitro* y además es el que tiene mayor sensibilidad y especificidad para RT-PCR en tiempo real entre los genes RdRp/Hel, S y N del SARS-CoV-2.³⁴

Actualmente, las recomendaciones de la OMS se centran en el estudio del **gen E**, seguido de un estudio de confirmación utilizando el **gen RdRp**, como detección de primera línea de casos de Covid-19.³² En cambio, en EEUU la CDC recomienda utilizar las dos **dianas proteicas de nucleocápside (N1 y N2)**.³²

Es aconsejable utilizar al menos dos dianas moleculares para evitar la situación de una posible deriva genética del SARS-CoV-2 y la reacción cruzada con otros coronavirus endémicos. Sin embargo, el diseño ideal incluiría al menos una región conservada y una región específica, para mitigar estos efectos. Se han realizado varios estudios en todo el mundo utilizando RT-PCR para el diagnóstico de infecciones por Covid-19, de los cuales la mayoría utilizaron al menos dos dianas en combinación para la detección del virus.³²

Reference	Genes	Forward Primer	Reverse Primer	Probe Sequence ^a
Corman et al. (2020)	RdRP	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC
	E	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG
	N	CACATTGGCACC CGCAATC	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA
Rao et al. (2020)	ORF1ab	CCCTGTGGGTTTTACACTTAA	ACGATTTGTCATCAGCTGA	CCGTCTGCG/ZEN/ GTATGTGGAAGGTTATGG
U.S. Centers for Disease Control and Prevention (2020)	N	GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAT	CAGACATTTGCTCTCAAGCTG	TTGCTGCTGCTTGACAGATT
	RdRP	AGATTTGGACCTGCGAGCG	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG
	N1	GACCCCAAAATCAGCGAAAT	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	ACCCCGCAT/ZEN/TACGTTTGGTGGACC
	N2	TTACAAACATTGGCGCAA	GCGGACATTCGGAAGAA	ACAAATTTGCCCGCAGCGCTTCAG
Chu et al. (2020)	N3	GGGAGCCTTGAATACACCAAAA	TGTAGCACGATTGCAGCATTG	AYCACATTGGCACC CGCAATCCTG
	ORF1b	TGGGGYTTTACRGTTAACCT	AACRCGCTTAAACAAAGCACTC	TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG
	N	TAATCAGACAAGGAACTGATTA	CGAAGGTGTGACTTCCATG	GCAAATTTGCAATTTGCGG
Nao et al. (2019) Institute of Pasteur (2020)	N	AAATTTGGGGACCGAGAAC	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	ATGTCGCGCATTGGCATGGA
	RdRP	ATGAGCTTAGTCTCTGTTG	CTCCCTTTGTTGTGTTGT	AGATGCTTTGTGCTGCGGTA
China CDC (2020)	RdRP	GGTAACTGGTATGATTTTCG	CTGGTCAAGGTTAATATAGG	TCATACAAACCACGCCAGG
	E	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG
	ORF1ab	CCCTGTGGGTTTTACACTTAA ACG	ACGATTTGTCATCAGCTGACCG	CCGTCTGCGGATGTGGAAAGGTTATGG
Thailand Ministry of Public Health (2020)	N	GGGGAACCTTCTCTGCTA GAA T	CAGACATTTGCTCTCAA GCT G	TTGCTGCTGCTTGACAGATT
	N	CGTTTGGTGGACCTCAGAT	CCCCACTGCGTCTCCATT	CAACTGGCAGTAACCA

^a All sequences are given in the direction of 5' to 3' (from left to right). Probe sequences are always labeled with a reporter dye at 5' (usually FAM) and a quencher at the 3' (usually BHQ).

Ilustración 9: genes diana, cebadores y secuencias de sonda utilizadas en los kits de RT-PCR hasta la fecha (10-06-2021) para la detección del SARS-CoV-2.²⁹

Los pacientes pueden clasificarse como positivos para SARS-CoV-2 (caso activo) o negativos para SARS-CoV-2, según los resultados de la reacción RT-PCR. Sin embargo, esta técnica no brinda información para los pacientes que ya se han recuperado del SARS-CoV-2, ya que la carga viral se elimina del organismo después de la recuperación. Del mismo modo, los pacientes que se encuentran

en los primeros días de la infección viral pueden no generar un resultado positivo con esta prueba, debido a una cantidad inadecuada de virus recogida en los hisopos. Por lo tanto, es posible que se requieran muestras procedentes de diferentes partes del cuerpo para una prueba de confirmación. El desarrollo de kits de detección más rápidos que no dependan de personal capacitado, reacciones avanzadas o laboratorios equipados, es de gran importancia.

5. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA

Actualmente la infección COVID-19 se diagnostica con RT-PCR, pero esto tiene una serie de inconvenientes⁹:

- Escasa disponibilidad de los kits de PCR para que puedan cubrir la gran demanda poblacional.
- Algunos hospitales comunitarios fuera de las ciudades carecen de la infraestructura adecuada.
- La necesidad de presencia de SARS-CoV-2 viable en la muestra.
- Los pacientes asintomáticos infectados previamente, no podrán ser identificados.

Es por eso que, según la OMS, es de absoluta importancia que se lleven a cabo investigaciones para mejorar el diagnóstico de esta infección, concretamente en el desarrollo de pruebas de detección de ácidos nucleicos y proteínas y sobre todo tener en cuenta las técnicas de detección tipo “point of care”.³⁶

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos han tenido un gran impacto en el desarrollo de la biología molecular y concretamente en el diagnóstico médico. Aunque la PCR continúa siendo la técnica molecular más utilizada en la mayoría de los ámbitos, especialmente en la clínica médica, no está exenta de limitaciones⁹:

- Requiere desnaturalización de la doble cadena de ADN y posteriores ciclos de desnaturalización-amplificación, por lo que requiere termocicladores, que son aparatos con un coste elevado. En consecuencia, esto limita en gran medida su aplicación a gran escala, sobre todo en entornos con recursos limitados y para realizar “Point-of-care testing” (POC) o pruebas de cabecera, que se definen como pruebas médicas que se realizan en el lugar donde se proporciona atención al paciente.
- Requiere personal capacitado y un equipo avanzado para realizar la técnica de forma correcta.
- El tiempo de ensayo es relativamente largo, lo cual tampoco hace que sea una técnica adecuada para comunidades a gran escala.

Para solventar las limitaciones de las técnicas anteriores han surgido las técnicas de amplificación isotérmica, como una alternativa prometedora, que consigue obtener una amplificación rápida y eficiente de un molde específico de ADN a temperatura constante, lo cual difiere de los sistemas de PCR convencionales.³⁷ La principal ventaja frente a la PCR, que requiere un termociclado complejo para producir la desnaturalización y extensión, es que se pueden realizar en condiciones más sencillas, con una sola reacción a temperatura constante.

La mayoría de estos métodos se basan en la amplificación de ácidos nucleicos utilizando cebadores que se utilizan con estrategias diferentes a los que se usaban en la PCR. En base a la cinética de la reacción, se pueden clasificar en:

- Los que operan mediante amplificación exponencial: la mayoría amplifican la plantilla de ácidos nucleicos utilizando 2 o más cebadores. Los principales son:
 - NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification).
 - SDA (Strand Displacement Amplification).
 - HRCa (Hyperbranching rolling circle amplification).
 - PG-RCA (Primer generation Rolling circle amplification).
 - LAMP (Loop-mediated isothermal amplification).
 - HAD (Helicase-dependent amplification).
 - RPA (Recombinase polymerase amplification).
 - EXPAR (Exponential amplification reaction).
 - WGA (Whole genome amplification).
- Los que operan mediante amplificación lineal.
- Los que operan por amplificación en cascada.

5.1. AMPLIFICACIÓN MEDIADA POR BUCLE (LAMP)

Esta técnica fue propuesta por Notomi y colaboradores en el año 2000 y fue creada con el objetivo de mejorar la especificidad y la simplicidad de las técnicas utilizadas hasta el momento.⁹

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema con 4 cebadores específicos que incluyen: 2 cebadores internos [forward inner primer (FIP) y backward inner primer (BIP)], y 2 cebadores externos, que son F3 y B3.³⁸ Se utiliza la polimerasa Bst de *Bacillus stearothermophilus*.⁹ Durante la primera etapa se produce la estructura inicial que requiere 4 cebadores.³⁸ En la segunda etapa, una vez completado un ciclo de reacción, solo requiere los 2 cebadores internos para la síntesis del ADN.

Los cebadores reconocen un total de 6 sitios distintos, flanqueando así la secuencia de ADN que se desea amplificar.³⁸ Los cebadores FIB y BIP juegan un papel importante en la técnica LAMP: cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores.

- Las secuencias (23-24 nucleótidos) dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación en un ADN, son denominadas F2c y B2, respectivamente.
- Dos secuencias internas (23-24 nucleótidos) que se sitúan a 40 nucleótidos de los extremos de F2c y B2, son designadas F1c y B1.
- Dos secuencias (17-21 nucleótidos) externas a los extremos de F2c y B2, son F3c y B3.

Las secuencias de FIP y BIP tienen el siguiente diseño:

- FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c.
- BIP contiene la secuencia B1c complementaria a B1, un espaciador de TTTT y a B2.

- Los dos cebadores externos consisten en B3 y la secuencia F3 complementaria a F3c.

En primer lugar, se parte de la muestra de ADN, que se desnaturaliza con calor. Después, se enfría rápidamente en hielo. La reacción de LAMP se inicia a continuación por la adición de ADN polimerasa y se eleva la temperatura a 65º C durante aproximadamente una hora.

Después, el cebador interno FIP se une a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El cebador externo F3, se une a F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra. Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, puede formar una estructura enrollada (en bucle o “loop”) en un extremo. Esta hebra sencilla de ADN sirve como molde para la síntesis de ADN iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra a partir del cebador B3, originando la producción de un ADN en forma de doble asa (“dumb-bell”), que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo (“stem loop”) por la síntesis de ADN del autocebador.

Este producto que se genera en la primera reacción sirve de inicio para los posteriores ciclos de LAMP. Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura en herradura de ADN y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra, lo que genera una separación intermedia en la estructura en herradura de ADN con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en la base y un asa o bucle formada en el extremo opuesto a través de la secuencia BIP. Posteriormente, la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra produce una estructura complementaria a la herradura de ADN original y un ADN en herradura reparado con una base elongada dos veces (hasta el doble de copias de la secuencia blanco) y un bucle en el extremo opuesto. Ambos productos sirven luego como molde para un cebador BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con diferentes longitudes en su tallo y con estructuras similares a una coliflor con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena.

La alta especificidad de la técnica viene dada por el uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias diferentes) en las etapas iniciales de la reacción LAMP y dos cebadores (reconocimiento de las cuatro secuencias) durante los siguientes pasos.³⁷

Los procedimientos estándar de LAMP son básicamente tres: (i) extracción del ADN o del ARN, según el agente infeccioso presente en la muestra (sangre, secreción, cultivo, etc.), (ii) amplificación del ácido nucleico, (iii) Detección del ácido nucleico presente por inspección visual directa (con fluorescencia) o con turbidímetro en tiempo real. La reacción LAMP genera estructuras de alto peso molecular que contienen hasta 10⁹ copias del blanco.

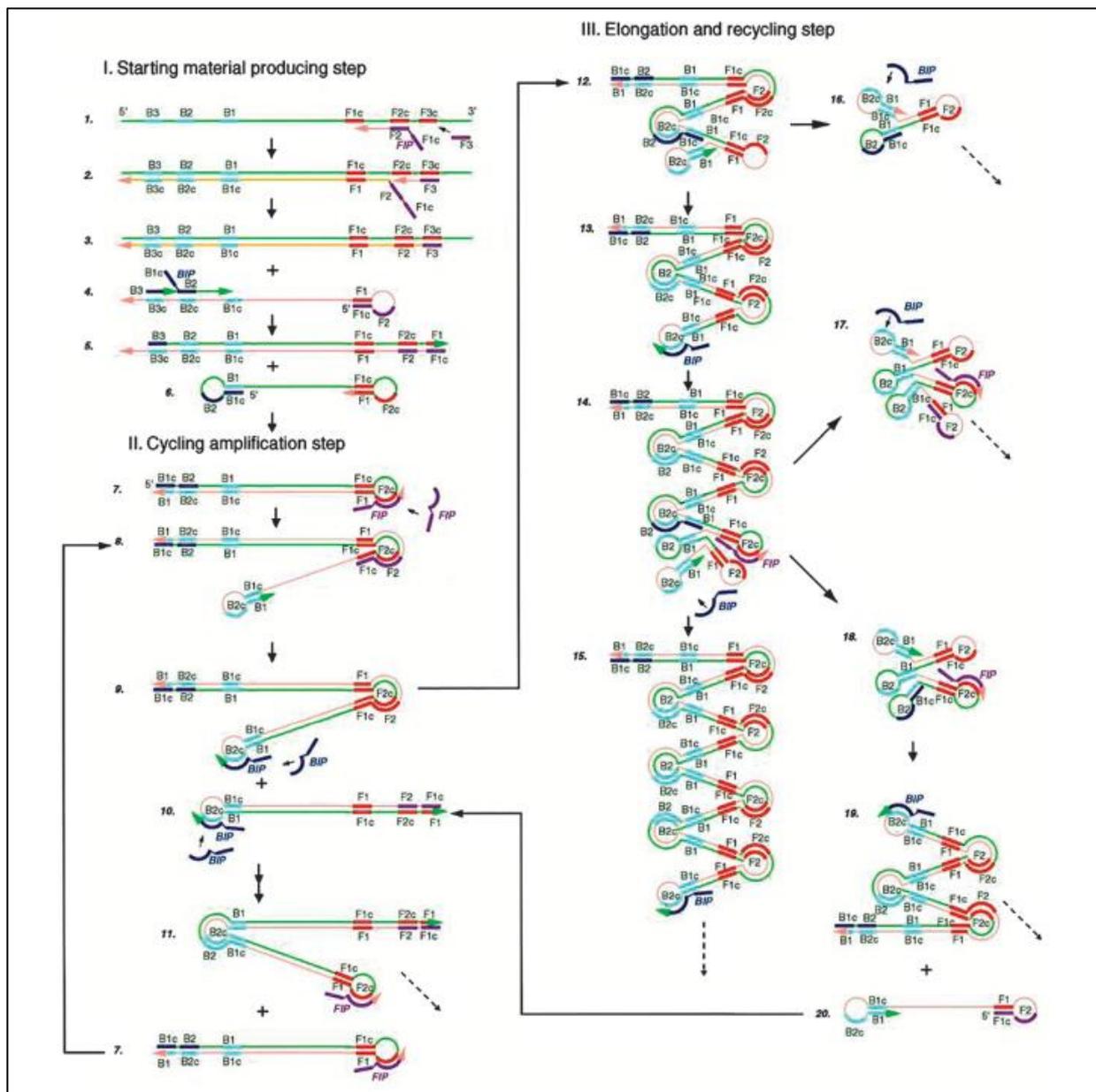


Ilustración 10. Mecanismo de amplificación mediada por bucle (LAMP). Para este método se utilizan 4 sondas (F1c-F2, F3, R1c-R2, R3). F1 es complementario con F1c (c de secuencia complementaria).³⁸

5.2. AMPLIFICACIÓN BASADA EN SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO (NASBA)

También conocida como replicación de secuencia autosostenida (3SR). Esta técnica se desarrolló en 1991, y fue especialmente creada para amplificar secuencias de ARN monocatenario imitando la replicación del ARN viral.³⁸

Requiere 3 enzimas: transcriptasa inversa, RNasa H y ARN polimerasa dependiente de ADN. Durante la reacción, el ARN diana primero se hibrida con el cebador y se transforma en ADN complementario (ADNc) mediante la transcriptasa inversa y la RNasa H. Después se forma el ADNc bicatenario que contiene una región promotora utilizando el segundo cebador. A partir de la transcripción de este ADNc de doble cadena mediante la ARN polimerasa T7 se producen muchas hebras de ARN complementario al ARN diana, formándose los moldes para la transcripción inversa (RT) original.

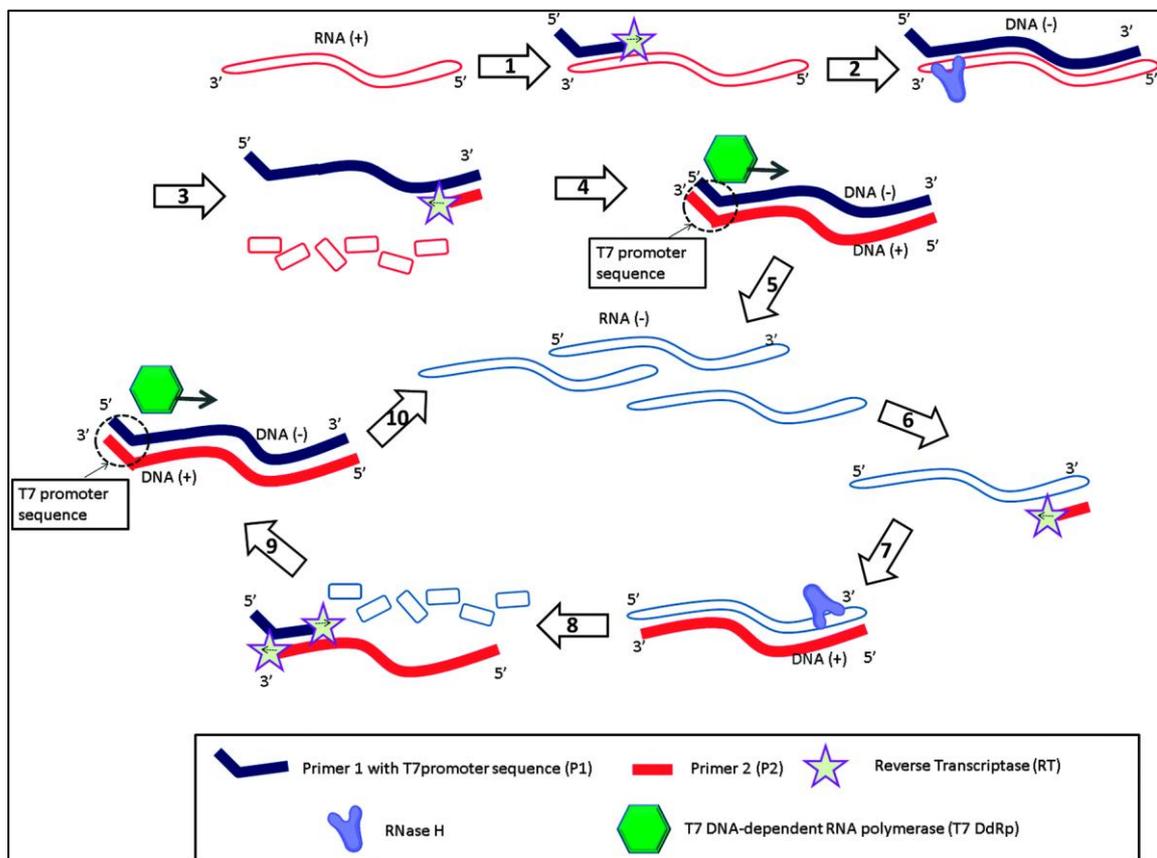


Ilustración 11. Esquema de la técnica NASBA.³⁸

El ARN antisentido y el ADNc sintetizados, sirven como molde para que se produzca el mismo ciclo de manera continua de la transcripción inversa y las reacciones de transcripción, lo que da como resultado una amplificación exponencial del ARN antisentido complementario al ARN diana.

NASBA puede lograr hasta 10^9 copias en 1,5-2 horas a una temperatura de 41 °C. La sensibilidad de esta técnica es comparable a la de la RT-PCR. Además, permite una detección rápida y sencilla, sin

ningún paso que requiera desnaturalización. Para la detección del amplicón en NASBA, se han utilizado diversos métodos, como electroforesis en gel, fluorescencia, ensayos colorimétricos, etc.

5.3. AMPLIFICACIÓN MEDIADA POR RECOMBINASA Y POLIMERASA (RPA)

Utiliza una recombinasa para separar la doble hebra de ADN. La recombinasa es una proteína que cataliza la hibridación de pequeños cebadores (oligonucleótidos) con la secuencia molde homóloga.³⁸ Durante la amplificación, el complejo recombinasa-cebador escanea la plantilla en busca de las secuencias homólogas. Una vez encuentra el sitio específico, la enzima abre la doble hebra de ADN para permitir la hibridación del cebador y la secuencia diana. Las estructuras resultantes se estabilizan mediante proteínas de unión a la hebra de ssADN (usadas también en la técnica HDA)

Después, la ADN polimerasa reconoce el extremo 3' del cebador, que ha quedado libre tras el desensamblaje de la recombinasa. Así se inicia la reacción de extensión del cebador. Finalmente, la unión/extensión de dos cebadores opuestos genera una copia completa del amplicón.

La repetición cíclica de este proceso da como resultado la amplificación exponencial de la secuencia objetivo. Así, en 40 minutos se obtienen millones de copias a una t^a de 37-42 °C, con un límite de detección muy bajo. Como en la mayoría de estas técnicas, se puede utilizar una sonda fluorescente y un sistema de detección de flujo lateral.

Se han comercializado varios kits de RPA (TwistDx, Cambridge, Reino Unido), que se han aplicado para detectar varios patógenos bacterianos y virus.

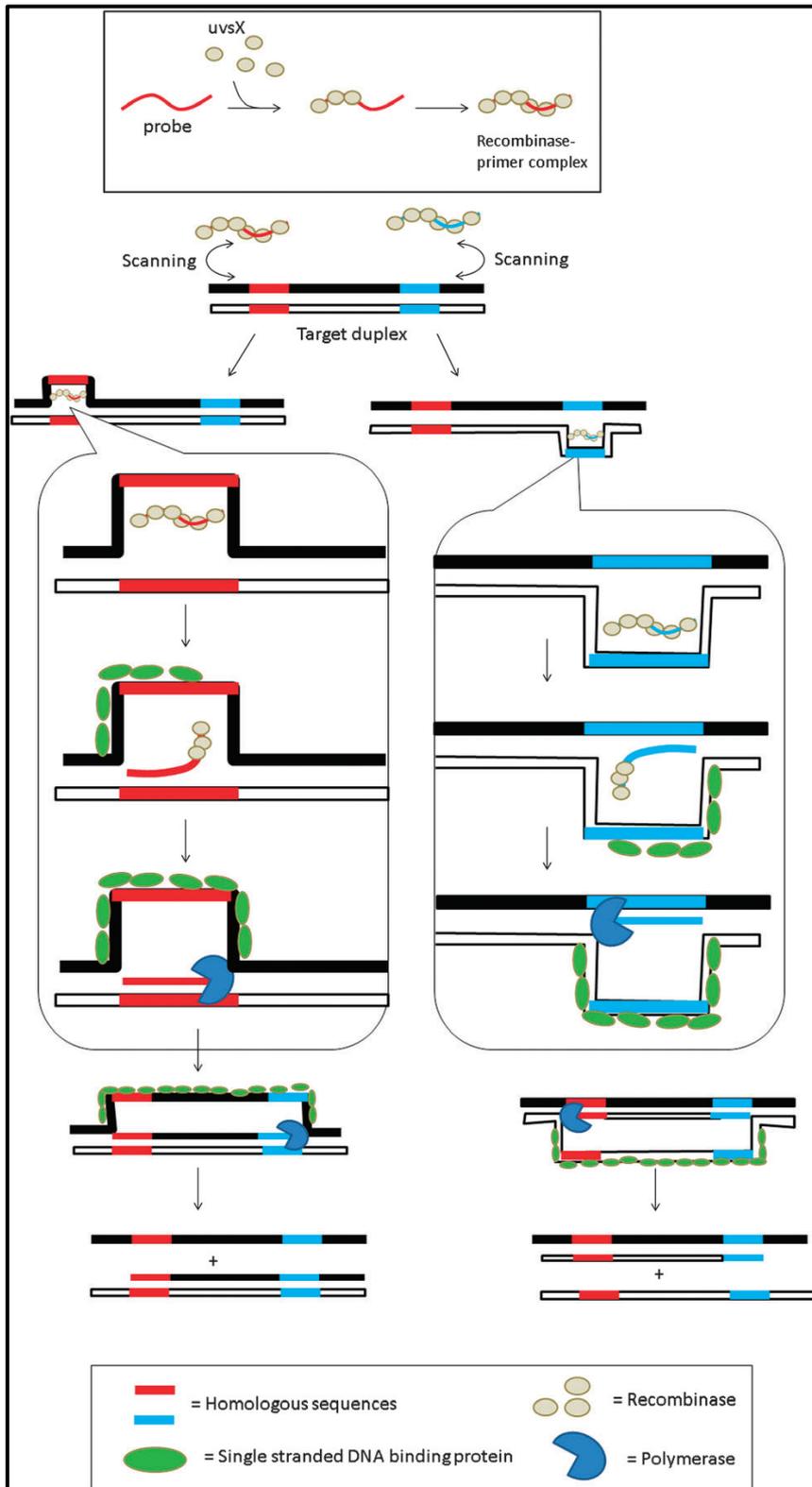


Ilustración 12. Esquema de la técnica RPA.³⁸

5.4. AMPLIFICACIÓN DE CÍRCULO RODANTE (RCA).

Es una técnica útil para la amplificación de ADN, especialmente en situaciones en las que se dispone de pequeñas cantidades de material genético.

La polimerasa utiliza una plantilla circular (“padlock probe” o sonda de candado) de la secuencia diana del ADN genómico para sintetizar una sola y larga hebra de ADN de concatémeros que contiene cientos de repeticiones en cadena de la secuencia complementaria a la secuencia circular.³⁸

Componentes:

- ADN polimerasa:
 - Phi29, Bst, y Vent exo-ADN polimerasa para amplificación de ADN. La polimerasa Phi29 es la más procesiva de estas y por lo tanto la más usada comúnmente.
 - T7 ARN polimerasa para amplificar ARN.
- Un cebador o primer.
- Plantilla/secuencia circular de ADN.
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP).
- ADN ligasa del fago T4.

Requiere ADN polimerasa durante la amplificación y una ligasa para la circularización de la plantilla de ADN (3'-hidroxi-5'). Después el primer cebador (P1) complementario a la padlock probe, inicia posteriormente la reacción de extensión catalizada por la ADN polimerasa, que genera un producto de ADN monocatenario con cientos de copias del molde. A continuación se inducen reacciones secuenciales de extensión del cebador mediante la unión del segundo cebador (P2) a la secuencia complementaria del ADN monocatenario.

Se produce desplazamiento de la hebra y como resultado produce secuencias repetitivas en tándem de la sonda circular original. Estas hebras a su vez sirven como plantillas para el próximo ciclo de extensión de P1. Como resultado, se generan ramas de ADN en continua expansión, conectadas a la sonda de candado ciclada. El proceso de desplazamiento de hebra también puede generar fragmentos de ADN de doble cadena que comprenden una o varias unidades del círculo.

Se producen aproximadamente 10^9 copias del círculo en 90 minutos y no requiere cebadores exógenos que causan a veces amplificaciones no específicas. Por otro lado, aunque no usa cebadores, requiere una ligasa y la generación de copias de la secuencia circular es compleja.

La RCA tiene generalmente 3 fases:

- Circularización de la secuencia: una secuencia lineal que se circulariza al hibridar con otra secuencia específica. Esta secuencia puede entonces ser ligada para convertirse en la secuencia circular que será amplificada.
- Amplificación inducida por cebador.
- Detección de los productos de la amplificación, lo cual puede hacerse de varias maneras. Una muy común es el uso de nucleótidos trifosfato unidos a fluorocromos, pero hay una gran variedad de técnicas.

Produce una amplificación lineal, ya que la polimerasa da vueltas constantemente a cada secuencia circular, y sus productos complementarios crecen a velocidad constante. Para incrementar la cantidad de productos se han desarrollado varias técnicas. Una es la llamada Hyperbranched RCA (HRCA), en la cual se añaden cebadores complementarios a los productos de la RCA, que son a su vez amplificados incrementando exponencialmente la amplificación.

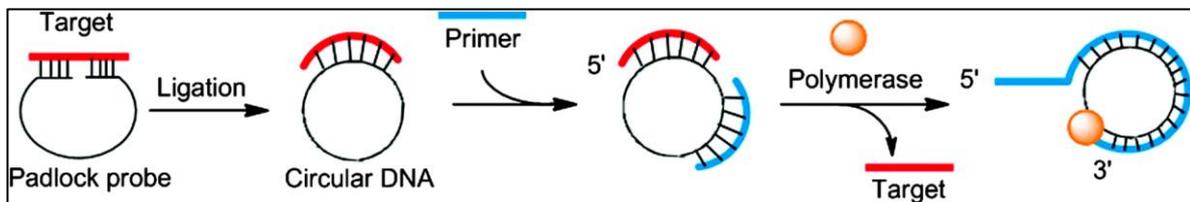


Ilustración 13. Esquema de la amplificación de círculo rodante (RCA).³⁸

5.5. AMPLIFICACIÓN POR DESPLAZAMIENTO DE CADENA (SDA).

Fue propuesta en 1992 y mejorada ese mismo año por Walker et al.³⁹ A diferencia de NASBA, se trata de un proceso de replicación de ADN que permite la acumulación exponencial de productos de ADN bicatenario del ADN genómico. Se basa en un proceso continuo de corte y polimerización/desplazamiento.

Antes de la amplificación, las plantillas de ADN diana se preparan mediante reacciones de desplazamiento con 4 cebadores o por escisión mediada por enzimas de restricción.³⁸ Después se desnatura con calor en presencia de 2 cebadores (P1 y P2) y 2 cebadores-templado dúplex (P1-T1 y P2-T2). Los cebadores tienen un extremo 5' que se utiliza para el reconocimiento de la endonucleasa.

Después, la ADN polimerasa extiende los extremos 3' de los dúplex para producir ADN de doble cadena, que contiene sitios de corte sobre los que actuará la endonucleasa. Al realizar el corte, se generan nuevos extremos 3' para iniciar una nueva reacción de extensión con el desplazamiento de la hebra objetivo, seguido de un nuevo corte. Los ciclos de corte y polimerización/desplazamiento, producen de forma continua un complemento de ADN monocadena de P1-T1 que actúa de molde para P2 y el complemento de P2-T2, que actúa de molde para P1. Estos pasos se repiten continuamente a lo largo de la amplificación, lo que produce una acumulación exponencial de las secuencias diana.

Antes requería un fosforotioato en el sitio de reconocimiento del amplicón durante la polimerización, para asegurar que la endonucleasa de restricción cortara solo una hebra en lugar de dos. Ahora este paso se ha suprimido, gracias al uso de la NEasa, que corta solo una hebra del ADN bicatenario.

Se generan hasta 10^7 copias en 2 horas a 37°C, aunque requiere un paso previo de desnaturación térmica a 95°C para la generación del ADN diana. Esta técnica tiene una cinética exponencial por el uso de 2 cebadores, aunque existe una versión más antigua que tiene una cinética lineal, usando un solo cebador (P1 o P2).

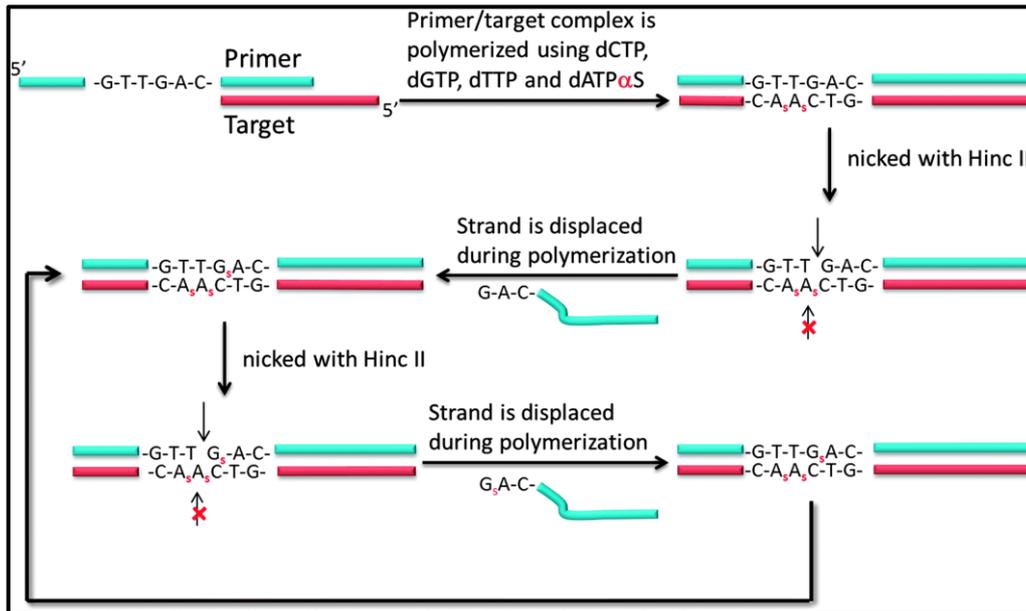


Ilustración 14. Esquema de la técnica SDA.³⁸

5.6. AMPLIFICACIÓN DEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD HELICASA (HDA).

A diferencia de la PCR, los métodos de amplificación isotérmica no son capaces de amplificar grandes regiones de ADN, del orden de varias kilobases (kb), que se requieren en muchas aplicaciones de diagnóstico e investigación. Por eso en 2004, para evitar estas deficiencias, se desarrolló la técnica HDA.³⁸

In vivo el ADN se replica mediante polimerasas y se utilizan varias proteínas accesorias, incluida la ADN helicasa, para separar las hebras de ADN. En la técnica HDA también se emplea una helicasa para separar el ADN de doble hebra y generar plantillas (de doble hebra) para la hibridación de cebadores y la posterior extensión de ADN mediante la ADN polimerasa. El proceso conlleva 3 etapas:

- Separación del molde.
- Hibridación del cebador.
- Extensión del cebador.

Es una técnica similar a la PCR, salvo que en este caso el ADN de doble hebra se abre mediante la helicasa, en lugar de calentar a 95°C. Produce más de un millón de copias de la secuencia diana. El desarrollo de proteínas termoestables ha permitido que en vez de a 37°C como se hacía al principio, se puedan amplificar más rápido a mayor temperatura (60-65 °C) y con más sensibilidad y especificidad para la detección de patógenos.

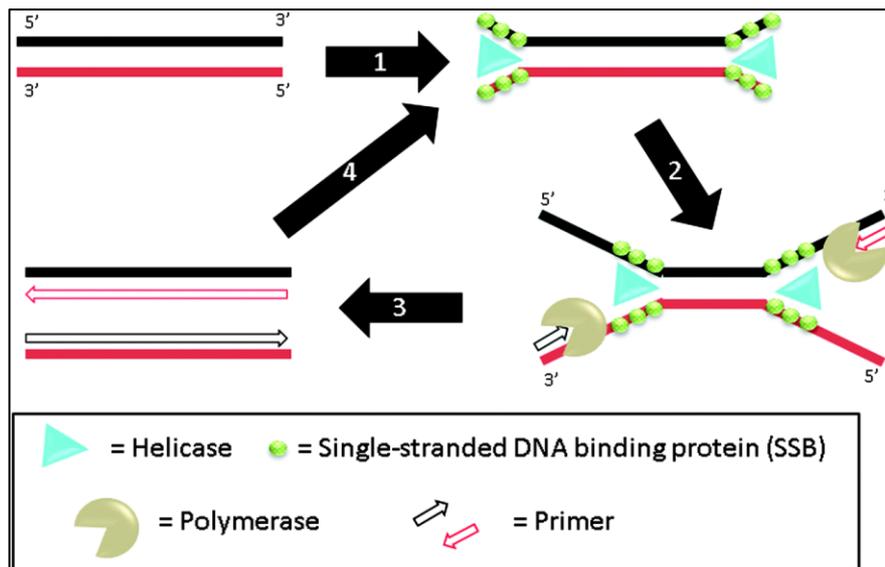


Ilustración 15. Esquema de la reacción HDA.³⁸

Según un estudio realizado por Laurence et al.⁴⁰ en el que se comparaban las distintas técnicas de amplificación isotérmica frente a la PCR obtuvieron los siguientes resultados:

- Para el gen N, MCDA fue más rápido (5,2 min) que LAMP (10 min) y RT-PCR (20 min). La RT-PCR obtuvo en cambio la mayor sensibilidad con 10 copias/ μ L en comparación con MCDA (100 copias/ μ L) y LAMP (500 copias/ μ L).
- Para ORF1ab, MCDA y LAMP tenían una velocidad similar con 9,7 y 8,4 min respectivamente. LAMP fue la más sensible para la detección con 50 copias/ μ L en comparación con MCDA (500 copias/ μ L).

Por lo tanto, estos 3 métodos en concreto proporcionan diferentes ventajas para la detección del SARS-CoV-2: MCDA es la técnica más rápida, mientras que la RT-PCR es la más sensible. Estas ventajas deben considerarse para determinar que método de amplificación de ácidos nucleicos es más adecuada en una determinada situación.

Como habíamos mencionado anteriormente, los análisis rápidos, portátiles y con alta sensibilidad son esenciales para controlar la epidemia por COVID-19. La técnica LAMP puede ofrecer una alta velocidad, sensibilidad y portabilidad para la detección del SARS-CoV-2. Otro método sería el MCDA, que utiliza 10 cebadores en lugar de 6, por lo que se ha sugerido que pueda tener una sensibilidad y velocidad mayor que la técnica LAMP, aunque aún no se ha desarrollado para la detección del SARS-CoV-2. Resultados recientes no publicados sugieren que la técnica RPA es la que puede tener mayor proyección en el futuro, permitiendo además la identificación de las variantes del SARS-Cov-2, si se combina con técnicas rápidas de secuenciación.

6. GESTIÓN DE LA RECOGIDA DE MUESTRAS Y EJECUCIÓN DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA

Como se mencionó anteriormente, durante la fase preanalítica se producen la mayoría de los errores potencialmente evitables en el laboratorio. Es por eso que la información diagnóstica de máxima calidad depende principalmente de la calidad de la muestra enviada, que a su vez depende del cumplimiento de una serie de requisitos en cuanto al procedimiento de la toma, la cantidad, el transporte y finalmente el manejo de la muestra.^{10,6,41}

En primer lugar y de forma general, la toma de muestras para estudio de virus se puede realizar con torundas de algodón, dacrón, rayón o nylon con bastón de aluminio o plástico.¹⁰ Posteriormente se clasifican en función del tipo de muestra: las tomadas de los pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2 son clasificadas como sustancias infecciosas categoría B; es decir, contienen agentes biológicos capaces de causar infección en seres humanos o animales, pero que no cumplen los criterios de la categoría A.^{42,10} La designación oficial de transporte que corresponde al N° UN 3373 para la mayoría de los envíos de sustancias infecciosas de categoría B (“Biological substance, Category B”).⁴²

	CATEGORY A	CATEGORY B
Definition	Containing a biological agent known, or reasonably expected, to cause permanent disability, or life-threatening or fatal disease	Containing a biological agent capable of causing infection in susceptible humans or animals, but which does not meet the criteria for inclusion in Category A
Identifiers (UN number and proper shipping name)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UN2814: Category A infectious substances (affecting humans or zoonotic infectious substances) ▪ UN2900: Category A Infectious substances (affecting only animals) ▪ UN3549: Category A solid medical waste 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UN3291: Category B clinical or medical waste ▪ UN3373: Category B infectious substances (for all other substances or materials including human or animal material, cultures and biological products)
Documentation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ An itemized list of contents (placed between the secondary and outer packaging) ▪ Names and addresses of the shipper and the receiver ▪ A dangerous goods transport document (dangerous goods declaration) ▪ Additional documentation may be required depending on the modal requirements (for example, air waybill for air shipments) or national regulations (for example, import/export permits) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ An itemized list of contents (placed between the secondary and outer packaging) ▪ Names and addresses of the shipper and the receiver ▪ Additional documentation may be required depending on the modal requirements (for example, air waybill for air shipments) and/or other national requirements (for example, import/export permits)
Packaging	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Triple packaging required to comply with UN packing instruction P620 ▪ Packaging must show a UN specification mark, indicating compliance with testing requirements for Category A infectious substances packaging 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ UN3291: single packaging acceptable provided that: enough absorbent material is present to absorb the entire amount of liquid, the package is leak-proof, and/ or any sharp items are contained within puncture-resistant packaging ▪ UN3373: Triple packaging required (for air transport, either the secondary or outer package must be rigid) which complies with and is packaged according to UN packing instruction P650

Ilustración 16. Manual de bioseguridad del laboratorio de la OMS. Resumen de la categorización, documentación y embalaje de las sustancias infecciosas para su transporte.⁴²

Es fundamental que las muestras recogidas para estudios microbiológicos se envíen lo más rápido posible a los laboratorios de referencia correspondientes siguiendo las instrucciones de embalaje P650 del Acuerdo Europeo sobre Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera que se aplica a la norma UN 3373 para el embalaje de sustancias peligrosas^{10,42}, que establece las siguientes especificaciones:

- Transporte en triple envase. Debe ser robusto, resistente a golpes y cargas habituales del transporte, incluyendo el trasbordo entre vehículos, contenedores y almacén o la manipulación manual o mecánica. Consta de:
 - Recipiente primario: estanco, hermético e impermeable.
 - Embalaje/envase secundario: estanco, hermético, impermeable y a prueba de derrames.
 - Embalaje exterior rígido: caja protectora.

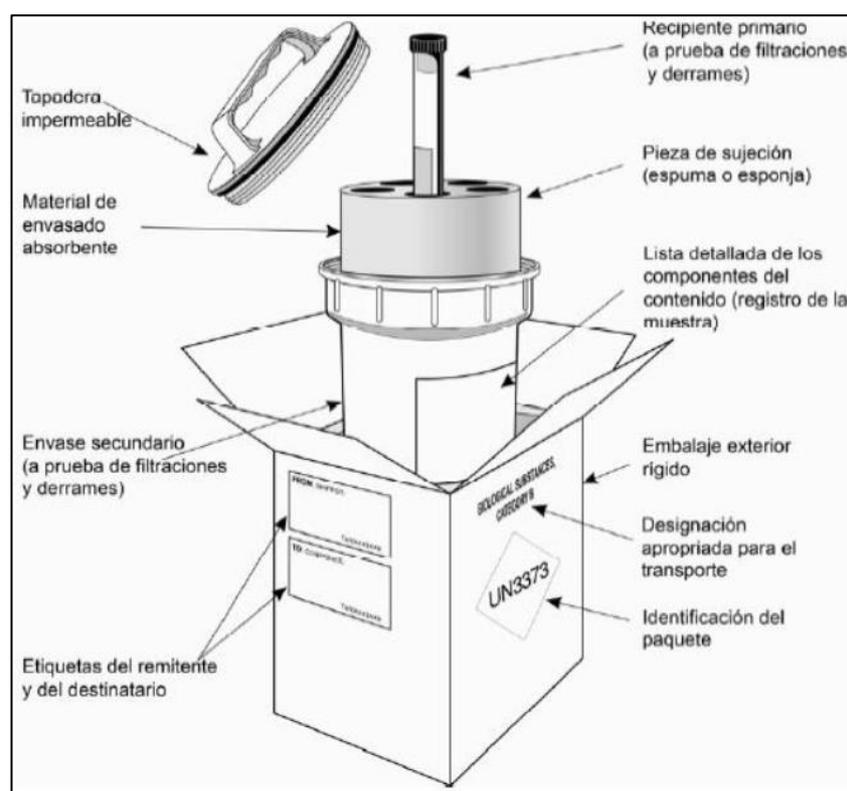


Ilustración 17. Embalaje triple.¹²

- En caso de ser necesario para la conservación de la muestra, se utilizará hielo o hielo seco; el cual nunca irá en el interior del embalaje secundario.
- La información sobre la muestra siempre debe ir fuera del embalaje secundario o incluso en el exterior (en una bolsa estanco) si se han rellenado fuera del quirófano (no sospecha de contaminación cruzada por contacto del propio personal). El etiquetado y registro de las muestras seguirá el protocolo habitual del centro siempre y cuando no interfiera con lo anteriormente citado.

- Los embalajes se construirán y cerrarán de forma que se evite cualquier fuga de su contenido, en las condiciones normales de transporte, por vibración o por cambios de temperatura, humedad o presión.

Además, estas muestras deben ser transportadas de forma segura, de modo que las personas encargadas de realizar el procedimiento deben adherirse a las directrices de prevención y control de infecciones de la OMS, utilizando los equipos de protección personas correspondientes mientras se realiza la recogida de la muestra: bata, guantes, pantalla/gafas y mascarilla N95 (evita la transmisión por gotículas de < 5 micras).¹²

Una muestra mal tomada y/o enviada puede suponer un fracaso en el aislamiento del agente etiológico.¹⁰

6.1. CENTROS HOSPITALARIOS

En los casos con infección activa que requieran ingreso hospitalario, el agente etiológico será aislado durante la estancia del paciente en el hospital.⁴¹ Podrán recibir el alta cuando su situación clínica lo permita, aún con PCR con resultado positivo, manteniendo un correcto aislamiento domiciliario con monitorización de situación clínica durante al menos 14 días tras inicio de los síntomas.

En caso de enfermedad grave o inmunodepresión, este período se alargará a 21 días. A partir de este período, siempre bajo criterio clínico, se podrá finalizar el aislamiento si han transcurrido tres días desde la resolución de la fiebre y el cuadro clínico.

6.2. CENTROS DE SALUD

Es clave la informatización del registro de las muestras procedentes de Atención Primaria, que se implantó paulatinamente durante la segunda ola en España.⁴³ Gracias al servicio de “Coroautos”, se puede realizar una toma de la muestra desde el servicio de Atención Primaria para posteriormente procesar la muestra en el hospital de referencia de la zona.

6.3. “COROAUTOS”

Durante la pandemia se consolidaron y crecieron los llamados “Coroautos”: equipos formados por personas de atención primaria que realiza la toma de muestras para PCR desde el coche en las distintas áreas sanitarias.

Los “Coroautos” realizan varios envíos de muestras al servicio de Microbiología del hospital a lo largo del día, llegando a mandar diariamente alrededor de unas 1000 muestras aproximadamente.

6.4. LABORATORIOS PRIVADOS

Desempeñan un papel destacado en la realización de pruebas que no cubre el sistema sanitario público. Por ejemplo, cuando se plantea un viaje por motivos no laborales (vacaciones, visita a familiares, etc.), las autoridades del país o región de destino pueden exigir el resultado de una prueba PCR realizada pocas horas antes de iniciar el desplazamiento. El sistema sanitario público español no costea estas pruebas, aunque algunas comunidades autónomas las han financiado, total o parcialmente, cuando sus residentes han regresado durante períodos vacacionales, como la Navidad de 2020.

6.5. RECOGIDA DOMICILIARIA DE MUESTRAS

La recogida de muestras en el domicilio puede proporcionar un mayor nivel de satisfacción en el paciente, al realizarse en un entorno más privado. Estas pruebas podrían ir dirigidas, además de a la detección del coronavirus SARS-CoV-2, a la detección de los agentes más prevalentes a nivel comunitario: faringitis bacterianas, infecciones de transmisión sexual, infección por el VIH, infecciones urinarias, determinadas infecciones respiratorias, etc. Las tecnologías utilizadas deberán ser muy sencillas, con mínimos tiempos de manipulación y de respuesta y máxima sensibilidad.

La ejecución de dichos tests “en casa”, requiere que se presenten instrucciones claras y muy sencillas sobre la recogida de las muestras, realización de las pruebas e interpretación de los resultados. Algunos expertos recomiendan el empleo de códigos QR que enlacen con vídeos tutoriales con las pertinentes explicaciones en múltiples idiomas.

7. DIAGNÓSTICO DEL CORONAVIRUS SARS-COV-2 EN LA CCAA DE CANTABRIA

Actualmente existen 3 centros de referencia para la realización de las pruebas diagnósticas:

- Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV).
- Hospital de Sierrallana (HS).
- Hospital Comarcal de Laredo (HCL).

Todas las pruebas de Atención Primaria se realizan en estos 3 hospitales, pero las pruebas pre-ingreso se realizan en el HUMV y en el HS.

La labor principal de los Servicios de Diagnóstico Clínico-Biológico es estudiar a las personas enfermas, portadoras o susceptibles a la infección. Su actividad tiene lugar especialmente, aunque no exclusivamente, en el laboratorio de Microbiología Clínica, que es el lugar donde se realizan las pruebas diagnósticas. La pandemia por SARS-CoV-2 supuso un reto para poder proporcionar una respuesta rápida y eficaz a la demanda asistencial, a la vez que ha supuesto un gran aumento de la carga de trabajo para los servicios hospitalarios de Microbiología, debido fundamentalmente a las pruebas PCR para SARS-CoV-2.⁴³ Los primeros casos, diagnosticados en febrero del 2020, requerían confirmación por parte del Centro Nacional de Microbiología. Poco después, la gran demanda obligó a configurar un equipo COVID con dedicación exclusiva al diagnóstico del SARS-CoV-2. Además, se

estableció, para asegurar la prioridad de las muestras de los infectados por COVID-19, un circuito diferenciado para su entrada.

Durante la primera ola, el principal problema consistió en el escaso número de reactivos que había en el mercado, por lo que se empezaron a desarrollar nuevos protocolos y reactivos que lo solventasen. Hacia finales de marzo, Cantabria fue una de las primeras comunidades autónomas en implementar el diagnóstico de COVID en pacientes extrahospitalarios. Esto supuso una gran ventaja, ya que junto con la colaboración de un grupo de voluntarios formado por investigadores y técnicos de laboratorio del IDIVAL y la Universidad de Cantabria, se pudieron reforzar las extracciones de ARN viral de las muestras derivadas de los “Coroautos”, que posteriormente se enviaban al laboratorio de Microbiología del HUMV e incluso se procesaban en las instalaciones del IDIVAL. Esto permitió que se generasen resultados antes de 24 horas para las muestras extra-hospitalarias.

El mes de mayo de 2020, se abrió paso una etapa de relativa calma antes del comienzo de la segunda ola, durante la cual se estudiaron diversas estrategias de extracción y protocolos de PCR, con el propósito de mejorar el procesamiento de las muestras y el tiempo de diagnóstico. Además de disponer de una mayor cantidad de reactivos diagnósticos, especialmente kits de extracción de ácidos nucleicos y termocicladores para realizar las reacciones de PCR, pero también nuevas cabinas de bioseguridad, neveras, congeladores y pipetas. El aumento de la capacidad diagnóstica vino de la mano de la estación robótica Opentrons, dotada de 8 módulos inteligentes, para el manejo de las muestras (pequeños volúmenes de líquidos). Permitted automatizar partes del procesamiento de muestras que hasta entonces se hacían de forma manual, dotando el procedimiento de mayor precisión y seguridad, que permitió afrontar un aumento de la demanda del número de muestras. La instalación de esta nueva tecnología en el pasillo sur del HUMV marcó un antes y un después en el diagnóstico del SARS-CoV-2 en Cantabria.



Ilustración 18. Estación robótica “Opentrons” en el servicio de Microbiología del HUMV.

Para aumentar aún más la capacidad diagnóstica, se establecieron estrategias de pooling: agrupamiento de las muestras de 2 o más pacientes diferentes que se analizan con una única PCR. Si la prueba diese un resultado positivo, habría que realizar otra vez el análisis de las muestras por

separado. Esto ha sido útil en los periodos con menor incidencia de infecciones por COVID y en personas con una baja probabilidad pre-test de estar infectados. Por ejemplo, en los cribados del personal sanitario.

NIVEL	TIEMPO DE RESPUESTA	CARACTERÍSTICAS DEL CIRCUITO	INDICACIONES	COMENTARIOS
NIVEL 1 <i>ULTRA-RÁPIDO</i>	1 h	Equipos automatizados (extracción y PCR en un solo paso).	-Cirugías urgentes -Ingresos urgentes -Partos inminentes -Trasplante	-Alto coste -Baja carga de trabajo -Escasa disponibilidad - Solicitud telefónica para control de demanda
NIVEL 2 <i>ESTÁNDAR</i>	4-6 h	-Series de muestras cortas (8-16). -Preparación y alicotado manual de las muestras. -Combinación de extractores automáticos y termocicladores convencionales.	-Traslado de pacientes -Pacientes de Urgencias que no requieren ingreso urgente. -Cirugía demorable 4 horas. -Estudio de contactos.	-Coste medio -Alta carga de trabajo
NIVEL 3 <i>ALTA CAPACIDAD</i>	24 h	-Paso previo de la inactivación de las muestras. -Cadenas robóticas "Opentrons". -Extractores de alta capacidad. -Uso de termocicladores a máxima capacidad (sábanas de 96 muestras).	-Pacientes de Coroautos, Residencias. -Pacientes con cirugías, exploraciones o ingresos programados. -Cribados de cuerpos esenciales.	-Bajo coste. -Diseñado para atender grandes volúmenes de muestra y cuyo requisito de rapidez en la respuesta sea menor. -Estrategias de pooling en muestras con baja probabilidad pre-test.

Ilustración 19. Niveles de prioridad de procesamiento de las muestras, indicaciones, circuitos de trabajo intra-laboratorio y tiempos de respuesta.⁴³

Además, durante este tiempo los distintos circuitos de procesamiento de muestras se beneficiaron de esta nueva tecnología:

- Atención Primaria: se consolidaron los Coroautos, que realizan 3 envíos de muestras por ambulancias al día al servicio de Microbiología.

- Cribados de residencias: su recogida y transporte también está coordinado a través del servicio de “Coroautos”, estableciéndose cribados periódicos en todas las residencias de la Comunidad de Cantabria, medida necesaria y de especial importancia debido al gran impacto que ha tenido la pandemia en estos lugares.
- Estudios de brotes: en este tipo de situaciones se realizan cribados masivos de la población para intentar controlar el brote, lo que hace que el número de muestras procesadas aumente exponencialmente.

Esta serie de cambios, que se realizaron durante el verano del 2020, permitieron afrontar la segunda ola, que se inició en Cantabria en agosto. La principal preocupación durante este periodo residía en la coincidencia de las infecciones por SARS-CoV-2 con las de otros virus estacionales (como el VRS). Paralelamente, se empezaron a lanzar los kits comerciales de PCR multiplex y las pruebas rápidas de antígenos para SARS-CoV-2.

En este momento, se creó el Laboratorio en el Punto de Atención al Paciente (Point-of-Care-Testing, POCT); que consiste en una herramienta utilizada en el Servicio de Urgencias para realizar una valoración rápida de los pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2. Para ello se habilitó una habitación en el Servicio de Urgencias del HUMV cerca de la “zona COVID” y se trasladaron los equipos necesarios para la puesta en marcha de lo que se denominó “Minilab”. Esto no solo ha sido útil para los enfermos COVID, sino que además ha proporcionado una mayor rapidez para realizar el diagnóstico de otros patógenos frecuentes con interés clínico, como el *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* (serotipo 1 en orina) y detección de virus enteropatógenos en heces (Rotavirus, Adenovirus y Rotavirus).

Por último, la adquisición de nuevos medios de transporte, junto con la homogenización de los tubos y la incorporación de la sustancia inactivante en los medios, permitió sacar el mayor rendimiento a los Opentrans, evitando así pasos previos de alicuotado e inactivación de todas las muestras.

Actualmente, se pueden sobrellevar situaciones con volúmenes mayores de muestras, reduciendo además los tiempos de respuesta a menos de 12 horas para la mayor parte de las muestras del ámbito extra-hospitalario (especialmente Atención Primaria). Por lo que es claro el papel que juega una adecuada organización y recogida de las muestras.

	ESCENARIO	TIPO DE PCR Y DIANA	TIEMPO DE RESPUESTA
URGENCIAS	-Proceso invasivo inmediato, parto o riesgo obstétrico, cirugía de emergencia, ingreso inmediato (sin clínica COVID).	-PCR rápida SARS-CoV-2	1 h
	-Sospecha COVID y criterios de ingreso.	-PCR rápida SARS-CoV-2 + gripe + VRS	1 h
	-Sospecha COVID sin criterios de ingreso. Síntomas < 5 días.	-Antígeno SARS-CoV-2 +	30 min
		-PCR convencional SARS-CoV-2 + gripe + VRS	4 horas
	-Sospecha COVID. Sin criterios de ingreso. Síntomas > 5 días.	-PCR convencional SARS-CoV-2 + gripe + VRS	4 horas
	-Ingreso sin sospecha COVID.	-PCR convencional SARS-CoV-2	4 horas
HOSPITALIZACIÓN	Ya ingresado con síntomas COVID.	-PCR convencional SARS-CoV-2 + gripe + VRS	4 h
	Seguimiento pacientes COVID.	-PCR convencional SARS-CoV-2	4 h
	Asistencia programada.	-PCR convencional SARS-CoV-2	12 h
	Contactos estrechos trabajadores sanitarios.	-Antígeno SARS-CoV-2 +	30 min
		-PCR convencional SARS-CoV-2	4 h
Cribados asintómicos.	-PCR convencional SARS-CoV-2	12 h	

Ilustración 20. Principales indicaciones recogidas en la petición electrónica y tiempos de respuesta. Modificaciones en función de los diferentes escenarios del ámbito hospitalario.⁴³

MEDIOS DE PROTECCIÓN

Son imprescindibles para recoger las muestras:

- Solución hidroalcohólica para realizar higiene de manos.
- Guantes.
- Mascarilla quirúrgica.
- Protección ocular anti-salpicaduras.
- Bata de manga larga.

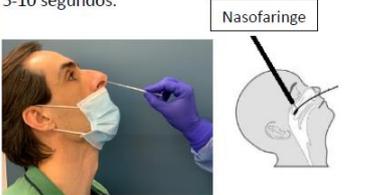
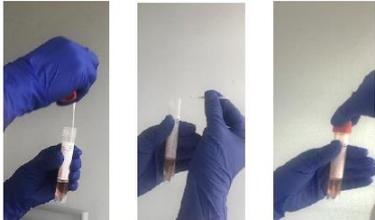
PUESTA: Higiene de manos → Bata → Mascarilla → Protección ocular → Guantes	
RETIRADA: Guantes → Higiene de manos → Protección ocular → Higiene de manos → Bata → Higiene de manos → Mascarilla → Higiene de manos.	
<p>1. Prepare el material previamente y pida al paciente que se sene la nariz.</p> 	<p>2. Pida al paciente que incline la cabeza hacia atrás en un ángulo de 70°.</p> 
<p>3. Introduzca la torunda por una de las fosas nasales hacia la parte posterior y pásela varios cm por el suelo del pasaje nasal hasta alcanzar la nasofaringe. No fuerce la torunda si encuentra resistencia. Gire la torunda suavemente durante 5-10 segundos.</p> 	<p>4. Retire la torunda e introdúzcala en el medio de transporte. Rompa el mango de la torunda por la muesca. Coloque y cierre bien el tapón, guarde la muestra en la nevera.</p> 

Ilustración 21. Procedimiento para la toma de muestras.

EMBALAJE

Las muestras tomadas deben transportarse en contenedores específicos, que consisten en:

- Envase primario: es el que contiene la muestra. Será estanco y estará identificado con los datos del paciente. Asegurarse que está bien cerrado.
- Envase secundario o contenedor: cerrado, estanco y a prueba de filtraciones, provisto de material absorbente, irrompible y con tapa de cierre hermético. La muestra debe enviarse refrigerada, por lo que el acumulador de frío debe situarse en este espacio (entre el envase primario y secundario).
- Envase terciario o externo: provisto de la etiqueta normalizada con el rotulo de “Sustancia biológica clase B” (UN3373)”, en el que deben figurar las direcciones completas y teléfonos de contacto del remitente y el destinatario (Servicio de Microbiología del HUMV; teléfonos:

942202580 extensión 73153 y 677984646). La documentación relativa al paciente y la solicitud se incluirán entre el contenedor secundario y el externo.

8. CONCLUSIONES

La pandemia provocada por el coronavirus SARS-CoV-2 ha puesto de manifiesto una amenaza que durante muchos años ha temido la comunidad científica. La gran amenaza que supuso el Ébola en el 2014 y la aparición del nuevo coronavirus, son los ejemplos más recientes de un problema a nivel mundial, que es la aparición de nuevos patógenos con graves consecuencias para la humanidad.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas en el diagnóstico molecular. Muchas de ellas se han desarrollado como posibles alternativas a la RT-PCR, entre otras las técnicas de amplificación isotérmica surgieron como una nueva alternativa prometedora. Esto es porque consiguen solventar las limitaciones de la PCR, como las puramente técnicas como el uso de termocicladores para los ciclos de desnaturalización-amplificación, requerimiento de personal capacitado y un tiempo de realización de la prueba que resulta no ser la mejor opción si se quieren detectar casos a gran escala.

Se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular como posibles alternativas a la prueba gold-estándar actual: la RT-PCR. Las que últimamente han cobrado más importancia han sido las técnicas de amplificación isotérmica, que surgieron en esta pandemia como una nueva alternativa muy prometedora. La mayoría de ellas se basan también en la amplificación de ácidos nucleicos, pero utilizando primers con estrategias diferentes.

A pesar de que la técnica LAMP es la que más se ha investigado, parece que los resultados de la RCA están siendo más satisfactorios. Con esta técnica, la polimerasa utiliza una plantilla circular de la secuencia diana del ADN genómico para sintetizar una sola y larga hebra de ADN de concatémeros que contiene cientos de repeticiones en cadena de la secuencia complementaria a la secuencia circular. Se producen aproximadamente 10^9 copias del círculo en 90 minutos y no requiere cebadores exógenos.

Aunque existen actualmente numerosas alternativas, la RT-PCR continúa siendo la técnica de elección para la detección del SARS-CoV-2. Promover la disponibilidad de más kits de PCR para que puedan cubrir la gran demanda poblacional (especialmente las PCR de corta duración), una gestión de la toma de muestra más protocolizada para mantener la viabilidad de la muestra junto con el desarrollo de infraestructuras para el desarrollo de la técnica en hospitales comarcales; son algunos ejemplos de cambios en los protocolos que se pueden realizar para que la técnica de PCR tenga más efectividad sin necesidad de depender de nuevas técnicas de biología molecular por el momento.

Esta pandemia también ha resaltado la enorme importancia de disponer de una gestión de recursos de calidad, tanto materiales como humanos, tanto de procesamiento de las muestras como en el campo diagnóstico mediante la aplicación de la Biología Molecular. Es de vital importancia también apostar por una actividad asistencial diaria (24 horas al día) para responder a las necesidades clínicas actuales.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Paredes Salido F, Roca Fernández J.** Enfermedades infecciosas emergentes y su tratamiento farmacológico. *Offarm Farm y Soc.* 2003;22(4):102–10.
2. **Suárez Larreinaga CL, Berdasquera Corcho D.** Enfermedades emergentes y reemergentes: Factores causales y vigilancia. *Rev Cuba Med Gen Integr.* 2000 [cited 2021 Apr 30];16(6):593–7.
3. **Jesús Gesta J.** Enfermedades infecciosas emergentes: alerta mundial, respuesta mundial. 1997;71(3):225-219.
4. **Cabezas C.** Reemergentes Y Sus Determinantes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2015;32(1):7–8.
5. **Obande GA, Singh KKB.** Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections. *Infect Drug Resist.* 2020;13:455–83.
6. **Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S.** Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(8):601–8.
7. **J. Farfán BM.** Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2015;26(6):788–93.
8. **Tsongalis GJ, Silverman LM.** Molecular diagnostics: A historical perspective. Vol. 369, *Clinica Chimica Acta.* 2006. p. 188–92.
9. **Carmona L, la Cruz Pérez D, Rodríguez M, Montes R.** Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya Isothermal amplification systems for the molecular detection of zika, dengue and chikungunya viruses. *Mens Bioquim.* 2018;42:92–102.
10. **García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI.** SEIMC_Recogida, transporte y procesamiento Diagnóstico microbiológico de general de las muestras en el laboratorio la infección por el virus del papiloma humano de Microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2017. 69 p.
11. **Casas Flecha I, Eiros Bouza JM, Ortiz de Lejarazu R, Pérez Breña P, Pozo Sánchez F, Ruiz Carrascoso G, Tenorio Abreu A.** Infecciones por virus respiratorios. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009. 1–28 p.
12. **Dirección General de Salud Pública calidad e innovación, Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias.** Toma y transporte de muestras para diagnóstico por PCR de SARS-CoV-2. *Minist Sanid.* 2020;12.
13. **Torretta S, Zuccotti G, Cristofaro V, Etori J, Solimeno L, Battilocchi L, et al.** Diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR Using Different Sample Sources: Review of the Literature. *Ear, Nose Throat J.* 2021;100(2):131-138.

14. **Mathuria JP, Yadav R, Rajkumar.** Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *J Infect Public Health.* 2020;13(7):901–5.
15. **Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al.** Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497–506.
16. **Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al.** Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. Vol. 323, *JAMA - Journal of the American Medical Association.* American Medical Association; 2020;323:1843–4.
17. **Hase R, Kurita T, Muranaka E, Sasazawa H, Mito H, Yano Y.** A case of imported COVID-19 diagnosed by PCR-positive lower respiratory specimen but with PCR-negative throat swabs. *Infect Dis (Auckl)* [Internet]. 2020 Jun 2 [cited 2021 Jun 10];52(6):423–6.
18. **Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al.** Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(11):1061–9.
19. **Peng X, Xu X, Li Y, Cheng L, Zhou X, Ren B.** Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):1–6.
20. **Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J.** Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology.* 2020;296(2):E41–5.
21. **Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al.** Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology.* 2020;296(2):E32–40.
22. **Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang X Lou, Hu B, et al.** Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):386–9.
23. **Melián-Rivas A, Calcumil-Herrera P, Boin-Bakit C, Carrasco-Soto R.** Detección de COVID -19 (SARS-CoV-2) Mediante la Saliva: Una Alternativa Diagnóstica poco Invasiva. *Int J Odontostomatol.* 2020;14(3):316–20.
24. **To KKW, Tsang OTY, Yip CCY, Chan KH, Wu TC, Chan JMC, et al.** Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):841–3.
25. **Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al.** Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: Retrospective cohort study. *BMJ.* 2020;369(3):350–1.
26. **Bwire GM, Majigo M V., Njiro BJ, Mawazo A.** Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol.* 2021;93(2):719–25.
27. **Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al.** Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020 Jul 1 [cited 2021 Jun 10];159(1):81–95.

28. **Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, et al.** Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):282–5.
29. **Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R.** Origen, características estructurales, medidas de prevención, diagnóstico y fármacos potenciales para prevenir y controlar COVID-19 [Internet], Medwave. NLM (Medline). 2020;20.
30. **To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al.** Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020 May 1;20(5):565–74.
31. **Sanitarias E.** Información científica-técnica Índice. 2021.
32. **Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al.** Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020;14(4):3822–35.
33. **Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG.** COVID-19 diagnosis- A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021;172(112752):112752.
34. **Friedrich R, Rappold E, Bogdan C, Held J.** Comparative analysis of the wako B-glucan test and the fungitell assay for diagnosis of candidemia and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9).
35. **Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al.** Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3).
36. **Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al.** Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2013;57(3):139–70.
37. **Arroyo A M, Morales L G, Sosa P, Carmona-Fonseca J, Maestre A.** Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica. *Medicas UIS*. 2008;21:158–75.
38. **Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, et al.** Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst*. 2014;10(5):970–1003.
39. **Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP.** Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(7):1691–6.
40. **Don L, Luu W, Payne M, Zhang X, Luo L, Lan R.** Development and comparison of novel multiple cross displacement amplification (MCDA) assays with other nucleic acid amplification methods for SARS-CoV-2 detection. *Sci Reports*. 123AD;11:1873.
41. **Gurrero C, Sanchez C.** Recogida, transporte y precesamiento general de las muestrs de laboratorio de microbiología. *Seimc*. 2017;45(7):705–14.
42. **WHO.** Laboratory biosafety manual 3rd edition [Internet]. World Health Organization. 2004. 1–178 p.

43. **Gozalo Margüello M, Velasco de la Fuente S, García Fernández S, Rodríguez Lozano S, Pérez del Molino Bernal IC, Pablo Marcos D, Agüero Balbin J, Calvo Montes J.** Revista Valdecilla, 2021;3(3): 92-100.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor Jesús Navas Méndez la ayuda y los consejos prestados durante la realización de este trabajo fin de grado.

A mis padres, mi hermano y al resto de mi familia que me han apoyado incondicionalmente todos estos largos y duros años de carrera.

A mis amigos de Asturias, los cuales me han apoyado siempre a pesar de la distancia.

A mis amigos de Medicina, que han hecho que esta carrera no se haya hecho tan cuesta arriba.

Y, por último, a mis compañeros de piso Pedro y Martín. Sin vosotros esto no habría sido lo mismo.