



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ACTUALIZACIÓN MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO VIRAL
2021**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTOR: DANIEL FUENTEALBA REVECO
PROFESOR GUÍA: Dr. ORLANDO ALVA GÁLVEZ**

TALCA-CHILE

2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	10
Objetivos generales	10
Objetivos específicos	10
METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA	11
MARCO TEÓRICO	12
1. INTRODUCCIÓN A LOS VIRUS	12
1.1 Historia del descubrimiento viral	12
1.2 Teorías de origen	13
1.3 Características	15
1.4 Clasificación	23
1.5 Rol en enfermedades	26
2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS	28
2.1 Cultivo celular	28
2.2 Histología	30
2.3 Serología	31
2.4 Moleculares	33
2.5 Proteómicas	34
3. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN VIRAL	36
3.1 Generalidades	35
3.2 Métodos de diagnóstico indirectos	41
3.3 Métodos directos	42
3.4 Elección prueba diagnóstica	44

4. MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO VIRAL	46
4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
4.2. Secuenciación masiva.	52
4.3. Citometría de flujo	60
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Componentes estructurales básicos de los virus.	16
Figura 2: Estructura morfológica virus icosaédricos.	17
Figura 3: Estructura morfológica virus helicoidales.	18
Figura 4: Estructura morfológica virus complejo o mixto.	19
Figura 5: Replicación viral por diferentes mecanismos.	22
Figura 6: Esquema de las principales familias de virus.	26
Figura 7: Representación de lugar anatómico en donde se realiza la muestra para el diagnóstico viral.	38
Figura 8: Etapas básicas de PCR.	47
Figura 9: Representación funcionamiento PCR transcriptasa reversa.	50
Figura 10. Tecnología de secuenciación de DNA de primera generación.	55
Figura 11. Tecnología de secuenciación de DNA de segunda generación. PCR en emulsión (a), PCR puente (b).	57
Figura 12. Representación del sistema óptico de un citómetro de flujo tradicional	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ventajas y desventajas generales del cultivo celular	29
Tabla 2. Tinción usada en distintas técnicas histológicas según grupo de agente infeccioso	31
Tabla 3. Principales agentes virales, su transporte y sobrevivencia	38
Tabla 4. Procedimiento de bioseguridad a realizar según tipo de muestra	39
Tabla 5. Procedimiento de bioseguridad a realizar según el manejo de la muestra	40
Tabla 6. Parámetros evaluados en la evaluación de un método de diagnóstico y su definición	44
Tabla 7: Etapas de la secuenciación en general con su definición correspondiente	55
Tabla 8: Sistemas que se encuentran en un citómetro de flujo tradicional con su respectiva descripción	61
Tabla 9: Descripción de los distintos gráficos que se pueden encontrar como resultado en la técnica de citometría de flujo	63
Tabla 10: Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico molecular descritos en la revisión	65

RESUMEN

Los virus son agentes microscópicos con actividad parasitaria, es decir no pueden vivir sin un hospedero, donde se han encontrado más de 2000 especies hasta la actualidad, aumentando constantemente. Estos se componen principalmente de material genético envuelto en proteínas que forman la cápside, donde además algunos pueden estar compuestos por estructuras más complejas. Su rol en enfermedades tanto en humanos como en otras especies y en distintas áreas de la ciencia ha permitido una constante evolución de los métodos de diagnóstico. La detección y cuantificación específica de material genético en una muestra biológica ha mostrado un significativo impacto en todas las áreas de la salud, entre ellas el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Actualmente existen diversas técnicas que permiten detectar agentes virales clasificándose como métodos indirectos donde se encuentran técnicas inmunológicas por detección de anticuerpos como el caso de los test rápidos para la detección del SARS-CoV-2 y métodos directos como la inmunofluorescencia directa, microscopia electrónica, espectrometría de masas, técnicas inmunológicas por detección de antígenos y técnicas de biología molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con todas sus variantes como la RT-PCR, q-PCR, PCR in situ, otras, donde la RT-PCR en tiempo real ha sido clave en el diagnóstico viral del SARS-CoV-2. Estas técnicas se caracterizan por tener un alto grado de sensibilidad frente a distintos virus responsables de múltiples patologías en el ser humano y otros seres vivos, sin embargo, presenta desventajas entre ellas su elevado costo y el requerimiento de personal capacitado para su funcionamiento. Durante los años se han mejorado estas técnicas, siendo más económicas, más rápidas, y más fiables en términos de sensibilidad y especificidad.

A nivel mundial los virus provocan millones de muertes de personas en el mundo producto de enfermedades como la hepatitis o el VIH. Hoy en día se vive una pandemia producto del virus SARS-CoV-2 en el cual es de suma importancia su diagnóstico temprano y oportuno, por ello, los métodos moleculares juegan un rol importante en el diagnóstico

clínico de infecciones virales ya que supera en términos de sensibilidad y especificidad a los métodos clásicos de diagnóstico.

Palabras claves: Virus, biología molecular, diagnóstico viral, diagnóstico molecular.

INTRODUCCIÓN

Los virus han convivido con los humanos durante toda su existencia, su rol en el ecosistema se fundamenta en su función regulatoria de la vida principalmente por su acción parasitaria, además de su capacidad de ejecutar la transferencia horizontal de genes entre bacterias. Debido a sus ciclos replicativos, estos pueden provocar distintas patologías y enfermedades e incluso en algunos casos provoca la muerte del individuo infectado, siendo este de origen animal, vegetal o bacteriano.

Hoy en día se han investigado y reconocido miles de tipos de virus existentes en nuestro planeta, donde la gran minoría afectan al ser humano, pero que sin embargo, pueden ser agentes causales desde infecciones leves, como los resfriados comunes producto frecuentemente de agentes virales provenientes del género *Rhinovirus*, hasta grandes complicaciones, como la fiebre hemorrágica producida por el virus del ébola o la pandemia actualmente conocida producto del virus SARS-CoV-2 que produce la enfermedad COVID-19. Gracias a los avances científicos se han estudiado de mejor forma a estos agentes parasitarios con el objetivo de no sólo combatir distintas infecciones producidas de forma natural por algunos virus como el VIH, virus la influenza H1N1 o los distintos virus que pueden provocar hepatitis, donde cabe destacar que generan un gran impacto en la salud pública y privada, sino que también, los virus han ido utilizados como tratamiento para distintas patologías incluidas algunos tipos de cáncer o infecciones bacterianas, a través de distintos métodos clínicos que los incluyen, entre ellos la fagoterapia.

El diagnóstico preciso de infecciones virales mejora la capacidad del médico tratante para tomar decisiones sobre el tratamiento apropiado de los pacientes, también evaluar la progresión de la enfermedad y prevenir el uso indebido de antibióticos. Además, permite la implementación del control de infecciones y el seguimiento del éxito de los tratamientos antivirales que pueden afectar el pronóstico de los pacientes. Los datos epidemiológicos recopilados a través de diagnósticos precisos juegan un papel importante en la salud pública mediante la identificación y el control de los brotes, la implementación de pruebas de

diagnóstico, programas de vacunación y tratamiento, sino también para reconocer patógenos comunes y emergentes.

Las técnicas moleculares han revolucionado el diagnóstico viral durante el último tiempo y mejoró tanto la sensibilidad como la especificidad de las pruebas y la velocidad con la que se puede hacer un diagnóstico preciso. Entre las técnicas de biología molecular se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa y todas sus variantes que hoy en día es fundamental en el diagnóstico viral del SARS-Cov-2 (variante RT-PCR específicamente), secuenciación masiva utilizada principalmente en epidemiología para identificar cepas de virus, citometría de flujo que identifica partículas víricas mediante sus características físicas-químicas, entre otras técnicas.

La búsqueda de nuevas herramientas de detección de agentes virales es indispensable en el conocimiento de la patogenia de múltiples enfermedades que gatillan en el ser humano y otros seres vivos, además, permite el paso a nuevas investigaciones de uso viral en distintas áreas de la ciencia como en biomedicina, botánica, agricultura e incluso en nanotecnología. Por ello el presente trabajo tiene como objetivo realizar una revisión bibliográfica acerca de los métodos de biología molecular actualmente utilizados para la detección de agentes virales, debido al rol que tienen en distintas patologías infecciosas de humanos y otros seres vivos, junto con su potencial en nuevos tratamientos clínicos y/o en distintas áreas científicas.

OBJETIVOS

1.Objetivo General:

1.1 Describir los distintos métodos moleculares de diagnóstico viral actualmente utilizados en laboratorios clínicos y de investigación.

2.Objetivos Específicos:

2.1 Comparar los distintos métodos de biología molecular utilizados para el diagnóstico de virus.

2.2 Informar avances de los métodos moleculares de diagnóstico viral descritos en la literatura.

METODOLOGIA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

La búsqueda de información se realizó con el metabuscador “Google académico”, “NCBI”, para la información general donde se introdujo palabras claves como detección viral, biología molecular, historia del virus, y se discriminó según fecha de publicación siendo esta mayor al año 2000.

Para la búsqueda de información de técnicas actualizadas como PCR, secuenciación masiva y citometría de flujo se utilizó la plataforma “PubMed” y “NCBI”, donde se introdujo palabras claves como PCR detección viral, infecciones virales, diagnóstico viral, citometría de flujo en diagnóstico viral, secuenciación masiva en diagnóstico viral, entre otras donde se discriminó según fecha de publicación siendo esta mayor al año 2010.

Se utilizaron manuales de procedimientos nacionales del MINSAL y de la OMS para la búsqueda de información relacionada tanto a la detección como transporte de las muestras y además se utilizó para la verificación de información de otros papers.

No hubo distinción ni restricciones de idioma, aunque gran parte de la evidencia hasta el momento aportada y utilizada proviene de artículos científicos y o revisiones en inglés.

MARCO TEÓRICO

1.INTRODUCCIÓN A LOS VIRUS

1.1 Historia del descubrimiento viral.

Hace millones de años que existen unos agentes microscópicos actualmente llamados virus, estos son a grandes rasgos una partícula de código genético, DNA o RNA, encapsulada en una vesícula de proteínas (65) que han pasado desapercibido en la humanidad hasta hace aproximadamente unos doscientos años. De acuerdo a la historia de su descubrimiento en el siglo XIX, se menciona a Luis Pasteur, un bacteriólogo francés, que propone su teoría germinal de las enfermedades infecciosas, estas pueden ser causadas y transmitidas por un germen (65). Luego en el año 1884 Charles Chamberland inventó un filtro en que el tamaño de sus poros era menor al del tamaño de una bacteria promedio (aproximadamente 1-10um) (46), otorgándole una herramienta al biólogo francés Dimitri Ivanovski que usó un filtro con estas características informando que las muestras de hoja molida de la planta de tabaco que estaba investigando seguía siendo infectada después de filtrarlas (65), demostrando que los agentes microscópicos que infectaban el mosaico del tabaco, tenían menor tamaño que las bacterias.

Unos años después el microbiólogo Martinus Beijerinck de origen neerlandés repitió los experimentos de Ivanovski observando que el agente infeccioso sólo se multiplicaba al interior de células vivas en división, llamando a este agente *contagium vivum fluidum* lo que significa que era un organismo vivo y reproductor que difería de otros organismos (93).

Con el paso del tiempo y del avance científico se logró un mejor entendimiento de estos entes biológicos, permitiendo así, hace menos de 100 años, observar por primera vez

un virus mediante la microscopía electrónica en el que junto con otros estudios se pudo determinar su estructura morfológica compuesta principalmente por proteínas y material genético.

Hoy en día se han reconocido más de 2000 especies de virus que afectan a animales, vegetales y bacterias, en donde frecuentemente van apareciendo cepas nuevas siendo de suma importancia los métodos moleculares para su identificación.

1.2 Teorías de origen

Actualmente no se conoce con exactitud el origen de estos componentes parasitarios, sin embargo, gracias a la investigación científica se han establecido posibles teorías al respecto, donde se encuentran principalmente tres:

1.2.1 Teoría de la degeneración o regresión celular:

Al considerar la actividad infecciosa que tienen los virus, distintos investigadores han postulado que estos no eran más que células pequeñas que parasitaban a células más grandes, siendo por este mismo mecanismo el hecho de que hayan perdido material genético que les permitía vivir fuera de otra célula y autosustentarse (98), por lo tanto a medida que pasaba el tiempo y evolucionaban, llegaron a un punto en que estos agentes ultramicroscópicos no necesitaban esta información genética (como por ejemplo el DNA responsable de codificar proteínas de la membrana plasmática) y por ende, por algún mecanismo lo fueron eliminando de su genoma.

En la actualidad se conocen bacterias del género *Rickettsia* y *Chlamydia* que son bacterias intracelulares obligadas, que evolucionaron de ancestros de vida libre (98), por lo tanto, sólo puede vivir dentro de una célula hospedadora debido a que ha perdido ciertos genes responsables de esta función. Por otro lado, existe un grupo particular de virus llamados virus de DNA grande nucleoplasmático (NCLDV por sus siglas en inglés), que además de su gran tamaño, poseen una mayor complejidad en su estructura, y dependen en menor grado de su hospedero, a diferencia de otros tipos de virus, por lo que algunos

virólogos han planteado que estos tipos de virus son descendientes de antepasados más complejos (98). Sin embargo, también hay argumentos en contra, uno de ellos es que, aunque a pesar de las que las cápsides tienen la misma conformación morfológica y genética que los flagelos bacterianos, estos no se asemejan en absolutamente nada a las membranas celulares (65).

1.2.2 Teoría del origen molecular:

También escrita en la literatura como hipótesis del nomadismo o del escape, postula que los virus provienen de fragmentos de material genético móvil, principalmente de plásmidos o elementos transponibles, conocidos generalmente como ‘genes saltarines’ y que se encuentran en el 50% del genoma humano y un 80% en el genoma del maíz (73). Estas secuencias de DNA mediante diferentes mecanismos salieron de la célula que lo contenía, además de adquirir una capacidad autorreplicativa para seguir evolucionando de forma independiente (65). Permitiendo así, explicar el origen de todos los virus. Los virus DNA a partir de elementos transponibles o plásmidos, por otro lado, los virus RNA que se sugiere que viene de RNA mensajero autorreplicativo y por último los retrovirus provenientes de retrotransposones (65).

1.2.3 Teoría de la coevolución viral:

Llamada también teoría virocétrica o hipótesis del virus primero, esta teoría indica en palabras simples que los virus aparecieron antes que las células, por lo tanto, estos pudieron haber sido las primeras entidades replicantes, empezando por estructuras proteicas complejas además de ácidos nucleicos (73). Actualmente se conoce estructuras de RNA con actividad catalítica llamadas ribozimas, que permiten catalizar reacciones químicas (73), y que probablemente estas hayan existido antes de la primera célula, siendo así los virus los vestigios del origen de la vida basada en RNA, desde antes del surgimiento de la vida celular (65).

A pesar de la evidencia presente en estas teorías, ninguna de estas se considera fielmente aceptada, e incluso ninguna de ellas es factible para considerar a estos agentes como seres vivos, para ello deben cumplir ciertas características como: crecer, reproducirse, mantener una homeostasis interna respecto al ambiente, responder a estímulos y llevar a cabo

diversos procesos metabólicos (73). Los virus son entidades ultramicroscópicas capaces de reproducirse y evolucionar pero que sin embargo como se nombró anteriormente carecen de metabolismo propio ya que necesitan de una célula hospedadora, incluso estos no poseen citoplasma ni ribosomas siendo incapaz de realizar el proceso de traducción. Producto de estas limitaciones en estricto rigor no se les consideraría como agentes vivos, aunque que algunos investigadores los han considerado en el límite de la vida (65).

1.3 Características de los virus

1.3.1 Características estructurales

Los virus a grandes rasgos están compuestos por una cápside (algunos autores también lo llaman cápsida) de proteínas que envuelve al material genético, este puede ser DNA o RNA que a su vez puede ser monocatenario o bicatenario (49). Ya que no todos los virus mantienen su capacidad infecciosa durante todo su ciclo biológico se les ha denominado virión, a los que se encuentran en su ciclo infeccioso (61). Su estructura consiste en una cubierta de proteína externa y un núcleo interno de ácido nucleico (27) , incluso los virus más simples contienen RNA o DNA que al usar la maquinaria celular parasitada solo pueden codificar de uno a dos pares de proteínas, mientras que el más complejo puede codificar entre 100 y 200 proteínas (49).

La función principal de los virus es transportar su material genético o ácido nucleico de una célula hospedadora a otra (65), por lo tanto, respecto a su tamaño este debe ser menor al de la célula que parasita, variando de 20 nm hasta los 250-400 nm de longitud (93), sin embargo, hay algunos en donde su tamaño puede llegar a los 1000nm, como es el caso del *Megavirus chilensis* que fue encontrado en la costa de Chile (25).

La cápside es una cubierta proteica compuesta de múltiples copias de una proteína o unas pocas proteínas diferentes, cada una de las cuales está codificada por un sólo gen viral (49), por lo tanto los virus pueden codificar la información para hacer esta cápside

relativamente grande con un material genético bastante reducido (49), además , existen proteínas que contribuyen al empaquetamiento del ácido nucleico, en donde el conjunto de estos elementos forma la estructura conocida como nucleocápside (65) . Los virus se pueden encontrar desnudos (figura 1 A) o en algunos casos están cubierta por una membrana externa o envoltura (figura 1 B), que consiste principalmente en una bicapa de fosfolípidos similares a los de la membrana plasmática de una célula huésped infectada, pero también contiene uno o dos tipos de glucoproteínas codificadas por sí mismo (49).

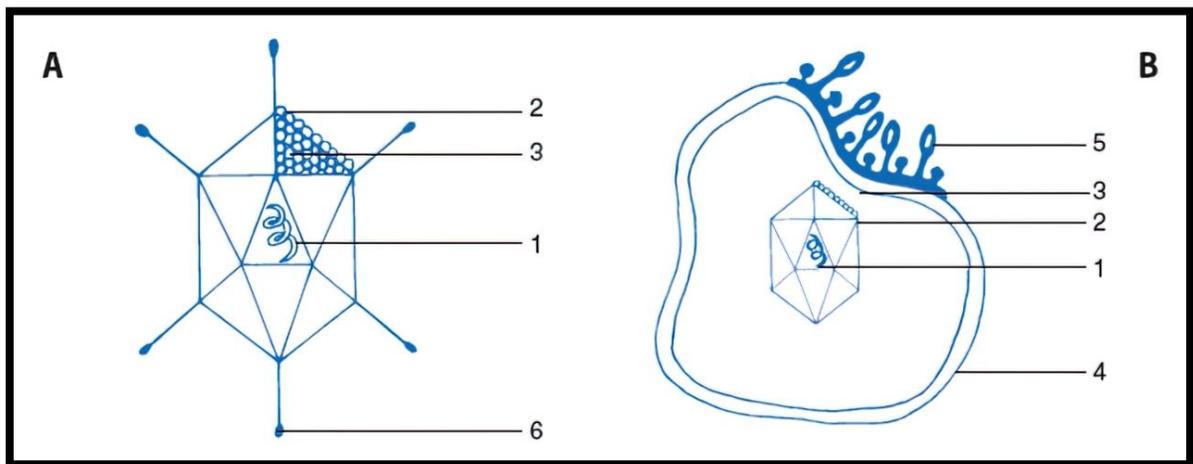


Figura 1: Componentes estructurales básicos de los virus. Virus con nucleocápside desnuda (A), virus con nucleocápside envuelta (B), 1= genoma viral; 2= cápside; 3=capsómeros; 4= envoltura; 5= espículas; 6=fibras. Tomado y adaptado de Negroni, M., & col. (2018).

Hoy en día se conocen tres formas principales de organización de las múltiples subunidades de las proteínas de la cápside del genoma viral, donde se encuentra:

1.3.1.1 Virus Icosaédricos:

Esta simetría se encuentra conformada por un poliedro de 20 caras triangulares (65), cada una de las cuales es un triángulo equilátero, constituido con tres subunidades de proteínas de cápside idénticas (figura 2 C) , lo que hace un total de 60 subunidades por

cápside, por lo tanto todas las subunidades de las proteínas están equivalentes entre sí (49), donde además puede o no presentar envoltura (figura 2 D)

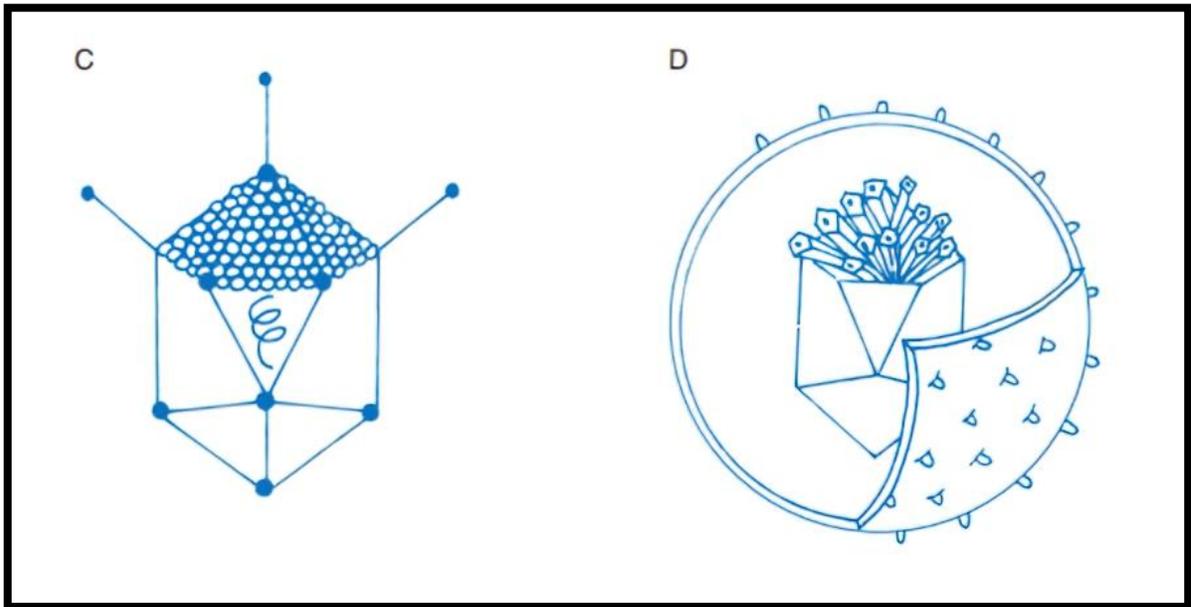


Figura 2: Estructura morfológica virus icosaédricos. Simetría icosaédrica desnuda (C), simetría icosaédrica envuelta (D). Tomado y adaptado de Negroni, M., y col (2018).

1.3.1.2 Virus Helicoidales:

En esta simetría las proteínas que originan los capsómeros se organizan en forma de espiral o hélice y se distribuyen alrededor del ácido nucleico (65), en el que las proteínas de carga positiva entran en contacto directo con el ácido nucleico cargado negativamente (65) (figura 3).

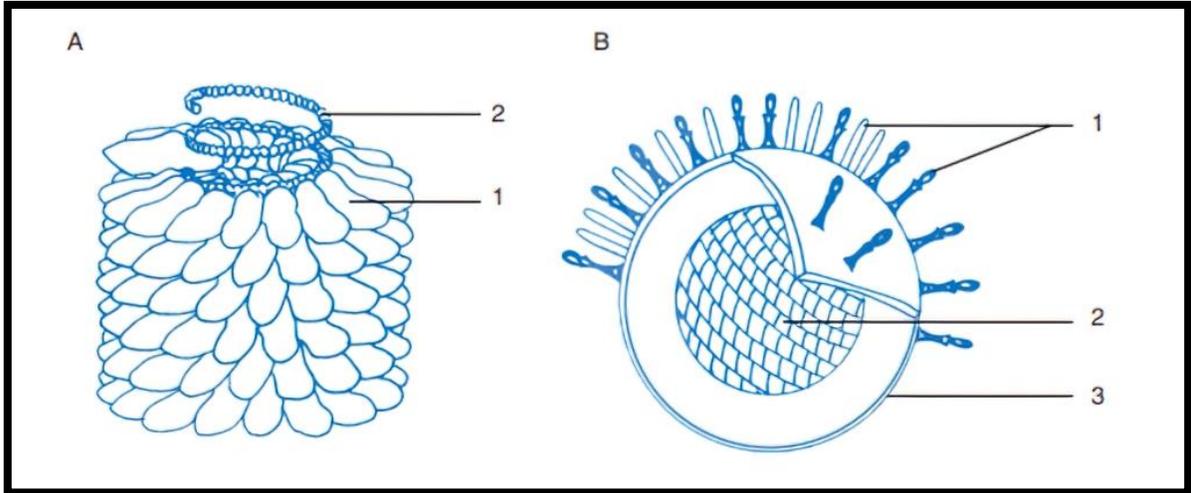


Figura 3: Estructura morfológica virus helicoidales. Simetría helicoidal desnuda (A), 1=capsómeros, 2=RNA. Simetría Helicoidal envuelta (B), 1=espículas; 2= nucleocápside, 3=envoltura. Tomado y adaptado de Negroni, M., y col. (2018).

1.3.1.3 Virus mixtos:

Existen virus que tienen una simetría binaria, es decir una mezcla de la simetría icosaédrica, con la helicoidal como por ejemplo los colifagos T, que incluso algunos poseen estructuras adicionales como colas proteicas (65) (figura 4 B).

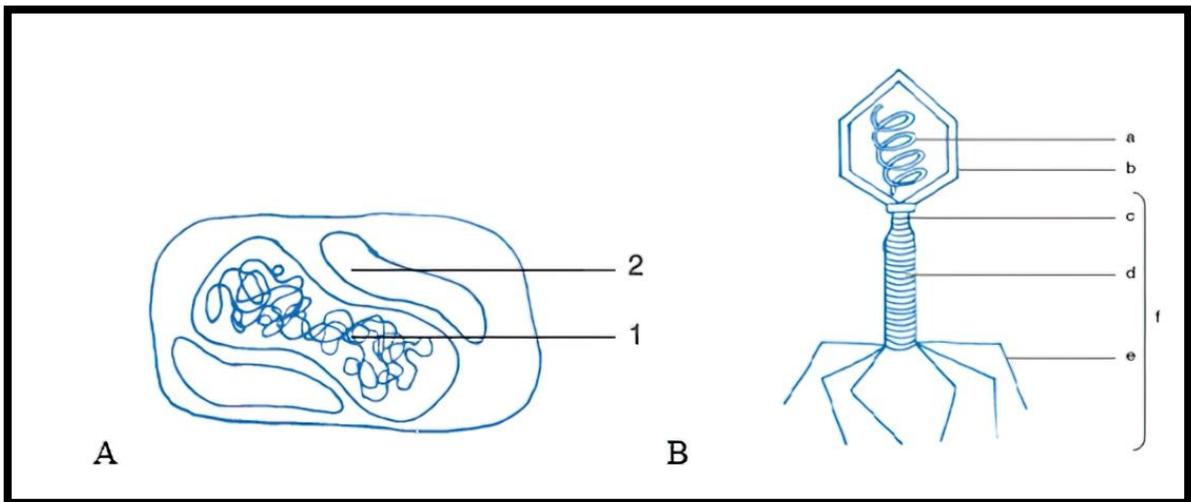


Figura 4: Estructura morfológica virus complejo o mixto. (Poxvirus con forma de ladrillo) Simetría compleja (A), 1 = ácido nucleico; 2=cuerpos laterales. Simetría binaria (B), a=DNA; b= cabeza; c=cuello; d=vaina; e=fibras; f= el conjunto que conforma la cola. Tomado y adaptado de Negroni, M., y col (2018) .

En la cápside se encuentran proteínas de superficie que forman la cápside externa como tal, que funcionan como antirreceptores de reconocimiento celular, también se encuentran las proteínas de la cápside internas, estructurales y no estructurales, asociadas al ácido nucleico, junto con enzimas como la proteasa y proteínas no metabólicas internas y superficiales asociadas al tropismo (65).

1.3.2 Características Genómicas:

En el genoma viral se encuentra toda la información genética de esta partícula submicroscópica y es responsable de toda la capacidad infecciosa del virus, este ácido nucleico se encuentra rodeado por una cubierta proteica llamada cápside y se caracterizan por poseer solo un tipo de material genético (65) que puede ser RNA o DNA, además de monocatenario o bicatenario es decir de una o dos hebras de material genético, en el que puede presentar una polaridad + (positiva) o – (negativa) (61).

1.3.2.1 Virus DNA

Los virus DNA bicatenarios pueden replicar y transcribir su genoma (las dos hebras) en el núcleo utilizando la maquinaria celular para producir RNAm necesario para la síntesis de proteínas (65), mientras que los virus que poseen cadenas de DNA simple requieren de la síntesis de una cadena complementaria de DNA, en donde luego de obtenerla, la replicación continúa en el núcleo celular como si este agente infeccioso hubiera tenido ambas hebras (61).

1.3.2.2 Virus RNA

Esta cadena de RNA puede tener polaridad positiva (+) o negativa (-), los RNA +, sirven como RNA mensajero y posee los genes necesarios para la traducción (11). Por otro lado, se encuentran los virus RNA -, es decir la secuencia inversa o anti-mensajero (5), estos inicialmente deben ser transcrito en RNA mensajero y así traducir proteínas (61).

1.3.3 Ciclos replicativos.

La replicación de los virus consta de un proceso en el cual esta partícula infecciosa penetra la célula huésped y mediante su maquinaria enzimática sintetizando nuevos agentes virales. La replicación viral se divide en seis etapas que son 1) adsorción o fijación, 2) penetración o entrada, 3) decapsidación o desnudamiento, 4) síntesis de proteínas y replicación del genoma, 5) maduración o ensamblaje y por último 6) liberación o egreso (61).

El ciclo replicativo del virus comienza con la adhesión o adsorción de proteínas de la cápside vírica con receptores específicos de superficie celular del huésped, aunque también se describe que pueden unirse a flagelos o pilis bacterianos (65) (figura 5-1). Luego sigue el siguiente paso que es el de penetración o entrada a la célula, este se puede realizar en forma directa, en el cual solo pasa el material genético viral quedando toda la estructura proteica adherida a la célula huésped, también se puede realizar por endocitosis producto de invaginaciones de la membrana plasmática (figura 5-2), o por fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula parasitada (98) (figura 5-2'). Posteriormente viene la etapa de decapsidación o desnudamiento en el cual enzimas celulares degradan la cápside viral, mediante el cual los virus DNA ingresan su material genético al núcleo a diferencia de los virus RNA que el material genético queda circulando en el citoplasma (61) (figura 5-4). En la cuarta etapa se encuentra la síntesis de proteínas y replicación, en donde participan distintos mecanismos dependiendo del material genético del virus. Como se nombró anteriormente los virus DNA necesitan la RNA polimerasa para sintetizar el RNAm y así producir proteínas víricas tempranas (no estructurales) o tardías (estructurales), los virus RNA + actúan como RNAm produciendo la síntesis de proteínas, mientras que el RNA - deben primero sintetizar RNAm, por lo que a este material genético no se le considera como infeccioso por sí mismo (61) (figura 5-6,7,8). Además, existe un grupo especial llamados

retrovirus que a pesar de ser RNA⁺ poseen una enzima llamada retrotranscriptasa que usando hebras de RNA puede sintetizar DNA sirviendo de molde para formar RNAm y así sintetizar proteínas virales (61). En la penúltima etapa de maduración o ensamblaje involucra un proceso termodinámico en el que la partícula viral se forma y adquiere estabilidad por la articulación de cada uno de estos componentes víricos (65), en este punto es donde se forman las nucleocápside por modificaciones postraduccionales, en el cual se pueden formar de estructuras vacías (pro-cápsides) que se rellenan posteriormente con el genoma del virus. El ensamblaje en los virus DNA ocurre en el núcleo, mientras que los virus RNA ocurre en el citoplasma (61). Con respecto a su envoltura, esta es adquirida por un proceso de gemación, en donde los virus RNA la adquieren de la membrana plasmática, mientras que los virus DNA lo hacen de la membrana del núcleo celular, luego son transportados por el aparato de Golgi, estos atraviesan la membrana del citoplasma por el sistema de endomembranas y finalmente se fusionan con la membrana citoplasmática (61). En la fase de maduración, los virus se convierten en viriones, es decir adquieren su capacidad infectiva. Por último, en la etapa de liberación las partículas víricas sintetizadas se liberan por lisis celular (figura 5.9), debido a la disminución de la síntesis de macromoléculas celulares o por algún efecto tóxico causado por los virus, aunque algunos casos la célula puede sobrellevar este daño y sobrevive (65). Los virus envueltos con la membrana citoplasmática pueden ser liberados instantáneamente con el proceso de adquisición de la envoltura (figura 5-9') mientras que los envueltos con la membrana del aparato de Golgi o retículo endoplásmico la liberación inducirá lisis celular (65)

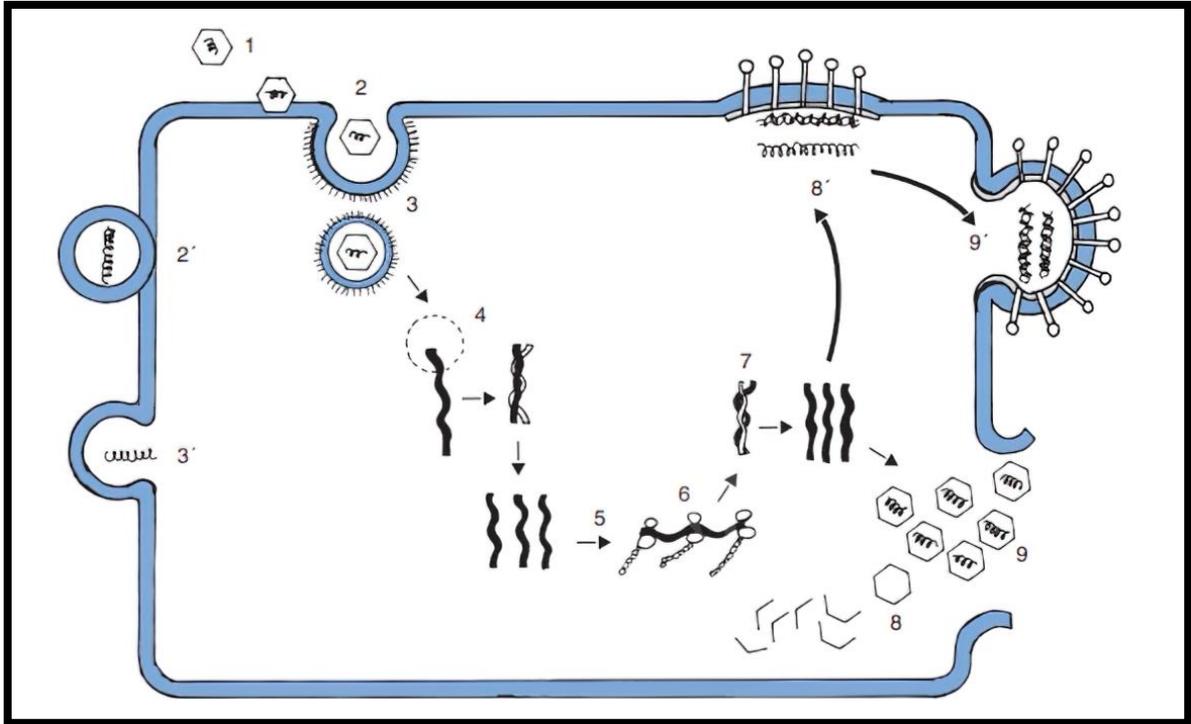


Figura 5: Replicación viral por diferentes mecanismos. 1= partícula viral y reconocimiento; 2=adsorción; 2' fusión= 3 y 3'= penetración; 4= desnudación; 5= transcripción; 6= síntesis de proteínas tempranas; 7= replicación del genoma; 8 y 8'= con la síntesis de proteínas tardías se produce el ensamblaje; 9= salida por lisis; 9'= salida por brotación. Tomado y adaptado de Negroni, M., y col (2018).

En la literatura el ciclo replicativo de los virus se divide según su duración, en donde se encuentran dos secciones, el ciclo lítico y el ciclo lisogénico: En el ciclo lítico el material genético viral se transcribe inmediatamente a RNAm para producir partículas víricas completas e infecciosas, mientras que en el ciclo lisogénico los virus circularizan en moléculas bicatenarias viajando al núcleo integrándose al genoma celular, la célula continúa haciendo sus funciones metabólicas normales hasta un cambio en el ambiente que produzca una activación del ciclo lítico (65).

1.3.4 Hospederos

Actualmente se conocen múltiples hospederos para estos agentes parasitarios, entre ellos se encuentran virus que infectan a bacterias, comúnmente llamados bacteriófagos, también virus que infectan a células vegetales o células animales llamados virus vegetales y virus animales respectivamente, incluso existen virus que infectan a otros virus conocidos actualmente como virófagos (42). La capacidad infecciosa y el rango que este tiene dentro de las células, depende de las proteínas que tiene en su cápside que le permiten la adherencia a la célula hospedadora. Algunos virus pueden infectar a plantas, como también a insectos que se alimentan de ella, por ejemplo, el virus amarillo de la papa que puede realizar su ciclo replicativo en los saltahojas (insectos que se alimentan de las hojas de la planta de papa) como también de la planta de papa misma (61). Existen virus con un amplio rango de huésped como es el caso del virus de la estomatitis vesicular, que infecta a células de múltiples mamíferos e insectos. Sin embargo, la mayoría de los virus animales no cruzan el nivel taxonómico *phylum*, y algunos infectan células de especies estrechamente relacionadas (49).

1.4 Clasificación

Existe múltiples parámetros que permiten la clasificación de estos agentes submicroscópicos, entre ellos: el tipo de ácido nucleico que posee, la simetría de su cápside, el tamaño del virus, si presenta o no presenta envoltura, el tipo de replicación viral, las células que es capaz de infectar, entre otros. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) es un comité de la División de Virología de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas en el cual sus actividades se rigen por los Estatutos acordados con la División de Virología. Los objetivos de este comité están basados en acuerdos internacionales aprobados por la comunidad de virólogos y virólogas, que permiten clasificar y nombrar a los diferentes tipos de virus existentes conocidos hasta el momento además de incorporar los descubrimientos nuevos (36).

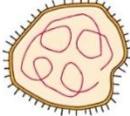
A nivel universal se utilizan los siguientes niveles taxonómicos: Orden, Familia, Subfamilia, Género y Especie, en el cual su clasificación primaria es esta última (1). La nomenclatura que se utiliza, incluye el sufijo -viridae para las familias y -virus para los géneros. La clasificación que se realiza en el ICTV considera a una especie un grupo

monofilético en el cual sus propiedades pueden ser distinguidas de otras especies por múltiples criterios, este grupo es monofilético si es que todos sus integrantes han venido de una población ancestral común (65). El sistema de clasificación presenta características comunes a las divisiones de otros organismos celulares, manteniéndose el taxón en donde normalmente los nombres de las especies virales se relacionan con la enfermedad causada. Por otro lado, existe otro tipo de clasificación viral que se basa en el tipo de material genético presente en el virus, el tipo de cadena y además su sentido. Esta clasificación consta de 7 grupos denominados con números romanos. Así los grupos I y II serán de virus DNA, los grupos III, IV y V corresponderán a virus RNA y los grupos VI y VII albergan a todos aquellos virus que realizan transcripción inversa (65). Las clasificaciones anteriores son las universalmente aceptadas pero no son las únicas, existen clasificaciones que se basan en la similitud del ensamblaje y la estructura del virión, otras por las células a la que infecta como la clasificación de Holmes o también clasificaciones por características físicas y químicas de los virus como el sistema LHT de clasificación de virus o la clasificación de Casjens y Kingsn (65).

RNAvirus de cadena positiva

					
	Picornaviridae	Caliciviridae	Togaviridae	Flaviviridae	Coronaviridae
Tamaño del genoma (kb)	7.2-8.4	8	12	10	16-21
Envoltura	No	No	Sí	Sí	Sí
Simetría de la cápside	Icosaédrica	Icosaédrica	Icosaédrica	Icosaédrica	Helicoidal

RNAvirus de tira negativa

			
	Rhabdoviridae	Filoviridae	Paramyxoviridae
Tamaño del genoma (kb)	13-16	13	16-20
Envoltura	Sí	Sí	Sí
Simetría de la cápside	Helicoidal	Helicoidal	Helicoidal

RNAvirus segmentado de tira negativa

				
	Orthomyxoviridae	Bunyaviridae	Arenaviridae	Reoviridae
Tamaño del genoma (kb)	14	13-21	10-14	16-27
Envoltura	Sí	Sí	Sí	No
Simetría de la cápside	Helicoidal	Helicoidal	Helicoidal	Icosaédrica

RNAvirus segmentado de tira doble

Retrovirus

	
	Retroviridae
Tamaño del genoma (kb)	3-9
Envoltura	Sí
Simetría de la cápside	Icosaédrica

Virus DNA

100 nm

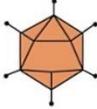
						
	Parvoviridae	Papillomaviridae	Hepadnaviridae	Adenoviridae	Herpesviridae	Poxviridae
Tamaño del genoma (kb)	5	5-9	3*	36-38	100-250	240
Envoltura	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Simetría de la cápside	Icosaédrica	Icosaédrica	Icosaédrica	Icosaédrica	Icosaédrica	Compleja

Figura 6: Esquema de las principales familias de virus. Los virus se agrupan por el tipo de genoma y se dibujan en una escala aproximada incluyendo aquellas especies que infectan a los seres humanos. Tomado y adaptado de Dennis, L., y col (2009).

1.5 Rol en enfermedades

La alteración producida por los virus en células normales infectadas, se conoce como efecto citopático viral y que es responsable de muchas enfermedades que afectan no solo al ser humano, sino que también a plantas u otros animales e insectos. Dentro de las infecciones virales que puede manifestar el ser humano se encuentran:

Infecciones respiratorias que son una de las más frecuentes como el virus de la influenza epidémica (A y B), virus de la influenza A aviar (H5N1), además el actualmente virus conocido del SARS-CoV-2 que ha causado una pandemia a nivel mundial. Estos tipos de virus tienen más probabilidades de causar síntomas graves en lactantes, adultos mayores y pacientes con trastornos pulmonares o cardiopatías (45). También existe virus capaces de provocar infecciones gastrointestinales como la gastroenteritis que afectan distintos tipos de virus según el grupo etario, por ejemplo, los pertenecientes al género *Rotavirus* que afectan principalmente a niños, los virus del género *Norovirus* que afectan a niños mayores y adultos, mientras que los del género *Astrovirus* suelen afectar a niños pequeños y lactantes. Además pueden provocar infecciones hepáticas como el virus de la hepatitis A,B,C,D y E en el que cada uno causa un tipo específico de hepatitis, infecciones neurológicas como el caso de las encefalitis virales producidas por virus del género *Arbovirus* a través de la picadura de un artrópodo, infecciones cutáneas o mucosas como el virus del herpes simple en el que puede comprometer la piel, boca, manos, ojos que puede llegar a ser grave, existe también el papilomavirus humanos causante de verrugas genitales o en las palmas de manos y pies, incluso algunos subgrupos pueden provocar cáncer de cuello uterino en mujeres (45). Por último, en algunos casos hay virus que pueden causar enfermedades multisistémicas como los enterovirus que incluyen *Coxsackievirus* y *Echovirus* de la misma manera que los *Citomegalovirus*.

Los virus como agentes infecciosos son causantes de muchas enfermedades tanto en el ser humano como en plantas y animales incluso bacterias, en donde el grado de daño de la patología depende del tipo de virus y su ciclo replicativo.

2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS

Los métodos utilizados para reconocer distintos patógenos entre ellos los virus, pueden clasificarse de dos formas, directos e indirectos (85). El primero se basa en demostrar la presencia del virus o de alguno de sus constituyentes como su genoma viral o distintos antígenos, mientras que el segundo se basa en la respuesta de anticuerpos específicos por parte del huésped en el curso de la infección (85). Así, se encuentran distintos métodos de diagnóstico directos como el aislamiento en cultivos celulares, identificación del virus mediante microscopía electrónica, PCR, hibridación, entre otras y métodos indirectos como ELISA, inmunofluorescencia indirecta, entre otros (17).

2.1 Cultivo celular

El cultivo de tejidos se refiere al mantenimiento o crecimiento, in vitro, de células, tejidos u órganos de origen animal o vegetal. El procedimiento consiste básicamente en liberar las células del tejido original y llevarlas a un ambiente artificial que permite su crecimiento, multiplicación y mantenimiento del metabolismo, de una manera controlada (85).

La aplicación de los cultivos celulares en virología está fundamentada en el requisito de los virus de penetrar y multiplicarse en las células, para producir alteraciones morfológicas y metabólicas características. La capacidad de las células de permitir la multiplicación de virus, y sufrir alteraciones, depende tanto del tejido y la especie de origen como de las condiciones del cultivo y de las características propias del virus (85).

El uso del cultivo celular es útil no sólo en virología, sino que, en distintas áreas de investigación como inmunología, ingeniería de proteínas, investigación del cáncer entre otros (85). Presentando, además, una serie de ventajas como también desventajas que hay tener en consideración y que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Ventajas y desventajas generales del cultivo celular. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.	Costo de producción. Aunque ha ido en decadencia con las nuevas tecnologías (especialmente por la biología molecular).
Caracterización y homogeneidad de la muestra.	Inestabilidad como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide.
Ocupan menos volúmenes de reactivos o fármacos en comparación con el ensayo in vivo.	El cultivo no siempre puede reemplazar el uso de animales de experimentación, sin embargo, es una alternativa válida en muchas ocasiones.

Actualmente se utiliza este método para el diagnóstico viral en infecciones de las vías respiratorias donde su agente etiológico generalmente son los virus de la influenza, aunque el método más sensible es la RT-PCR (17). Por otro lado, ya que la infección por citomegalovirus es la infección intrauterina más frecuente y afecta a cerca del 1% de los recién nacidos, la prueba prenatal más fiable para verificar la infección es su cultivo junto con su detección en el líquido amniótico mediante alguna técnica molecular como PCR (17). También la infección neonatal por el virus del herpes simple posee una elevada mortalidad y una morbilidad significativa, donde pueden aparecer lesiones cutáneas, oculares o daño

cerebral grave. Su diagnóstico principalmente se realiza por el cultivo del virus y detección con técnicas de biología molecular igualmente que los virus del género *Citomegalovirus* (14).

Sin embargo, en la rubéola que es una enfermedad muy contagiosa que se propaga a través de las secreciones respiratorias y que su agente etiológico es un virus RNA de la familia *Togavirus*, no se puede emplear el método de cultivo ya que este requiere mucho tiempo en realizarse y no es eficaz en una patología que se agrava con mucha rapidez (32).

Los métodos modernos de cultivo celular aún se consideran en muchos laboratorios lo más precisos y sensibles para el diagnóstico viral, sin embargo, las técnicas de biología molecular avanzan rápidamente como técnica elegida para la identificación de virus.

2.2 Histología

En la actualidad la biología molecular logra identificar cepas de virus, bacterias y parásitos que han sido de importancia clínica y medioambiental. Los estudios histológicos con técnicas histológicas convencionales y especiales le brindan una información básica al clínico acerca de la naturaleza del proceso infeccioso (95)

Algunos agentes infecciosos se pueden ver en cortes teñidos con hematoxilina-eosina (por ejemplo, cuerpos de inclusión formados por *Citomegalovirus* y virus del herpes simple, cúmulos bacterianos, que normalmente se tiñen de azul, *Candida* y *Mucor* entre los hongos, la mayoría de los protozoos y todos los helmintos). Sin embargo, muchos agentes infecciosos se ven mejor con tinciones especiales que identifican los microorganismos a partir de las características particulares de su pared celular o su cápsula tinciones de Gram, acidorresistentes, plata, mucicarmín y Giemsa o después del marcado con anticuerpos específicos, donde los microorganismos se ven mejor en el borde de avance de la lesión que en el centro de la misma, en particular si hay necrosis (95).

Existen diferentes técnicas histológicas para identificar distintos patógenos, donde alguna de ellas se presentará en la siguiente tabla.

Tabla 2. Tinción usada en distintas técnicas histológicas según grupo de agente infeccioso. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021).

TINCIÓN	AGENTE INFECCIOSO
Brown Brenn	Bacterias gran positivas y negativas
Verde metilo	Bacterias gran negativas
Pironina	Bacterias gran positivas
Glenn	Bacterias gran negativas
PAS	Hongos
Hematoxilina/ eosina	Inclusiones virales
Warthin Starry	Espiroquetas

La utilización de técnicas histológicas convencionales y especiales posibilita determinar la presencia del agente causal de infección a nivel celular, lo que permite emitir un diagnóstico de infección más discriminativo y de mayor calidad por el especialista (7).

2.3 Serología

El organismo dispone de un sistema de defensa inespecífico que le permite defenderse de los patógenos externos en ausencia de un contacto previo con ellos (en ausencia de reconocimiento), y de un sistema de defensa específico, más desarrollado y sofisticado, que le permite defenderse con eficacia frente a los microorganismos y que exige para su desarrollo de un reconocimiento previo del agente. Este segundo mecanismo de defensa puede adquirirse por contacto con el agente o sus antígenos a través de una infección, por inoculación voluntaria (vacunación) o por administración de anticuerpos preformados en otro organismo (anticuerpos maternos transferidos a través de la placenta o por administración de sueros hiperinmunes). Esta respuesta es específica y con capacidad de distinguir entre lo

propio y extraño; en las ocasiones en las que existe conflicto en este reconocimiento aparece la enfermedad autoinmune. La respuesta es más o menos persistente y capaz, además, de dejar recuerdo de este su primer contacto con el antígeno (memoria inmunológica) que le permitirá reaccionar de forma más eficaz y violenta en las exposiciones posteriores al mismo antígeno (15).

En el curso de una infección varían las poblaciones de anticuerpos frente al agente infectante, en primer lugar, la clase predominante suele ser IgM, mientras que con el transcurso del tiempo las IgM disminuyen hasta desaparecer o quedar a muy baja concentración y, en cambio, aumentan las IgG. La búsqueda de anticuerpos clase IgM es de utilidad para hacer diagnóstico de infección reciente en una sola muestra de suero extraída en el período agudo de la enfermedad. Este método se emplea para el diagnóstico de enfermedades como: Rubéola, infecciones por *Citomegalovirus*, Hepatitis a virus A, como también actualmente se realizan test serológicos para la detección del SARS-Cov-2, sin embargo, los métodos moleculares (RT-PCR en específico) siguen siendo el gold estándar para su diagnóstico (37). La búsqueda de anticuerpos clase IgG en una sola muestra se utiliza como técnica de tamizaje, por ejemplo, para el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Posteriormente los hallazgos positivos son confirmados en la misma muestra de suero por otra metodología que preferentemente son métodos de biología molecular (13).

La confirmación serológica de una infección aguda por cualquiera de estas técnicas tradicionales está dada por un aumento de cuatro veces o mayor en el título de anticuerpos cuando se emplean diluciones al doble seriadas. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para la detección de anticuerpos virales, y en muchos casos han demostrado ser mejores que las pruebas tradicionales en términos de economía, sensibilidad, especificidad y rapidez (95).

2.4 Moleculares

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación mediada por transcripción, se utilizan para el diagnóstico de múltiples patologías, entre ellas la gonorrea, la infección por clamidias (57), infecciones virales como la actual pandemia producto del virus SARS-CoV-2 que se diagnostica mediante PCR (6). Los métodos moleculares son mucho más sensibles que el estudio convencional de algunos patógenos como el cultivo celular o algunas técnicas histológicas (17). Por ejemplo el estudio de la encefalitis por el virus del herpes simple mediante PCR del líquido cefalorraquídeo tiene una sensibilidad aproximada del 80%, mientras que la del cultivo vírico del líquido cefalorraquídeo es inferior al 10% (17), del mismo modo, las pruebas de ácidos nucleicos para *Chlamydia* genital detectan entre un 10 y un 30% más de casos que el cultivo convencional de *Chlamydia*. En cuanto a otras infecciones, como la gonorrea, la sensibilidad del estudio de los ácidos nucleicos es parecida a la del cultivo (17). Además, hoy en día existen actualizaciones de estas técnicas como la PCR cuantitativa que para el virus BK, el Citomegalovirus y el virus de Epstein-Barr permite valorar la carga viral en los receptores de trasplantes, también estas pruebas cuantitativas que miden los ácidos nucleicos víricos permiten orientar el tratamiento médico de los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C (13).

Actualmente, se emplean de forma rutinaria paneles moleculares que permiten la detección de 20 patógenos o más para el diagnóstico de las infecciones respiratorias bacterianas y víricas y también de las infecciones bacterianas, víricas y parasitarias digestivas (17). Esta secuenciación masiva, asociada o no a una amplificación inicial por PCR, se emplea para la detección de patógenos nuevos o poco frecuentes y también para la investigación epidemiológica (95). En el capítulo “**Métodos Moleculares Para El Diagnóstico Viral**” se explican las técnicas con detalle.

2.5 Proteómicas

El proteoma es el conjunto de proteínas que un organismo o en este caso agente viral que produce o modifica. Gracias a la proteómica ha permitido la identificación de cantidades cada vez mayores de proteínas de distinto tipo y con distinta función (67). Esta generalmente se refiere al análisis experimental a gran escala de proteínas y proteomas, pero que sin embargo a menudo se uso específicamente para referirse a la purificación de proteínas y la espectrometría de masas.

En proteómica, existen múltiples métodos para estudiar proteínas. Generalmente, las proteínas pueden detectarse mediante el uso de anticuerpos (inmunoensayos) o espectrometría de masas. Si se analiza una muestra biológica compleja, se debe usar un anticuerpo muy específico en el análisis de transferencia de puntos cuantitativos (QDB) o se debe usar una separación bioquímica antes del paso de detección, ya que hay demasiados analitos en la muestra para realizar detección y cuantificación precisas (17).

3. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN VIRAL

3.1 Generalidades

Gran parte de las técnicas utilizadas en el diagnóstico clínico se basan en pruebas serológicas que identifican anticuerpos específicos frente a diversas proteínas antigénicas. Sin embargo, existen circunstancias en las cuales son necesarias pruebas que detecten precozmente la infección viral (tratamientos específicos, medidas profilácticas, entre otras.).

En algunas infecciones virales es posible detectar la presencia de antígenos virales previamente al desarrollo de la seroconversión, siendo esta prueba la única evidencia de la exposición al virus cuando no existe aumento de los niveles de anticuerpos circulantes (pacientes inmunodeprimidos) (17). Igualmente, la detección del genoma viral puede favorecer la precocidad del diagnóstico viral y su confirmación. En la última década se han desarrollado una serie de técnicas para el diagnóstico viral basadas en la detección de ácidos nucleicos. De ellas la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada. En el momento actual, la tendencia en el diagnóstico virológico consiste en emplear nuevas y más sensibles tecnologías de detección de antígenos y de investigación de ácidos nucleicos con el propósito de lograr un diagnóstico viral más rápido (96).

El diagnóstico clínico orientará hacia la prueba apropiada a realizar, pero además de aquel, se requiere información epidemiológica, identificación correcta del paciente, edad de aquel y la fecha de obtención de la muestra. También resulta útil averiguar si el paciente ha recibido vacunas virales o terapéutica antiviral en una fecha reciente.

Las etapas de diagnóstico viral son principalmente cinco: Identificación de síntomas, recolección de la muestra, transporte y/o almacenamiento, procesamiento de la muestra y entrega de resultados que se detallan en los próximos subcapítulos (83).

3.1.1 Recolección, transporte y procesamiento de la muestra.

Las mejores muestras por lo general son las que se obtienen en un estadio temprano de la enfermedad (dentro de las primeras 72hs), cuando el virus se excreta en concentraciones relativamente elevadas y todavía no se ha unido con anticuerpos (22). Después de transcurridos 7 días habitualmente no vale la pena realizar cultivos virales cuando se trata de huéspedes inmunocompetentes. No obstante, en huéspedes inmunocomprometidos y en las infecciones virales persistentes o crónicas, el virus puede estar presente durante períodos prolongados (22). Además, el volumen de la muestra debe ser suficiente como para permitir la realización de los ensayos apropiados y la conservación, por ejemplo: en caso de tener que repetir el ensayo en pruebas adicionales, como PCR.

A continuación, se detallan algunas técnicas de recolección de muestras clínicas:

- ❖ Hisopados conjuntivales: Se debe frotar la conjuntiva palpebral con un hisopo estéril humedecido con solución salina estéril. Luego se debe colocar el hisopo en 3-4ml de medio de transporte, este posee proteínas como puede ser la albúmina de bovino o la gelatina. Además, posee un agregado de antibióticos y antifúngicos logrando así prevenir el sobredesarrollo de la flora bacteriana y fúngica residente del huésped (19).
- ❖ Hisopados de lesiones y vesículas cutáneas: Se debe recolectar la muestra dentro de los 3 días de la erupción de la vesícula. Primero, se lava suavemente la superficie de la vesícula o la lesión con 70% de etanol, luego se aspira el fluido vesicular con una jeringa de tuberculina y se coloca el fluido aspirado en 3-4ml de medio de transporte. Luego se debe frotar las lesiones cutáneas o vesículas abiertas con un hisopo y colocarlo en 3-4ml de medio de transporte. El hisopado de las vesículas puede ser colocado en el medio de transporte que ya tiene el fluido vesicular (83).
- ❖ Aspirado nasofaríngeo: Se introduce una sonda nasogástrica por las fosas nasales hasta la rinofaringe y se aspira el mucus en un tubo colector con características especiales. El contenido de la sonda se lava con medio de transporte para virus, que se recoge en el tubo colector (19).
- ❖ Hisopados nasales: Se introduce un hisopo de algodón, seco, suavemente en la nariz. Se deja el hisopo en la nariz durante algunos segundos para que las secreciones sean

absorbidas y así obtener la muestra. Luego se coloca el hisopo dentro de 3-4ml de medio de transporte. Es la muestra de elección para virus respiratorios (19).

- ❖ Hisopados faríngeos: En esta técnica se frota las amígdalas y faringe con un hisopo de algodón seco. Se coloca el hisopo en 3- 4ml de medio de transporte (19).
- ❖ Hisopados rectales: Se introduce un hisopo de algodón humedecido 2-3cm dentro del canal anal realizando movimientos rotatorios. Posteriormente, se coloca el hisopo dentro de 3- 4ml de medio de transporte. (83)
- ❖ Orina: Se debe recolectar un total de 10-15ml de orina recientemente emitida en un recipiente estéril y enviarla directamente al laboratorio (19).
- ❖ Líquido cefalorraquídeo (LCR): Se debe recolectar al menos 0,1ml de LCR (2-3ml preferentemente) y además se debe transportar directamente al laboratorio (19).
- ❖ Sangre con anticoagulante (para cultivo viral o inmunofluorescencia): Se debe recolectar sangre entera en un tubo que contenga heparina, citrato o EDTA. Además, se debe enviar la sangre directamente al laboratorio donde su rápida entrega (2- 6 horas) al laboratorio es esencial (83)
- ❖ Suero (para pruebas serológicas): En este caso se debe recolectar la muestra de sangre en un tubo estéril que no contenga anticoagulantes, luego se debe enviar la muestra al laboratorio sin congelar. De acuerdo al origen de la muestra, esta requerirá diferentes tratamientos previos a ser inoculada. Si lo que se quiere es inocular la muestra en cultivos celulares lo que se recomienda es hacerlo inmediatamente después de obtenida. Además, si el método de estudio a aplicar es una inmunofluorescencia, se deben confeccionar frotis y se fijan al portaobjeto con acetona, para así poder conservarlos a -20° o -70° hasta su tinción (83).

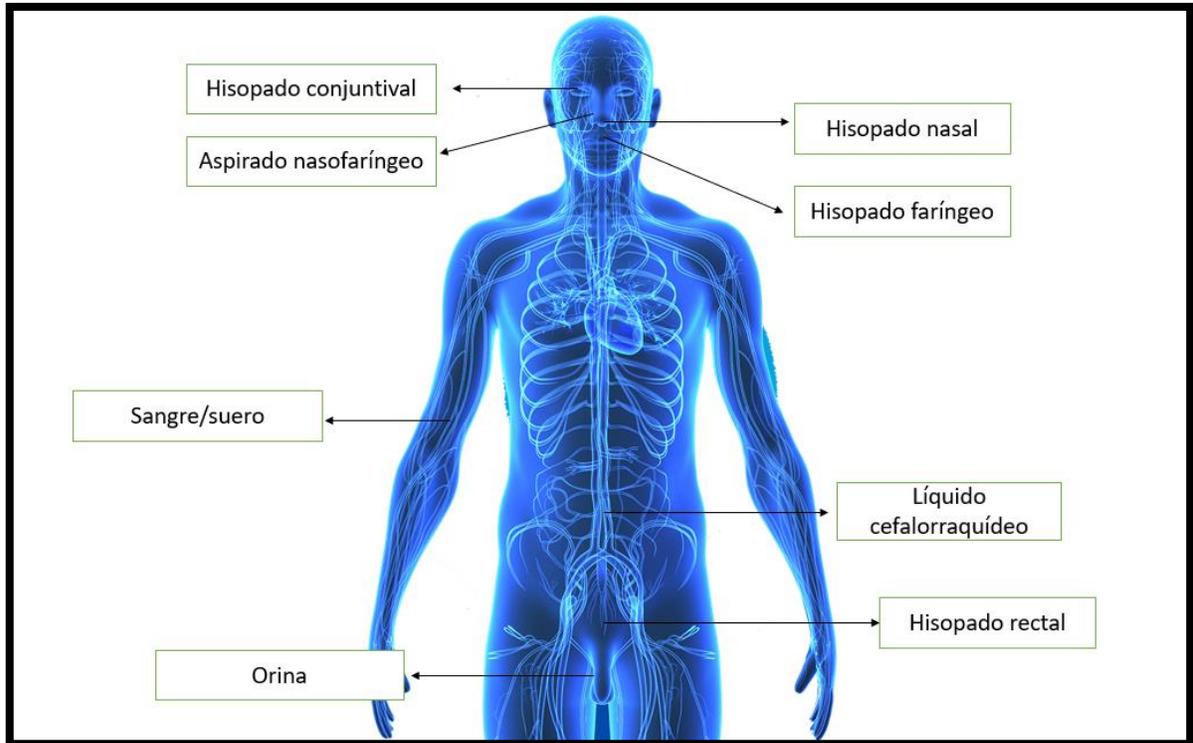


Figura 7: Representación de lugar anatómico en donde se realiza la muestra para el diagnóstico viral. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021).

En la siguiente tabla se detalla el medio de transporte y condiciones de transporte de las muestras en la pesquisa de distintos tipos de virus.

Tabla 3. Principales agentes virales, su transporte y sobrevida.

Virus	Medio de transporte	Tiempo días / Temperatura °C	% de recuperación
Adenovirus	Bentonita	14/ambiente	100
B5	Bentonita	21/ambiente	100
CMV	2SP (Medio chlamyidia), Sorbitol 70% Medio de cultivo viral SPG	21/4 3/4 3/4 3/4	4 4 1 10
Echovirus 11	Bentonita	21/ambiente	100

HSV	Leche descremada Medio de Richards SPG	30/4 12/2 3/4	25 10-50 30
Influenza	Bentonita	14/ambiente	33
Parainfluenza	Bentonita	14/ambiente	50
Rubeola	Bentonita	14/ambiente	1
VZV	2 SP	3/20	4

CMV: Citomegalovirus, HSV: virus del herpes simple, VZV: virus varicela-zóster, 2SP: 2 sacarosa fosfato, SPG : sacarosa fosfato glutámico. Tomado de del Pilar Crespo, M. (2000).

3.1.3 Bioseguridad

La bioseguridad es el Conjunto de normas y actitudes que tienen como objetivo proteger la salud del personal frente a los riesgos biológicos, químicos y físicos a los que está expuesto en el desempeño de sus funciones, es por ello que es esencial cumplir las normas de seguridad que son establecidas a nivel nacional (43). A continuación, se establecen a grandes rasgos el uso de elementos de protección personal, junto con acciones que debe realizar el laboratorista según el tipo de muestra (64):

Tabla 4. Procedimiento de bioseguridad a realizar según tipo de muestra. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021).

TIPO DE MUESTRA	PROCEDIMIENTOS Y USO DE ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

Sangre	Higiene de manos, uso de guantes, uso de sistema de extracción al vacío, evitar producción de aerosoles.
Secreción respiratoria	Higiene de manos, uso de guantes, mascarilla N95, protección ocular.
Orina	Higiene de manos, guantes, evitar la generación de aerosoles.
Manejo de tejidos	Higiene de manos, uso de guantes, delantal, pechera plástica, mascarilla N95, protección ocular.

Tabla 5. Procedimiento de bioseguridad a realizar según el manejo de la muestra,
Elaboración propia Fuentealba, D., (2021).

DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA	PROCEDIMIENTOS Y USO DE ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL
Traslado De muestras de laboratorio dentro del hospital	Personal capacitado exclusivamente para transporte, no manipular muestras, estas deben estar en envases plásticos cerrados mínimo con tapa rosca, transporte en cajas cerradas, de material liso, lavable, resistente, con gradillas apropiadas al envase.
Transporte de muestras de laboratorio fuera del hospital:	Personal capacitado y exclusivamente para transporte, no debe manipular las muestras,

	la muestra debe estar en contenedor sellado y se debe descontaminar el envase.
Recepción de la muestra de laboratorio	Se deben utilizar guantes, además se debe realizar una higiene de manos al retirar los guantes.
Manipulación y procesamiento de la muestra de laboratorio	Se deben utilizar guantes, una pechera plástica, una mascarilla N95 y protección ocular en caso de aerosoles, y, además, se debe higienizar las manos al retirar los guantes
En caso de accidentes en el transporte de muestras de laboratorio (derrame o quiebre):	Se deben utilizar los guantes, absorber fluidos con papel desechable luego se debe lavar con abundante agua junto con la desinfección de la superficie con solución clorada. Por último, se debe higienizar las manos al retirar los guantes.

3.2 Métodos de diagnóstico indirectos

El diagnóstico indirecto implica la demostración de la huella que el agente infeccioso ha dejado por su contacto con el sistema inmune. La muestra más frecuente en este caso es la muestra de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos específicos, por lo que frecuentemente se lo denomina diagnóstico serológico y que se realiza mediante distintos métodos inmunológicos que se presentan a continuación (24).

3.2.1 Métodos Inmunológicos (Detección de anticuerpos)

- ❖ Inmunofluorescencia indirecta: La Inmunofluorescencia indirecta, es un método rápido y confiable para la determinación de anticuerpos antivirales en el suero del paciente. Se basa en la unión de anticuerpos antivirales presentes en el suero del paciente a los

antígenos virales expresados en la superficie y citoplasma de células infectadas, que han sido fijadas a un portaobjeto de vidrio. Como control de especificidad se usan células no infectadas. La presencia de anticuerpos se evidencia por la aparición de fluorescencia en el citoplasma (que es vista a través de microscopía fluorescente) y superficie de las células infectadas, mientras que las células control no tienen fluorescencia (44).

- ❖ Enzimoimmunoanálisis indirecto: Los enzimoimmunoanálisis indirectos se han aplicado de forma amplia en los últimos años al diagnóstico de anticuerpos virales. Tiene las ventajas de ser un método versátil, relativamente económico y sensible. La metodología es la siguiente: Los antígenos virales se inmovilizan sobre una fase sólida (esferita, policubetas para microtitulación u otros elementos de plástico) y se agregan los sueros en estudio, se incuban, se lavan y se revela la reacción antígeno-anticuerpo por el agregado de una inmunoglobulina antiespecie conjugada con una enzima, seguida por el sustrato apropiado para esta. Los resultados se pueden leer con un espectrofotómetro y en algunos casos de forma visual (79).
- ❖ Western Blot; La técnica de Western Blot se basa en la separación electroforética de proteínas virales que son posteriormente inmovilizadas en papel de nitrocelulosa con el objeto de determinar la presencia de anticuerpos específicos contra cada una de esas proteínas (51).

3.3 Métodos directos

El diagnóstico directo implica la demostración del agente infeccioso y/o componentes antigénicos en los fluidos orgánicos. Incluye la elección de la muestra, su transporte, conservación y procesamiento que permita la identificación del patógeno en específico en este caso los virus. Existen diferentes métodos directos para el diagnóstico viral, donde los más importantes son: Cultivo celular para diagnóstico viral, estudios inmunológicos de detección de antígenos, estudios de visualización como la microscopía electrónica, test de aglutinación entre otros.

3.3.1 Cultivos celulares

El cultivo celular para el diagnóstico viral se basa en preparar diferentes líneas celulares que son inoculadas con la muestra clínica sospechosa. El éxito del aislamiento del virus depende de la óptima selección, recogida y transporte de la muestra clínica (86). Con relación a su procedimiento, una vez que ingresa la muestra al laboratorio se agita

fuertemente y se descarta el tejido sobrante. Seguidamente se centrifuga al medio líquido de forma que en el pellet contendrá hongos, bacterias, células entre otras cosas para luego ser desechado. Por otro lado, en el sobrenadante contendrá los virus ya que estos presentan menos densidad. Este último posteriormente se inocula en los diferentes medios de cultivo celulares y a través del efecto citopático que se presente en el monocapa celular del cultivo se detecta la presencia viral. (17).

Los distintos cultivos celulares varían en cuanto a su susceptibilidad a los diferentes virus, ya que existe una relación específica huésped-virus, y es en función de los datos clínicos y del tipo de muestra que se elige el cultivo para inocular el material (17).

3.3.2 Inmunológicos (Detección de antígenos)

En el caso de detección de antígenos, se utiliza un anticuerpo específico antiviral (por lo general IgG) en el cual la fracción Fc se ha conjugado una molécula marcada, que puede ser isotiocianato de fluoresceína (Inmunofluorecencia), un isótopo radioactivo ^{125}I o ^{131}I (RIA), o una enzima: peroxidasa, fosfatasa alcalina, o biotina-avidina (EIA), para objetivar la reacción (54).

3.3.3 De visualización (Microscopía electrónica)

Mediante el microscopio electrónico es posible observar la morfología de los viriones presentes en muestras clínicas. La limitación del método además del costo del microscopio, es que necesita de una alta concentración de viriones (aproximadamente 10^9 partículas virales/ml, dependiendo del virus) presentes en la muestra, por ello es poco sensible. Esto hace que sea una técnica poco utilizada, más aún con el desarrollo de técnicas alternativas de utilidad similar (85). El microscopio electrónico nos permite, por ejemplo, obtener resultados positivos rápidos de muestras de materias fecales de pacientes con diarrea, ya que tanto los *Rotavirus*, como los *Adenovirus*, *Coronavirus* y *Calicivirus* pueden ser visualizados e identificados como causantes de enfermedad. Por ejemplo, los *Rotavirus* poseen una forma característica en doble rueda y un tamaño distintivo, 70nm de diámetro, y se los encuentra en concentraciones de hasta 10^{11} partículas virales por gramo de heces. También en otras muestras, como líquido vesicular, biopsia de tejidos, verrugas, orina o suero es posible obtener resultados positivos, mediante coloración negativa. Si la concentración de virus en la muestra clínica es baja, y por tanto no visible directamente por microscopio electrónico, se pueden utilizar técnicas que aumenten la visualización, por ejemplo, la inmunoelectromicroscopía, que consiste en el agregado de anticuerpos específicos antivirales y la formación de agregados de partículas que son más fácilmente visibles que las partículas solas (85).

3.3.4 Enzimoimmunoanálisis (EIA)

Los enzimoimmunoanálisis para la detección de antígeno se basan habitualmente en la captura del antígeno por anticuerpos específicos unidos a una fase sólida, en general el pocillo de una microplaca o una pequeña esfera de plástico. El antígeno viral presente en la muestra clínica se combina con el anticuerpo fijado a la fase sólida y el antígeno viral se detecta mediante la adición de otro anticuerpo específico conjugado a una enzima. La enzima conjugada suele ser peroxidasa o fosfatasa alcalina (79). El sustrato para esas enzimas varía. En la reacción con la peroxidasa el sustrato es un peróxido capaz de oxidar un compuesto químico incoloro que en su forma oxidada tiene un color característico. En el caso de la fosfatasa la desfosforilización es la responsable directa de la aparición del color. Por esta técnica se puede procesar gran número de muestras en forma rápida y automatizada, no requiriendo de un observador experimentado para leer los resultados, ya que estos se leen por medio de espectrofotómetros especialmente diseñados, siendo entonces una técnica más objetiva (79).

3.3.5 Test de Aglutinación

El test de aglutinación es un método simple, de un solo paso, que a veces se usa para la detección de antígenos virales en muestras clínicas. Los ensayos de aglutinación, dependen de la fijación inicial de anticuerpos antivirales específicos sobre eritrocitos o partículas de látex. Luego este reactivo se incuba con la muestra clínica en la cual se investiga el antígeno y las partículas se aglutinan si el antígeno adecuado se encuentra presente. Estas pruebas en general se complementan o se confirman por medio de otros ensayos debido al elevado porcentaje de reacciones inespecíficas. El test de aglutinación ha sido usado para detectar antígeno de *Rotavirus* en heces (el más importante) mostrando una buena sensibilidad cuando se lo compara con el EIA para *Rotavirus*. Además, es una técnica rápida y barata. También se la ha usado para detectar antígenos de Adenovirus.

3.4 Elección de prueba diagnóstica.

En la valoración de los diferentes procedimientos de diagnóstico descriptos, se pueden considerar tres parámetros de importancia fundamental que se define cada uno de ellos de la siguiente manera:

Tabla 6. Parámetros evaluados en la evaluación de un método de diagnóstico y su definición. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021)

PARÁMETRO	DEFINICIÓN
-----------	------------

Sensibilidad	Proporción de personas con la infección que reaccionan positivamente en la prueba diagnóstica realizada. Por ejemplo: Una prueba diagnóstica será más sensible, cuando detecte un mayor número de personas infectadas o enfermas.
Especificidad	Es la proporción de personas sin la infección o enfermedad que reaccionan como negativos. Por ejemplo: Una prueba es más específica cuando tiene menos reacciones positivas entre las muestras de personas que no tienen la enfermedad.
Valor Predictivo	Es la probabilidad de tener la enfermedad dado el resultado del test.
Valor Predictivo Positivo	Es la probabilidad de tener la enfermedad si el resultado del test es positivo.
Valor Predictivo Negativo	Es la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado del test es negativo

Los valores predictivos de los test lo determinan la sensibilidad, la especificidad y la prevalencia de la enfermedad en la población a la que se le aplique el test. Un test de alto valor predictivo negativo será aquel que tenga una alta especificidad y no necesariamente una alta sensibilidad. Por el contrario, un test de alto valor predictivo positivo tendrá que tener una gran especificidad ya que debe acertar la positividad de las muestras realmente positivas. Por ello un test ideal sería aquel que detectara el 100% de las personas con la enfermedad y excluyera el 100% de las personas sin la enfermedad, no dando nunca resultados falsos positivos o falsos negativos. Desafortunadamente, esto no ocurre con las técnicas disponibles actualmente (96). En la elección del método diagnóstico además de la sensibilidad y especificidad se debe considerar aspectos operativos en las técnicas a ser usadas, como ser: costos, complejidad técnica del ensayo, volumen necesario y preparación de la muestra, tiempo que requiere el proceso, disponibilidad comercial del kit de calidad reconocida. Además, se debe considerar el nivel de complejidad del laboratorio y la disponibilidad tecnológica y de recursos que requiere cada técnica (96).

4. MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO VIRAL

4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction), es un método de biología molecular desarrollado por Kary Mullis en la década de 1980 (59). Esta técnica se basa en los procesos naturales que usa la célula para replicar una nueva cadena de DNA complementaria a la hebra molde y así obtener un gran número de copias de un DNA particular, para ello se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas con el propósito de separar las hebras del material genético recién formado tras cada fase de replicación para luego mediante una reacción enzimática poder amplificarlas.

4.1.1 Fundamentos de la técnica

Este método de diagnóstico presenta generalmente 6 etapas que son: inicio, desnaturalización, alineamiento o unión al cebador, extensión o elongación de la cadena, elongación final y conservación, donde en algunos casos se señalan los básicos correspondientes a desnaturalización, alineamiento y por último extensión (39) (Figura 6).

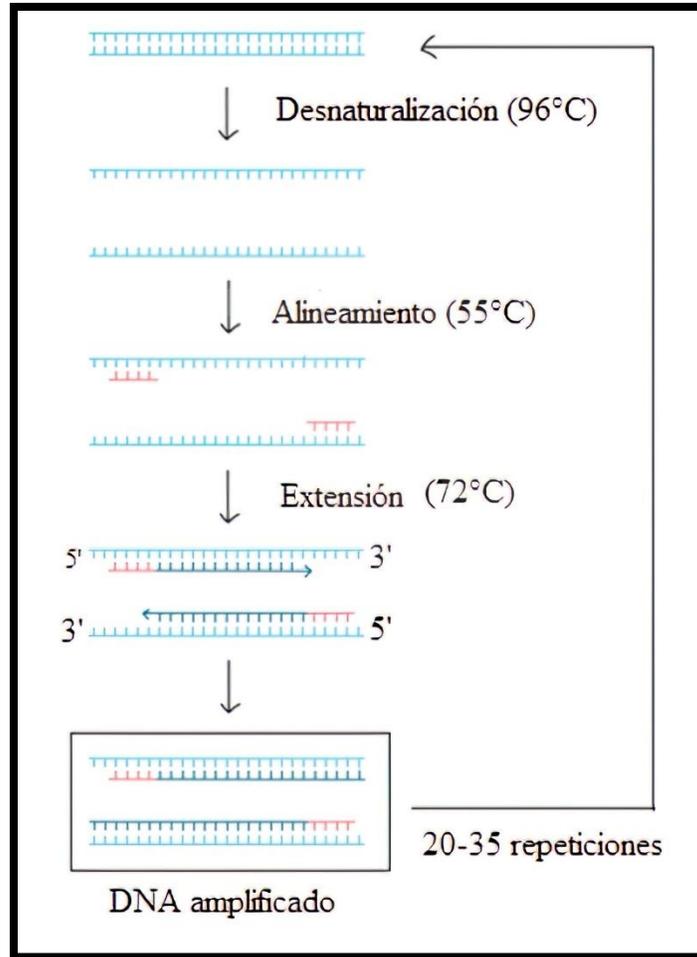


Figura 8: Etapas básicas de PCR. Banda azul: hebras de DNA. Banda roja: Cebadores. Flechas: dirección polimerización. Tomado y adaptado de Khanacademy. (2020).

La etapa inicial de la PCR consiste en elevar la temperatura de la reacción con el objetivo de separar las cadenas de DNA por desnaturalización, obteniendo dos plantillas monocatenarias para poder amplificarlas. En algunos casos la desnaturalización se hace por adición de sales u otros agentes químicos (15).

El siguiente paso corresponde al alineamiento o unión al cebador, estos son oligonucleótidos cortos (aproximadamente entre 18 y 30 nucleótidos) complementarios a sección del DNA que se quiere en este caso amplificar (secuencia diana), ubicándose uno al comienzo de la cadena monocatenaria y otro al final (13). La unión del cebador a la hebra molde requiere de la disminución de temperatura en la reacción, entre 40 – 68°C durante 20-40 segundos (33).

En la etapa de extensión o elongación de la cadena, se eleva nuevamente la temperatura permitiendo así la extensión de la Taq polimerasa, esta añade los deoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) en dirección 5' a 3' sintetizando nuevas hebras de DNA. Se usa la Taq polimerasa ya que esta proteína tiene la capacidad de soportar temperaturas altas que pueden llegar a los 80 °C sin desnaturalizarse.

Por último, en algunos casos se eleva la temperatura de 70 a 74°C durante un periodo de 5 -15 minutos para asegurarse que no queden hebras de DNA sin ser amplificado, además se incluye un paso llamado conservación durante aproximadamente 10 minutos con el objetivo de sobrellevar la reacción a corto plazo (70).

Una vez terminada la amplificación se puede utilizar un método llamado electroforesis para verificar la cantidad y tamaño de los fragmentos de DNA producidos.

4.1.2 Ventajas comparativas

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de material genético a partir de una o muy pocas copias de DNA, presenta también una alta especificidad por lo que puede diferenciar especies de microorganismos muy cercanos evolutivamente y por último puede detectar infecciones virales de forma precoz (20), además se ha evidenciado una alta sensibilidad y especificidad de la PCR en infecciones perinatal de VIH en comparación con el cultivo viral y el antígeno p24 (19), y también se ha identificado un mayor número de muestras positivas en muestras bovinas por PCR en comparación con ensayos como ELISA y AGID para la detección del virus de leucosis (37).

4.1.3 Limitaciones

Una de las limitaciones de la reacción de PCR es el requerimiento de personal altamente especializado ya que uno de los principales problemas radica en la contaminación inherente de la muestra que pueden conducir a resultados erróneos, además posee ciertos problemas de reproducibilidad por lo que dificulta su estandarización para ser llevado a cabo por personal no capacitado (37). Otro punto importante es el tiempo de resultado

relativamente largo 2 a 5 horas, demorándose hasta 72 horas en ser entregados al paciente en los servicios sanitarios chilenos para detectar el SARS-COV-2, a diferencia de por ejemplo los test rápidos, con un tiempo de espera de aproximadamente 30 minutos (78). Además, esta técnica es relativamente costosa sin considerar la instrumentación necesaria. (37)

Por último, con respecto a la técnica, solo durante la fase exponencial de la reacción de PCR es posible extrapolar hacia atrás para determinar la cantidad inicial de la secuencia diana contenida en la muestra. la reacción de PCR finalmente deja de amplificar la secuencia diana a una velocidad exponencial y se produce un "efecto meseta" debido a los inhibidores de la reacción de la polimerasa que se encuentran en la muestra, la limitación del reactivo, la acumulación de moléculas de pirofosfato y el autoanillado del producto acumulado, haciendo que la cuantificación del punto final de los productos de PCR no sea confiable. Este es el atributo de la PCR que hace que la PCR cuantitativa (q-PCR) en tiempo real sea tan necesaria (59).

4.1.4 Variantes

4.1.4.1 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR normal en el que además de la amplificación del material genético es posible cuantificarlo. Para ello es necesario emplear fluoróforos que pueden ser de dos tipos: de afinidad al DNA o sondas específicas para fragmentos de DNA, es decir sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado el material genético. Finalmente, se realiza la amplificación (síntesis) del ADN o ADNc en un termociclador acoplado a un sistema óptico, que monitorea la señal de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado. Debido a que la fluorescencia de éstos aumenta conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa (3).

4.1.4.2 PCR transcriptasa reversa

La técnica PCR con transcriptasa reversa permite la amplificación de material genético a partir de RNA formando DNA complementario (DNAc) usando una enzima llamada transcriptasa reversa. Puede utilizarse como método de detección de genes, estudiar el material genético de virus RNA como los retrovirus entre ellos el VIH o el virus de la

gripe. Actualmente se usa la técnica RT-PCR en tiempo real para diagnosticar la infección por el virus SARS-COV-2 (virus RNA), siendo el más usado en Chile desde el inicio del diagnóstico del virus en la población (1).

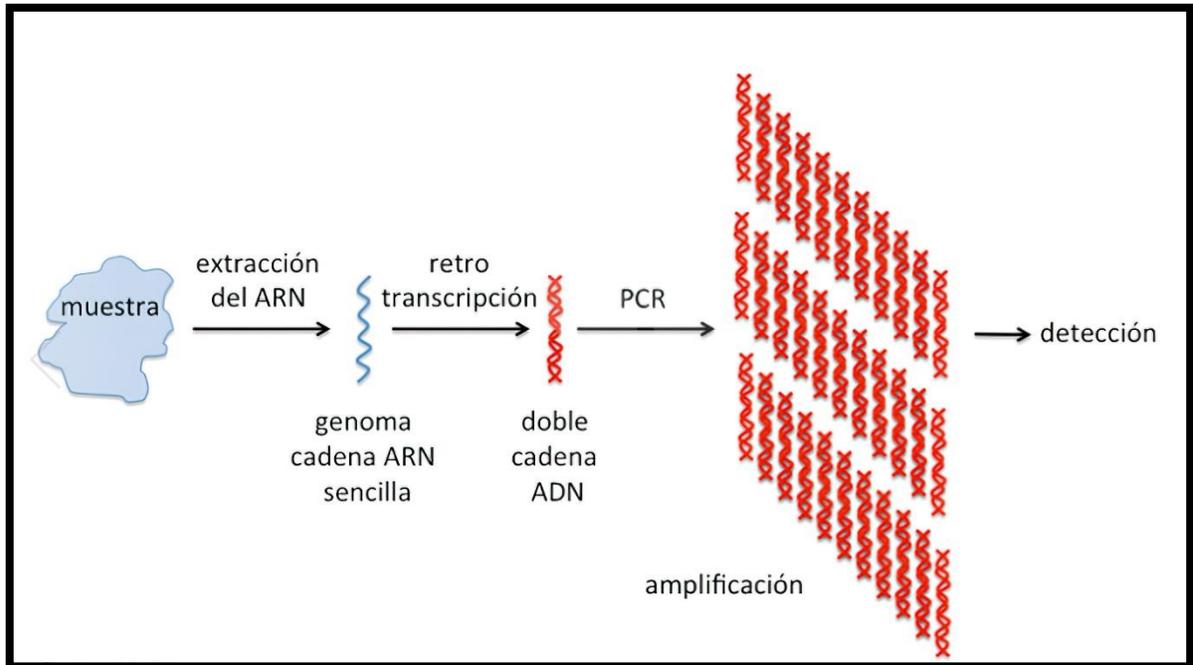


Figura 9: Representación funcionamiento PCR transcriptasa inversa. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021).

4.1.4.3 PCR in situ

Con la explosión en la identificación de virus "nuevos" en prácticamente cualquier especie animal examinada, el dilema se convierte en vincular la presencia de un virus responsable de una patología en el individuo afectado. Como se señaló anteriormente, esto se puede hacer utilizando inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Un problema con estas técnicas, particularmente con un agente recién descubierto, es que no se tienen los anticuerpos necesarios para su diagnóstico. La alternativa a los sistemas de detección de anticuerpos es el uso de sondas de ácido nucleico (FISH—hibridación in situ fluorescente). Estas corresponden a regiones conservadas del genoma se sintetiza con una etiqueta fluorescente en el extremo 5' (6-carboxifluoresceína como ejemplo). Desde la evaluación histopatológica de muestras de tejido, pueden seleccionarse cortes que muestren una lesión

característica asociada con la enfermedad clínica. La aplicación de la sonda específica del virus a la sección de tejido permite determinar si el agente es específicamente asociado con las lesiones en conjunto a la inespecífica señal de PCR positiva de un extracto de tejido (33).

Esta variación de PCR como dice su nombre, se realiza en secciones histológicas o células que pueden ser visualizadas en el sitio de amplificación puede ser mediante dos mecanismos:

- ❖ PCR-hibridación in situ (PISH): Consiste en realizar una PCR sobre el corte de tejido o la extensión citológica y después detectar el DNA amplificado mediante hibridación in situ con sondas complementarias marcadas colorimétricamente (avidina-biotina-peroxidasa).
- ❖ PCR in situ (en sentido estricto): Consiste en realizar una PCR sobre el corte de tejido o la extensión citológica utilizando nucleótidos (dNTPs) o cebadores marcados colorimétricamente o con fluorescencia. (23)

4.1.4.4 PCR múltiple

Esta variante de PCR lleva su nombre ya que puede amplificar simultáneamente más de una hebra de DNA, combinándose múltiples parejas de cebadores, con la precaución de estar lo suficientemente lejos unas de otras para que las amplificaciones no interfieran entre sí. (23)

Los ensayos de PCR multiplex se utilizan ahora con frecuencia para detectar la presencia de una variedad de virus implicados en síndromes específicos como infecciones respiratorias, por ejemplo: Influenza virus (INF) A y B, virus de la parainfluenza (PIV) tipos 1, 2, 3 y 4, virus respiratorio sincitial humano, metaneumovirus humano (hMPV), rinovirus humanos (RV), coronavirus humanos y coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), humano enterovirus (EV) y adenovirus. Entre sus desventajas, incluyen costos de puesta en marcha más altos, costos de reactivos más altos y capacitación extensa y específica para laboratorios especializados y equipo especializado para su funcionamiento.

4.1.4.5 PCR anidada

Se realizan dos PCR consecutivas de 25 a 30 ciclos cada una. En la primera se utilizan un par de cebadores llamados externos; en la segunda se usan cebadores complementarios a secuencias de ADN contenidas en los fragmentos que se amplificaron en la primera PCR (llamados cebadores internos) que flanquean una región central que es la que queremos amplificar. El fundamento de esta técnica es que los productos de la primera amplificación son un molde ideal para la segunda amplificación, mucho mejor que el ADN genómico original. Dada su enorme sensibilidad, uno de los peligros de esta técnica es la contaminación, por lo que su utilización es difícil en laboratorios de rutina. (23)

4.2.1 Secuenciación masiva.

En 1975, Sanger y Coulson publicaron el primer método enzimático para secuenciar el DNA a través de la incorporación de dideoxinucleótidos terminales, y poco después lograron secuenciar el genoma del bacteriófago Phi-X174, que fue el primer ácido nucleico totalmente secuenciado en la historia de la humanidad (31). En los últimos años se han desarrollado nuevas plataformas de secuenciación denominadas de alto rendimiento o nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) que son capaces de generar de forma paralela y masivamente millones de copias de material genético en un único proceso de secuenciación, elevando significativamente su rendimiento a un menor coste y ofreciendo ventajas significativas respecto a los sistemas convencionales de secuenciación (54).

4.2.1.1 Fundamentos de la técnica.

El gran avance que alteró para siempre el progreso de la tecnología de secuenciación de DNA se produjo en 1977, con el desarrollo de la técnica de "terminación de cadena" o dideoxi de Sanger. Esta técnica utiliza análogos químicos de los desoxirribonucleótidos (dNTP) que son los monómeros de las cadenas de DNA. Los dideoxinucleótidos (ddNTP) carecen del grupo hidroxilo 3' que se requiere para la extensión de las cadenas de DNA y,

por lo tanto, no pueden formar un enlace con el fosfato 5' del siguiente dNTP (36). La mezcla de ddNTP radiomarcados en una reacción de extensión de DNA a una fracción de la concentración de dNTP estándar da como resultado la producción de hebras de DNA de cada longitud posible, ya que los didesoxinucleótidos se incorporan aleatoriamente a medida que la hebra se extiende, deteniendo la progresión adicional. Al realizar cuatro reacciones paralelas que contienen cada base de ddNTP individual y ejecutar los resultados en cuatro carriles de un gel de poliacrilamida, se puede utilizar la autorradiografía para inferir cuál era la secuencia de nucleótidos en la plantilla original, ya que habrá una banda radioactiva en el carril correspondiente. en esa posición del gel (ver figura 8). Aunque se trabajaba con el mismo principio que otras técnicas (el de producir todas las posibles secuencias de longitud incremental y etiquetar el nucleótido final), la precisión, robustez y facilidad de uso llevaron al método de terminación de cadena didesoxi, o simplemente, secuenciación de Sanger, a convertirse en la tecnología más común utilizada (35).

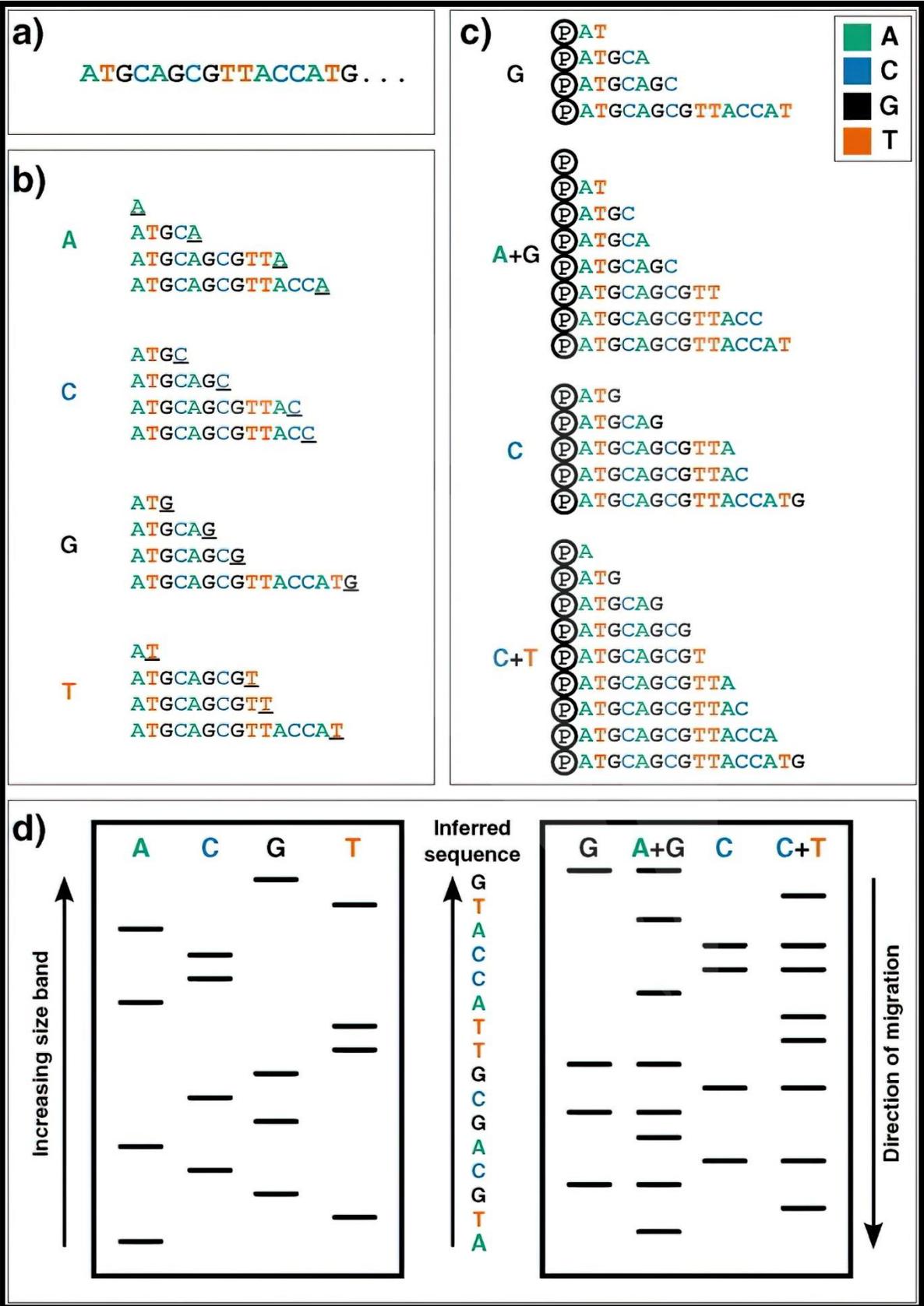


Figura 10. Tecnología de secuenciación de DNA de primera generación. El ejemplo de ADN que se va a secuenciar (a) se ilustra mediante secuenciación de Sanger (b) o Maxam-Gilbert (c), los fragmentos generados a partir de cualquiera de las metodologías se pueden visualizar mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida de alta resolución (d). Tomado de Heather y col (2016).

4.2.1.2 Secuenciación de primera generación

La secuenciación de primera generación se basó en la utilización de métodos y técnicas bioquímicas capaces de cortar cadenas de RNA en sitios específicos y ya reconocidos (35), el procedimiento general de las técnicas de secuenciación incluye 5 etapas, que son:

Tabla 7: Etapas de la secuenciación en general con su definición correspondiente.

Elaboración propia Fuentealba, D., (2021)

ETAPA	DEFINICIÓN
Fragmentación del DNA	Generación de pequeños fragmentos de distinto tamaño, luego se unen a sus extremos moléculas llamadas adaptadores (La unión del adaptador más el fragmento de DNA se conoce como librería)
Enriquecimiento (opcional)	Consiste en seleccionar exclusivamente las áreas de interés antes de la secuenciación.
Ligación	Unión del material amplificado a una superficie sólida donde se llevará a cabo la reacción de secuenciación.
Secuenciación	Uso de métodos y técnicas bioquímicas con el propósito de determinar el orden del material genético, tanto la secuenciación y detección de las bases ocurren al mismo

	tiempo en todas las moléculas de ADN (secuenciación masiva y paralela)
Creación de archivos	Creación de una base de datos con la información de la secuenciación y alineamiento de las lecturas contra un genoma de referencia.

Los dispositivos de secuenciación de primera generación producen lecturas de aproximadamente 1 Kilobase (Kb) de longitud (considerando que el Homo-sapiens consta de unos 3200 millones de pares de bases (10²), por lo tanto, para analizar fragmentos más largos, los investigadores utilizaban “fragmentos de escopeta” en el que el material genético superpuesto se clonaba y se secuenciaba por separado (35).

4.2.1.3 Secuenciación de segunda generación:

Con el desarrollo de esfuerzos de secuenciación didesoxi a gran escala, apareció otra técnica que preparó el escenario para la primera ola en la próxima generación de secuenciadores de DNA. Este método difería de los métodos existentes en que no infirió la identidad de nucleótidos mediante el uso de dNTP u oligonucleótidos marcados con radio o fluorescencia antes de visualizar con electroforesis. En su lugar, los investigadores utilizaron un método luminiscente descubierto recientemente para medir la síntesis de pirofosfato: este consistía en un proceso de dos enzimas en el que se usa ATP sulfurilasa para convertir el pirofosfato en ATP, que luego se usa como sustrato para la luciferasa, produciendo así luz proporcional a la cantidad. de pirofosfato (35).

Las máquinas de secuenciación de segunda generación fueron un cambio de paradigma en el sentido que permitieron la paralelización masiva de reacciones de secuenciación, aumentando la cantidad de DNA que se puede secuenciar (35).

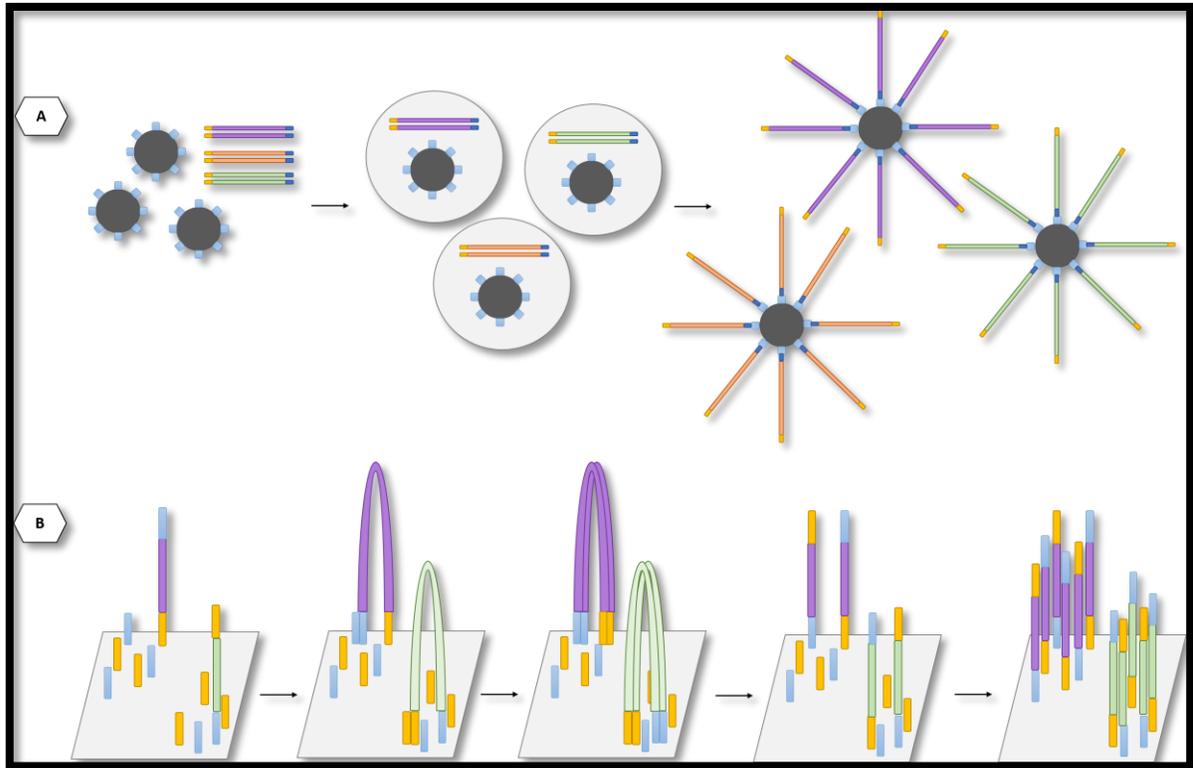


Figura 11. Tecnología de secuenciación de DNA de segunda generación. PCR en emulsión (a), PCR puente (b). Tomado y adaptado de Pareek, C y col (2011) (36)

Estas plataformas de segunda generación pueden generar entre quinientos millones de bases de secuencia sin procesar y miles de millones de bases en una sola ejecución. En la PCR en emulsión (Ver figura 9, A), la mezcla de reacción consiste en una emulsión aceite-agua creada para encapsular complejos entre el DNA y nanoesferas, dentro de gotículas de agua. Tras la emulsión, se lleva a cabo la amplificación, de tal manera que cada nanoesfera queda recubierta por varios miles de copias de la misma secuencia molde formando una colonia. En la PCR puente (B), la secuenciación tiene lugar sobre una placa de vidrio, sobre la que están dispuestos adaptadores complementarios a los adaptadores anclados en las secuencias desnaturalizadas a secuenciar. Así, cada fragmento de DNA monocatenario se unirá por uno de sus extremos a uno de los oligonucleótidos complementarios presentes en la placa. Tras la acción de la polimerasa, que utiliza estos adaptadores como cebador, se sintetiza la cadena complementaria, quedando inmovilizada. Seguidamente, tendrá un nuevo

ciclo de desnaturalización, provocando que las hebras desnaturalizadas formen puentes gracias a la unión de su extremo libre con otro de los adaptadores inmovilizados en la placa. Este proceso se repite varias veces, hasta formar lo que se conoce como clusters, una agrupación de secuencias idénticas inmovilizadas sobre una superficie sólida. (68).

4.2.1.4 Secuenciación de tercera generación.

En las plataformas HT-NGS de segunda generación discutidas anteriormente, el principio se basaba en la amplificación por PCR en emulsión de fragmentos de DNA, para hacer que la señal de luz sea lo suficientemente fuerte para la detección de bases confiable por las cámaras CCD (Dispositivo de carga acoplada). Aunque la amplificación por PCR ha revolucionado el análisis de ADN, en algunos casos puede introducir errores de secuencia de bases o favorecer ciertas secuencias sobre otras, cambiando así la frecuencia relativa y la abundancia de varios fragmentos de ADN que existían antes de la amplificación. Para superar esto, se podría lograr la miniaturización final en la nanoescala y el uso mínimo de bioquímicos si la secuencia pudiera determinarse directamente a partir de una sola molécula de DNA, sin la necesidad de amplificación por PCR y su potencial de distorsión de los niveles de abundancia. Esta secuenciación de una sola molécula de DNA ahora se denomina "tercera generación de tecnología HT-NGS". El concepto de secuenciación por síntesis sin una etapa de amplificación previa, es decir, secuenciación de una sola molécula (35).

4.2.1.5 Utilidad en investigación y diagnóstico viral.

El hito de la secuenciación del genoma humano fue logrado por dos grupos de científicos utilizando estrategias diferentes de secuenciación (68), con ello se han podido detectar distintos tipos de variaciones genómicas y mutaciones en distintos tipos de organismos e incluso en virus (35).

La actual pandemia surgió durante la era de la epidemiología genómica impulsada por los continuos avances en la secuenciación de próxima generación. Desde su reciente aparición, la epidemiología genómica permitió la identificación precisa de nuevas cepas o especies de agentes patógenos y la reconstrucción de su variabilidad genética en tiempo real, lo que se hizo evidente en los brotes de influenza H1N1, MERS y SARS. Sin embargo, la

escala global y descontrolada de esta pandemia ha generado una situación que obligó a utilizar de forma masiva herramientas de la epidemiología genómica como la rápida identificación del SARS-CoV-2 y el registro de nuevas cepas y su vigilancia activa en todo el mundo. Antes de la pandemia de COVID-19 la disponibilidad de datos genómicos de agentes patógenos circulantes en varios países de Latinoamérica era escasa o nula (16). Con la llegada del SARS-CoV-2 dicha situación cambió significativamente, aunque la cantidad de información disponible sigue siendo escasa y, en países como Colombia, Brasil, Argentina y Chile, la información genómica del SARS-CoV-2 provino principalmente de grupos de investigación en epidemiología genómica más que como producto de una política o programa de vigilancia en salud pública (6). Por lo tanto, esta pandemia ha puesto de manifiesto la importancia de la secuenciación genómica en dos aspectos clave en enfermedades infecciosas, la identificación rápida del patógeno que causa la infección, y su caracterización, seguimiento y evolución que faciliten el control de la infección. El estado de desarrollo de la secuenciación y de su metodología de análisis en las unidades de genómica y bioinformática de los centros de investigación y sanitarios ha facilitado enormemente su aplicación durante esta pandemia, aunque es necesario llegar a protocolos estandarizados y armonizados que permitan la comparación de datos de una forma fidedigna (102).

4.2.1.6 Ventajas comparativas.

La secuenciación masiva como se ha dicho anteriormente, permite detectar distintos tipos de mutaciones en un tiempo relativamente corto dependiendo de la cantidad de pares de bases que se quiera secuenciar y día a día se están realizando mejoras continuas con el propósito de que sea más eficiente. Su uso radica principalmente en la epidemiología de las enfermedades infecciosas y se complementa con las otras técnicas de diagnóstico como la PCR.

La secuenciación masiva ha transformado la microbiología, sobre todo desde que se han reducido los costes y los tiempos de análisis, gracias al desarrollo de la bioinformática, que va generando nuevos programas de análisis. La masiva generación de datos requerirá cada vez más inversiones en grandes centros de supercomputación, y el desarrollo de programas de código abierto será cada vez más profuso, aunque, paralelamente, se comercializarán paquetes de uso bioinformático que requerirán mínimos conocimientos técnicos (9).

4.3.1 Citometría de flujo

A grandes rasgos, la citometría de flujo es una tecnología que proporciona un análisis multiparamétrico rápido de células individuales en solución, estos utilizan láseres como fuentes de luz para producir señales de luz tanto dispersas como fluorescentes que son leídas por detectores como fotodiodos o tubos fotomultiplicadores. Estas señales se convierten en señales electrónicas que son analizadas por una computadora y escritas en un archivo de datos de formato estandarizado (55).

Esta tecnología es una herramienta poderosa que tiene aplicaciones en inmunología, biología molecular, bacteriología, virología, biología del cáncer y monitoreo de enfermedades infecciosas que ha visto avances dramáticos en los últimos 30 años, permitiendo detalles sin precedentes en los estudios del sistema inmunológico y otras áreas de la biología celular (55). También, es un instrumento sofisticado que mide múltiples características físicas de una sola celda, como el tamaño y la granularidad, simultáneamente mientras la celda fluye en suspensión a través de un dispositivo de medición. Su funcionamiento depende de las características de dispersión de la luz de las células bajo investigación, que pueden derivarse de colorantes o anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas extracelulares ubicadas en la superficie o moléculas intracelulares dentro de la célula (2).

4.3.1.1 Fundamento de la técnica.

Un citómetro de flujo tradicional consta de tres sistemas los que se encuentran: sistema fluídico o sistema de fluidos, sistema óptico y sistema electrónico (55) que se describen a continuación:

Tabla 8: Sistemas que se encuentran en un citómetro de flujo tradicional con su respectiva descripción. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021)

SISTEMA	FUNCIONAMIENTO
De fluidos	Fluido envolvente (generalmente una solución salina tamponada) que se presuriza para administrar y enfocar la muestra al punto de intercepción o interrogación del láser donde se analiza la muestra.
Óptico	Ópticas de excitación (láseres) y ópticas de recogida (tubos fotomultiplicadores o PMT y fotodiodos) que generan las señales de luz visible y fluorescente que se utilizan para analizar la muestra.
Electrónico	Convierte las señales de los detectores en señales digitales que pueden ser leídas por una computadora.

En el sistema de fluidos su función principal es alinear y transportar células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz, por lo tanto, es necesario que la muestra se encuentre suspendida en un fluido, en el cual se aplica una propiedad hidrodinámica que consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente de fluido envolvente, el cual puede ser agua o un buffer de fosfatos (87). Lo anterior se logra porque la presión de la muestra es mayor que la presión del líquido envolvente por lo que gracias a este sistema, las células pueden ser alineadas en “fila india”, y de esta manera se asegura que el haz de luz incida sobre una célula a la vez (70) (Ver figura 10).

El sistema óptico está compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Las células, al ser incididas por el láser, tendrán la capacidad de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad. En caso de que la luz se disperse frontalmente, se obtendrá un parámetro denominado FSC (forward scatter), que indica el tamaño de la célula (aunque también se

puede realizar en partículas virales) (Figura 11). Por tal motivo, aquellas células marcadas con fluorocromos serán excitadas por el láser y la luz será dirigida hacia un detector, el cual recibirá la longitud de onda emitida por la excitación del fluorocromo. Gracias a este sistema, se puede conocer el tamaño y la granularidad de la célula, así como las proteínas que se expresan (marcadores), permitiendo así la identificación de diferentes tipos celulares. A medida que el citómetro posea más detectores, mayor será su capacidad para identificar poblaciones celulares (55).

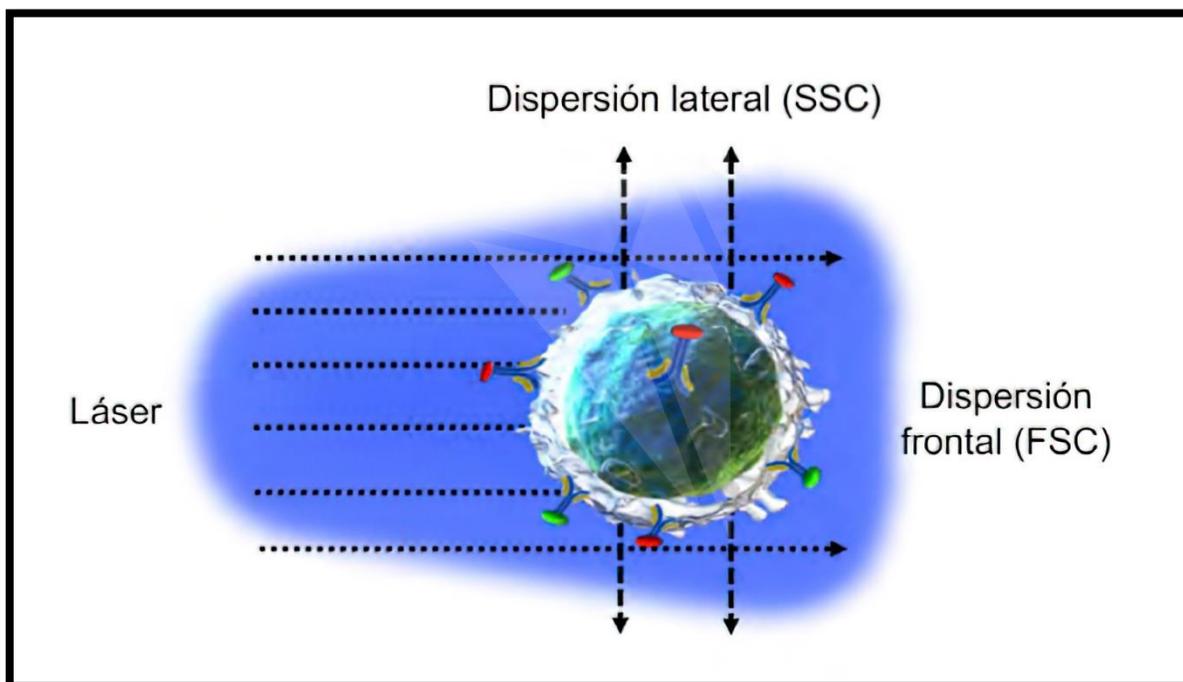


Figura 12. Representación del sistema óptico de un citómetro de flujo tradicional. Tomado y adaptado de McKinnon y col. (2018).

Como se mencionó anteriormente, el marcaje celular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y “etiquetar” poblaciones específicas de células (2). Esta tecnología consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), mismo que se expresa en el tipo celular que se requiere identificar. Adicionalmente, este anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que

emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser (2) de este modo, la célula se “tiñe” y facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador (71).

Por último, los resultados obtenidos pueden ser representados mediante diferentes estilos, desde una gráfica de puntos hasta una figura tridimensional; la clave se centra en seleccionar los gráficos que reflejen los resultados con precisión y sin generar confusiones (71).

Los distintos gráficos que podemos encontrar en resultados de citometría de flujo se muestran a continuación

Tabla 9: Descripción de los distintos gráficos que se pueden encontrar como resultado en la técnica de citometría de flujo. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021)

Gráfico de puntos	Este gráfico muestra la relación entre dos marcadores diferentes y muestra a cada punto como un evento (se define como evento a cualquier partícula que haya sido excitada por el láser).
Gráfico de densidad	Estos gráficos, además de representar a las poblaciones con base en la expresión de dos marcadores, muestran la frecuencia relativa (densidad) de las poblaciones mediante colores cercanos al naranja (gráfico pseudocolor), o mediante líneas.
Histograma	Los histogramas muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas.

Gráficos 3D	Este tipo de gráficos permite comparar a las poblaciones con respecto a la expresión de tres marcadores diferentes y la frecuencia relativa.
--------------------	--

4.3.1.2 Utilidad en investigación y diagnóstico viral.

Por tratarse de una técnica de identificación y cuantificación específica de células, la citometría de flujo facilita el diagnóstico o seguimiento de patologías como leucemias, linfoma, inmunodeficiencia primaria, monitoreo del estado hematológico de pacientes con infección de VIH, así como la detección de células cancerosas o tumorales (55).

Actualmente, la citometría de flujo es una poderosa herramienta para el diagnóstico, clasificación y determinación del pronóstico de diversas enfermedades, no obstante, es imprescindible vincular la investigación biomédica con la investigación clínica, y de esta manera, fortalecer la caracterización de nuevas poblaciones celulares que se encuentren implicadas en el desarrollo de estas patologías (2).

En el mundo globalizado de hoy la citometría de flujo ha mostrado a lo largo y ancho del planeta ser de gran utilidad para la detección o identificación de microorganismos desde bacterias hasta diferentes familias de virus incluyendo *Baculoviridae*, *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Picordnaviridae*, *Retroviridae*, *Rotavirus*, entre otros (87).

Varios estudios han descrito las características biológicas e inmunológicas de las epidemias de coronavirus anteriores (SARS, MERS) y la mayoría de los investigadores han utilizado la citometría de flujo para describir los cambios en los linfocitos T y B, así como el papel de las células inflamatorias en la inmunopatogénesis de la enfermedad. Actualmente, se dispone de información muy limitada sobre el estado inmunológico innato del huésped de los pacientes infectados con SARS - CoV - 2 y con respecto a la descripción del aumento de neutrófilos totales, reducción de linfocitos totales y aumento de los niveles séricos de IL - 6 y de proteína C reactiva. lo que sugiere una fuerte respuesta inflamatoria en estos pacientes (16).

4.3.1.3 Ventajas comparativas.

Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos que emplean fluorocromos es que se puede utilizar para medir muchos parámetros, y obtener medidas cualitativas y cuantitativas de cada célula, siendo una técnica con alta sensibilidad, especificidad y objetividad. Además, puede utilizarse de forma muy sencilla para diferenciar poblaciones celulares y determinar diferencias en tamaño y/o complejidad en nuestras células favoritas por tratamientos o condiciones determinadas. Y también nos sirve para medir, en general, cualquier elemento que podamos marcar en la célula, desde marcajes muy simples, como transfecciones con GFP, hasta dobles marcajes con anticuerpos secundarios, entre otros parámetros (87).

4.3.1.4 Avances y descubrimientos

La disponibilidad de métodos de alta capacidad de procesamiento, el incremento continuo de las capacidades de los sistemas de computación, los nuevos desarrollos en los softwares para análisis y la creatividad de los investigadores han acelerado los descubrimientos en la genómica, proteómica y los campos relacionados en el mundo. El conocimiento obtenido en estas áreas augura un futuro promisorio para entender el impacto directo que los microorganismos tienen no sólo en la vida humana, sino que también en distintas áreas como aplicaciones industriales, veterinaria, agricultura, entre otros (2).

A continuación, se presenta una tabla resumen con los distintos métodos moleculares descritos.

Tabla 10: Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico molecular descritos en la revisión. Elaboración propia, Fuentealba, D., (2021)

TÉCNICA DE BIOLOGÍA MOLECULAR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PCR simple y múltiple	-Mayor rapidez que los métodos basados en cultivos. -Alta especificidad y sensibilidad	-Técnicamente puede ser un reto optimizar las condiciones de PCR

	<ul style="list-style-type: none"> -PCR múltiple: Detecta varios patógenos al mismo tiempo. -Automatizados -Resultados precisos y exactos a partir de la detección genética específica -Diferenciación de varios serotipos de microorganismos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Se requiere enriquecimiento para detección -Se necesita procesamiento post- PCR de los productos (electroforesis) -Costosa -Requiere personal calificado para su funcionamiento.
PCR en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> -Es más específica y sensible que los métodos de cultivo -No se encuentra influenciada por la amplificación no específica, esta puede además ser monitoreada en tiempo real. 	<ul style="list-style-type: none"> -Dificultad en ensayos múltiples -Labilidad del ARNm -Posibilidad de contaminación cruzada. -Requiere personal calificado para su manipulación
Secuenciación Masiva	<ul style="list-style-type: none"> -Alta precisión y sensibilidad. -Más rápido que los métodos basados en cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> -Costosa. -Requiere personal calificado para su funcionamiento. -Su uso radica más en la epidemiología como tal más que en el diagnóstico
Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad y especificidad. -Más rápido que los métodos basados en cultivo. 	<ul style="list-style-type: none"> -Costosa. -Requiere personal calificado para su manipulación.

CONCLUSIONES

Hoy en día, la tendencia en el diagnóstico viral consiste en emplear nuevas y más sensibles tecnologías de detección de antígenos y de investigación de ácidos nucleicos con el propósito de lograr un diagnóstico viral más rápido y efectivo. Las técnicas de biología molecular presentan varias ventajas, entre ellas su rapidez, costo/beneficio y el hecho de que el resultado no es fácilmente alterado por la calidad de la muestra y momento de recolección de ésta en relación al inicio de los síntomas.

La velocidad de implementación de técnicas de biología molecular en laboratorios de virología no ha sido muy rápida, considerando los costos directos e indirectos que se requieren. Hasta ahora, la inmunofluorescencia es indirecta han sido la técnica de detección más utilizada, por ser barata, rápida y fácil de implementar. Sin embargo, los costos de las técnicas de biología molecular han tenido una reducción consistente, dada la capacidad de análisis simultáneo de múltiples virus, lo que reduce volúmenes de reactivos utilizados y aumentan el grado de automatización de la técnica.

La patogenia y la epidemiología ayudan a tomar decisiones con respecto a la prueba correcta para elegir un diagnóstico apropiado. Los avances en la especificidad y sensibilidad y la capacidad para realizar pruebas para una variedad de virus a través de múltiples plataformas hacen un diagnóstico preciso e identificación rápida de virus circulantes para obtener datos clínicos relevantes. Posibilitar nuevas técnicas para la identificación de virus emergentes y reemergentes. La calidad de las muestras, la historia clínica y la presentación del paciente y la estrecha colaboración entre el médico, el patólogo y el laboratorio siguen siendo fundamentales para datos de diagnóstico para una mejor gestión del paciente.

Las pruebas moleculares han mejorado enormemente la capacidad del laboratorio para diagnosticar infecciones virales. El aumento de la sensibilidad significa que los pacientes infectados serán diagnosticados con mayor precisión y más a menudo, especialmente en momentos durante el curso de su infección cuando están diseminando niveles bajos de virus que ser pasado por alto por pruebas no moleculares. El beneficio de un diagnóstico más preciso es cuádruple: primero, beneficia al paciente en términos de recibir

los medicamentos antivirales apropiados; en segundo lugar, ayuda a controlar las infecciones
médicos en la provisión de medidas apropiadas de control de infecciones, como la contención
de gotas cuando sea necesario para minimizar el riesgo de diseminación nosocomial; tercero,
puede detener la búsqueda de un diagnóstico incluso si no hay un agente antiviral beneficioso
para el virus que se encontró; y cuarto, proporciona más información precisa a las autoridades
de salud pública sobre qué virus están circulando en la comunidad para que puedan ajustar
la política de salud pública en consecuencia.

BIBLIOGRAFIA

1. ¿Por qué en Chile utilizamos el RT-PCR si existen 6 técnicas para el diagnóstico de COVID? (2020). <https://www.uchile.cl/noticias/164468/tecnicas-para-la-deteccion-covid-por-que-en-chile-usamos-rt-pcr>.
2. Adan, A., et al. (2017). "Flow cytometry: basic principles and applications." *Critical Reviews in Biotechnology* 37(2): 163-176.
3. Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., Cháñez Cárdenas, M. E., & Chain, P. (2015). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR en tiempo real. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, 13(3), 175–202. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pertiempo.pdf>
4. Almanza Holguín, L. N. and J. P. Duque Varela (2020). Estandarización de una metodología para la cuantificación de títulos virales por citometría de flujo: virus dengue y zika, Universidad El Bosque.
5. Alonso, R., Aguilera, A., Córdoba, J., & Fuertes, A. (2015). Diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(9), e53-e62. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.08.002>
6. Álvarez Díaz DA, Laiton-Donato K, Franco-Muñoz C, Mercado-Reyes M. Secuenciación del SARS-CoV-2: la iniciativa tecnológica para fortalecer los sistemas de alerta temprana ante emergencias de salud pública en Latinoamérica y el Caribe. *biomedica* [Internet]. 30 de octubre de 2020;40(Supl. 2):188-97. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5841>.
7. Álvarez R. Guía de estudios: técnicas histológicas (2001). Facultad de Ciencias Veterinarias Departamento de Ciencias Biológicas. (N.o 1–15). UNCPBA.
8. Budnik, I., Ferrés, M., & Pardo, T. (2016). Aporte de la biología molecular en el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 32, 224–232.

9. Cadena-Zamudio, Jorge & Martínez-Peña, Marcos & Guzman, Luis & Arteaga-garibay, Ramón. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. 9. 13. Carballal, G., et al. (2014). Virus respiratorios emergentes y el nuevo impacto de los rinovirus por medio del diagnóstico molecular, Corpus.
10. Castaño, M. E., & Zapata, J. C. (2000). Cultivos celulares. Fondo Editorial Biogénesis, 49-64.
11. Caygill, R. L., et al. (2010). "A review on viral biosensors to detect human pathogens." *Anal Chim Acta* 681(1-2): 8-15.
12. Chang, K. S. (1994). Polymerase chain reaction. *Cancer Bulletin*, 46(3), 280–283. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5_1252
13. Conde-Ferrández, L., Ceh-Guerrero, A. L., Canché-Pech, J. R., Ayora-Talavera, G., & del Refugio González-Losa, M. (2019). Infección por citomegalovirus humano en neonatos de un hospital público de Mérida, Yucatán. *Gaceta medica de México*, 155(4), 336-342.
14. Contreras, Ana M., & Reta, Cynthia B, & Torres, Oscar, & Celis, Alfredo, & Domínguez, Jacqueline (2011). Sangre segura en ausencia de infecciones virales por VHB, VHC y VIH en período de ventana serológica de donadores. *Salud Pública de México*, 53 (1), S13-S18. ISSN: 0036-3634. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10619778003>
15. Cossarizza A, De Biasi S, Guaraldi G, Girardis M, Mussini C; Modena Covid-19 Working Group (MoCo19). SARS-CoV-2, the Virus that Causes COVID-19: Cytometry and the New Challenge for Global Health. *Cytometry A*. 2020 Apr;97(4):340-343. doi: 10.1002/cyto.a.24002. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32187834; PMCID: PMC7162395.
16. De Buitrago J. M. (2010). Técnicas virológicas y virología clínica. *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico*, 501–510. <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-2029-2.50036-7>

17. De Grazia, S., et al. (2019). "Performance evaluation of gastrointestinal viral ELITE panel multiplex RT-PCR assay for the diagnosis of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection." *J Virol Methods* 268: 48-52.
18. Dougnac, A. Manual de toma, manejo y envío de muestras al laboratorio clínico (2013, octubre). Ministerio de Salud del Salvador.
19. Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct;17(4):903-25, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.903-925.2004. PMID: 15489354; PMCID: PMC523566.
20. Debiasi, R. L., & Tyler, K. L. (2004). Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 903–925. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.903-925.2004>
21. Del Pilar Crespo, M. (2000). El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colombia Médica*, 31(3), 135-150.
22. Del Carmen C, Variantes de PCR. (2011). *Dermatología Peruana*, 9(1), 15–29.
23. Edward H, MT Ph D, Pérez-Campos Mayoral L Ph D, Sánchez Navarro LM, et al. ¿Debería considerarse la RT-PCR un estándar de oro en el diagnóstico de COVID-19? *Revista de Virología Médica*. Enero de 2021; 93 (1): 137-138. DOI: 10.1002 / jmv.26228. PMID: 32592498; PMCID: PMC7361438.
24. Ed, Y. (2013). Giant viruses open Pandora's box. *Nature. Antiviral Res* 79(1): 1-5.
25. Eiros, J. M., Ortiz de Lejarazu, R., Tenorio, A., Casas, I., Pozo, F., Ruiz, G., & Pérez-Breña, P. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias [Microbiological diagnosis of viral respiratory infections]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(3), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.03.004>
26. Fernández, M. A. M., González, E. O., Caspistegui, J. N., Gutiérrez, M. D. G., Sampelayo, T. H., & Fernández-Cruz, E. (1996). Estudio comparativo de técnicas para el diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana en niños menores de 15 meses por: cultivo viral, reacción en cadena de la polimerasa y antígeno p24. *Canales Españoles de Pediatría*, 44(6), 540–544. <https://www.aeped.es/sites/default/files/anales/44-6-4.pdf>
27. Filippone, M. P., et al. (2010). Molecular diagnosis of systemic sugarcane diseases in Argentina. methodology adjustment and applications." 87(2).

28. Forbes, B. A., et al. (2007). *Diagnostic microbiology*, Mosby St Louis.
29. Gadsby, N. J., et al. (2010). "Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis." *48(6): 2213-2216.*
30. Goldsmith, C. S., & Miller, S. E. (2009). Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 552–563. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-09>
31. González Muñoz, G., Laferte Serrano, J., Guzmán Tirado, M. G., Rosario Domínguez, D., & Rodríguez Váldez, C. (1992). Evaluación de un sistema ultramicroELISA para el diagnóstico de la rubéola. *Rev. cuba. med. trop*, 220-3.
32. Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). *The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(5), 10.1101/pdb.prot095117. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095117>
33. Gunson, R., et al. (2005). "Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions." *33(4): 341.*
34. Heather, JM y Chain, B. (2016). La secuencia de secuenciadores: La historia de la secuenciación del ADN. *Genómica*, 107 (1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
35. ICTV. (2020). *The ICTV report on Virus Classification and Taxon Nomenclature.*
36. Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología. (2020). Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19: clasificación, características, ventajas y limitaciones diagnóstico de COVID-19 SARS-CoV-2. *NanoB2A - ICN2*, 1–10. <http://www.ciencia.gob.es/stfls/MICINN/Ministerio/FICHEROS/TecnicasDiagnosticoCOVID19-ICN2.pdf>
37. Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología. (2017). Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19: clasificación, características, ventajas y limitaciones Diagnóstico de COVID-19 SARS-CoV-2.
38. Khanacademy. (2020). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

39. Kreuze, Jan & Perez, Ana & Untiveros, Milton & Quispe-Huamanquispe, Dora & Fuentes, Segundo & Barker, Ian & Simon, Reinhard. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*. 388. 1-7. [10.1016/j.virol.2009.03.024](https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.024).
40. Kuypers, J., Wright, N., Ferrenberg, J., Huang, M. L., Cent, A., Corey, L., & Morrow, R. (2006). Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *Journal of clinical microbiology*, 44(7), 2382–2388. <https://doi.org/10.1128/JCM.00216-06>
41. La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I. et al. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 455, 100–104 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07218>
42. Lara-Villegas, H. H., Ayala-Núñez, N. V., & Rodríguez-Padilla, C. (2008). Bioseguridad en el laboratorio: medidas importantes para el trabajo seguro. *Bioquímica*, 33(2), 59-70.
43. Larrañaga Larrañaga, C., Avendaño Carvajal, L. F., Gaggero Brillouet, A., Suárez González, M., Montaldo, G., Palomino, M. A., & Díaz, A. (1990). Diagnóstico de infección por adenovirus y virus respiratorio sincicial en lactantes: comparación entre aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Rev. chil. infectol*, 167-71.
44. Laura, K. (2018). Tipos de enfermedades virales. Manual MSD.
45. Levin, P. A., & Angert, E. R. (2015). Small but mighty: Cell size and bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019216>
46. L., Vabret, A., Buchy, P., Freymuth, F., & Deubel, V. (2009). Simultaneous detection of respiratory viruses in children with acute respiratory infection using two different multiplex reverse transcription-PCR assays. *Journal of virological methods*, 162(1-2), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.004>
47. Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., & Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>

48. Lorca J., & Merchant, H. (2010). *Biología Celular y Molecular* (1.a ed.). Perason Educación.
49. Loeffelholz, M. J., & Tang, Y. W. (2020). Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 747–756. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1745095>
50. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
51. Mahony J. B. (2008). Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 716–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-07>
52. Mora, M. V., Botelho, L., Vieira, D. S., Pinho, J. R., Carrilho, F. J., Honda, E. R., & Salcedo, J. M. (2010). Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil. *Virology journal*, 7, 315. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-315>
53. María Santamaría González, J. M. L. R. (2018). "Aplicaciones clínicas de las técnicas actuales de biología molecular." 8.
54. McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1– 5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40
55. Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., & van Doorn, L. J. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 32 Suppl 1, S43–S51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.004>
56. M, Torres MAE, Villalba MJDA. Diagnóstico de infección por Chlamydia trachomatis mediante PCR en pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de la Secretaría de la Defensa Nacional. *Ginecol Obstet Mex*. 2009;77(01):13-18.
57. Mushahwar I. K. (2008). Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *Journal of medical virology*, 80(4), 646–658. <https://doi.org/10.1002/jmv.21116>
58. NCBI. (2017). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 09/11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

59. NCBI. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa generalidades (PCR). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcrqse/>
60. Negroni, M., & Inés González, M. (2018). Virus: Generalidades. Microbiología Estomatológica Parte I, 69–80. [https://www.berri.es/pdf/MICROBIOLOGIA ESTOMATOLOGICA, Fundamentos y guía práctica/9789500695572](https://www.berri.es/pdf/MICROBIOLOGIA_ESTOMATOLOGICA_Fundamentos_y_guía_práctica/9789500695572)
61. Neske, F., Blessing, K., Tollmann, F., Schubert, J., Rethwilm, A., Kreth, H. W., & Weissbrich, B. (2007). Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *Journal of clinical microbiology*, 45(7), 2116–2122. <https://doi.org/10.1128/JCM.00027-07>
62. Obando-Pacheco, P., Justicia-Grande, A. J., Rivero-Calle, I., Rodríguez-Tenreiro, C., Sly, P., Ramilo, O., Mejías, A., Baraldi, E., Papadopoulos, N. G., Nair, H., Nunes, M. C., Kragten-Tabatabaie, L., Heikkinen, T., Greenough, A., Stein, R. T., Manzoni, P., Bont, L., & Martín-Torres, F. (2018). Respiratory Syncytial Virus Seasonality: A Global Overview. *The Journal of infectious diseases*, 217(9), 1356–1364. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy056>
63. Organización Mundial de la Salud. (2006). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. World Health Organization.
64. Padilla, C., Lobos, O., & Brevis, P. (2006). Biología Fundamental (Editorial Universidad de Talca, Chile).
65. Pozo, F., Ruiz, G., & Pérez-Breña, P. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias [Microbiological diagnosis of viral respiratory infections]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 27(3), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.03.004>
66. Pando, V. (2010). El proteoma, análisis fundamental para el entendimiento de un sistema biológico. *Revista de Divulgación Científico-Tecnológica del Gobierno del Estado de Morelos*, 21–32.
67. Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics*, 52(4), 413–435. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>

68. Pawlotsky J. M. (2002). Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*, 122(6), 1554–1568. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33428>
69. Pérez, A. M. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Repositorio Institucional de La Universitat Politècnica de València, 10. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci3n en cadena de la polimerasa.pdf](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf)
70. Pérez-Lara JC, Santiago-Cruz W, Romero-Ramírez H, et al. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagn3stica en la investigaci3n biomédica y clínica. *Rev Med UV*. 2018;18(2):41-52.
71. Plotnikova, M. A., et al. (2020). "Antibody microarray immunoassay for screening and differential diagnosis of upper respiratory tract viral pathogens." *J Immunol Methods* 478: 112712.
72. Pray, L. (2008) Transposons: The jumping genes. *Nature Education* 1(1):204
73. Pretorius, M. and M. Venter (2017). Diagnosis of Viral Infections. *Viral Infections in Children, Volume I*: 151-182.
74. Purcell R. (1997). The hepatitis C virus: overview. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 26(3 Suppl 1), 11S–14S. <https://doi.org/10.1002/hep.510260702>
75. Quan, P. L., et al. (2008). "Rapid sequence-based diagnosis of viral infection." *Antiviral Res* 79(1): 1-5.
76. Ramírez T, M. (2020). "Rol del laboratorio clínico ante la epidemia del COVID-19: revisi3n de los métodos diagn3sticos disponibles y sus limitaciones." *Revista médica de Costa Rica* 86(629).
77. Red salud. (2020). EXÁMENES COVID-19. <https://www.redsalud.cl/nuestra-red/campanas/examenes-covid-19-disponibles>
78. Reinhardt, G., Carrasco, L., Tadich, N., & Riedemann, S. (2001). Comparaci3n entre dos técnicas de diagn3stico para diarrea viral bovina (Dvb) en 50 predios de la X Regi3n, Chile: seroneutralizaci3n y enzimoimmunoensayo indirecto (Elisa-I). *Archivos de medicina veterinaria*, 33(2), 173-183.

79. Reyes O, Jesús, Comach P, Guillermo, Franco, Leticia, & Camacho G, Daría. (2016). ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FLAVIVIRUS Y ALFAVIRUS. *Comunidad y Salud*, 14(1), 27-32. Recuperado en 26 de julio de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169032932016000100005&lng=es&tlng=es.
80. Riedemann, JP;Illesca, M;Droghetti, J. (2013). Comparative study of nested PCR, ELISA and AGID tests in the detection of bovine leukaemia virus infection in serum, blood and milk samples. In *Rev. méd. Chile* (Vol. 129, pp. 647–652). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000053>
81. Riedemann, JP;Illesca, M;Droghetti, J. (2013). Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. In *Rev. méd. Chile* (Vol. 129, pp. 647–652). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000053>
82. Sandín, M. (2010). Métodos de estudio y diagnóstico viral. Edición de un artículo científico. <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%208.pdf>
83. Segretín, M. E. (2003). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *Argen Bio*.
84. Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología, 2, 5-8.
85. Saguado, José. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Revista MVZ Córdoba*, ISSN 1909-0544, N°. 2, 2007, pags. 1077-1095. 12. 10.21897/rmvz.430.
86. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>Skidmore, S. J. C. i. d. r. (2002). "Overview of hepatitis E virus." 4(2): 118-120.
87. Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.200>

88. Van Borm, S., Belák, S., Freimanis, G., Fusaro, A., Granberg, F., Höper, D., King, D. P., Monne, I., Orton, R., & Rosseel, T. (2015). Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases?. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1247, 415–436. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4_30
89. Vargas, C. (2005). Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas, San Luis Potosí, Mexico: Instituto Potosino de Investigación Científica.
90. Wagner, R., & Krug, R. (2020). Virus. In *ncbl (Encyclopæd)*.
91. Walker, D. (1996). *Medical Microbiology* (Baron. S).
92. Walwyn Salas, Verónica, Iglesias Duquesne, C. Magaly, Almarales, María Rosa, Acosta Tiele, Néstor, Mera Fernández, Ana, & Cabrejas Acuña, María Ofelia. (2004). Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 33(2) Recuperado en 26 de julio de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572004000200006&lng=es&tlng=es.
93. Watzinger, F., Ebner, K., & Lion, T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 254-298.
94. Watzinger, F., Suda, M., Preuner, S., Baumgartinger, R., Ebner, K., Baskova, L., Niesters, H. G., Lawitschka, A., & Lion, T. (2004). Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 5189–5198. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5189-5198.2004>
95. Wessner, D. R. (2010) The Origins of Viruses. *Nature Education* 3(9):37
96. Yadav, A. R., et al. (2020). "An overview on Ebola virus disease." 12(4): 267-270.
97. Youlton, Sardi, Antonella. (2020). El impacto del Proyecto Genoma Humano y la discriminación genética: aspectos éticos, sociales y jurídicos. *Revista de Bioética y Derecho*, (48), 209-226. Epub 11 de mayo de 2020. Recuperado en 26 de julio de

- 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872020000100015&lng=es&tlng=es.
98. Your genome. (2016). What is PCR (polymerase chain reaction)? <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>
99. Zaballo, A. (2011). Secuenciación de genomas de SARS-CoV-2: herramienta clave en esta pandemia. *Sem@foro*, 70(1), 54–89.
100. Zhu, H., et al. (2020). "Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis." *Biosens Bioelectron* 153: 112041.