

# NOTA TÉCNICA N°16

Mayo 2025



## PRINCIPIOS Y UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)



# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

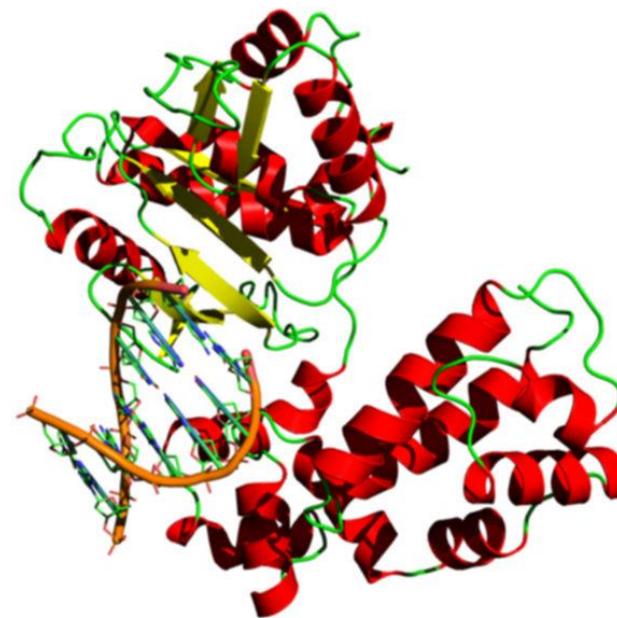


La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es quizás la técnica más relevante en cuanto a biología molecular del último siglo. Es difícil pensar en otro procedimiento de laboratorio que haya tenido un mayor impacto en tantas facetas diferentes de la investigación biológica. Descrita por Kary Banks Mullis en 1983, esta técnica permite obtener más de un billón de copias desde un fragmento de material genético, en solo horas (Mullis K. et al., 1986).

Gracias a este proceso de amplificación, podemos, por ejemplo, identificar individuos en genética forense, diagnosticar trastornos hereditarios o, **como hacemos en ADL, detectar agentes causales de enfermedades, realizar vigilancia epidemiológica, evaluar expresión génica y estados inmunológicos (marcadores), entre otros.** Para entender y dar contexto sobre la técnica, debemos tener presente que todas las células, independiente de su origen, poseen material genético, tengan (Eucariotas) o no tengan núcleo (Procariotas). Este material genético se va a componer esencialmente de ADN y, en algunos casos, de ARN, como la situación de los virus que, a pesar de no ser células, también poseen material genético y este suele ser ARN.

# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

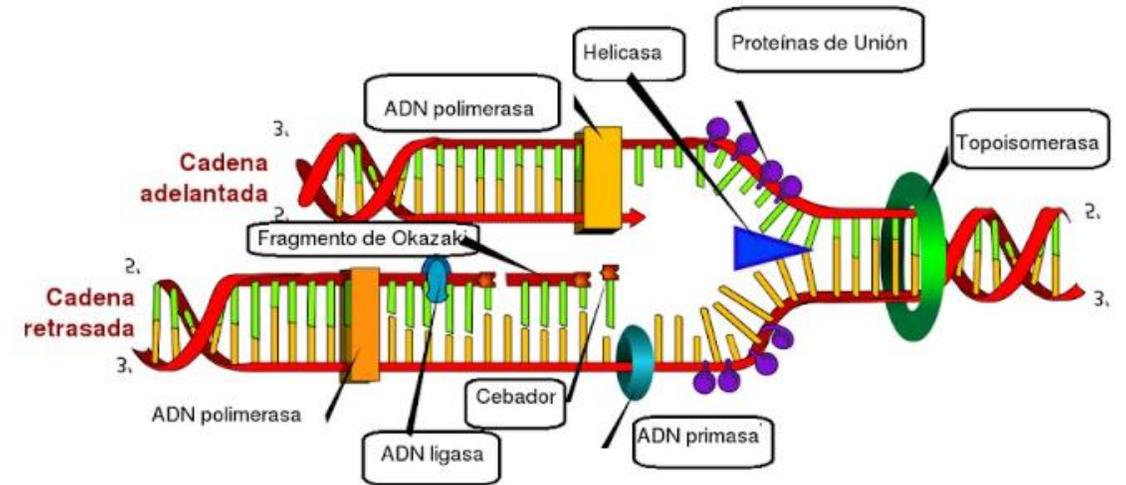
La ejecución de esta técnica nos introduce en un área de estudio clave: la **biotecnología**. Esta, en resumen, dirige sus esfuerzos a utilizar como “herramientas” componentes de organismos vivos. Para el caso de la PCR, dicha herramienta corresponde a la enzima TaqADN polimerasa (Fig.1). La PCR utiliza la capacidad de esta enzima para sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria a una hebra molde (Koutsi et al 2018).



**Figura 1.** La TaqADN polimerasa es la enzima que interviene en la replicación del ADN y se utiliza en la PCR.

# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Pero, ¿qué significa sintetizar una nueva doble cadena a base de una hebra molde? Para explicar esto, es preciso mencionar que si bien la PCR es una técnica *in-vitro*, esta se basa en el proceso biológico de **replicación** del ADN. Durante la división celular, las células hijas reciben una copia de la información genética de la madre, por lo que es necesario que en la célula madre se sinteticen dos copias exactas de su ADN. En este proceso participan diversas enzimas que desenvuelven el ADN y rompen los puentes de hidrógeno (desnaturalización del ADN) que unen a los nucleótidos y que sintetizan la nueva cadena (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de replicación del ADN

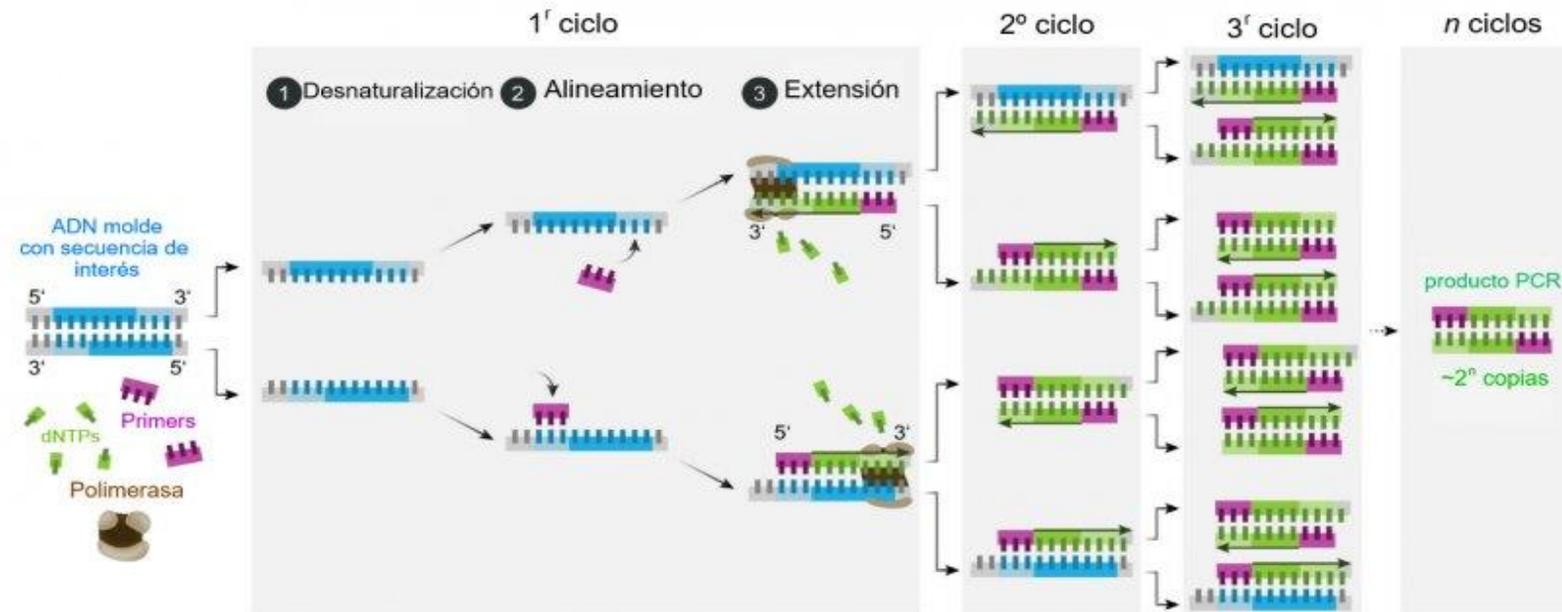
# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa



La participación de la **enzima ADN polimerasa** es esencial, ya que esta colabora agregando nucleótidos a cada una de las cadenas abiertas (hebras) para la formación de nuevas cadenas. De esta manera, las hebras sirven como molde para la síntesis de la nueva cadena. En la PCR, esta reacción de síntesis es catalizada por una ADN Polimerasa Termoestable, obtenida del *Thermus aquaticus*, de ahí el nombre **“Taq” Polimerasa** (Saiki et al 1988). Esta polimerasa es idónea para la PCR por su resistencia a las altas temperaturas que se utilizan en el proceso. Entonces, a base de este complejo proceso biológico, se entiende que la PCR es un **“método enzimático *in vitro*”** que permite la **amplificación de una secuencia específica del ADN**.

La PCR utiliza dos partidores que son elegidos durante el diseño experimental de forma tal que delimiten el fragmento de ADN a ser amplificado y otorguen la especificidad y sensibilidad según el objetivo (Ej: fragmento de ADN único presente en una subespecie de la bacteria *Aeromona salmonicida*).

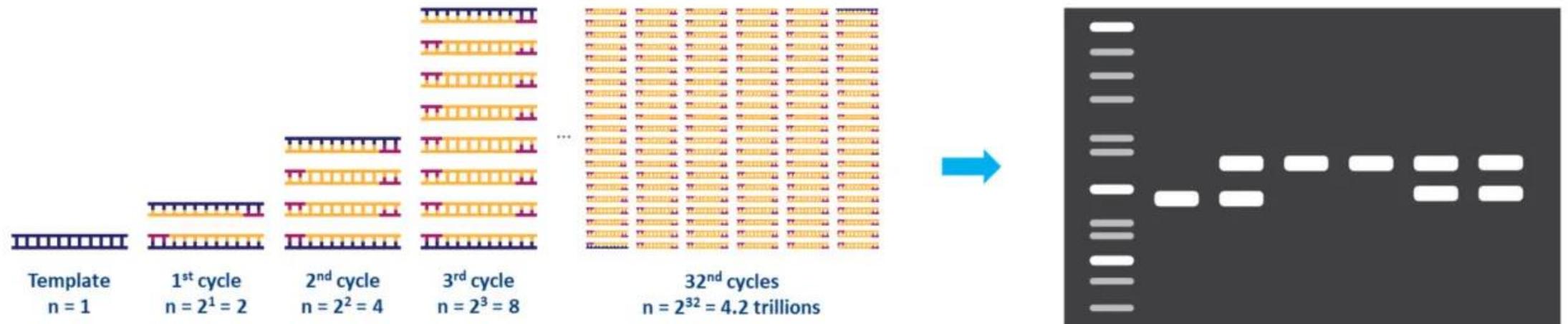
# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa



Luego de reconocer la secuencia complementaria en la molécula de ADN, los partidores se hibridan y son extendidos cíclicamente mediados por la acción de la TaqADN Polimerasa.

Cada ronda de la técnica generalmente comprende entre 20 a 45 ciclos en total; esto implica la **desnaturalización** del ADN, el **apareamiento de los partidores** (*primers*) y la síntesis del **nuevo fragmento de ADN** a partir del partidador (Amado et al 1999), lo que resulta en un crecimiento exponencial de millones de copias del fragmento seleccionado.

# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa



La especificidad de esta reacción se mantiene aún cuando en la muestra original exista una mezcla compleja de ácidos nucleicos, permitiendo así trabajar en el laboratorio desde muy bajas cantidades de material genético.

Finalmente, la evaluación del resultado de esta amplificación se evalúa en geles de agarosa, donde se compara con estándares de ADN de tamaños conocidos.

# Principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Todo este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado **termociclador**, que básicamente permite realizar de forma automatizada y secuencial los ciclos de temperatura. Dependiendo de la variante de la técnica a utilizar, este equipo cambiará en su composición. Existen diversos tipos y variaciones de la técnica PCR original que, para efectos de clasificación, recibe el nombre de **PCR de punto final** o simplemente PCR. **Otras derivaciones de la técnica a mencionar son: RT-PCR, qPCR, y qRT-PCR.**



**Figura 5.** Termociclador tiempo real Quant studio 3, Thermofisher.

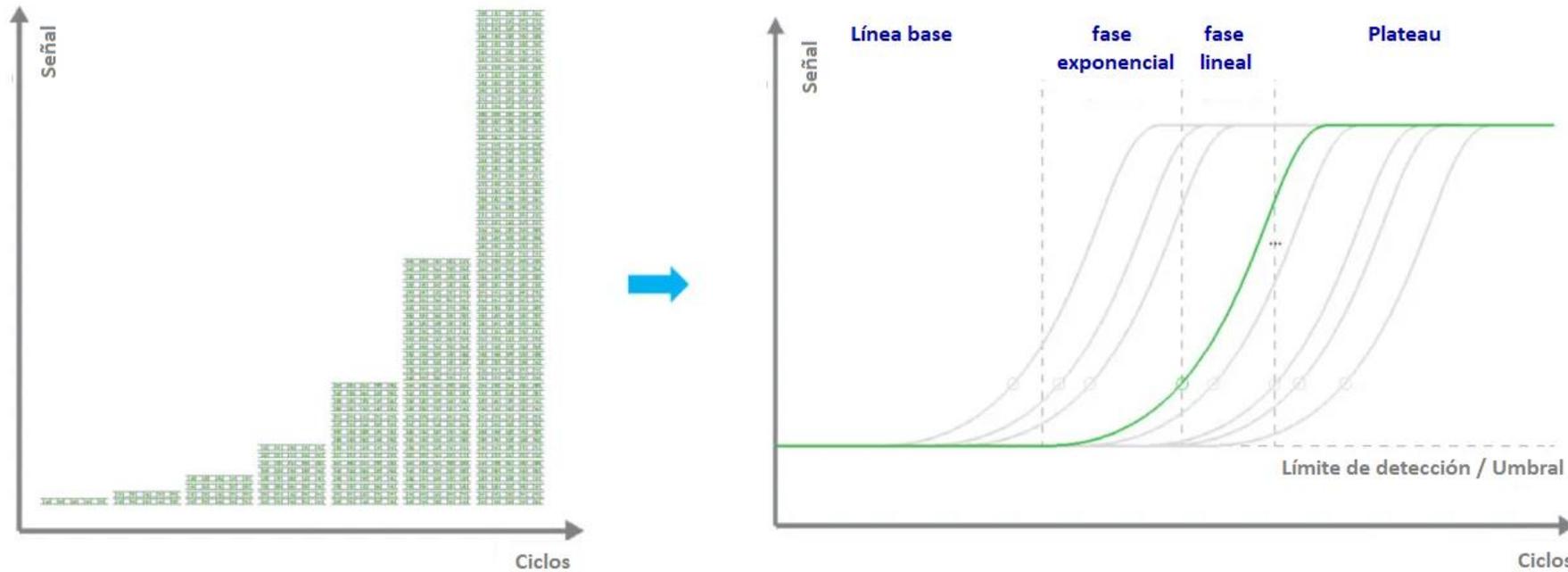
## RT-PCR

La PCR con transcripción reversa, o RT-PCR, permite el uso de ARN como molde. Un paso adicional permite la detección y amplificación del ARN. El ARN se transcribe de forma inversa en ADN complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa reversa. El primer paso de la RT-PCR es la síntesis de un híbrido ADN/ARN. La transcriptasa reversa también tiene una actividad ARNasa H, que degrada la porción de ARN del híbrido. La molécula de ADN hebra simple resultante se completa entonces mediante la actividad ADN polimerasa que posee también la transcriptasa reversa. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento estándar de PCR para amplificar el cDNA. La posibilidad de convertir el ARN en cDNA mediante RT-PCR tiene muchas ventajas y se utiliza, principalmente, para el análisis de la **expresión génica** o de **material genético viral**.

## qPCR y RT-qPCR

La PCR cuantitativa (qPCR) se utiliza para detectar, caracterizar y cuantificar ácidos nucleicos en numerosas aplicaciones. En la RT-qPCR, los transcritos de ARN suelen cuantificarse primero mediante su transcripción inversa a cDNA, como ya se describió, y posteriormente se realiza la qPCR. Al igual que en la PCR estándar, el ADN se amplifica mediante tres pasos repetitivos: desnaturalización, hibridación y elongación. Sin embargo, en la qPCR, el **marcaje fluorescente** permite la recopilación de datos a medida que avanza la PCR.

# qPCR y RT-qPCR



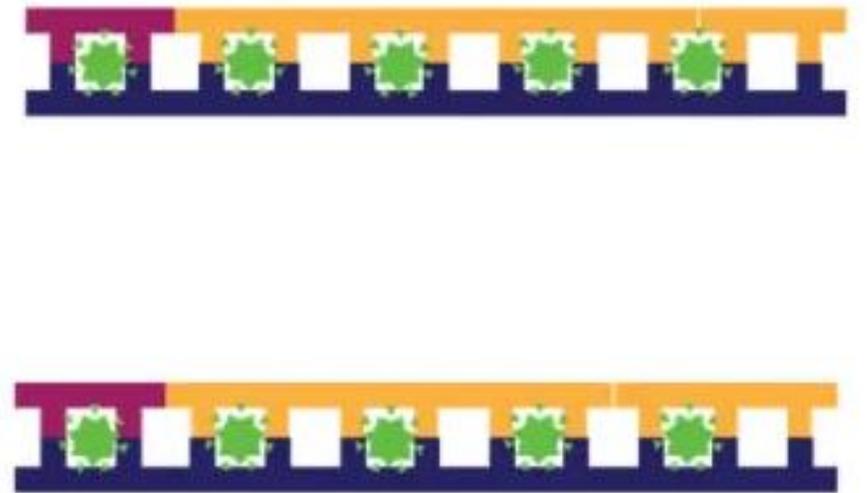
**Figura 6.**  
Amplificación de un  
templado de ADN  
mediante qPCR y  
medición de la señal  
de fluorescencia en  
tiempo real.

El concepto clave que permite evaluar si una muestra es positiva es **el ciclo umbral o Ct** (*Cycle threshold*), que indica el ciclo a partir del cual se comienza a detectar fluorescencia por encima del ruido de fondo. Por tanto, para un mismo marcador, un Ct reportado en un ciclo menor se asocia a mayores cantidades de material genético.

**Por consiguiente, un resultado expresado en Ct indica el número de ciclo donde la muestra evaluada supera el umbral y se interpreta como positiva.**

## Tipos de qPCR

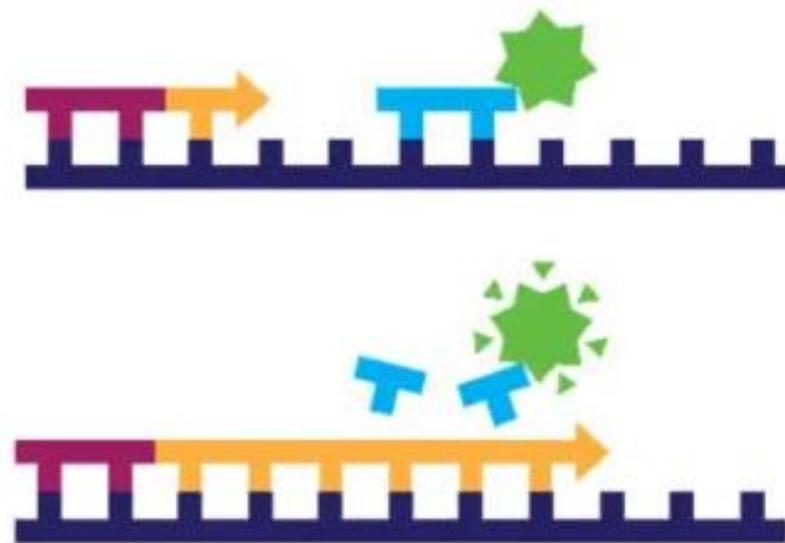
El primer tipo es la qPCR con colorante (normalmente verde, ej: SYBr green). El marcaje fluorescente permite cuantificar las moléculas de ADN amplificadas mediante un colorante de unión al ADN de doble hebra. Durante cada ciclo, se mide la fluorescencia. La señal de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN replicado. Por lo tanto, el ADN se cuantifica en tiempo real. Las desventajas de la qPCR basada en colorante son que solo se puede examinar un objetivo a la vez y que el colorante se unirá a cualquier ADN doble hebra presente en la muestra.



Colorante inespecífico, EJ: SYBR Green

## Tipos de qPCR

Otro tipo de qPCR es la basada en sonda. Existen varios tipos de diseños de sonda, pero el más común es la sonda de hidrólisis (**Taqman**), que incorpora un fluoróforo y un extintor. La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) impide la emisión del fluoróforo a través del extintor mientras la sonda está intacta. Sin embargo, durante la reacción de PCR, la sonda se hidroliza durante la extensión del partidor y la amplificación de la secuencia específica a la que está unida. La escisión de la sonda separa el fluoróforo del extintor y produce un aumento de la fluorescencia dependiente de la amplificación. Por lo tanto, la señal de fluorescencia de una reacción de qPCR basada en sonda es proporcional a la cantidad de la secuencia objetivo de la sonda presente en la muestra (Sykes et al 1992). Esta versión de la técnica requiere de diseño para las sondas y su costo es elevado.



Sonda Blanco específica, EJ: Taqman

En ADL utilizamos esta variante de la PCR, pues debido a su diseño presenta mayor especificidad y reduce los errores asociados a señales falso-positivas. Contamos con más de 20 años de información sobre genomas y compilación de datos históricos que nos permiten evaluar los mejores diseños de sonda y partidores.

## PCR como herramienta diagnóstica

Las técnicas de qPCR y RT-qPCR se utilizan de forma rutinaria en la detección de agentes causales para enfermedades infecciosas. La selección de genes específicos de copia única por genoma (*singletones*) permiten evaluar la presencia o ausencia del material genético de diversos patógenos en muestras complejas.

En ADL, optimizamos la información que la qPCR otorga sobre cada agente. Por ejemplo, la **qPCR-SRS** ha sido diseñada para amplificar una región génica única y específica dentro del genoma de la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Este diseño confiere un alto grado de especificidad independiente del tejido que se esté evaluando.

Asimismo, posterior a un resultado positivo, hemos diseñado otras reacciones de qPCR anexas que permiten evaluar el **Genogrupo (EM-90=A o LF-89=B)** y, dependiendo de este, poder identificar entre las cinco **Genovariantes** (I, II, III, IV y V) identificadas por ADL en Chile (Bohle et al 2014).

## PCR como herramienta diagnóstica

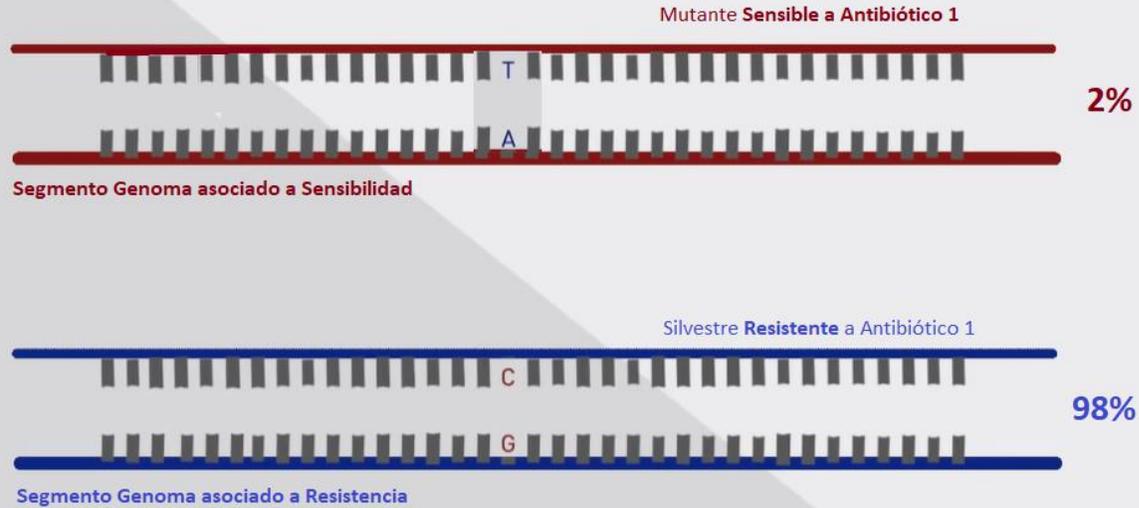
La alta variabilidad intraespecífica presente en el genoma de las cepas de *P. salmonis*, identificadas en el Genogrupo B (LF-89), exhiben distintos comportamientos de virulencia dependiendo del hospedero. Además, manifiestan distinta susceptibilidad a los antibióticos.

Esto último resulta ser de vital importancia a la hora de decidir con qué antibiótico tratar los cultivos en acuicultura. Es por esto que en ADL, además de discriminar el Genogrupo de las muestras qPCR-SRS positivas entre A (EM-90) o B (LF-89), también evaluamos posteriormente por qPCR a las agrupadas en B, para determinar a qué Genovariante representan y de esta manera saber con exactitud **a qué antibióticos es más o menos sensible o definitivamente resistente nuestra muestra positiva a *P. salmonis* (SRS)**. Ello sin necesidad de aislar la bacteria y tan solo en 24 horas (Henríquez et al 2016).

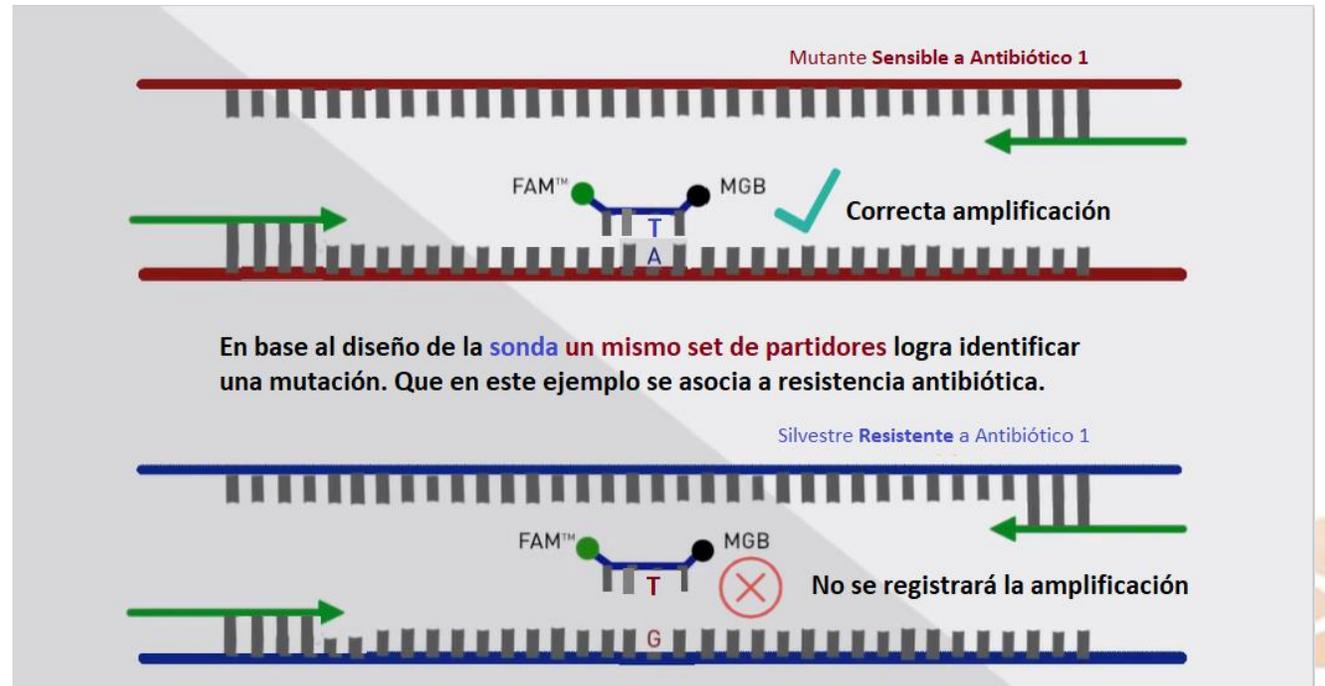
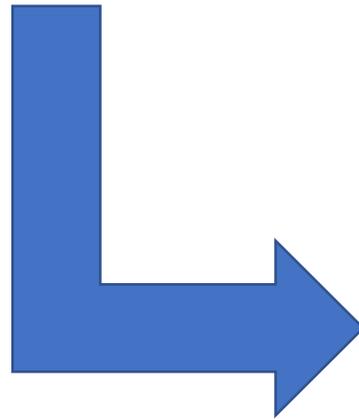
Estos servicios son un claro ejemplo de cómo la técnica qPCR permite no solo detectar patógenos, sino que también brindar información oportuna de procesos de la industria, como es la correcta elección de un antibiótico, tal como se muestra en la figura de la siguiente lámina.



## Esquema análisis de Genovariantes de SRS por qPCR



Esquema de identificación para genovariantes de *P. salmonis* por qPCR .



## Referencias

1. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
2. Koutsis A, Vervesou EC. Diagnostic molecular techniques in haematology: recent advances. Ann Transl Med. 2018;6(12):1-9.
3. Saiki R. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239:487-491.
4. PEDROSA AMADO, Andrés. Reacción en cadena de la polimerasa. AMC [online]. 1999, vol.3, n.2 [citado 2025-04-15], pp. 0-0 .Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02551999000200011&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011&lng=es&nrm=iso)>.ISSN 1025-0255.
5. Sykes PJ, et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. Biotechniques. 1992 Sep;13(3):444-9.
6. Bohle H, Henríquez P, Grothusen H, Navas E, Sandoval A, Bustamante F, Bustos P, Mancilla M. 2014. Comparative Genome Analysis of Two Isolates of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis* from Different Hosts Reveals Major Differences in Virulence-Associated Secretion Systems. Genome Announcement <https://doi.org/10.1128/genomea.01219-14>
7. Henríquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P. and Mancilla, M. (2016), Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. J Fish Dis, 39: 441-448. <https://doi.org/10.1111/jfd.12427>