

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA LABORATORIO CLINICO**  
**CURSO DE ESPECIALIZACION EN BIOLOGIA MOLECULAR**



**Tema:**

AVANCES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS  
RESPIRATORIOS MÁS FRECUENTES EN EL SALVADOR EN EL MES DE JULIO DE  
2023

**Presentador por:**

RONALD ENRIQUE RAMÍREZ MARTÍNEZ

**Para optar al grado de:**

LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

**Asesora:**

LICDA. KARLA STEPHANIE DÍAZ DE LÓPEZ

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

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**Rector**

Msc. Roger Armando Arias

**Vicerrector Académico**

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López

**Vicerrector Administrativo**

Ing. Juan Rosa Quintanilla

**Secretario/a General**

Ing. Francisco Antonio Alarcón

## **AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA**

### **Decana**

Msc. Josefina Sibrián de Rodríguez

### **Vicedecano**

Dr. Saúl Díaz Peña

### **Secretaria**

Msc. Aura Marina Miranda de Arce

### **Director de Escuela**

Msc. José Eduardo Zepeda Avelino

### **Directora de Carrera**

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera

## CONTENIDOS

<b>AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR .....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>viii</b>
<b>DESARROLLO.....</b>	<b>1</b>
<b>A. PCR CONVENCIONAL/ELECTROFORESIS.....</b>	<b>1</b>
<b>B. PCR EN TIEMPO REAL.....</b>	<b>3</b>
<b>C. RT-PCR.....</b>	<b>5</b>
• <b>RT-PCR EN TIEMPO REAL.....</b>	<b>5</b>
• <b>RT-PCR MULTIPLEX.....</b>	<b>6</b>
<b>D. PCR MULTIPLEX .....</b>	<b>6</b>
<b>E. SECUENCIACION.....</b>	<b>7</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>11</b>
<b>FUENTES DE INFORMACIÓN.....</b>	<b>12</b>

## AGRADECIMIENTOS

Al concluir **una etapa maravillosa de mi vida** quiero extender un profundo agradecimiento, a quienes hicieron posible este sueño, aquellos que junto a mí caminaron en todo momento y siempre fueron inspiración, apoyo y fortaleza.

Esta mención en especial para **DIOS** por bendecirme con este logro tan grande en mi vida a mis **padres** que sin su ayuda esto no hubiese sido posible, mis **hermanos**, mis **docentes** y **amigos**. Muchas gracias a ustedes por demostrarme que «El verdadero amor no es otra cosa que el deseo inevitable de ayudar al otro para que este se supere.»

Mi gratitud, también a la Carrera de Licenciatura de Laboratorio Clínico, **mi agradecimiento sincero a mi asesora de trabajo de grado**, Licda. Karla Stephanie Díaz de López, gracias a cada docente quienes con su apoyo y enseñanzas constituyen la base de mi vida profesional.

**Gracias, infinitas a todos**

## **RESUMEN**

El diagnóstico de infecciones respiratorias por virus a través de la biología molecular a través de la identificación del ácido nucleico (ADN) y Ácido Ribonucleico (ARN) viral.

Mediante el avance de la tecnología para el diagnóstico clínico precoz de los virus más frecuentes en El Salvador desde la implementación de métodos moleculares como lo es la PCR punto final (Reacción en cadena de la polimerasa) también denominada PCR convencional o electroforesis en gel de agarosa siendo este la base de la biología molecular y siguiendo con nuevos métodos moleculares siendo la más innovadora la PCR en tiempo real que es una modalidad de la PCR punto final cuyo fin es la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, de la misma manera hay subclasificación o tipos de este tipo de PCR como lo son la RT-PCR y la MULTIPLEX, por último y uno de los métodos más recientes en el país que permite no solo identificar al agente infeccioso si no también clasificar sus variantes es la secuenciación genómica que sirve para el diagnóstico, identificación y clasificación de los diferentes virus que afectan la población salvadoreña.

### **Palabras claves:**

1. Biología Molecular
2. Diagnóstico Molecular
3. Técnicas de Amplificación de Ácido Nucleico
4. Reacción en Cadena de la Polimerasa
5. Virus Respiratorio

## **ABSTRACT**

The diagnosis of respiratory infections by viruses through molecular biology through the identification of viral nucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA).

Through the advancement of technology for the early clinical diagnosis of the most frequent viruses in El Salvador since the implementation of molecular methods such as end-point PCR (Polymerase Chain Reaction) also called conventional PCR or agarose gel electrophoresis This being the basis of molecular biology and continuing with new molecular methods, the most innovative being real-time PCR, which is a modality of end-point PCR whose purpose is the accumulation of amplified DNA that is detected and quantified as the reaction progresses. In the same way, there is subclassification or types of this type of PCR such as RT-PCR and MULTIPLEX, lastly and one of the most recent methods in the country that allows not only to identify the infectious agent but also to classify its variants is the genomic sequencing that serves for the diagnosis, identification and classification of the different viruses that affect the Salvadoran population.

### **Keywords:**

1. Molecular Biology 2. Molecular Diagnosis 3. Nucleic Acid Amplification Techniques 4. Polymerase Chain Reaction 5. Respiratory Viruses

## INTRODUCCIÓN

La biología molecular es un campo que estudia la estructura, composición, función y las relaciones de las moléculas celulares en los seres vivos. Las unidades básicas de la vida son aquellas moléculas que hacen parte de un grupo de átomos que están unidos por varios enlaces químicos. La biología molecular se enfoca en estudiar los ácidos nucleicos y sus proteínas, permitiendo realizar procesos biológicos esenciales en el funcionamiento de las células.

En el laboratorio de biología molecular se llevan a cabo infinidad de métodos y técnicas a partir de los ácidos nucleicos con fines diagnósticos o de estimación de riesgo en patologías tanto genéticas como no genéticas. La biología molecular se centra en el estudio de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y las proteínas: las dos macromoléculas de mayor relevancia en el funcionamiento de los seres vivos.

La función principal de los ácidos nucleicos es almacenar información genética y transmitirla de generación en generación. Por otro lado, está el ADN, que es responsable de contener toda la información genética y se usa en el desarrollo o funcionamiento de los organismos vivos, y el ARN que se encarga de transmitir la información genética de las proteínas.

El principio del diagnóstico de la biología molecular de enfermedades infecciosas consiste en detectar el genoma de los agentes patógenos a través de las secuencias de su ADN que difieren radicalmente de las secuencias del genoma humano.



El diagnóstico es una etapa crítica en el manejo de un paciente, que implica decisiones médicas que definirán el progreso del cuidado de un individuo. De esta forma, el diagnóstico de enfermedades virales, a través de las técnicas de biología molecular a través de la detección del genoma de los agentes patógenos en este caso los Virus a través de la secuenciación de su ADN sirve de apoyo diagnóstico es decir un servicio fundamental para el equipo médico, y, por ende, para la institución que lo realiza.

De forma general, los laboratorios clínicos que ofrecen estos test diagnósticos se agrupan en una sección de la institución, en espacios con una infraestructura adecuada para dar un servicio de calidad. Con el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular, la sección de laboratorio clínico ha debido incorporar nuevos laboratorios con el fin de implementar técnicas de biología molecular al servicio de los pacientes. Hoy en día, el laboratorio de biología molecular es el área diagnóstica de mayor dinamismo y crecimiento dentro los laboratorios clínicos, revolucionando el sistema de salud, liderando la investigación biomédica y optimizando los tratamientos médicos.

En los últimos 5 años, la biología molecular ha experimentado un desarrollo de gran importancia para el diagnóstico clínico preciso de las enfermedades virales en objeto de vigilancia epidemiológica.

Cada vez es mayor nuestra capacidad para manipular, amplificar y analizar los ácidos nucleicos. Desde la primera descripción de las técnicas de hibridación y especialmente con el desarrollo de métodos para la amplificación enzimática de una secuencia determinada de ADN, la biología molecular ha pasado de ser un conjunto de técnicas de difícil manejo en laboratorios de educación científica y especializados, a ser algo que cada vez promete tener mayor utilidad en campo del diagnóstico, prevención y control de enfermedades virales.

Es importante que tanto los médicos como los laboratoristas tengan un conocimiento amplio de la teoría y de la práctica de estas técnicas para poder entender el significado de los resultados que se obtienen y las limitaciones de los mismos. Se ha hecho un gran esfuerzo en el país para introducir estas técnicas que no solo son innovadoras si no que de gran ayuda para el medico en dar una respuesta y tratamiento adecuado al paciente que padece una patología de igual manera a prevenir la propagación de la misma a la población.

A pesar de que existen varios obstáculos para la introducción de técnicas de detección de ácidos nucleicos para los laboratorios clínicos en los países en vías de desarrollo como El Salvador. En primer lugar, está el costo de los equipos y los reactivos necesarios para equipar un laboratorio de este tipo. Por otro lado, está la falta de capacitación del personal técnico en la metodología de la biología molecular. Se hizo un esfuerzo enorme en la necesidad de coordinar esfuerzos por parte del Sector Salud con la cooperación de la OPS durante la pandemia del Covid-19 ante la necesidad diagnóstica e identificación del SARS-CoV-2 en el país, trajo consigo nuevas técnicas para la identificación de virus respiratorios y con el paso del tiempo para el 2021 se hizo la primera secuenciación del SARS-CoV-2 en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad De El Salvador, un hecho histórico para el país y para las investigaciones científicas del alma mater.

El objetivo principal de este ensayo es hacer una recopilación y breve descripción de las principales técnicas de biología molecular que actualmente se están aplicando para fines diagnósticos de virus respiratorios de vigilancia epidemiológica en el país haciendo énfasis en aquellas que han presentado mayor utilidad o tienen un uso potencial determinado en el campo de la biología molecular; así como desventajas. La epidemiología molecular es otro campo muy amplio que merece una revisión amplia y detallada y aquí no se abordará

## DESARROLLO

Según datos obtenidos de los boletines epidemiológicos desde el 2020-2023 las enfermedades de origen viral más frecuentes en el salvador son: Influenza A (H1N1, H3N2) Influenza B, Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio (VSR), Adenovirus y SARS-CoV-2.

### A. PCR CONVENCIONAL/ELECTROFORESIS

Cuando no incluye fluorescencia, la **PCR** es convencional y el método para ver las zonas de interés es tintarlas. En este caso, las muestras se introducen en un **gel de agarosa**, un fluido procedente de algas, al que se añade un tinte que permite ver las bandas de ADN en una pantalla de luz ultravioleta.

Para ello se utiliza la **electroforesis**, una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN y proteínas) por su tamaño y carga. La electroforesis consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras.

La electroforesis en gel de los ácidos nucleicos es una técnica utilizada en biología molecular para la separación, la identificación y la purificación de fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño y su carga. En esta técnica, las moléculas de ADN y ARN se separan mediante la aplicación de un campo eléctrico para mover los ácidos nucleicos cargados negativamente a través de una matriz de gel de agarosa o de poliacrilamida.

*Este tipo de PCR se le denomina convencional, punto final o electroforesis en gel de agarosa, se emplea como base para multitud de técnicas en el laboratorio debido a su rapidez y costos mucho menores a una PCR en tiempo real. De este modo, la PCR de punto final permite controlar y detectar los fragmentos de ADN de interés, que luego se pueden observar cómo líneas de color en el gel de agarosa y se compara con un patrón establecido.*

Todas las moléculas de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa. Debido a esto, la electroforesis en gel separa los fragmentos de ADN únicamente por su tamaño. La electroforesis nos permite ver cuántos fragmentos diferentes de ADN están presentes en una muestra y cuán grandes son unos con respecto a otros. También podemos determinar el tamaño absoluto de un fragmento de ADN examinándolo junto a una "escala" estándar de fragmentos de tamaño conocido.

**VIRUS RESPIRATORIO IDENTIFICADO CON ESTA TÉCNICA:** Se pueden realizar la mayoría de virus respiratorios, pero por ser más eficiente la PCR en tiempo real se está dejando como segunda opción.

**VENTAJAS:**

- Menor costo de los reactivos e insumos
- Cualitativa
- Se puede realizar a múltiples microorganismos
- Menos complejidad del método

**DESVENTAJA:**

- Detecta un único segmento de ADN
- Menor sensibilidad en comparación de otras técnicas de biología molecular

- Menor especificidad en comparación de otras técnicas de biología molecular
- Mas riesgo de contaminación en cada una de las etapas
- Requiere mucho más tiempo
- Las etapas de la amplificación y detención se hacen de manera individual.
- Requiere un análisis post-PCR (electroforesis)

## **B. PCR EN TIEMPO REAL**

Esta variante de la PCR añade marcadores fluorescentes con el objetivo de saber la cantidad de ADN inicial en todo momento y detectar la presencia de variaciones genéticas. La emisión de fluorescencia será proporcional al número de moléculas producidas, haciendo que la técnica sea cuantitativa.

*El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más novedosa, importante y revolucionaria en biología molecular debido a que permite obtener millones de copias de ADN, a partir de una pequeña muestra (eluido).se considera una de las técnicas más sensibles, específicas para el diagnóstico clínico.*

Para la realización de esta técnica, además de los reactivos necesarios para la PCR convencional, se necesitan sondas marcadas con enzimas, sustratos antigénicos, radioisótopos, quimioluminiscencia o fluorescencia, con capacidad de unión a la cadena de ácido nucleico que se requiere amplificar.

En función del marcado de la sonda, para su interpretación se utilizarán diferentes métodos. Se puede utilizar para la identificación de virus, bacterias y hongos. El fluoróforo marcador más

utilizado es el SYBR Green, presenta carga positiva y no emite fluorescencia si está libre pero sí lo hace al unirse al surco menor del ADN.

*La detección de la fluorescencia liberada durante la reacción de amplificación puede medirse la cantidad de ADN sintetizado, la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado.*

Otra ventaja de esta técnica es que, en la mayoría de los casos, no es necesario el paso posterior de evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante el gel de agarosa o poliacrilamida, pues según se está realizando la técnica ya se sabe si el funcionamiento y la obtención de amplificaciones ha sido correcta.

Se pueden utilizar diferentes sondas fluorescentes para marcar genes de varios microorganismos distintos, de forma que se convierte en una PCR en tiempo real múltiple o si primero obtenemos ADNc y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-qPCR.

**VIRUS RESPIRATORIO IDENTIFICADO CON ESTA TÉCNICA:** Todos los virus mencionados anteriormente (Influenza A (H1N1, H3N2) Influenza B, Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio (VSR), Adenovirus y SARS-CoV-2). Las mismas ventajas y desventajas son aplicadas a las variantes de este tipo de PCR.

#### **VENTAJAS:**

- Detecta el ADN del microorganismo
- Rápida obtención de resultados
- Altamente sensible
- Mas Eficiente
- Cuantitativa

- Mas Especifica
- Menor indice de contaminación (en el caso de usar equipos automatizados)

#### **DESVENTAJA:**

- Altos costos de los reactivos (sondas fluorescentes son más costosas)
- Mantenimientos periódicos de equipos
- Riesgo de contaminación de las muestras por el operador

#### **SUBCLASIFICACIONES:**

##### **C. RT-PCR**

Es una variante de la PCR convencional en la que la hebra molde que se utiliza es ácido ribonucleico (ARN). A partir de esta hebra de ARN se sintetiza ADN complementario (ARN) sobre el que posteriormente se realizará la PCR convencional.

Los pasos de que consta esta reacción son desnaturalización del RNA a 70°C por 10 min para eliminar estructuras secundarias, alineación de los hexámeros por 10 min a 25°C y polimerización por la retrotranscriptasa a 37°C por 1 h. Una vez obtenida la cadena de cDNA, ésta se emplea como molde para la técnica de PCR. Este método se utiliza principalmente para detectar genomas virales compuestos por RNA (como la influenza A, el VIH y la hepatitis C tomados como ejemplo), así como para cuantificar mRNA de cualquier proteína expresada en un tejido.

Se trata pues, de un método dividido en dos procesos, el primero de ellos, la transcripción inversa y el segundo, la PCR. Sobre esta prueba además existen diferentes variantes:

- **RT-PCR EN TIEMPO REAL:** basada en la combinación de la RT-PCR con el marcaje fluorescente.

**VIRUS RESPIRATORIO IDENTIFICADO CON ESTA TÉCNICA:** Influenza A (H1N1, H3N2) Influenza B, Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio (VSR) y SARS-CoV-2.

- **RT-PCR MULTIPLEX:** permite la amplificación simultánea de varios genes en una única reacción. Se utilizan en este caso más de una pareja de primers.

**VIRUS RESPIRATORIO IDENTIFICADO CON ESTA TÉCNICA:** Influenza A (H1N1, H3N2) Influenza B, Virus Sincitial Respiratorio (VSR) y SARS-CoV-2.

#### **D. PCR MULTIPLEX**

Una PCR múltiple refiere al uso de reacción de cadena de la polimerasa para amplificar varias secuencias de ADN diferentes simultáneamente (como si se realizaran muchas reacciones de PCR separadas todas juntas en una sola reacción).

*En una sola reacción de PCR se pueden amplificar al mismo tiempo 2 o más regiones de una secuencia, para ello se combinan dos o más pares de cebadores en un mismo tubo de reacción.*

Este proceso amplifica ADN en las muestras que utilizan múltiples primers y una ADN polimerasa mediada por temperatura en un termociclador.

El diseño de cada par de primers tiene que ser optimizado de modo que todos puedan trabajar a la misma temperatura de hibridación durante la PCR.

*En este tipo de PCR hay presentes múltiples pares de primers lo que da una serie de productos.*

*La PCR Multiplexes frecuentemente usada en el diagnóstico clínico aporta información sobre varios locus en una sola reacción, se requiere menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos*



Tiene la ventaja de que ahorra tiempo, reactivos y muestras; sin embargo, el diseño de los primers debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (hibridaciones inespecíficas), lo que resulta en amplificaciones erróneas.

La PCR múltiple o multiplex puede emplearse para la búsqueda de varias deleciones, mutaciones y polimorfismos en un solo gen o en múltiples. Esta técnica se utiliza para el análisis simultáneo de múltiples marcadores moleculares asociados a alguna enfermedad, para la detección simultánea de varios agentes patógenos, organismos genéticamente modificados, etcétera.

#### **VENTAJAS:**

- Menor cantidad de reactivos
- Menor costo
- Mucho más específica
- No hibridan entre ellos
- Mayor rango de detención

#### **DESVENTAJA:**

- EL diseño de los primers debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos (hibridaciones inespecíficas).

**VIRUS RESPIRATORIO IDENTIFICADO CON ESTA TÉCNICA:** para el diagnóstico diferencial de (Influenza y SARS-CoV-2).

#### **E. SECUENCIACION**

La secuenciación masiva, también conocida como NGS por sus siglas en inglés, engloba a todos los métodos de secuenciación a gran escala de cualquier ácido nucleico. En la actualidad, la secuenciación masiva es la técnica más avanzada para el estudio genético.

Este tipo de análisis tiene la ventaja de poder estudiar los 23 pares de cromosomas en un único análisis, por lo que supone menor tiempo. Además, la secuenciación masiva es capaz de analizar más de 500 genes de forma simultánea y a un precio bastante asequible.

La secuenciación del genoma consiste en determinar la secuencia completa de ADN (orden de las bases Adenina, Citosina, Guanina y Timina) en el genoma. La secuenciación es fundamental para determinar los aminoácidos que codifican un gen en concreto, para el diagnóstico de enfermedades y la detección de mutaciones y resistencias a tratamientos farmacológicos.

Estos métodos de secuenciación se basan en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que sintetiza ADN a partir de otro fragmento de ADN produciendo su hebra complementaria. Se pueden obtener secuencias de hasta 500 bases aproximadamente.

*La secuenciación consiste en determinar cuál es el orden de los nucleótidos que conforman el material genético de un microorganismo en estudio en este caso serían los virus.*

### **TIPOS DE SECUENCIACIÓN:**

1. Primera generación (Secuenciación de Sanger):
2. Segunda generación (Secuenciación de nueva generación, NGS): Varias plataformas, como Illumina, Ion Torrent, Roche 454
3. Tercera generación (Secuenciación de tercera generación, NGS): Plataformas como PacBio y Oxford Nanopore.

**Dentro de la secuenciación podemos encontrar diferentes métodos, entre los cuales encontramos:**

1. Secuenciación Sanger.
2. Secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS).

3. Pirosecuencia.
4. Hibridación de sondas de ADN.
5. Polimorfismo amplificado aleatorio ADN (RAPD).
6. Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP)

#### **PASOS PRINCIPALES DE UNA SECUENCIACION:**

1. Extracción del ADN de la muestra o aislado
2. Preparación de las bibliotecas o librerías.
3. Secuenciación en equipo
4. Análisis bioinformático e interpretación de los resultados.

#### **LOS RESULTADOS DE UNA SECUENCIACION SON REFLEJADOS DE LA SIGUIENTE MANERA:**

- Un equipo secuenciador genera lecturas de secuencia, que son fragmentos de ADN o ARN secuenciados de forma individual.
- Se generan lecturas de secuencia, que son fragmentos de ADN o ARN secuenciados de forma individual.
- Se utilizan diversos programas y algoritmos para llevar a cabo cada etapa y extraer la información relevante de los datos secuenciados.

*Los métodos y reactivos de las NGS están en evolución y cada vez hay nuevas y mejores métodos aplicables de secuenciación escoger un método que sea eficiente y que cumple con las necesidades dependerá del entorno y el presupuesto del laboratorio de biología molecular en este caso para*

*la secuenciación de virus en El Salvador la metodología más usada es Miniseq SY-420-1001 Illumina utilizando el Protocolo Paragon Cleanplex SARSCOV by SOPHIA.*

**VIRUS RESPIRATORIO IDENTIFICADO CON ESTA TÉCNICA:** Por el momento solo se está realizando secuenciación de SARS-COV-2 en el país.

**VENTAJAS:**

- Rápida obtención de resultados
- Eficiente
- Sensible
- Detectar y clasificar patógenos antes desconocidos
- Identificar patógenos conocidos y sus subtipos
- Determinar mutaciones
- Permite conocer la estructura básica de un nucleótido o gen en estudio

**DESVENTAJA:**

- Material y equipo complejo
- Personal más capacitado
- Error técnico del personal

## CONCLUSIONES

En virtud de toda la información recopilada podemos constatar la importancia de la biología molecular en el diagnóstico precoz de las enfermedades causadas por los agentes causantes más frecuentes de infecciones de las vías respiratorias en la población salvadoreña; ya que gracias a dicho diagnóstico ayuda a poder aliviar, prevenir y dar un tratamiento oportuno.

De acuerdo al método utilizado así será el nivel de complejidad de lo más básico hablando del área de biología molecular como lo es una Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional (PCR) que utiliza el método de electroforesis en gel de agarosa hasta lo más innovador como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR En tiempo Real) y los avances en este área de laboratorio y tecnología sigue avanzando llegando hasta lo más reciente en nuestro país que es la secuenciación genómica o viral en este caso que permite clasificar los subtipos o variantes de los virus que sirve de mucha ayuda no solo para el diagnóstico si no como aporte a la epidemiología molecular que puede ser usada para la prevención y creación de nuevos métodos o mejoras de los existentes.

De este modo podemos comparar los diferentes métodos utilizados para el diagnóstico viral, sus ventajas ,desventajas y el agente etiológico que se identifica por esta metodología; en virtud de lo estudiado podemos concluir que la biología molecular es de suma importancia si es utilizada de la forma correcta por personal debidamente capacitado y de esta manera poder implementar medidas de prevención y control de los virus respiratorios que más afectan a la población ;gracias a la eficiencia y sensibilidad de los métodos moleculares en las etapas tempranas y tardías de la enfermedad.

### FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Electroforesis en gel (artículo 2023). Academia Khan. Academia Khan. Recuperado de <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
2. Amalia Rodríguez. (2000) ¿Qué es la PCR y para qué se utiliza? ¡Descubre. Recuperado de <https://idescubre.fundaciondescubre.es/noticias/que-es-la-pcr-y-para-que-se-utiliza/>
3. La biología molecular y sus aplicaciones. (2021) (s. f.-b). Universidad Central. Recuperado de <https://www.ucentral.edu.co/noticentral/biologia-molecular#:~:text=La%20biolog%C3%ADa%20molecular%20es%20un,unidos%20por%20varios%20enlaces%20qu%C3%ADmicos.>
4. Farfán, B. M. J. (2015). Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. Revista Médica Clínica Las Condes, 26(6), 788-793.  
Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001546>
5. Diagnóstico Molecular y Genómico de Enfermedades Infecciosas. (2020) (s. f.). Recuperado de <https://www.bimodi.com/diagnostico-molecular-y-genomico-de-enfermedades->

infecciosas/#:~:text=El%20principio%20del%20diagn%C3%B3stico%20molecular,las%20secuencias%20del%20genoma%20humano.

6. El Salvador inaugura laboratorio de biología molecular con el apoyo de Alemania y SICA - Fondo de Desarrollo Verde. (2022) Recuperado de <https://fondodesarrolloverde.org/gobierno-de-el-salvador-inaugura-laboratorio-de-biologia-molecular-con-el-apoyo-de-alemania-y-sica/>
7. Diz Mellado, O. M. (2020). Técnicas de Biología Molecular En El Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas,100(100),1-100  
Recuperado de <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>
8. Minsal. Calendarios epidemiológicos. Ministerio De Salud. (enero 2023). Recuperado de <https://www.salud.gob.sv/calendarios-epidemiologicos/>
9. Minsal. Calendarios epidemiológicos. Ministerio De Salud. (2021). Recuperado de [https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/01/1353079/boletin\\_epidemiologico\\_se502021.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/01/1353079/boletin_epidemiologico_se502021.pdf)
10. Mellado, O. M. D. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. NPunto, 3(30), 88-111. Recuperado de <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>
11. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Principios básicos de la PCR cuantitativa en tiempo real. Expert Review of Molecular Diagnostics (2005). Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15833050/>
12. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. (1990). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5121205/>
13. Morley AA. PCR digital: una breve historia. Biomol Detect Quantif (2014). Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/343779197\\_PCR\\_past\\_present\\_and\\_future](https://www.researchgate.net/publication/343779197_PCR_past_present_and_future)

14. Sigma Aldrich.Aplicaciones, genómica qPCR.MERCK. (2023). Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/SV/es/applications/genomics/qpcr>
15. Sigma Aldrich.Aplicaciones, Electroforesis en gel de los ácidos nucleicos. MERCK. (2023) Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/SV/es/applications/genomics/nucleic-acid-gel-electrophoresis>
16. Sigma Aldrich.Aplicaciones, Secuenciación de última generación. MERCK. (2023). Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/SV/es/applications/genomics/next-gen-sequencing>
17. Ministerio de salud, Primeras seis secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 (2022).Recuperado de [https://alerta.salud.gob.sv/wp-content/uploads/2022/02/Primeras-seis-secuencias-del-genoma\\_version-final\\_24-febrero-2022\\_1455pm.pdf](https://alerta.salud.gob.sv/wp-content/uploads/2022/02/Primeras-seis-secuencias-del-genoma_version-final_24-febrero-2022_1455pm.pdf)
18. INS prepara Laboratorio Nacional de Salud Pública para estudios de vigilancia genómica. (2022). Instituto Nacional De Salud De El Salvador. Recuperado de <https://ins.salud.gob.sv/ins-recibe-equipo-de-tercera-generacion/>
19. Ministerio de Salud participa en investigación de secuencias del virus que produce la COVID-19. (2020). Instituto Nacional De Salud De El Salvador. Recuperado de <https://ins.salud.gob.sv/ministerio-de-salud-participa-en-investigacion-de-secuencias-del-virus-que-produce-la-covid-19/>
20. Schreiber, D. a. K. (2020, 2 de diciembre). Ventajas de la Secuenciación Masiva. Reproducción Asistida ORG. Recuperado de <https://www.reproduccionasistida.org/procedimiento-del-dgp/ventajas-secuenciacion-masiva/>



21. Instituto Nacional de Salud El Salvador. (2023, 27 de julio). Introducción a la Secuenciación de Nueva Generación [Vídeo].

Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=CM0Cy7XzNQc>

22. Instituto Nacional de Salud El Salvador. (2021, 11 de marzo). “Análisis de la mutación D614G en secuencia del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador”. [Vídeo]. Recuperado de

<https://www.youtube.com/watch?v=-FDfEQSq37s&t=3523s>