



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**Iniciadores de PCR en la detección de Citomegalovirus mediante herramientas
bioinformáticas**

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciado en Laboratorio
Clínico**

**Autor:
Acosta Tenelema Marcela Carolina**

**Tutor:
Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda**

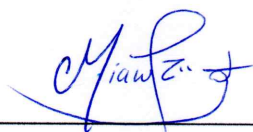
Riobamba, Ecuador. 2025

DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, Marcela Carolina Acosta Tenelema, con cédula de ciudadanía 0604987685, autora del trabajo de investigación titulado: Iniciadores de PCR en la detección de Citomegalovirus mediante herramientas bioinformáticas, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autora de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 18 de julio de 2025



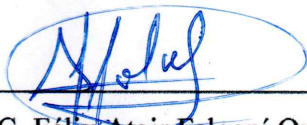
Marcela Carolina Acosta Tenelema

C.I: 0604987685

DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, Félix Atair Falconí Ontaneda catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: Iniciadores de PCR en la detección de Citomegalovirus mediante herramientas bioinformáticas, bajo la autoría de Marcela Carolina Acosta Tenelema; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los 18 días del mes de julio de 2025.



MsC. Félix Atair Falconí Ontaneda

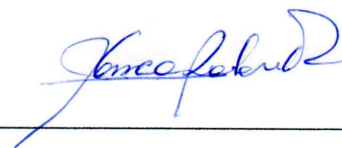
C.I: 0702782020

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación Iniciadores de PCR en la detección de Citomegalovirus mediante herramientas bioinformáticas, presentado por Marcela Carolina Acosta Tenelema, con cédula de identidad número 0604987685, bajo la tutoría de Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 30 de octubre de 2025.

Ximena del Rocío Robalino Flores, Mgs.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



Yisela Carolina Ramos Campi, Mgs.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Gisnella María Cedeño Cajas, Mgs.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO





CERTIFICACIÓN

Que, **ACOSTA TENELEMA MARCELA CAROLINA** con CC: **0604987685**, estudiante de la Carrera de **LABORATORIO CLÍNICO**, Facultad de CIENCIAS DE LA SALUD; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado **"INICIADORES DE PCR EN LA DETECCIÓN DE CITOMEGALOVIRUS MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS"**, cumple con el **1 %**, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **COMPILATIO**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 08 de octubre de 2025

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda
TUTOR

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado, ante todo, a Dios, mi luz y guía constante en cada paso de mi vida, cuya presencia me ha brindado fuerza y esperanza en los momentos más difíciles. A mis queridos padres, Eulalia Tenelema y Hugo Acosta, cuyo amor incondicional, apoyo constante y cuidado desinteresado han sido el pilar que sostuvo mis sueños y me impulsó a seguir adelante. A mi hermana Nancy Acosta, compañera de vida y cómplice en este camino, por su ayuda incansable y su abrazo siempre presente en estos años de esfuerzo. A Albedo K., quien se convirtió en una de las razones más importantes que mantuvieron viva mi motivación y entusiasmo durante toda mi carrera. A mis gatos que en incontables noches estuvieron junto a mí en mis sesiones de estudio. Y, finalmente, a todas las personas que jamás me abandonaron, que con su cariño y apoyo hicieron que este logro fuera posible.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a Dios, por concederme la dicha y la fortaleza de culminar esta etapa tan importante en mi formación profesional. A la Universidad Nacional de Chimborazo, por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de alcanzar una de las metas más significativas de mi vida. A cada uno de los docentes que, con su dedicación y entrega, contribuyeron a mi crecimiento académico y personal a lo largo de este camino. A mi tutor de tesis, Mgs. Félix Falconí, por su confianza, paciencia y compromiso, así como por compartir generosamente sus conocimientos y guiarme con esmero en este proceso. A mis familiares y amigos que me han acompañado y apoyado en cada paso de este camino. Y también gracias a HoYoverse, por dar vida a Genshin Impact, un universo que, en medio de la exigencia académica, me ofreció momentos de inspiración, calma y nuevas formas de ver el mundo, ayudándome a seguir adelante con una mente más clara y creativa.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I. INTRODUCCION..... | 13 |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO..... | 17 |
| Estructura de Citomegalovirus | 17 |
| Mecanismos de infección | 18 |
| Patogenia | 19 |
| Ciclo de replicación de HCMV | 19 |
| Unión viral a la célula hospedadora y entrada | 20 |
| Expresión de genes tempranos..... | 20 |
| Biogénesis del compartimento de replicación | 21 |
| Replicación del genoma viral | 21 |
| Expresión de genes tardíos | 22 |
| Biogénesis del compartimento de ensamblaje viral..... | 22 |
| Ensamblaje de la cápside y empaquetamiento del genoma | 23 |
| Salida hacia el núcleo | 23 |
| Proceso de envoltura de la nucleocápside madura..... | 24 |
| Salida del virión | 24 |
| Métodos de diagnóstico..... | 24 |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 25 |
| Componentes de la PCR | 26 |
| Instrumento para PCR: Termociclador | 27 |
| Fases del ciclo de PCR..... | 31 |
| Tipos de técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa | 32 |
| Herramientas bioinformáticas | 35 |
| CAPÍTULO III. METODOLOGIA..... | 37 |
| Según el enfoque | 37 |
| Según el nivel | 37 |
| Según el diseño..... | 37 |
| Según el corte | 37 |
| Según la cronología de los hechos | 37 |

| | |
|---|----|
| Población..... | 38 |
| Muestra..... | 38 |
| Métodos y técnicas | 39 |
| Procesamiento de datos | 39 |
| Consideraciones éticas | 39 |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| Iniciadores aplicados en la técnica de PCR para la detección de Citomegalovirus | 40 |
| Parámetros de los iniciadores aplicados en la detección de Citomegalovirus a través de PCR | 47 |
| Iniciadores recopilados con características óptimas en la identificación de Citomegalovirus por PCR | 61 |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES | 66 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |
| ANEXOS..... | 76 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Cepas más comunes de HCMV adaptadas al laboratorio..... | 25 |
| Tabla 2. Parámetros técnicos óptimos de los cebadores utilizados en PCR..... | 31 |
| Tabla 3. Tipos de técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa..... | 34 |
| Tabla 4. Iniciadores empleados en PCR para la detección de HCMV..... | 41 |
| Tabla 5. Parámetros técnicos de iniciadores para detección de HCMV..... | 48 |
| Tabla 6. Iniciadores óptimos recomendados para la detección de HCMV mediante PCR..... | 62 |

RESUMEN

El Citomegalovirus, miembro de la familia Herpesviridae, es un virus de ADN de gran tamaño cuya infección representa una de las principales causas de patología congénita y complicaciones en pacientes inmunocomprometidos. Su diagnóstico se apoya principalmente en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, siendo esta una técnica altamente sensible y específica que requiere del uso de iniciadores diseñados adecuadamente. Considerando que la eficiencia de la PCR depende en gran medida de los parámetros de estos iniciadores, el presente estudio tuvo como objetivo general la elaboración de una lista que reúna los iniciadores utilizados en la detección de HCMV mediante PCR, así como el análisis de sus parámetros mediante herramientas bioinformáticas. La investigación fue de tipo mixto, descriptivo, documental, retrospectivo y de corte transversal. La población estuvo conformada por 51 artículos científicos obtenidos de bases de datos reconocidas como PubMed, Science Direct y Cochrane, de los cuales se seleccionó una muestra de 18 artículos aplicando criterios de inclusión y exclusión definidos. La técnica empleada fue la revisión bibliográfica sistemática y el análisis se realizó mediante hojas de cálculo y herramientas bioinformáticas como MFEprimer y Primer BLAST para la evaluación de los iniciadores. Como resultado, se recopilieron 50 pares de iniciadores y, tras el análisis comparativo, se identificaron 11 pares que presentaron las características consideradas como óptimas para la detección de HCMV por PCR. Esta información se consolidó en una lista que puede servir como referencia para futuros trabajos de diagnóstico molecular.

Palabras claves: PCR, Citomegalovirus, diagnóstico molecular, cebadores, bioinformática

Abstract

Cytomegalovirus, a member of the Herpesviridae family, is a large DNA virus whose infection is among the main causes of congenital pathology and complications in immunocompromised patients. Its diagnosis relies mainly on the Polymerase Chain Reaction, a highly sensitive and specific technique that requires the use of adequately designed primers. Given that PCR efficiency largely depends on primer parameters, the general objective of the present study was to compile a list of primers used for HCMV detection by PCR and to analyze their parameters using bioinformatic tools. The research employed a mixed-methods approach, a descriptive design, a documentary design, a cross-sectional design, and was a retrospective study. The population consisted of 51 scientific articles obtained from recognized databases, including PubMed, from which a sample of 18 articles was selected using defined inclusion and exclusion criteria. The technique employed was a systematic literature review, and the analysis was performed using spreadsheets and bioinformatic tools, including MFEprimer and Primer BLAST, for primer evaluation. As a result, 50 primer pairs were compiled, and after comparative analysis, 11 pairs were identified that presented the characteristics considered optimal for HCMV detection by PCR. This information was consolidated into a list that can serve as a reference for future molecular diagnostics work.

Keywords: PCR, Cytomegalovirus, molecular diagnosis, primers, bioinformatics



Reviewed by:

Mgs. Sonia Granizo Lara.

ENGLISH PROFESSOR.

c.c. 0602088890

CAPÍTULO I. INTRODUCCION.

El Citomegalovirus humano (HCMV) conocido también bajo el nombre de herpesvirus humano 5 beta (HHV-5-) forma parte de la familia *Herpesviridae*. Cuenta con envoltura, su diámetro es de aproximadamente 200 nm; tiene una cápside icosaédrica que incluye un genoma de ADN de doble cadena conformado por 235 a 250 Kpb. Al igual que otros virus, en su estructura se puede encontrar tegumento, una membrana externa y glucoproteínas del tipo I y III¹⁻³.

Este virus se puede transmitir de distintas maneras, ya sea mediante la saliva, orina, sangre, leche materna y a través de una transmisión vertical o transplacentaria. Una vez expuesto al cuerpo, Citomegalovirus permanece en latencia por largos periodos de tiempo, las personas sanas serán asintomáticas mientras que pacientes cuyo sistema inmune esté comprometido o suprimido padecerán de infecciones oportunistas que en consecuencia lesionarán el tejido de los órganos donde el virus permaneció inactivo^{1,2}. El daño celular producido conlleva a complicaciones tales como retinitis, síndrome tipo mononucleósico y síndrome de Guillan Barré en adultos. En recién nacidos surgen problemas en el neurodesarrollo⁴⁻⁷.

A nivel mundial, las infecciones por HCMV presentan una prevalencia considerable, que alcanza hasta el 90% en países en vías de desarrollo y alrededor del 60% en países desarrollados⁸. En el contexto regional, los datos varían de acuerdo con el continente. En Europa, la seroprevalencia estimada se sitúa entre 56 y 74% en la población general, con valores de 63 a 76% en mujeres en edad reproductiva y 61 a 77% en donantes de órganos y de sangre⁹. En Asia, un estudio realizado en Sri Lanka reportó una prevalencia de CMV del 94,9% en una muestra de 820 participantes, donde se observó además un incremento en el porcentaje de acuerdo a la edad, obteniendo 94,3% en jóvenes de 15 a 19 años frente a 98,8% de prevalencia en mayores de 60 años¹⁰. En la región del Mediterráneo oriental, los valores oscilan entre 85 y 94% en la población general, mientras que en el continente americano se reportan cifras con un rango de 69 a 87% en mujeres en edad fértil y 67 a 87% en donadores de órganos y sangre⁹.

A nivel local, estudios en América Latina muestran cifras relevantes. En la Amazonía brasileña, de acuerdo con de Melo J. et al.¹¹, la prevalencia de infección por CMV alcanza

el 91,3%, mientras que en Perú, en pacientes atendidos en el Hospital III Iquitos EsSalud durante 2019, se registró una seroprevalencia de 69,71%¹². En Ecuador, las mujeres embarazadas constituyen un grupo de especial riesgo dado que se ha reportado una incidencia del 37,2%¹³, y en un estudio realizado en el Laboratorio de Análisis Clínico de Paján en 2022, sobre 182 gestantes evaluadas, se identificó que 1,6% presentaban infección aguda por CMV¹⁴. En 2018 Cepeda⁸ trabajó con una muestra de 137 niños de la Escuela de Educación Básica “García Moreno”, Parroquia Rural San José del Batán, Provincia de Chimborazo y obtuvo una prevalencia de seropositividad del 12% en pruebas IgM y del 47% en IgG, mientras que la seronegatividad fue del 88% en pruebas de IgM y del 53% en pruebas IgG.

El diagnóstico de infecciones por Citomegalovirus incluye procedimientos como la citología, aislamiento viral en orina u otros fluidos, histopatología y la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo esta última el procedimiento *gold estándar* para el diagnóstico, dada la alta sensibilidad y especificidad que posee^{2,7,15,16}.

La PCR permite amplificar regiones específicas del ADN utilizando iniciadores, cebadores o también llamados como *primers*, que son secuencias cortas de nucleótidos que marcan el punto de inicio para la actividad de la polimerasa en la síntesis de cadenas complementarias¹⁷. Utilizando ciclos de temperatura controlada, la PCR permite la replicación de millones de copias de una secuencia, lo que facilita la detección y el análisis de material genético en una muestra¹⁸. Es importante resaltar que el desempeño de la PCR depende en gran medida del diseño de los iniciadores, por lo que estos mismos deben contar con características adecuadas para garantizar la especificidad y sensibilidad en la detección de microorganismos como lo es Citomegalovirus.

En el caso de detección mediante PCR los cebadores utilizados pueden llegar a ser inapropiados por lo que deben contar con características particulares para ser específicos y sensibles en la identificación del ADN viral. Así mismo, las características con las que cuenta cada cebador se ven sujetas a factores relacionados al diseño bioinformático.

Por consiguiente, la unión eficiente entre el cebador y el molde va a verse comprometida en caso de un mal diseño de los oligonucleótidos, dando como resultado productos inespecíficos

que disminuyen el rendimiento de la PCR. Esto representa un problema ya que puede conducir a resultados erróneos o un diagnóstico tardío, afectando especialmente a poblaciones vulnerables o pacientes críticos que necesitan de una respuesta oportuna.

Entonces, ¿Es relevante un análisis bioinformático de parámetros de iniciadores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en la detección de Citomegalovirus?

El presente trabajo tuvo por objetivo la elaboración de una lista de cebadores que sirva para una base de datos de tal modo que esta pueda ser utilizada en la selección del par de cebadores más conveniente para la detección de Citomegalovirus mediante PCR. La utilización de estos, requiere la determinación de parámetros que se consigue a través de herramientas bioinformáticas, con las que posteriormente se elabora el diseño de las condiciones para programar el termociclador y conseguir amplificaciones apropiadas.

Por objetivos específicos se plantearon los siguientes: la recopilación de los iniciadores aplicados en PCR para la detección de Citomegalovirus, a través de una revisión bibliográfica, para la compilación de una lista que sirva para una base de datos; así como el análisis de los mismos mediante la utilización de aplicaciones bioinformáticas, con el fin de identificar los valores de cada parámetro técnico; y por último, se buscó constatar que los iniciadores recopilados cuenten con características óptimas mediante la comparación de parámetros, estableciendo así una lista con los iniciadores considerados como más adecuados en la identificación de Citomegalovirus por PCR. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una lista organizada de cebadores con su respectivo análisis bioinformático de parámetros técnicos como referencia para futuras investigaciones. De este modo, se facilita la selección de los pares que los profesionales consideren como más pertinentes en el diagnóstico de CMV mediante PCR.

La investigación se encuentra organizada en cinco acápite. El capítulo I abarca la sustentación, importancia y objetivo del estudio, el capítulo II corresponde al marco teórico donde se expone la información actual disponible sobre el tema como los aspectos generales del CMV, características de los iniciadores e información sobre las herramientas bioinformáticas. El capítulo III da a conocer el proceso metodológico mientras que el capítulo IV presenta los resultados obtenidos a partir del respectivo análisis de cada tabla,

por último, el capítulo V se centra en los hallazgos más relevantes a los que se llegó tras finalizar el estudio, respondiendo de este modo los objetivos previamente planteados.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

Citomegalovirus (CMV)

El Citomegalovirus humano forma parte de la subfamilia Betaherpesvirinae de la familia Herpesviridae, su ADN es bicatenario y de un diámetro aproximado de 200 nm, el más grande entre los de su familia. Este patógeno se caracteriza por su habilidad de establecer infecciones persistentes a lo largo de la vida del huésped, permaneciendo en estado latente y reactivándose de forma intermitente, en especial en individuos inmunodeprimidos. Su descubrimiento remonta a 1904, cuando patólogos observaron en tejidos de pacientes células grandes con inclusiones intranucleares, asociándolas inicialmente a protozoarios^{5,8,19,20}.

El HCMV puede encontrarse en diversos fluidos corporales como saliva, sangre, leche materna, orina, semen e incluso lágrimas, permitiendo su transmisión por diferentes vías lo que incluye el contacto directo, las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos y la exposición perinatal. Aunque en individuos inmunocompetentes la infección primaria suele ser controlada por el sistema inmune, el virus nunca se elimina completamente, permaneciendo latente. En condiciones de inmunosupresión, como en el caso de trasplantes y enfermedades como el virus de inmunosupresión humana (VIH), el HCMV se reactiva y pone en manifiesto altos niveles de viremia que conllevan a complicaciones severas e incluso éxitus²⁰.

A su vez, este virus se considera como una de las causas principales de infecciones congénitas, aunque los recién nacidos usualmente no presentan síntomas al nacer con el paso del tiempo comienzan a mostrar las secuelas de la infección que afectan tanto al neurodesarrollo como a la capacidad auditiva⁷. Debido a las complicaciones y como fuente significativa de morbilidad y mortalidad, resulta relevante un diagnóstico temprano de HCMV¹⁹.

Estructura de Citomegalovirus

En su nucleocápside presenta 162 capsómeros y proteínas virales tales como pUL86, pUL85, pUL46 y pUL48-49 que representan un 30% del total de proteínas en el virión, el restante

de proteínas aún no se ha identificado y la función de muchas de ellas no se ha descubierto. En la parte de la nucleocápside también se halla tegumento que contiene 14 proteínas de la cual sobresale la fosfoproteína 65 (pp65 o pUL83) ya que su presencia indica una replicación viral activa²¹.

Las glicoproteínas que se hallan en la envoltura son importantes para el ciclo de replicación del HCMV y la respuesta inmune del hospedador, aquellas que han sido mayor sujeto de estudio son las glicoproteínas tipo B (gB), gH, gL, gM, gN y gO²¹. La glicoproteína más abundante en la envoltura lipídica es la gB codificada por el gen UL55, que participa en la entrada del virus y propagación a otras células. La gH es codificada por el gen UL75 y al actuar en conjunto a otras glicoproteínas como lo es en el complejo gH/gL, cumple un rol importante en la fusión del HCMV a la membrana plasmática de las células mientras que la gN codificada por el gen UL73 tiene una función en la unión viral a la célula del hospedador^{3,22}.

El virus no presenta serotipos distintos, pero sí se han identificado diversas cadenas virales o genotipos, los cuales se clasifican en cuatro variantes principales (gB1-gB4) basadas en la secuencia de la glicoproteína gB²³⁻²⁵. Estas variantes tienen afinidad por diferentes tipos de células, lo que influye en la gravedad de la enfermedad y su patogénesis. La caracterización genotípica de las cepas que infectan a pacientes inmunocomprometidos es especialmente relevante, ya que permite realizar estudios moleculares y epidemiológicos que ayudan a comprender la variabilidad genética del virus y su impacto clínico²⁴.

Mecanismos de infección

La transmisión de HCMV se da principalmente por contacto directo y se adquiere de diversas maneras²³:

- Infección intrauterina: Transmisión de madre a hijo donde la infección es transplacentaria.
- Infección perinatal: Se produce durante el parto por el contacto con secreciones cervicovaginales o durante la lactancia.
- Contacto directo: Por exposición a saliva, orina, secreciones de vías respiratorias, entre otras.

- Contacto sexual: Transmisión mediante secreciones.
- Procedimientos médicos como el trasplante de órganos o la transfusión de sangre.

Patogenia

El HCMV posee un amplio tropismo celular, infectando preferentemente células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, hepatocitos, macrófagos y células progenitoras hematopoyéticas. Esta versatilidad permite su diseminación sistémica en el organismo, generando afección multiorgánica, en particular en tejidos altamente vascularizados y en sistemas como el nervioso central, el digestivo y el ocular²⁶. La entrada del HCMV en las células depende de la interacción específica entre las glicoproteínas de la envoltura viral y los receptores en la superficie de las células²⁷.

De manera particular, para la fusión del virus con la membrana plasmática de fibroblastos son esenciales las glicoproteínas gH/gL, mientras que la entrada en células epiteliales y endoteliales requiere un complejo adicional (gH/gL/UL128–131), que facilita la endocitosis y la fusión de endosomas². Además, el HCMV utiliza diferentes rutas y complejos de glicoproteínas para entrar en distintas células del huésped, siendo la glicoproteína B (gB), codificada por el gen UL55, una de las más importantes y conservadas. La gB es crucial para la entrada del virus y su propagación de célula a célula^{1,27}.

Ciclo de replicación de HCMV

El ciclo de replicación de HCMV permite la producción de nuevos virus infecciosos, para un mejor entendimiento Declan expone 10 etapas que ocurren en este proceso, comprendiendo: la unión viral a la célula hospedadora y entrada, expresión de genes tempranos, biogénesis del compartimento de replicación, replicación del genoma viral, expresión de genes tardíos, biogénesis del compartimento de ensamblaje viral, ensamblaje y maduración de la cápside, egreso nuclear, envolvimiento de la nucleocápside madura y el egreso del virion²⁸. El HCMV se caracteriza por un ciclo lento: tarda aproximadamente 24 horas en producir nuevos viriones dentro de una célula infectada y puede requerir días o semanas para manifestar efectos citopáticos visibles en cultivos celulares^{15,23}.

Unión viral a la célula hospedadora y entrada

Como todo virus el primer paso para replicarse es entrar a una célula humana por lo que la infección de HCMV inicia con la adhesión del virión a la célula diana, dada por una interacción altamente específica entre las glicoproteínas de la envoltura viral y receptores localizados en la superficie celular²⁷. En este proceso participan principalmente dos complejos de glicoproteínas virales: el trímero gH/gL/gO y el pentámero gH/gL/UL128/UL130/UL131A, los cuales median el reconocimiento del virus con receptores celulares como el receptor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α), neuropilina 2 (NRP2) y OR1411^{2,26,28}.

El complejo trímero facilita la entrada del virus en fibroblastos al darse paso una unión inicial mediada por el trímero de glicoproteínas al PDGFR α , mientras que el pentámero es esencial para la entrada en células epiteliales, endoteliales, mieloides y de otras líneas celulares susceptibles, al unirse a receptores tales como OR1411 o NRP2, dando como resultado de esta unión un proceso de endocitosis del virión. En ambos casos la glicoproteína B (gB), codificada por el gen UL55, se activa posteriormente para inducir la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula hospedadora, promoviendo así la penetración viral y liberando la nucleocápside tegumentada al citosol^{2,26,27}.

Consecutivamente las proteínas del tegumento proceden a disociarse y comienza la preparación de la célula para la siguiente etapa, iniciando la reprogramación de la célula. A su vez la nucleocápside se dirige hacia el núcleo, donde se entabla la transcripción de genes virales, usando como medio de transporte el citoesqueleto celular para finalmente dar lugar a la deposición del ADN viral²⁶.

Expresión de genes tempranos

Tras la liberación del genoma en el núcleo, el ADN viral se circulariza y se activa la transcripción de los genes inmediatos tempranos (IE), proceso regulado por el promotor mayor inmediato temprano (MIEP) que actúa como un integrador de señales provenientes tanto del huésped como del virus. Gracias a su capacidad de respuesta a distintos estímulos,

el MIEP cumple un rol importante en la regulación del cambio de la fase lítica a una fase latente y vice versa²⁸.

Los primeros genes en ser transcritos son UL123 y UL122 que codifican las proteínas IE1 e IE2, respectivamente. Ambas proteínas tienen funciones clave como transactivadores en la expresión génica viral de los genes virales subsiguientes, evasión de la respuesta innata y desempeñan un papel central en la regulación del ciclo viral, también guardando relación con la transición hacia la latencia^{26,28,29}.

Biogénesis del compartimento de replicación

Las proteínas virales tempranas ayudan al establecimiento de áreas especiales dentro del núcleo celular donde el virus lleva a cabo la transcripción, replicación del ADN y ensamblaje de partículas virales, estos sitios se conocen como compartimento de replicación (RCs). Los genes UL112/UL113 son indispensables en la formación del compartimento permitiendo la formación de precursores de los RCs (pre-RCs) alrededor del genoma viral utilizando el mecanismo de separación de fases líquido-líquido^{28,30}.

Los pre-RCs inicialmente son pequeños y múltiples sin embargo tras el avance de la infección y acumulación de ADN viral recién replicado, los pre-RCs coalicionan y conforman una zona de replicación más grande. Posterior a la fusión y agrandamiento del compartimento de replicación, proteínas tales como UL44, UL57, UL84 y UL34 trabajan en conjunto para iniciar estabilizar y mantener el entorno donde ocurre la replicación del genoma viral, es decir, el compartimento de replicación^{28,30}.

Replicación del genoma viral

El proceso de replicación ocurre dentro de los RCs e intervienen los genes tempranos tardíos (DE), activados primero por las proteínas inmediatas tempranas (IE), que en trabajo conjunto a las proteínas IE, ayudan a la expresión de componentes esenciales utilizados en la replicación. La etapa de replicación empieza desde que el genoma entra al núcleo por lo que la circularización del ADN viral ocurre simultáneamente a la expresión de genes IE, las copias resultantes del ADN son genomas virales lineales concatenados, es decir múltiples

copias del genoma unidas secuencialmente formando una molécula larga y continua de ADN, formada esta estructura es que se expresan los genes DE y cumplen su función^{28,30}.

El mecanismo inicia en el origen de replicación lítica (*oriLyt*) ubicado justo antes del comienzo del gen UL57. La horquilla de replicación necesita de seis proteínas virales que incluyen el ADN polimerasa (UL54) y su factor de procesividad (UL44), así como el complejo helicasa-primasa (UL70, UL102 y UL105) y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (UL57). Además, se ha encontrado otros factores esenciales que participan en la replicación, pero actúan como proteínas esenciales adicionales, siendo estas IE1/IE2, UL36-38, IRS1/TRS1, UL112/UL113 y UL84. No obstante IE1/IE2 y UL112/UL113 no juegan un papel directo en la replicación del ADN en sí mismas, sino que, contribuyen a transactivar la maquinaria de replicación central^{28,30}.

Expresión de genes tardíos

Después de la replicación se activan los genes tardíos (L) tras ser transcritos por la ARN polimerasa II del huésped. Los genes L junto a mecanismos complejos que involucran tanto factores del huésped como virales, codifican componentes estructurales del virión, como las proteínas pertenecientes de la cápside, las proteínas del tegumento y las glicoproteínas de la envoltura^{28,30}.

Biogénesis del compartimento de ensamblaje viral

Cuando el genoma de HCMV ha terminado de replicarse el virus se prepara para ensamblar sus nuevos viriones, para ello se crea el centro de ensamblaje viral (vAC) que es una mega estructura generada en el citoplasma de la célula del huésped y actúa como centro organizador de microtúbulos (MTOC) derivado del aparato de Golgi. Esta etapa implica el reclutamiento de proteínas de carga del virión como gH, UL32 y UL83, así como la proteína viral UL132. Se consideran como marcadores principales de este compartimento de ensamblaje a la proteína tegumentaria UL99 y la glicoproteína de la envoltura gB^{28,30}.

Ensamblaje de la cápside y empaquetamiento del genoma

El ensamblaje inicia con la formación de una estructura intermedia conocida como procápside a partir de la proteína de la cápside (MCP), cuyas unidades son ensambladas sobre una proteína de andamiaje codificada por el gen UL80. Posterior a la formación de la procápside se da una maduración de la misma, este proceso implica la angularización de la cápside, degradación de la proteína de andamiaje y, en el caso de formación de cápsides infecciosas, también incluye el empaquetamiento del ADN viral²⁸.

El empaquetamiento se da gracias a la acción del complejo terminasa conformado por proteínas codificadas por los genes UL51, UL56 y UL89. Este complejo corta el ADN concatemerizado en genomas de longitud unitario y los empaqueta dentro de las cápsides maduras. Por su parte, las cápsides maduras se dividen en tres tipos²⁸:

- Cápsides tipo A: vacías, sin ADN ni andamiaje.
- Cápsides tipo B: contienen restos de la proteína de andamiaje, pero sin ADN.
- Cápsides tipo C: completamente maduras, con el genoma viral empaquetado. En consecuencia, son las únicas que forman viriones infecciosos.

Finalmente, la estabilización de la cápside es lograda por adición de proteínas del tegumento a la estructura de la cápside, proveyendo rigidez y protección al genoma de HCMV.

Salida hacia el núcleo

Las cápsides maduras con genoma viral deben salir del núcleo y llegar al citoplasma para lograr la maduración completa, para ello cruzan la doble membrana del núcleo utilizando los complejos del poro nuclear, el complejo de egreso nuclear (NEC) formado por las proteínas virales pUL50 y pUL53 y la quinasa viral UL97 que fosforila la lámina nuclear permiten que la cápside logre egresar. En el caso de las cápsides tipo C se ha logrado observar que el transporte hacia la membrana nuclear externa se realiza usando los filamentos de actina nuclear²⁸.

En el transcurso de esta etapa se da un envolvimiento primario de la cápside C madura en la membrana nuclear interna. Posterior al transporte mediante filamentos las cápsides envueltas alcanzan la membrana nuclear externa donde se fusiona con esta, dejando libre la cápside en el citoplasma²⁸.

Proceso de envoltura de la nucleocápside madura

Después de alcanzar el citoplasma, dentro del compartimento de ensamblaje viral, la cápside madura adquiere una segunda envoltura nuclear que contiene las glicoproteínas virales esenciales para la entrada a nuevas células. En la generación de la envoltura final participan proteínas del tegumento como pUL94 y pUL71. Dependiendo del tipo de célula, ya sean células endoteliales o fibroblastos, la envoltura tendrá una composición divergente de la membrana de los cuerpos multivesiculares. Además, en el caso de las células endoteliales la participación del locus UL133/8 es indispensable para la maduración del virus²⁸.

Salida del virión

Para el traslado del virión hacia el medio extracelular es necesario un transporte, el cual será dentro de los cuerpos multivesiculares los cuales al alcanzar la membrana plasmática se fusionan con esta y finalmente el virión queda libre para infectar otras células y tejidos²⁸. Esta es la etapa que cierra el ciclo lítico de reproducción de HCMV, no obstante, en células como los monocitos CD14+ y sus progenitores hematopoyéticos CD34+, en lugar de completar el ciclo, el virus puede entrar en un estado de latencia que carece de la producción de viriones²⁶.

Métodos de diagnóstico

La detección cuantitativa de Citomegalovirus en fluidos corporales se realiza principalmente mediante una variante de la PCR convencional, esta es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR), considerada el estándar de oro para su diagnóstico. Esta prueba es ampliamente utilizada debido a su alta precisión y capacidad para cuantificar la carga viral en muestras biológicas. Sin embargo, existen limitaciones en cuanto a su sensibilidad, con un rango de detección de aproximadamente 100 a 400 copias por mililitro^{16,19}.

Dada la variabilidad genética del Citomegalovirus humano, a continuación, se presentan las cepas más comúnmente empleadas en investigaciones científicas³¹, junto con sus respectivos números de acceso en GenBank, los cuales, además de otras secuencias utilizadas, sirvieron como referencia genómica en el presente estudio. Estas secuencias permitieron comprobar si los iniciadores recopilados en la revisión bibliográfica se alinean con regiones específicas

del genoma del virus y, en algunos casos, determinar la cepa correspondiente cuando no fue especificada por los autores de los artículos.

Tabla 1. Cepas más comunes de HCMV adaptadas al laboratorio.

| Cepa | GenBank |
|--------|-------------|
| Towne | GQ121041.1 |
| TB40E | AF390839.2 |
| AD169 | X17403.1 |
| Toledo | GU937742.2 |
| VR1814 | GU179289.1 |
| | PP803491.1 |
| Merlin | NC_006273.2 |

Nota: Adaptado de Wang H et al.³¹

No obstante, el diagnóstico de la enfermedad invasora por HCMV también puede realizarse mediante estudios histológicos de biopsias tisulares. En estos casos, la identificación de cuerpos de inclusión intranucleares, que aparecen como inclusiones basófilas características, es crucial. En algunos casos también se pueden observar inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas, lo que permite confirmar la presencia del virus en el tejido afectado²³.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es un procedimiento parte de la biología molecular, descrita primero por Kjel Klepper para años más tarde ser demostrada en 1985 por Mullis et al. Esta técnica se basa en la amplificación exponencial y posterior generación de copias de un segmento de interés del ADN^{32,33}. Para realizar la técnica en un tubo eppendorf se coloca la muestra de ADN, los cebadores, desoxinucleótidos, un ADN polimerasa termoestable y un cofactor de la ADN polimerasa. Mediante la operación del termociclador en varios ciclos y con cambios de temperatura se obtiene la amplificación de la región del ADN que sea de interés³⁴.

Cada ciclo consta de tres fases: desnaturalización, apareamiento y la elongación. La PCR se utiliza de manera extendida en la investigación biomédica, el diagnóstico de enfermedades,

detección de enfermedades hereditarias, pruebas de paternidad, análisis de ADN en las ciencias forenses, etc^{32,35}.

Varios factores influyen en la eficiencia de la PCR, pero el diseño y elección de cebadores resulta de suma importancia para el éxito de este método en cuanto a sensibilidad y especificidad³⁶. Así mismo, durante el diseño aspectos como la longitud del cebador, temperatura *melting* y de alineamiento, contenido GC, entre otros, influyen en la especificidad, sensibilidad y robustez de la reacción³⁷.

Componentes de la PCR

ADN Molde

Es el fragmento de material genético objetivo que contiene la región específica que se desea amplificar y actúa como plantilla para que la ADN polimerasa pueda sintetizar nuevas cadenas complementarias. Las muestras utilizadas para la PCR pueden provenir de sangre, tejidos, muestras forenses y otras fuentes, pero es importante tener en cuenta que la cantidad utilizada para la reacción debe ser la adecuada ya que un exceso de muestra puede conllevar la inhibición de la reacción y una escasa cantidad causa una amplificación deficiente. La pureza es otro factor a tener en cuenta dado que causan interferencias y por lo tanto es recomendable aplicar métodos de extracción y purificación³⁸.

ADN polimerasa

Es la enzima encargada de catalizar la síntesis de las cadenas complementarias, iniciando desde el extremo 3' del cebador unido al molde y extendiéndolo al añadir nucleótidos. La polimerasa utilizada con mayor frecuencia es la Taq polimerasa, una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus*, que soporta las altas temperaturas del ciclo de desnaturalización sin perder su funcionalidad. Existen también otras variantes de polimerasa como Pfu derivada de *Pyrococcus furiosus* y KOD ADN polimerasa obtenida a partir de *Thermococcus kodakarensis*³⁸.

Nucleótidos (desoxinucleótido trifosfatos o dNTPs)

Son los bloques constructores del nuevo ADN. Incluyen los dNTPs: deoxiadenosin trifosfato (dATP), deoxicistidin trifosfato (dCTP), deoxiguanosin trifosfato (dGTP) y deoxitimidin trifosfato (dTTP), cada uno contienen su respectiva base nitrogenada ya sea adenina (A), citosina (C) guanina (G) y timina (T). La concentración que usualmente se usa para realizar PCR gira alrededor de los 200 μM ³⁸.

Buffer de reacción

Se trata de una solución que brinda las condiciones adecuadas para que la ADN polimerasa cumpla sus actividades y permanezca estable durante los distintos ciclos térmicos de la PCR, preferiblemente manteniendo un pH entre 8,3 a 8,8^{38,39}. De manera general los buffers suelen hallarse en concentración 10X y están compuestos de: Tris-HCl que permite mantener el pH necesario para la reacción, y de sales como KCl, que asiste en la estabilización de la unión del cebador al molde y MgCl_2 ³⁸.

Cationes monovalentes y divalentes

En aplicaciones estándar de PCR el catión monovalente de KCl se dispone en una concentración de 50 mM, los iones divalentes de magnesio (Mg^{2+}), que son indispensables para la actividad termostable de la ADN polimerasa, deben mantener una concentración recomendablemente excedente a la concentración molar de los grupos fosfatos contenidos tanto en los desoxinucleótidos trifosfatos y los cebadores, no obstante en la aplicación es común emplear una concentración de 1,5 mM³⁹.

Instrumento para PCR: Termociclador

Permite la configuración de diferentes ciclos de calentamiento y enfriamiento necesarios para efectuar las etapas que componen un ciclo de PCR, es decir; la desnaturalización, hibridación y extensión. El ciclo se repite alrededor de unas 20 a 40 veces, además, en la actualidad los termocicladores modernos emplean el efecto Peltier para lograr dichos cambios³⁸.

Iniciadores

Los iniciadores, cebadores o *primers* son fragmentos cortos de secuencias de nucleótidos (oligonucleótidos) de una sola hebra que tienen la capacidad de unirse y complementar una secuencia simple del ADN diana para comenzar con la síntesis de nuevas cadenas de ADN mediante la reacción de la ADN polimerasa^{33,35}. Para la PCR son necesarios dos tipos de cebadores: un cebador directo (*forward*) y un cebador inverso (*reverse*), ambos ayudan a la formación de la cadena complementaria³⁸.

Los cebadores mantienen estrecha relación con la especificidad de la PCR, por lo que el diseño de los mismos debe realizarse teniendo en cuenta aspectos como la longitud, posesión de bases de guanina o citosina en su extremo 3', temperatura de alineamiento, entre otros, para que el rendimiento de la PCR sea óptimo y evitar la formación de uniones no específicas o de estructuras secundarias como los dímeros. El diseño de cebadores se realiza mediante el uso de herramientas bioinformáticas como Primer Quest y bases de datos de las secuencias genómicas las cuales se pueden encontrar en la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI)³⁸.

Características de los cebadores

Longitud

Mardalisa S, et al.³⁵ menciona que una longitud adecuada para el cebador es de 18 a 33 pb, basándose en las combinaciones probables de secuencias que se puedan hallar, es así que una base nitrogenada se puede encontrar en una probabilidad 1/4, una secuencia de dos bases 1/16, una secuencia de cuatro bases 1/256 y así sucesivamente. Sin embargo, para Masnaini M, et al.³⁶ la longitud ideal es de 18 a 25 pb y para Asif S, et al.³² es de 14 a 28 pb para una PCR normal y de 28 a 38 pb para una PCR multiplex. Si el cebador es demasiado corto la especificidad se reduce mientras que si supera las 30 pb puede producir un efecto en el cual el *primer* no sea específico³⁶.

Temperatura melting o de fusión (Tm)

Se define como la temperatura necesaria para que el 50% del ADN de doble cadena se separe en hebras^{35,40}. Para calcular la temperatura *melting* se puede utilizar la fórmula de Wallace, que se describe a continuación³⁵:

$$T_m = (nG + nC) * 4 + (nA + nT) * 2$$

Donde:

T_m: Temperatura *melting*

nG: número de bases G en el primer

nC: número de bases C en el primer

nA: número de bases A en el primer

nT: número de bases T en el primer

Otra fórmula aplicada se basa en la fórmula del Nearest Neighbor Thermodynamic³⁵:

$$T_m = (\Delta H(P) / ((\Delta S(P) + R \ln [\gamma/4])) + T_o + t$$

Donde:

T_m : Temperatura *melting*

P : Longitud del primer

R: 1,987 (cal/°)

γ : 50 x 10⁻⁹, concentración molar

T_o: -273.15 °C

t : -21,6 °C

ΔH: Entalpía

ΔS: Entropía

Entendiendo que “la entalpía (H) representa el contenido total de calor de un sistema, mientras que la entropía (S) es una medida del desorden o aleatoriedad en un sistema”⁴¹.

Masnaini M, et al.³⁵ considera que la temperatura *melting* adecuada debe encontrarse en un rango de 42 a 65 °C, mientras que para Dreier M, et al.⁴² la temperatura optima es de 60°C y para Asif S, et al.³² la temperatura *melting* debe hallarse en un rango de 52 a 60°C. Una temperatura superior reduce la efectividad de alineamiento mientras que una temperatura baja tiende a producir productos no específicos, además es recomendable que la diferencia

de temperaturas entre el par de cebadores (*reverse* y *forward*) no sea más de 5°C³⁵. Pero es preferible que los cebadores tengan temperaturas similares, así como menciona Mitin V y Mitina I⁴⁰ “La diferencia entre la temperatura de fusión de los cebadores directos e inversos no debe ser mayor a 1-2 °C”.

Temperatura de alineamiento

La temperatura de alineamiento (Ta) determina la temperatura a la que la cantidad máxima de cebador se une a su objetivo⁴³.

Tamaño del amplicón

El término amplicón hace referencia a un fragmento de ADN o ARN que ha sido amplificado mediante la técnica de PCR, actuando como secuencia molde para la síntesis de nuevas copias durante el proceso⁴⁴. Para Mitin V y Mitina I.⁴⁰ la longitud optima del amplicón debe ser de aproximadamente 120 pb pero que un rango entre 80 a 200 pb también es aceptable, no obstante es importante que el amplicón no supere este rango ya que amplicones más largos disminuyen la eficiencia de la PCR.

Contenido GC

Este punto es importante ya que la cantidad de contenido GC influye directamente en la temperatura melting, Masnaini M, et al.³⁶, Mardalisa S, et al.³⁵ y Asif S, et al.³² mencionan que el porcentaje de GC debe encontrarse entre un 40 a 60%. Una baja cantidad de %GC reduce la eficiencia de la PCR mientras que un alto contenido en GC da como resultado una disminución de los productos de la PCR pero que son más específicos³⁶.

Secuencia en el extremo 3'

Es preferible que al final del extremo 3' de la secuencia del primer debe estar presente una secuencia GC, o tener como base en el extremo una guanina o una citosina, esto facilita la unión del cebador y evita el emparejamiento incorrecto. También es importante que este extremo no se complementen entre sí para evitar la formación de horquillas^{32,45}.

Estructuras secundarias y energía libre de Gibbs

Es preferible que la PCR no contenga estructuras secundarias en la forma de horquillas o dímeros ya que estas estructuras disminuyen la capacidad del cebador de unirse al ADN. Los extremos de primers que sean complementarios se unirán a su par inverso y se dará lugar la formación de dímeros cruzados mientras que los primers que se unen a otras secuencias se denominan autodímeros. La energía libre de Gibbs (ΔG), representa una medida cuantitativa de la estabilidad termodinámica de las estructuras de ácido nucleico que se forman durante el proceso de amplificación⁴⁶.

Este valor es utilizado como indicador predictivo en la formación y estabilidad de estructuras secundarias, en el caso de autodímeros y dímeros cruzados con valores por debajo a -7 kcal mol^{-1} de energía libre Gibbs pueden ser tolerados al igual que horquillas con valores que no superen a -3 kcal/mol^{-1} ^{35,47}. Sin embargo, Integrated DNA Technologies (IDT), un proveedor líder de oligonucleótidos, recomienda que la ΔG sea superior a -9 kcal/mol , criterio adoptado en herramientas de diseño de cebadores como OligoAnalyzer⁴⁸.

Tabla 2. Parámetros técnicos óptimos de los cebadores utilizados en PCR.

| Parámetro | Valor | Autor |
|----------------------------|--|--|
| Longitud del cebador (pb) | 18-25 | Masnaini et al. ³⁶ |
| Temperatura melting (°C) | 42-65 | Masnaini et al. ³⁶ |
| Tamaño del amplicón (pb) | 80-200 | Mitin V y Mitina I. ⁴⁰ |
| Contenido GC (%) | 40-60 | Masnaini et al. ³⁶ , Mardalisa et al. ³⁵ y Asif et al. ³² |
| Secuencia en el extremo 3' | GC | Asif et al. ³² |
| Estructuras secundarias | Sin presencia de dímeros ni horquillas | Mardalisa et al. ³⁵ |
| ΔG (kcal/mol) | ≥ -9 | IDT ⁴⁸ |

Fases del ciclo de PCR

Desnaturalización

Para desnaturalizar el ADN, es decir separar las dos hebras que conforman el ADN molde, es imprescindible usar temperaturas altas que rondan entre 94 a 95 °C. Para procedimientos

donde el ADN molde tengan $\leq 55\%$ de contenido en GC% se recomienda usar una temperatura entre 94 y 95°C por 45 segundos, pero si el contenido en GC% es mayor se requiere aplicar temperaturas más altas, mientras que cadenas largas de ADN necesitan de más tiempo para completar su correcta desnaturalización. Las temperaturas presentadas de acuerdo a la bibliografía son las adecuadas para que la enzima pueda soportar 30 o más ciclos del proceso sin llegar a dañarse³⁹.

Alineamiento

En la etapa de alineamiento los cebadores se unen a las hebras sencillas de ADN a una temperatura de 55 a 65 °C o 50 a 65 °C durante 20 a 60 segundos, pero esto puede variar teniendo en cuenta que la temperatura varía de acuerdo a la longitud del cebador. Se pueden llevar a cabo ensayos utilizando 2 a 100 °C por debajo de la temperatura *melting* de los cebadores para optimizar la temperatura de alineamiento, no obstante un alineamiento óptimo ocurre cuando la temperatura es 3 o 5 °C menos que la T_m del primer^{38,39}

Extensión

En la fase de extensión, la Taq polimerasa, con capacidad de polimerizar miles de bases por minuto, termina de sintetizar las cadenas de ADN al añadir dNTPs complementarios en dirección 5'-3' a partir de cada cebador. La temperatura requerida depende de la estabilidad térmica de la Taq polimerasa, estableciéndose entre 75 y 80°C, habitualmente usando 72 °C en procedimientos de rutina^{38,49}. El tiempo de extensión depende de la longitud del molde, Rajalakshmi⁴⁹ menciona que puede aplicarse un período de 5 a 15 minutos.

Tipos de técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR convencional

La PCR convencional se describe el proceso normal para llevar a cabo una PCR, siendo que es una técnica que permite amplificar in vitro un segmento específico de ADN, generando múltiples copias de una secuencia de interés para su análisis posterior. El procedimiento se basa en la repetición de ciclos secuenciales de desnaturalización, alineamiento y extensión, mediante los cuales se logra la amplificación dirigida de la secuencia diana. Este principio

básico constituye también la base de funcionamiento sobre la que se desarrollan las distintas variantes de la PCR⁴⁹.

PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real permite la cuantificación precisa de la amplificación de un ADN molde mientras la reacción de PCR se desarrolla en tiempo real. El monitoreo de la amplificación se lleva a cabo mediante la incorporación de colorantes fluorescentes inespecíficos o sondas fluorescentes específicas para secuencias de ADN, cuya señal aumenta en proporción al avance de la reacción³⁸.

PCR anidada

Utiliza dos reacciones consecutivas de PCR y dos pares de cebadores para incrementar la especificidad de amplificación de la región diana del ADN. En la primera ronda de amplificación el primer par de cebadores, cebadores externos, amplifican una región más extensa del ADN y en la segunda ronda, los cebadores internos se alinean dentro del fragmento amplificado previamente, enfocándose únicamente en la región objetivo que resulta ser más pequeña y específica⁵⁰.

PCR seguida de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP-PCR)

En la PCR-RFLP, el ADN genómico se digiere utilizando enzimas de restricción, seguido por una separación en gel aplicando electroforesis y la posterior detección mediante Southern blot, transfiriéndolos fragmentos desnaturalizados del gel a una membrana de nitrocelulosa o de nailon y aplicando sondas marcadas radiactivamente cuya señal emitida permite identificar el ADN específico presente en la muestra. La importancia de esta técnica radica en la identificación de variaciones genéticas específicas entre individuos de una población, detectando diferencias en las longitudes de los fragmentos generados tras la digestión⁵⁰.

PCR ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR)

En la técnica RAPD-PCR no se requieren primers específicos para la secuencia objetivo. Se emplean primers cortos de unos 10 nucleótidos que se unen de manera aleatoria en el ADN molde, generando un patrón de bandas tras la amplificación. Estos patrones reflejan las variaciones genéticas como mutaciones o reordenamientos en el ADN, y permiten construir árboles filogenéticos o dendrogramas de similitud genética entre organismos⁵⁰.

PCR múltiple

Llamada también como PCR multiplex, es una variante de la técnica convencional que permite amplificar múltiples secuencias dianas de ADN en una única reacción, utilizando varios pares de iniciadores. Esta modalidad no solo optimiza tiempo y recursos en el laboratorio, sino que también incrementa la eficiencia experimental sin sacrificar precisión⁵⁰. Existen dos tipos principales de reacciones de PCR múltiple:

- Reacción de un solo molde: Se emplea un solo ADN molde junto con varios pares de primers para amplificar diferentes regiones específicas del mismo⁵⁰.
- Reacción de múltiples moldes: Utiliza distintos moldes de ADN junto con múltiples sets de primers. No obstante, esta modalidad puede presentar complicaciones como hibridaciones cruzadas entre los diferentes moldes, lo que podría generar resultados confusos si no se controla adecuadamente⁵⁰.

Tabla 3. Tipos de técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

| Tipo de PCR | Principio básico | Objetivo principal |
|---------------------------|---|---|
| Convencional | Amplificación in vitro de un segmento específico de ADN mediante ciclos térmicos. | Obtener múltiples copias de una secuencia diana para análisis posterior. |
| PCR en tiempo real (qPCR) | Cuantificación de la amplificación en tiempo real mediante señales fluorescentes. | Cuantificar ADN durante la reacción; útil en diagnóstico y estudios de expresión. |
| PCR anidada | Dos rondas de PCR usando un par de primers externos e internos. | Incrementar la precisión de la amplificación reduciendo falsos positivos. |

| | | |
|------------------------------|---|--|
| PCR-RFLP | Amplificación seguida de digestión enzimática y análisis de los fragmentos generados. | Detectar polimorfismos y variaciones genéticas entre muestras. |
| RAPD-PCR | Amplificación aleatoria del ADN mediante primers cortos no dirigidos. | Evaluar diversidad genética sin necesidad de conocer secuencias específicas. |
| PCR múltiple (Multiplex-PCR) | Amplificación simultánea de varias secuencias en una única reacción. | Detectar múltiples blancos genéticos en un solo ensayo de PCR. |

Fuente: Different types of PCR techniques and its applications⁴⁹, Polymerase Chain Reaction³⁸ y Different types of PCR⁵⁰.

Herramientas bioinformáticas

Desde el desarrollo de la PCR se han desarrollado diversos softwares que permiten el diseño, análisis y la selección de cebadores mediante un análisis informático, algunos de ellos son de código abierto lo que permite que cualquier persona sea capaz de utilizar estas herramientas bioinformáticas. Para el diseño de cebadores un programa conocido es Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) que usando la estructura de código del programa Primer3 permite la búsqueda de cebadores, es gratuito y se lo puede encontrar en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)⁴⁰.

El programa Primer3 constituye la base de múltiples herramientas bioinformáticas, ya que fue uno de los primeros softwares de código abierto desarrollados específicamente para el diseño de cebadores. Su interfaz web continúa siendo una de las más utilizadas por investigadores en todo el mundo. No obstante, para aprovechar plenamente sus funcionalidades, el usuario debe contar con conocimientos avanzados en bioinformática. Esto se debe a que, en aplicaciones que requieren cálculos complejos o parámetros específicos, Primer3 suele necesitar el apoyo de programas complementarios para su correcto funcionamiento.³⁷.

MFEprimer es una herramienta bioinformática especializada en el control de calidad de cebadores utilizados en reacciones de PCR. Se trata de un programa gratuito accesible tanto desde un servidor web (<https://m4.igenetech.com/>) sin necesidad de registro como desde una línea de comandos. Esta herramienta evalúa diversos parámetros críticos relacionados con

el diseño y validación de cebadores, con el objetivo de garantizar su especificidad y evitar la generación de productos no deseados⁵¹.

Entre sus principales funciones se encuentra la detección de amplicones inespecíficos, la predicción de estructuras secundarias como dímeros (autodímeros y dímeros cruzados) y horquillas (*hairpins*), así como la verificación de si los sitios de unión contienen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los cuales pueden afectar la eficiencia de hibridación entre distintas muestras. La herramienta acepta como única entrada obligatoria la secuencia del iniciador, permitiendo trabajar con archivos en formato FASTA o con múltiples secuencias en línea⁵¹.

En el análisis de amplicones, se utiliza por defecto el genoma humano GRCh37/hg19 como plantilla, aunque puede modificarse. MFEprimer calcula automáticamente parámetros como la longitud del cebador, el contenido de GC, el T_m , ΔG y dos indicadores: PBN y MBN (número de sitios de unión del cebador en las hebras positiva y negativa del ADN)⁵¹.

Otro programa útil es NetPrimer que a diferencia de otros softwares usa la fórmula del Nearest Neighbor Thermodynamic para el cálculo de la temperatura melting³⁵. Aplicaciones no muy conocidas consideradas de nicho pero que tienen el mismo fin son: PrimerX, RJPrimers, AcePrimer, PrecisePrimer, MultiMPrimer3 y AmplifX³⁷.

CAPÍTULO III. METODOLOGIA.

Según el enfoque

De tipo mixto, ya que combina el análisis cualitativo de información bibliográfica sobre iniciadores utilizados en la PCR para la detección de Citomegalovirus y el estudio cuantitativo de valores de los parámetros obtenidos mediante herramientas bioinformáticas.

Según el nivel

De nivel descriptivo, ya que se analizan y detallan las características de las variables objeto de estudio que en este caso son los cebadores publicados en la bibliografía utilizados en la detección de Citomegalovirus mediante PCR, así como el análisis de los mismos para identificar las secuencias más óptimas.

Según el diseño

De diseño documental y no experimental. La investigación se centró en la recopilación de literatura científica actualizada sin la necesidad de la manipulación de variables, con el propósito de crear una lista para una base de datos sobre los iniciadores aplicados en PCR para la detección de Citomegalovirus.

Según el corte

De corte transversal, dado que el estudio se desarrolló en un único momento temporal buscando información y bibliografía disponible entre los años 2015 a 2025. Esto permitió compilar y analizar la información de forma puntual, optimizando los recursos disponibles y ofreciendo un panorama claro del estado actual sobre los iniciadores de PCR en la detección de Citomegalovirus mediante herramientas bioinformáticas.

Según la cronología de los hechos

De tipo retrospectivo, ya que la investigación implica el análisis de información generada previamente al inicio del estudio, lo que permitió establecer conclusiones basadas en evidencias acumuladas durante los últimos cinco años.

Población

La población está constituida por artículos científicos principalmente obtenidos de la base de datos PubMed haciendo uso de palabras clave y operadores booleanos que permitieron ampliar o restringir los resultados de una búsqueda. El total de artículos revisados fue de 51 artículos, estas fuentes contienen información relevante sobre la aplicación de iniciadores en la detección de Citomegalovirus mediante PCR.

Muestra

De la población total, se seleccionó una muestra atendiendo a criterios de selección, además de la aplicación de un muestreo no probabilístico por conveniencia. La muestra finalmente estuvo compuesta por 18 artículos científicos de los cuáles se obtuvieron 50 pares de primers aplicados en PCR para la identificación de HCMV.

Criterios de inclusión

- Estudios que incluyan cebadores utilizados en la amplificación del ADN de Citomegalovirus
- Artículos redactados en idioma inglés o español
- Publicaciones científicas relevantes que documenten el uso de cualquier variante de la técnica de PCR aplicada a la detección del Citomegalovirus humano

Criterios de exclusión

- Estudios que no incluyan la secuencia específica de los primers utilizados, o que solo mencionen el nombre del gen o técnica sin detallar los oligonucleótidos
- Artículos que reportan cebadores con una longitud inferior a los 10 nucleótidos
- Publicaciones en las que los cebadores contienen nucleótidos degenerados

Métodos y técnicas

Técnica: Observación

El método que se utilizó fue el análisis de la información documental a través de la revisión de artículos publicados en revistas científicas, datos que fueron recolectados en una hoja electrónica de Excel para el procesamiento y elaboración de tablas descriptivas. Se utilizaron hojas de cálculo de Excel para la organización de la información que se recolectó y también se usaron programas bioinformáticos direccionados al análisis y diseño de cebadores para la obtención de los parámetros de los iniciadores investigados.

Procesamiento de datos

Realizado mediante la recopilación de información disponible en la literatura científica actual. Los iniciadores recopilados fueron organizados y analizados primero por herramientas básicas como Word y Excel, para posteriormente utilizar programas bioinformáticos como MFEprimer en la obtención de los valores correspondientes a los parámetros técnicos. Estos resultados fueron complementados con datos procesados por Primer-BLAST. Por último, se hizo un análisis comparativo entre los valores con el fin de categorizar los iniciadores y establecer una lista final de aquellos considerados como óptimos.

Consideraciones éticas

Al carecer de manipulación de muestras y tratarse de una revisión bibliográfica, el presente trabajo no requirió de la participación de un comité de ética.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se exponen los resultados obtenidos a partir del análisis de 50 pares de cebadores empleados para la detección de Citomegalovirus humano mediante PCR. Las secuencias fueron recopiladas de literatura científica y posteriormente evaluadas utilizando herramientas bioinformáticas como MFEprimer v4.0 y Primer-BLAST.

Iniciadores aplicados en la técnica de PCR para la detección de Citomegalovirus

La recopilación bibliográfica permitió conformar una lista representativa para una base de datos de cebadores diseñados para la detección molecular del HCMV mediante PCR. Estos abarcan regiones génicas del virus de gran interés diagnóstico, incluyendo genes estructurales y regulatorios, y se encuentran respaldados por artículos científicos que describen su validación experimental. En la **Tabla 4** se detallan las secuencias recopiladas, su región génica blanco, el sitio de amplificación, el número de acceso en la base de datos de GenBank de las cepas con las cuales se halló alineamiento y las fuentes bibliográficas asociadas.

Tabla 4. Iniciadores empleados en PCR para la detección de HCMV.

| Nº | Regiones génicas | Cepa de HCMV (representativo) ^a | Accession GenBank | Iniciador F (Forward) | Iniciador R (Reverse) | Sitio de amplificación | Autores |
|----|---------------------|---|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|
| 1 | UL111A | Merlín | NC_006273.2 | CATCATAACATAAAGGACCACCTAC | CTGAGACAGCCGACTAATCAC | 16988-17649 | Berg C. et al, 2019 ⁵² |
| 2 | UL146 | Toledo | GU937742.2 | CCGGAATACCGGATATTACG | CAGCACTTCCTGACGATTG | 185398-186119 | |
| 3 | US28 | AD169 | X17403.1 | CCGCTCATATAGACCAAACC | AGGGAGTTGTGATCTAGGAG | 136630-137016 | |
| 4 | gB gene | AD169 | X17403.1 | ACAGACACAAACAGCACCCA ^b | TAAGGTGACGACAGGTTGGC ^b | 979-1428 | Noorbakhsh S. et al, 2020 ⁵³ |
| 5 | IRL 11 | AD169 | FJ527563.1 | GTACACGCACGCTGGTTACC | GTAGAAAGCCTCGACATCGC | 8893-9149 | Khodamoradi S. et al, 2021 ⁵⁴ |
| 6 | UL55 (gB1) | AD169 | X17403.1 | CGCGGAATCGGTTTGTGT | CGAGAAGAATGTCACCTGCC | 81879-82479 | Dong N. et al, 2020 ⁵⁵ |
| 7 | UL75 (gH1) | CINCY+ Towne | GU980198.1 | TGTTACGGAGGCTGCTGTTGT | GACGCGACTTTTGTAAACCG | 114323-114656 | |
| 8 | UL73 (gN1) | AD169 | X17403.1 | TCCCAGAATCGCTGAAAA | CACCCACGTATGTAAACCTTAC | 105639-106213 | |
| 9 | UL55(gN2) | Cepa transgénica Towne | GQ121041.1 | TGGTGTGATGGAGTGGAAC | TAGCCTTTGGTGGTGGTTGC | 106575-106988 | Vasiljevic T. et al, 2024 ⁵⁶ |
| 10 | IE | Merlín | NC_006273.2 | CGCTCACATGCAAGAGTTAATCTTC | AACTCGGTAAGTCTGTTGACATGTATG | 173618-173724 | |
| 11 | UL97 | Merlín | NC_006273.2 | TCCTCCGCACTTCGGTCTCG | TACTCGGGGAACAGTTGACG | 146807-148926 | |
| 12 | UL54 | Merlín | NC_006273.2 | AGTCCACGCCGCCTCATCTC | TCGTAAGCTGTCAGCCTCTCAC | 81168-85045 | Torii Y. et al, 2022 ⁵⁸ |
| 13 | UL97 | Merlín | NC_006273.2 | GCAATCCCCGTCACGCCTCTG | AACCGTCACGTTCCGCGTCC | 141686-143944 | |

| | | | | | | | |
|----|---------|--------|-------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|---|
| 14 | UL123 | Merlin | NC_006273.2 | TCCCGCTTATCCTCAGGTACA | TGAGCCTTTCGAGGACATGAA | 173311-173394 | Rozman B. et al, 2022 ²⁹ |
| 15 | UL83 | Merlin | NC_006273.2 | CCAGCGTGACGTGCATAAAG | TCGTGTTTCCACCAAGGAC | 121603-121785 | |
| 16 | UL99 | Merlin | NC_006273.2 | GGGAGGATGACGATAACGAG | TGCCGCTACTACTGTCGTTT | 145860-145943 | |
| 17 | UL32 | Merlin | NC_006273.2 | GGTTTCTGGCTCGTGGATGTCG | CACACAACACCGTCGTCCGATTAC | 41015-41151 | |
| 18 | RNA 2.7 | AD169 | X17403.1 | TCCTACCTACCACGAATCGC | GTTGGGAATCGTCGACTTTG | 185403-185519 | Tai-Schmiedel J. et al, 2020 ⁵⁹ |
| 19 | RNA4.9 | Merlin | NC_006273.2 | GGGCCTCTGAAAACCTATAAAACCC | ATGGTGCTCCAGGGCGGT | 94282-94472 | |
| 20 | RNA4.9 | Merlin | NC_006273.2 | GGTGACTTTCTCGACGGTTC | ACGCTCCTAGGCTCTCGAC | 95903-95995 | |
| 21 | RNA4.9 | Merlin | NC_006273.2 | GTAAGACGGGCAAATACGGT | AGAGAACGATGGAGGACGAC | 97725-97830 | |
| 22 | UL123 | Merlin | NC_006273.2 | TCCCGCTTATCCTCAGGTACA | TGAGCCTTTCGAGGACATGAA | 173311-173394 | |
| 23 | UL99 | Merlin | NC_006273.2 | GGGAGGATGACGATAACGAG | TGCCGCTACTACTGTCGTTT | 145860-145943 | |
| 24 | RNA1.2 | AD169 | X17403.1 | TGACAACGCCTTGTATAGCC | AGACTGTCGTGGTTCGATGAA | 182434-182535 | |
| 25 | RNA2.7 | Merlin | NC_006273.2 | TCCATGTTTCCATCCTTTCA | AATCAGCGTTGCAGTAGTCG | 3275 - 3390 | |
| 26 | UL32 | Merlin | NC_006273.2 | GGTTTCTGGCTCGTGGATGTCG | CACACAACACCGTCGTCCGATTAC | 41015 - 41151 | Rajendiran P. et al, 2021 ⁶⁰ |
| 27 | MIE | AD169 | M21295.1 | TGTGTTTAGGCCCCGAGACAC | TGAGGGATTCTTCGGCCAAC | 1655 - 1782 | |
| 28 | UL83 | Merlin | NC_006273.2 | GGACACAACACCGTAAAGC | GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA | 121512-121793 | Meyers L. et al, 2017 ⁶¹ |
| 29 | UL123 | AD169 | M21295.1 | TTACCAAGAACTCAGCCTTCCCTAAGACCACCA | GAACTCACTTAAGAGAGAGATGCCCCCGTA | 2406 - 2686 | Chu C. et al, 2023 ⁶² |
| 30 | UL124 | AD169 | M21295.1 | ACCACCAATGGCTGCAGTCAGGCCATGGCGGCA | CATGTAGTGAGGATATCCATAAAATATGTGAT | 2432 - 2598 | |
| 31 | UL125 | AD169 | M21295.1 | GGCTAAGGCCCGTGCTAAAAAGGATGAA | ATAAATATGTGATCAATGTGCGTGAGC | 2332 - 2580 | |

| | | | | | | | |
|----|------------------------|------------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------|---|
| 32 | UL97 | Merlin, aislado RHCMV1871 | KU221100 | ACCGTCTGCGCGAATGTTA | TCGCAGATGAGCAGCTTCTG | 143285-143351 | Svetoslav N. et al, 2016 ⁶³ |
| 33 | circUS12 ^c | Merlin | NC_006273.2 | GCTCCAGAAGGGCAGTGTATCG | CCTATGTCCTGTCATCCATGCTCTG | ADN circular | |
| 34 | circUL55 ^c | Merlin | NC_006273.2 | AAGTGGTGTGGATGTAAGCGTAGC | TGAACGTGCGGACTCGGTGAT | ADN circular | |
| 35 | circUL89 ^c | Merlin | NC_006273.2 | CGATGGAGGTCTGCGAGAGGAA | AGGGACGACAGGTGTTGCTTGT | ADN circular | Deng J. et al, 2022 ⁶⁴ |
| 36 | circUL89A ^c | Merlin | NC_006273.2 | GGATGATGAACCAAGTCTTG | CGCCTTAATAATACAGCTACG | ADN circular | |
| 37 | circUL89B ^c | Merlin | NC_006273.2 | CTACGATGACCACGAAGTC | CAGGTGTTGCTTGTCTCC | ADN circular | |
| 38 | UL83 | VR1814 | GU179289.1 | GGACACAACACCGTAAAGC | GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA | 121322-121603 | Hernandez N. et al, 2024 ⁶⁵ |
| 39 | gN up/gN lo | Towne | GQ121041.1 | TGGTGTGATGGAGTGGAAC | TAGCCTTTGGTGGTGGTTGC | 106575-106988 | Vankova O. et al, 2023 ⁶⁶ |
| 40 | UL73 | BE/37/2011 | KP745723.1 | AGTCGATTCGGTCGGTCAAC | CCACCCTCAATAGCCTTTGGT | 106325-106787 | |
| 41 | UL74 | BE/17/2010 | KP745727.1 | TGGTGTGATGGAGTGGAAC | AACGGTAGATGAGCAGCAAAACGAC | 107053-108954 | |
| 42 | gO | AD169 | FJ527563.1 | GCTCATGGCGTTAACCAGGTA | ATAATCGTCCTTGGAGGGGC | 107788-108368 | |
| 43 | gO | Towne | FJ616285.1 | GCTCATGGCGTTAACCAGGTA | ACTGCAAGAACTAGCGTCAA | 107359-107878 | |
| 44 | gO | Merlin | AY446894.2 | GCTCATGGCGTTAACCAGGTA | CAGTACTCAACTCCGAAAACCA | 108138-108489 | Jiang -J. et al,2017 ⁶⁷ |
| 45 | gO | AD169 | FJ527563.1 | GCTCATGGCGTTAACCAGG | TAATCGTCCTTGGAGGGGCT | 107788-108367 | |
| 46 | gO | TB40/E clon Lisa | KF297339.1 | GCTCATGGCGTTAACCAGG | AGGCAACACGTTAAAAATCTTACT | 108541-109002 | |
| 47 | gO | U8 | GU179288.1 | GCTCATGGCGTTAACCAGG | ATAATCAAACGGCTCAGAAAATCA | 108073-108380 | |
| 48 | IE | AD169 | FJ527563.1 | TTTAGCACGGGCCTTAGCCT | GCTGCATGATGTGAGCAAGGG | 172849-172918 | |

| | | | | | | |
|-----------|---------|--------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|
| 49 | UL34 | Merlin | NC_006273.2 | TGAACTTCATCATCACCACCCGAGACT | CCTTGTACGCTTTGGAAATCGAGCCTG | 45142-45246 |
| 50 | UL 80.5 | Merlin | NC_006273.2 | CGGCTAGTGTCGTGTTAGC | CACAAAAATCCGCCGATTCAGAT | 118505-118602 |

____Cássia F. et al, 2020⁶⁸

Nota:**a:** Se muestra un acceso de GenBank representativo para cada cebador; algunos cebadores pueden alinearse con múltiples cepas de HCMV;

b: Cebadores externos de una PCR anidada; **c:** Cebadores utilizados en la amplificación de ARN circular transcriptor del HCMV.

Análisis

La **Tabla 4** presenta una lista conformada por 50 pares de iniciadores junto a las regiones target a las que se dirigen, incluyendo genes como UL55, UL83, UL97, IE, entre otros. Varias de estas regiones corresponden a genes relevantes en el ciclo replicativo de CMV, por lo cual muchos de ellos se consideran, dentro de la literatura, como altamente conservados. Una observación relevante es la amplia diversidad de cepas virales incluidas, tales como Merlin, AD169, Towne, VR1814, TB40/E, Toledo, CINCY+Towne y otras, siendo la cepa Merlin aquella que aparece con más frecuencia al estar presente en 22 de los 50 pares recopilados.

Esta diversidad aporta un valor agregado al análisis, ya que permite considerar la variabilidad genómica natural del HCMV, un factor crucial dado su alto grado de polimorfismo. Las secuencias correspondientes fueron contrastadas con sus respectivos accesos a la base de datos GenBank, lo cual garantiza la trazabilidad y validez de la información genética analizada. Asimismo, se destaca la inclusión de iniciadores dirigidos a genes correspondientes a ARNs virales no codificantes como RNA1.2, RNA2.7 y RNA4.9, cuya relevancia ha sido recientemente reconocida en el contexto de la regulación viral y la replicación⁵⁹.

Discusión

En el diagnóstico molecular de HCMV resulta importante diseñar primers dirigidos a regiones altamente conservadas del genoma viral, lo que garantiza la detección del virus independientemente de la cepa o variante y disminuye el riesgo de falsos negativos. En este contexto, Liu M-h et al.⁶⁹, diseñaron iniciadores dirigidos a la región UL83, de 1683 pb, ampliamente reconocida por su grado de conservación, empleando el software Premier 5.0 y validando posteriormente su especificidad a través de BLAST.

Mientras que Bilenoğlu O. et al.⁷⁰ orientaron el diseño de sus primers hacia las zonas más conservadas del gen UL54 el cual codifica la ADN polimerasa viral. Este gen constituye un blanco bien caracterizado para la detección de HCMV en muestras clínicas, y su secuenciación completa permitió identificar los segmentos más conservados, sobre los

cuales se seleccionaron los sitios de unión para primers y sondas en un ensayo de qPCR destinado a cuantificar el ADN viral presentes en el suero de pacientes infectados.

En adición, el estudio de Ávila da Rocha A. et al.⁷¹ reporta el diseño de cebadores dirigidos al gen UL97, específicamente en el dominio de la quinasa viral pUL97. Estos cebadores mostraron un alineamiento adecuado en regiones conservadas del dominio a lo largo de distintas cepas de referencia de HCMV (Merlin, Towne, VR1814, Toledo, TB40/E y AD169). A pesar de que en este gen se describen mutaciones puntuales asociadas a resistencia a ganciclovir, las secuencias adyacentes al sitio de interés permanecen lo suficientemente conservadas para permitir una amplificación confiable mediante PCR.

La recopilación de cebadores efectuada en este estudio muestra que varios de ellos se dirigen a regiones genómicas conservadas del HCMV, en concordancia con las zonas de conservación descritas por Liu M-h et al.⁶⁹, Bilenoglu O. et al.⁷⁰ y Ávila da Rocha A. et al.⁷¹ Esta correspondencia se ve respaldada por el análisis de Charles O. et al.⁷², quienes elaboraron un mapa circular del genoma viral en el que las barras rojas representan áreas de heterocigosidad, es decir polimorfismo, mientras que las secciones sin sombreado azul señalan porciones monoalélicas altamente conservadas, que abarcan cerca del 86 % del genoma (ver **Anexo 1**).

Parámetros de los iniciadores aplicados en la detección de Citomegalovirus a través de PCR

En la **Tabla 5** se presentan los parámetros técnicos obtenidos a partir del análisis bioinformático de los 50 pares de iniciadores recopilados para la detección de Citomegalovirus mediante PCR. Para este proceso se emplearon herramientas como MFEprimer 4.0 y Primer BLAST.

Tabla 5. Parámetros técnicos de iniciadores para detección de HCMV.

| N° | Orientación de la Secuencia | Longitud (pb) | Base en el extremo 3' | Contenido GC (%) | Promedio Tm (°C) | ΔG (kcal/mol) | PBN* | MBN* | Potenciales amplificaciones | | Dímero | Horquilla |
|----|-----------------------------|---------------|-----------------------|------------------|------------------|-----------------------|------|------|-----------------------------|---------------------|--------|-----------|
| | | | | | | | | | Cepa | Tamaño del amplicón | | |
| 1 | F | 25 | C | 40,00 | 58,25 | -23,12 | 21 | 30 | Towne | 662 ^a | 0 | 0 |
| | R | 21 | C | 52,38 | | -22,00 | 2 | 9 | Merlin | 662 ^a | | |
| 2 | F | 21 | G | 52,38 | 57,59 | -21,72 | 14 | 16 | Merlin | 727 ^a | 0 | 0 |
| | R | 19 | G | 52,63 | | -20,19 | 13 | 9 | Towne | 704 ^a | | |
| 3 | F | 20 | C | 50,00 | 56,03 | -20,19 | 13 | 19 | Merlin | 387 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | G | 50,00 | | -19,77 | 15 | 6 | Towne | 387 ^a | | |
| 4 | F | 20 | A | 50,00 | 60,52 | -22,03 | 29 | 24 | Merlin | 450 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -22,16 | 38 | 31 | | | | |
| 5 | F | 20 | C | 60,00 | 60,71 | -23,37 | 21 | 19 | Merlin | 257 ^a | 1 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -21,92 | 52 | 27 | | | | |
| 6 | F | 20 | T | 55,00 | 61,19 | -23,82 | 49 | 18 | AD169 | 601 ^b | — | — |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -21,68 | 20 | 38 | | | | |
| 7 | F | 21 | T | 52,38 | 61,56 | -23,74 | 103 | 67 | Merlin | 331 ^a | — | — |
| | R | 20 | G | 55,00 | | -22,50 | 11 | 11 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|----|---|-------|-------|--------|----|----|--------|-------------------|---|---|
| 8 | F | 18 | A | 44,44 | 55,73 | -18,28 | 58 | 54 | Towne | 569 ^a | — | — |
| | R | 22 | C | 45,45 | | -21,64 | 2 | 13 | | | | |
| 9 | F | 19 | C | 52,63 | 59,41 | -20,19 | 19 | 14 | Towne | 414 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -22,43 | 26 | 25 | | | | |
| 10 | F | 25 | C | 44,00 | 61,54 | -25,49 | 17 | 8 | Merlin | 107 ^a | 0 | 0 |
| | R | 27 | G | 40,74 | | -26,68 | 13 | 38 | | | | |
| 11 | F | 20 | G | 65,00 | 62,22 | -24,30 | 30 | 32 | Merlin | 2119 ^c | — | — |
| | R | 20 | G | 55,00 | | -21,94 | 7 | 11 | | | | |
| 12 | F | 20 | C | 65,00 | 63,74 | -24,40 | 27 | 10 | Merlin | 3882 ^d | — | — |
| | R | 22 | C | 54,55 | | -24,39 | 11 | 28 | | | | |
| 13 | F | 21 | G | 66,67 | 66,32 | -25,94 | 25 | 14 | Merlin | 2259 ^d | — | — |
| | R | 20 | C | 65,00 | | -25,33 | 62 | 51 | | | | |
| 14 | F | 21 | A | 52,38 | 60,25 | -22,44 | 45 | 16 | Merlin | 84 ^a | 0 | 0 |
| | R | 21 | A | 47,62 | | -22,22 | 15 | 36 | | | | |
| 15 | F | 20 | G | 55,00 | 60,55 | -22,52 | 20 | 18 | Merlin | 183 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -22,18 | 21 | 26 | Towne | 183 ^a | | |
| 16 | F | 20 | G | 55,00 | 58,85 | -21,02 | 24 | 7 | Merlin | 84 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | T | 50,00 | | -21,94 | 20 | 53 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|---|-------|-------|--------|-----|-----|--------|------------------|---|---|
| 17 | F | 22 | G | 59,09 | 64,45 | -25,45 | 20 | 14 | Merlin | 137 ^a | 0 | 0 |
| | R | 24 | C | 54,17 | | -27,14 | 6 | 12 | Towne | 134 ^a | | |
| 18 | F | 20 | C | 55,00 | 58,54 | -21,74 | 14 | 21 | Towne | 117 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | G | 50,00 | | -21,02 | 8 | 14 | Merlin | 117 ^a | | |
| 19 | F | 25 | C | 48,00 | 63,23 | -25,48 | 12 | 15 | Towne | 191 ^a | 0 | 0 |
| | R | 18 | T | 66,67 | | -22,44 | 10 | 32 | Merlin | 191 ^a | | |
| 20 | F | 20 | C | 55,00 | 60,20 | -21,75 | 8 | 23 | Merlin | 92 ^a | 0 | 0 |
| | R | 19 | C | 63,16 | | -22,14 | 14 | 15 | Towne | 92 ^a | | |
| 21 | F | 20 | T | 50,00 | 58,95 | -21,26 | 11 | 5 | Merlin | 106 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -21,72 | 117 | 114 | Towne | 104 ^a | | |
| 22 | F | 21 | A | 52,38 | 60,25 | -22,44 | 45 | 16 | Merlin | 84 ^a | 0 | 0 |
| | R | 21 | A | 47,62 | | -22,22 | 15 | 36 | | | | |
| 23 | F | 20 | G | 55,00 | 58,85 | -21,02 | 24 | 7 | Merlin | 84 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | T | 50,00 | | -21,94 | 20 | 53 | | | | |
| 24 | F | 20 | C | 50,00 | 58,87 | -21,26 | 22 | 19 | Towne | 102 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | A | 50,00 | | -21,60 | 39 | 20 | Merlin | 102 ^a | | |
| 25 | F | 20 | A | 40,00 | 57,07 | -19,28 | 7 | 11 | Towne | 116 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | G | 50,00 | | -21,78 | 12 | 8 | Merlin | 116 ^a | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|---|-------|-------|--------|----|----|--------|------------------|---|---|
| 26 | F | 22 | G | 59,09 | 64,45 | -25,45 | 20 | 14 | Merlin | 137 ^a | 0 | 0 |
| | R | 24 | C | 54,17 | | -27,14 | 6 | 12 | Towne | 134 ^a | | |
| 27 | F | 20 | C | 55,00 | 60,52 | -22,16 | 42 | 33 | Towne | 128 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -22,07 | 21 | 24 | | | | |
| 28 | F | 19 | C | 52,63 | 59,50 | -20,43 | 11 | 16 | Merlin | 282 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | A | 55,00 | | -22,92 | 28 | 27 | Towne | 282 ^a | | |
| 29 | F | 33 | A | 48,48 | 68,87 | -35,72 | 48 | 48 | Merlin | 281 ^a | 0 | 0 |
| | R | 30 | A | 50,00 | | -32,01 | 7 | 12 | Towne | 281 ^a | | |
| 30 | F | 33 | A | 63,64 | 69,70 | -43,26 | 22 | 31 | Towne | 167 ^a | 0 | 0 |
| | R | 31 | T | 32,26 | | -27,26 | 18 | 19 | Merlin | 167 ^a | | |
| 31 | F | 28 | A | 50,00 | 64,60 | -30,93 | 6 | 35 | Towne | 249 ^a | 0 | 0 |
| | R | 27 | C | 37,04 | | -26,46 | 23 | 32 | Merlin | 249 ^a | | |
| 32 | F | 19 | A | 52,63 | 60,77 | -21,87 | 14 | 19 | Towne | 67 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | G | 55,00 | | -22,56 | 67 | 53 | Merlin | 67 ^a | | |
| 33 | F | 22 | G | 59,09 | 63,41 | -24,93 | 11 | 33 | — | 226 ^c | — | — |
| | R | 25 | G | 52,00 | | -26,40 | 22 | 22 | | | | |
| 34 | F | 24 | C | 50,00 | 64,30 | -26,14 | 32 | 20 | — | 189 ^c | — | — |
| | R | 21 | T | 57,14 | | -25,03 | 23 | 44 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|---|-------|-------|--------|----|----|------------|-------------------|---|---|
| 35 | F | 22 | A | 59,09 | 64,62 | -25,24 | 21 | 20 | — | 189 ^c | — | — |
| | R | 22 | T | 54,55 | | -25,32 | 10 | 16 | | | | |
| 36 | F | 20 | G | 45,00 | 54,67 | -19,32 | 18 | 11 | — | 2161 ^c | 1 | 0 |
| | R | 21 | G | 42,86 | | -20,12 | 24 | 36 | | | | |
| 37 | F | 19 | C | 52,63 | 55,87 | -19,73 | 24 | 10 | — | 2234 ^c | — | — |
| | R | 18 | C | 55,56 | | -19,31 | 15 | 28 | | | | |
| 38 | F | 19 | C | 52,63 | 59,50 | -20,43 | 11 | 16 | Merlin | 282 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | A | 55,00 | | -22,92 | 28 | 27 | Towne | 282 ^a | | |
| 39 | F | 19 | C | 52,63 | 59,41 | -20,19 | 19 | 14 | Towne | 414 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -22,43 | 26 | 25 | | | | |
| 40 | F | 20 | C | 55,00 | 60,57 | -22,44 | 28 | 14 | BE/37/2011 | 463 ^b | — | — |
| | R | 21 | T | 52,38 | | -22,39 | 10 | 23 | | | | |
| 41 | F | 19 | C | 52,63 | 61,01 | -20,19 | 19 | 14 | Towne | 1863 ^a | 0 | 0 |
| | R | 25 | C | 48,00 | | -27,39 | 34 | 31 | Merlin | 1905 ^a | | |
| 42 | F | 21 | A | 52,38 | 60,34 | -22,90 | 15 | 11 | AD169 | 581 ^b | — | — |
| | R | 20 | C | 55,00 | | -21,60 | 26 | 5 | | | | |
| 43 | F | 21 | A | 52,38 | 59,45 | -22,90 | 15 | 11 | Towne | 520 ^a | 0 | 0 |
| | R | 20 | A | 45,00 | | -20,96 | 2 | 11 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|----|---|-------|-------|--------|----|----|---------------------|------------------|---|---|
| 44 | F | 21 | A | 52,38 | 59,85 | -22,90 | 15 | 11 | Merlin | 352 ^a | 0 | 0 |
| | R | 22 | A | 45,45 | | -22,30 | 43 | 30 | | | | |
| 45 | F | 19 | G | 57,89 | 60,13 | -21,30 | 19 | 8 | AD169 | 580 ^b | — | — |
| | R | 20 | T | 55,00 | | -21,95 | 27 | 13 | | | | |
| 46 | F | 19 | G | 57,89 | 58,63 | -21,30 | 19 | 8 | TB40/E clon Lisa | 462 ^b | — | — |
| | R | 24 | T | 33,33 | | -22,62 | 2 | 16 | | | | |
| 47 | F | 19 | G | 57,89 | 58,57 | -21,30 | 19 | 8 | U8 | 308 ^b | — | — |
| | R | 24 | A | 33,33 | | -22,53 | 17 | 36 | | | | |
| 48 | F | 20 | T | 55,00 | 62,41 | -22,64 | 12 | 6 | Merlin | 70 ^a | 0 | 0 |
| | R | 21 | G | 57,14 | | -23,96 | 10 | 10 | Towne | 70 ^a | | |
| 49 | F | 27 | T | 48,15 | 66,52 | -29,13 | 19 | 21 | Merlin | 105 ^a | 0 | 0 |
| | R | 27 | G | 51,85 | | -30,10 | 19 | 17 | Towne | 105 ^a | | |
| 50 | F | 19 | C | 57,89 | 59,77 | -21,26 | 14 | 15 | Towne | 98 ^a | 0 | 0 |
| | R | 23 | T | 43,48 | | -23,90 | 18 | 42 | Merlin | 98 ^a | | |

Nota: ΔG : Energía libre de Gibbs, **PBN** y **MBN**: número de sitios de unión del cebador en las hebras positiva y negativa del ADN, **a**: Resultado obtenido mediante MFEprimer 4.0, **b**: resultado obtenido mediante Primer BLAST, **c**: resultado extraído del artículo de los autores, **d**: resultado obtenido utilizando el contador de caracteres de Word.

Análisis

La **Tabla 5** presenta el análisis individual de 100 cebadores (50 *forward* y 50 *reverse*) empleados en la detección de HCMV, evaluados en función de sus parámetros técnicos más relevantes. Estos permiten asegurar la especificidad y adecuación de los iniciadores para la eficacia al aplicar la técnica de PCR. Respecto a la longitud de los cebadores, la gran mayoría (91%) se encontró dentro del intervalo ideal de 18 a 25 pb. Cebadores como de los ítems 8 *forward* (18 pb), 19 *reverse* (18 pb) y 37 *reverse* (18 pb), se encuentran en el límite inferior del rango, lo cual sigue siendo aceptable, aunque podría comprometer la especificidad si no se apoya en los valores de otros parámetros igual de importantes. También es posible observar como una gran parte de los cebadores (41%) poseen una longitud de 20 pb mientras que en menor porcentaje se hallan primers de 23, 28, 30 y 31 pb (1% respectivamente).

La base presente en el extremo 3' de los cebadores es otro parámetro relevante, ya que influye directamente en la estabilidad del inicio de la síntesis de la nueva cadena que realiza la ADN polimerasa. En este análisis se observó que la mayoría de cebadores terminan en bases G o C (63%), como en los ítems 1 *forward* y *reverse* (ambos en C), 10 *forward* (C), 12 *forward* y *reverse* (ambos en C) y 33 *forward* y *reverse* (ambos en G), lo cual se considera favorable para una hibridación específica y eficiente. No obstante, algunos cebadores terminan en A o T, como es el caso de los ítems 4, 6, 7, 8, 14, 16, 19, 21-25, 28-32, 34, 35, 38, 40, 42-50 (37%).

Al evaluar las combinaciones de bases en el extremo 3', se identificó que el 40% de los pares de cebadores presentan terminaciones con combinaciones de G y C (GC, GG o CC), por ejemplo, *forward* en G y *reverse* en C, siendo la más frecuente CC (18%). El 60% restante se distribuyó entre terminaciones en A y T, A y C, T y C, T y G, A y A o A y G, con mayor frecuencia en las combinaciones AC y TG (14% en ambos casos). Cabe resaltar que no se registraron terminaciones TT (0%). A partir del análisis, los resultados muestran que un porcentaje considerable de los iniciadores presentan, en al menos uno de los extremos 3', terminaciones distintas a G o C. De acuerdo con lo descrito en la literatura, estas variantes no son óptimas, ya que pueden disminuir la especificidad del apareamiento y generar resultados ineficientes.

En relación con el contenido de guanina-citosina (% GC), se determinó que la mayoría de los cebadores (89%) presentan valores dentro del rango considerado óptimo, comprendido entre 40% y 60% de GC. Este predominio garantiza una hibridación eficiente y la estabilidad necesaria para la unión cebador-molde. En contraste, un 11% de los cebadores se ubicó fuera de dicho rango. Entre los cebadores que superan el límite superior se encuentran el ítem 11 y 12 *forward* (65% de GC) y el ítem 13 *forward* (66,67% de GC), cuyos valores elevados pueden incrementar la temperatura de fusión del cebador durante la PCR. Por el contrario, algunos cebadores mostraron un contenido por debajo del umbral mínimo, como el ítem 30 *reverse* (32,26% de GC) y el ítem 31 *reverse* (37,04% de GC), lo cual podría comprometer la estabilidad de la unión, afectando en consecuencia la eficiencia del apareamiento.

Tal es el caso del ítem 11 y 12 *forward* (65% en GC %) y el ítem 13 *forward* (66,67% en GC %), que al tener valores superiores puede incrementar el punto de fusión del cebador durante la PCR. A la inversa, cebadores con contenido GC por debajo del umbral, como el ítem 30 *reverse* (32,26% en GC %) y el ítem 31 *reverse* (37,04% en GC %), pueden comprometer la estabilidad de la unión, afectando la eficiencia del apareamiento.

Respecto a la temperatura *melting*, se observó que la mayoría de los pares de cebadores (92%) se ubicaron dentro del rango considerado apropiado en este trabajo (42–65 °C), siendo 60 °C el valor más frecuente. Sin embargo, un 8% de los iniciadores superó el límite superior, como en el caso de los cebadores *forward* de los ítems 29 (68,87 °C) y 30 (69,70 °C).

En este análisis, los cebadores evaluados mostraron valores de ΔG comprendidos entre -18 y -43 kcal/mol. Los resultados más recurrentes fueron -22 kcal/mol (28%) y -21 kcal/mol (24%), seguidos de -20 kcal/mol y -25 kcal/mol (9% cada uno), -23 kcal/mol (6%), -19 kcal/mol (5%), -24 kcal/mol (4%), -26 kcal/mol (4%), -27 kcal/mol (4%), -30 kcal/mol (2%), -18 kcal/mol (1%), -29 kcal/mol (1%), -32 kcal/mol (1%), -35 kcal/mol (1%) y -43 kcal/mol (1%). En consecuencia, puede afirmarse que el umbral de ΔG adoptado en este estudio excluye, en su totalidad, los valores registrados en el conjunto de datos analizado. Estos resultados, al ubicarse en rangos significativamente negativos especialmente en casos críticos como del ítem 29 *forward* (-35 kcal/mol) e ítem 30 *forward* (-43,26 kcal/mol), demuestran que las estructuras secundarias son muy estables y podrían competir con la unión

del cebador al molde, lo que afecta a la especificidad y estabilidad del proceso de amplificación.

No obstante, al considerar los estudios que incluyeron electroforesis en gel de agarosa, se observó que el cebador correspondiente al ítem 41 *reverse*, con una energía libre de Gibbs de -27,39 kcal/mol, no mostró alteraciones en la definición ni en la nitidez de las bandas obtenidas. En consecuencia, y conforme a la evidencia reportada por el autor de dicho trabajo, este valor puede considerarse un umbral compatible con una buena calidad de visualización en gel, al menos dentro de las condiciones descritas en esa publicación.

Los valores de PBN y MBN reflejan cuántos sitios potenciales pueden ser amplificados en el genoma objetivo, no obstante, dentro de la literatura a fecha de culminación del estudio, no fue posible encontrar un rango o valor que permita determinar si un cebador es específico o no de acuerdo a estos parámetros. Por lo tanto, no es posible realizar un análisis comparativo entre los valores resultantes de estos criterios basándose solamente en la bibliografía, no obstante, cabe destacar que de los cebadores recopilados se observó que el valor de PBN=19, MBN= 11 y MBN=14 fueron los más frecuentes, alcanzando un 8% cada uno. También es relevante mencionar que dos datos de PBN superaron un valor de 100 (ítem 7 *forward* PBN = 103 e ítem 21 *reverse* PBN = 117) y en MBN el caso fue uno solo (ítem 21 *reverse* MBN = 114), lo que indica una alta probabilidad de generar múltiples productos amplificados, comprometiendo la especificidad de los cebadores.

Por otra parte, al examinar los cebadores cuyos estudios incluyeron electroforesis en gel de agarosa, se observa que incluso con un valor de PBN = 52 (ítem 5 *reverse*) la definición de las bandas no presentó alteraciones, manteniéndose nítidas y bien delimitadas. De igual modo, en el caso del ítem 47 *reverse*, con un MBN = 36, la calidad de la visualización en el gel tampoco se vio comprometida. Estos representan los valores más elevados reportados entre los cebadores analizados que contaban con evidencia de gel, sin que ello afectara la claridad de las franjas obtenidas.

Referente al tamaño del amplicón, de acuerdo a la literatura revisada este valor debe estar comprendido entre 80 y 200 pares de bases para lograr una amplificación eficiente y una visualización clara mediante técnicas como electroforesis. En este análisis, 18 ítems

cumplieron este criterio de forma estricta, entre los cuales se encuentran los ítems 10, 14-27, 30 y 49-50 siendo así que los amplicones formados por estos ítems conforman un 44,4% del total. Resulta importante mencionar que los ítems 12 y 13 al momento de determinar el amplicón mediante MFEprimer y BLAST no fue posible encontrar posibles amplicones, por lo cual se empleó la herramienta de búsqueda de Word así como la función de conteo de caracteres para identificar el rango de amplificación esperado, mientras que los ítems 11 y 33-37 usan la información proporcionada por los autores del artículo correspondiente dado que al introducir los pares de cebadores en las herramientas bioinformáticas no se obtuvieron resultados y en el caso especial de los ítems 33-37, debido a limitaciones del estudio no fue posible adquirir programas de pago capaces de analizar ARN circular.

En cuanto a las estructuras secundarias, un 96% de los cebadores no presentan formación de horquillas o dímeros, lo que sugiere que la viabilidad de interferencia durante la amplificación es baja. El 4% restante que corresponde a los ítems 5 y 36, presentaron un dímero probable, no obstante, este valor debe interpretarse y considerarse en conjunto con los demás parámetros disponibles para realizar la selección final de cebadores.

Discusión

Autores como Zeng H, et al.⁷³ han señalado que, a pesar de existir múltiples programas para la evaluación *in silico* de iniciadores, tales como Ultiplex, NGS-PrimerPlex, MPprimer, Oli2go, MPD, MFEprimer, PrimerMapper y BatchPrimer3, la mayoría presenta limitaciones en funcionalidad o accesibilidad, por ejemplo, estos programas realizan la selección de cebadores de acuerdo en una estrategia de filtrado lo que puede llevar a fallos en el diseño. En contraste, Wang K, et al.⁵¹ destacan que MFEprimer-3.0 incorpora algoritmos optimizados capaces de predecir con precisión la especificidad y la estabilidad de la unión. Los resultados de este trabajo respaldan lo expuesto por Wang K, et al.⁵¹ dado que MFEprimer permitió identificar cebadores con parámetros acordes con los rangos recomendados en la literatura y, al mismo tiempo, comprobó limitaciones en otros, como la presencia de estructuras secundarias desfavorables.

Bustin S, et al.⁷⁴ señalan que la longitud óptima de un cebador se sitúa entre 18 y 24 pb, ya que con 18 bases la probabilidad de que la secuencia se repita al azar en el genoma es

extremadamente baja. De manera ilustrativa, una secuencia de 4 bases aparece en promedio una vez cada $4^4 = 256$ combinaciones; por lo tanto, con 18 bases tendría una frecuencia estimada de 1 cada 4^{18} , es decir, aproximadamente $6,8 \times 10^{10}$, cifra que equivale a unas veinte veces el tamaño del genoma humano. Este rango coincide con lo descrito por Sharma M.⁷⁵, quien también propone un rango de 18 a 24 pb.

En el presente estudio se empleó un rango ligeramente más amplio, de 18 a 25 pb, tal como sugieren Masnaini M, et al.³⁶, aunque este valor difiere de los reportados por otros autores citados en este trabajo, como Mardalisa S, et al.³⁵ y Asif S, et al.³², y de otros estudios como en el caso de Fulghum B, et al.⁷⁶ quienes proponen un intervalo diferente. Pese a estas variaciones, Bustin S, et al.⁷⁴ y Masnaini M, et al.³⁶ coinciden en que a mayor longitud del iniciador, aumenta el riesgo de formación de estructuras secundarias y se reduce la especificidad de la amplificación. A su vez, Bustin S, et al.⁷⁴ añaden que el uso de iniciadores más largos puede justificarse únicamente en situaciones particulares, por ejemplo cuando se incorporan secuencias adicionales, como sitios de restricción o promotores, o cuando se espera heterogeneidad en la región blanco, con el fin de compensar posibles desajustes.

Respecto al contenido de GC, Bustin S, et al.⁷⁴ sugieren un valor de referencia cercano al 50%, mientras que Masnaini M, et al.³⁶, Mardalisa S et al.³⁵, Asif S, et al.³², Sharma M⁷⁵ y Fulghum B, et al.⁷⁶ coinciden en un rango más amplio, de 40–60 %, criterio adoptado en este trabajo donde un 89% de los iniciadores se hallan dentro de este rango. Bustin S, et al.⁷⁴ y Masnaini M, et al.³⁶ advierten que porcentajes superiores pueden generar uniones excesivamente fuertes y favorecer amplificaciones inespecíficas durante los primeros ciclos de PCR. En el caso de la terminación en el extremo 3', Sharma M⁷⁵ y Bustin S, et al.⁷⁴ recomiendan que los iniciadores concluyan en G o C, pero sin más de cuatro repeticiones consecutivas de estas bases para evitar auto complementariedad y formación de autodímeros. Asimismo, la ausencia de estructuras secundarias como dímeros y horquillas es un requisito que comparten Mardalisa S, et al.³⁵ y Fulghum B, et al.⁷⁶.

En cuanto a la energía libre de Gibbs, la literatura no establece un rango universal para la hibridación cebador–molde, aunque se acepta que valores más negativos reflejan una interacción más estable. Yuan J, et al.⁷⁷, al desarrollar Ultiplex, validaron experimentalmente un umbral de -10 kcal/mol como predictor fiable de amplificación específica. En su

experimento, diseñaron cinco conjuntos de *primers* con diferentes valores de corte de ΔG y evaluaron su tasa de amplificación precisa. Los resultados mostraron que los *primers* con un valor de ΔG superior a -10 kcal/mol tuvieron una tasa de amplificación precisa del 100%. En contraste, para los *primers* con valores de ΔG en los rangos de -10 a -11, -11 a -12, -12 a -13 y menores de -13 kcal/mol, las tasas de amplificación precisa disminuyeron a 90%, 70%, 70% y 70%, respectivamente.

De manera similar, Fulghum B, et al.⁷⁶ penalizan en su software DeGenPrime los *primers* con ΔG inferior a -3 kcal/mol, reduciendo su puntuación sin excluirlos completamente. Afectando de esta manera su posición en el listado de selección. Por su parte, la elección del umbral $\Delta G \geq -9$ kcal/mol en el presente trabajo, se encuentra dentro del rango demostrado por Yuan J, et al.⁷⁷ aunque los resultados del análisis de iniciadores estuvieron fuera del rango establecido. Sin embargo, es importante referir que el parámetro de ΔG va a depender del contexto experimental.

En relación a la obtención de amplicones mediante herramientas bioinformáticas como MFEprimer, esta puede verse limitada por diversos factores, entre ellos la naturaleza fragmentada del ADN viral, la variabilidad genética del CMV y la longitud del amplicón diseñado. Naegele et al.⁷⁸ señalan que la falta de estandarización en el tamaño del amplicón, sumada a la fragmentación y desprotección del genoma viral en plasma, puede comprometer la comparabilidad de los resultados obtenidos por PCR. Por lo tanto, proponen establecer una longitud de referencia para los amplicones, recomendando que se mantenga alrededor de 100 pb, a fin de mejorar la comparabilidad entre ensayos cuantitativos (QNAT) de carga viral de CMV.

En la misma línea, Leuzinger K y Hirsch H⁷⁹. explican que tanto la longitud del amplicón como la integridad del ADN y la presencia de polimorfismos en las regiones diana son variables que afectan directamente la sensibilidad y exactitud de las pruebas PCR. En particular, se ha observado que amplicones más cortos, <150 pb, permiten una detección más sensible del virus, especialmente en casos con baja carga viral.

Además, se debe tener en cuenta la fragmentación del ADN del CMV presente en plasma, que mayoritariamente se encuentra en forma no encapsulada, lo cual implica que es

altamente susceptible a la degradación. Esta condición afecta de manera crítica la etapa pre-analítica, haciendo imprescindible un manejo rápido y cuidadoso de las muestras para evitar la pérdida de material genético. Incluso se ha reportado que el tratamiento con DNasa-I, enzima que degrada el ADN libre, puede hacer indetectables las cargas virales en varios ensayos de PCR, confirmando la naturaleza libre y fragmentada del ADN viral en circulación⁷⁹.

Así mismo, la diversidad genética del CMV también interfiere en la precisión de la PCR. La presencia de polimorfismos en las regiones blanco de los primers puede disminuir la eficiencia de hibridación y afectar negativamente la sensibilidad del ensayo, generando sub-cuantificaciones o resultados falsamente negativos. Esto se relaciona directamente con los hallazgos del presente estudio, en el cual no fue posible detectar algunos amplicones con MFEprimer debido a que esta herramienta se limita a un subconjunto de accesos FASTA del GenBank y no cubre toda la variabilidad genómica del virus. Asimismo, se observó que secuencias diseñadas para regiones circulares (como circRNAs) tampoco fueron detectables por MFEprimer o BLAST, dado que estos softwares solo aceptan entradas de secuencia lineal.

Iniciadores recopilados con características óptimas en la identificación de Citomegalovirus por PCR

La comparación de los parámetros técnicos permitió constatar qué pares de cebadores cumplen con los criterios de diseño más estrictos para la detección de HCMV mediante PCR. A partir de esta evaluación basada en los criterios de la **Tabla 2**, se obtuvo un listado de iniciadores clasificados en categorías de desempeño de acuerdo al número de criterios cumplidos: óptimo (7 – 9), subóptimo (5 - 6) y no óptimo (<5) (ver **Anexo 8**). Lo que facilitó la identificación de aquellos iniciadores considerados óptimos y, por tanto, más adecuados para conformar una lista confiable que sirva para una base de datos orientada al diagnóstico molecular del virus. Los resultados de esta clasificación se encuentran en la **Tabla 7**.

Tabla 6. Iniciadores óptimos recomendados para la detección de HCMV mediante PCR.

| Regiones génicas | Iniciador F (Forward) | Iniciador R (Reverse) | Longitud (pb) | | Base en el extremo 3' | | Contenido GC (%) | | Promedio Tm (°C) | ΔG (kcal/mol) | | Tamaño del amplicón | Dímero | Horquilla | Puntuación | Autor |
|---------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------|----|--------------------------|---|---------------------|-------|---------------------|------------------|--------|--------------------------------------|--------|-----------|------------|--|
| | | | F | R | F | R | F | R | | F | R | | | | | |
| UL111A | CATCATAACATAAAGGACCACCTAC | CTGAGACAGCCGACTAATCAC | 25 | 21 | C | C | 40,00 | 52,38 | 58,25 | -23,32 | -22,00 | 662 ^a 662 ^b | 0 | 0 | 7 | Berg C. et al, 2019 ⁵² |
| UL146 | CCGGGAATACCGGATATTACG | CAGCACTTCCTGACGATTG | 21 | 19 | G | G | 52,38 | 52,63 | 57,59 | -21,72 | -20,19 | 727 ^b 704 ^a | 0 | 0 | 7 | |
| US28 | CCGCTCATATAGACCAAACC | AGGGAGTTGTGATCTAGGAG | 20 | 20 | C | G | 50,00 | 50,00 | 56,03 | -20,19 | -19,77 | 387 ^b 387 ^a | 0 | 0 | 7 | |
| UL55 | TGGTGTGATGGAGTGGAAC | TAGCCTTTGGTGGTGGTTGC | 19 | 20 | C | C | 52,63 | 55,00 | 59,41 | -20,19 | -22,43 | 414 ^a | 0 | 0 | 7 | Dong N. et al, 2020 ⁵⁵ |
| IE | CGCTCACATGCAAGAGTTAATCTTC | AACTCGGTAAGTCTGTTGACATGTATG | 25 | 27 | C | G | 44,00 | 40,74 | 61,54 | -25,49 | -26,68 | 107 ^b | 0 | 0 | 8 | Vasiljevic T. et al, 2024 ⁵⁶ |
| UL83 | CCAGCGTGACGTGCATAAAG | TCGTGTTTCCCAACCAAGGAC | 20 | 20 | G | C | 55,00 | 55,00 | 60,55 | -22,52 | -22,18 | 183 ^b 183 ^a | 0 | 0 | 8 | Rozman B. et al, 2022 ²⁹ |
| UL32 | GGTTTCTGGCTCGTGATGTCG | CACACAACACCGTCGTCGATTAC | 22 | 24 | G | C | 59,09 | 54,17 | 64,45 | -25,45 | -27,14 | 137 ^b 134 ^a | 0 | 0 | 8 | |
| RNA 2.7 | TCCTACCTACCACGAATCGC | GTTGGGAATCGTCGACTTTG | 20 | 20 | C | G | 55,00 | 50,00 | 58,54 | -21,74 | -21,02 | 117 ^a 117 ^b | 0 | 0 | 8 | |
| MIE | TGTGTTTAGGCCCGAGACAC | TGAGGGATTCTTCGGCCAAC | 20 | 20 | C | C | 55,00 | 55,00 | 60,52 | -22,16 | -22,07 | 128 ^a | 0 | 0 | 8 | Rajendiran P. et al, 2021 ⁶⁰ |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---------------------|--------------------------|----|----|---|---|-------|-------|-------|--------|--------|-------------------------|---|---|---|--------------------------------------|
| gN | TGGTGTGATGGAGTGGAAC | TAGCCTTTGGTGGTGGTTGC | 19 | 20 | C | C | 52,63 | 55,00 | 59,41 | -20,19 | -22,43 | 414 ^a | 0 | 0 | 7 | Vankova O. et al, 2023 ⁶⁶ |
| UL74 | TGGTGTGATGGAGTGGAAC | AACGGTAGATGAGCAGCAAACGAC | 19 | 25 | C | C | 52,63 | 48,00 | 61,01 | -20,19 | -27,39 | $\frac{1863^a}{1905^b}$ | 0 | 0 | 7 | Jiang J. et al, 2017 ⁶⁷ |

Nota: **a.** Cepa Towne, **b.** Cepa Merlin.

ANÁLISIS

En la **Tabla 7** se presentan los iniciadores que, según el análisis *in silico*, se perfilan como candidatos teóricamente óptimos para la detección de Citomegalovirus mediante PCR. Sin embargo, es necesario validar experimentalmente su eficiencia, especificidad y límite de detección antes de su uso diagnóstico. Del total de 50 pares analizados, solo el 24 % cumplió con los criterios considerados como óptimos mientras que el 46 % se clasificó como subóptimo y el 30 % restante como no óptimo (ver **Anexo 8**).

Los iniciadores categorizados como óptimos se dirigen a regiones target importantes en el CMV, ya sea por su función estructural o participación en el ciclo replicativo, sirva como ejemplo, el gen UL55 que codifica la glicoproteína B y UL74 que codifica la glicoproteína O, ambas implicadas en la entrada del virus a la célula. En cambio, el gen UL83 y UL32 que codifican las fosfoproteínas 65 y 150 respectivamente, se encuentran en el tegumento que forma parte de la nucleocápside viral.

DISCUSIÓN

Los genes seleccionados *in silico* como blancos “óptimos” (UL83, UL32, IE, UL55, RNA2.7 y gN) coinciden con los momentos de expresión más relevantes del ciclo vital del CMV. Ye L. et al.⁸⁰ manifiestan que los genes inmediatos tempranos, como UL123 y UL122, que codifican las proteínas inmediatas tempranas, junto con genes de expresión tardía como UL83 y UL32, son fundamentales en el ciclo vital del HCMV, y su expresión está estrictamente regulada para garantizar la replicación viral exitosa. Este patrón respalda la utilidad diagnóstica de los iniciadores identificados como óptimos en este trabajo, los cuales abarcan tanto regiones de expresión temprana, indicativas de infección activa inicial, como de expresión tardía, representativas de la fase de ensamblaje viral.

De forma similar, Rozman B, et al.²⁹ reportan que durante la fase lítica de la infección tanto el gen UL83 como UL32 alcanzan su pico de transcripción a las 48 y 72 horas y que por el contrario su expresión se ve reducida por la presencia de inhibidores como foscarnet que bloquean la replicación del ADN viral. Lo descrito confirma que estos genes son de expresión tardía. Por su parte, Tai-Schimiedel et al.⁵⁹ señalan que el RNA 2.7, parte del

grupo de RNAs largos no codificantes (lncRNAs), se expresa de manera abundante durante infecciones líticas en fibroblastos, superando en cantidad los niveles de otros genes virales y aunque su función aún no está muy clara es evidente su importancia dada su expresión cuantiosa y conservación genómica al estar codificada por una región estable del HCMV. En este contexto, los iniciadores dirigidos a genes inmediatos tempranos podrían ayudar a la identificación temprana de CMV mientras que iniciadores dirigidos a genes tardíos serían de utilidad para reconocer una posible reactivación de la infección, a menos que el paciente esté bajo tratamiento con inhibidores como el mencionado foscarnet, más es importante aclarar que esta posibilidad requiere de validación experimental.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- La revisión bibliográfica permitió recopilar y presentar de forma ordenada un listado de los iniciadores empleados en la detección de CMV junto a aspectos como las regiones génicas, cepa de referencia, número de acceso y el sitio de amplificación. En su mayoría, las regiones génicas blanco corresponden a genes conservados, como UL83, UL54 y UL97, respecto a las cepas observadas, resaltó el tipo Merlín con una recurrencia notable que sugiere su empleo habitual como cepa de referencia en distintos estudios dirigidos a la detección de CMV. Del mismo modo resulta importante mencionar que, la diversidad de las cepas virales descritas denota el alto grado de polimorfismo de CMV, lo cual debe ser considerado durante la selección de iniciadores. Es así como los hallazgos encontrados que poseen el respaldo científico de los artículos revisados y la organización de la lista presentada proporciona una referencia inicial para aquellos trabajos enfocados en la detección de CMV mediante PCR, omitiendo la necesidad de repetir el proceso de búsqueda desde cero.
- Las herramientas bioinformáticas MFEprimer y Primer BLAST facilitaron el análisis de los parámetros técnicos de los iniciadores como la longitud, temperatura melting, contenido porcentual de GC, ΔG , base en el extremo 3' y posible formación de estructuras secundarias como dímeros y horquillas. Los valores obtenidos junto a su respectiva interpretación permitieron evaluar in silico el rendimiento teórico de la PCR, ayudando a anticipar posibles interferencias y orientar la selección de iniciadores. Aunque varios pares se ajustan a los rangos, descritos por la literatura como favorables, otros presentan valores fuera de los límites establecidos, sin embargo, esto no implica que carezcan de utilidad puesto que los iniciadores provienen de artículos donde fueron aplicados de manera práctica en el laboratorio. Además, es importante señalar que los resultados alcanzados son computacionales y, en consecuencia, poseen un valor exclusivamente predictivo, así que para determinar la eficiencia real de los iniciadores en función de los parámetros técnicos es necesaria una validación experimental.

- Al comparar los resultados obtenidos del análisis bioinformático, se obtuvo un conjunto de 11 pares de iniciadores clasificados como óptimos. Los iniciadores de esta lista están dirigidos a regiones target que poseen relevancia estructural y funcional en el proceso de replicación de CMV, como es el caso de los genes UL83, UL32, UL55, genes inmediatos tempranos y otras regiones importantes como RNA2.7. En adición, la presentación de este número reducido de iniciadores es un recurso práctico que permite acortar el tiempo destinado a la búsqueda y selección de iniciadores que cumplan criterios considerados como favorables. Sin embargo, esta clasificación se trata de un referente teórico basado en un análisis *in silico*, siendo necesaria la validación experimental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chen SJ, Wang SC, Chen YC. Challenges, Recent Advances and Perspectives in the Treatment of Human Cytomegalovirus Infections. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(12):1–15.
2. Abdullah D. [Review Article] Cytomegalovirus Infection. *Qeios.* 2024;(1):2011–8.
3. Venturini C, Breuer J. Cytomegalovirus Genetic Diversity and Evolution: Insights into Genotypes and Their Role in Viral Pathogenesis. *Pathogens.* 2025;14(1).
4. Kawakami-Campos PA. Retinitis por citomegalovirus bilateral con reacción tipo Coats en paciente portador del VIH. *Rev Mex Oftalmol.* 2019;93(5S):1–2.
5. Fakhreddine AY, Frenette CT, Konijeti GG. A practical review of cytomegalovirus in gastroenterology and hepatology. *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2019;2019(1):11. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2019/6156581>
6. Hoyos-Illanos DM, Cortes-mejia NA, Rico-bolivar DL, Giraldo-posada P, Perez-rengifo FA, Vera-torres A. Cytomegalovirus-related Guillain-Barre syndrome in an adult liver transplant recipient : a case report. 2023;27(3):186–90.
7. Nath M, Valero N. Epidemiología y diagnóstico de infección congénita por citomegalovirus. *Pol Con.* 2023;8(4):92–114.
8. Cepeda Guayolema C del R. Prevalencia en la determinación de Citomegalovirus y *Toxoplasma gondii* IgM e IgG, en los niños de la escuela de Educación Básica García Moreno, Parroquia rural San José del Batán, provincia de Chimborazo [Internet]. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; 2018. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/9023>
9. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleesschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2019;e2034.
10. Sunil-Chandra NP, Jayasundara MVML, Gunathilaka MGRSS, Suminda SDH. Human cytomegalovirus (HCMV) trends in Sri Lanka: insights from a hospital-based seroprevalence analysis. *BMC Infect Dis.* 2025;25(184):1–7.
11. de Melo Silva J, Pinheiro-Silva R, Costa de Oliveira R, de Castro Alves CE, Barbosa AN, Pontes GS. Prevalence and Recurrence Rates of Cytomegalovirus Infection Among Patients With Hematological Diseases in the Western Brazilian Amazon: A

- Cross-Sectional Study. *Front Public Heal*. 2021;9:692226.
12. Lopez Diaz C, Macuyama Saavedra D. Prevalencia del Citomegalovirus en pacientes que acuden al laboratorio del hospital III Iquitos EsSalud de enero a diciembre del 2019 [Internet]. Universidad Científica del Perú; 2022. Disponible en: <https://repositorio.ucp.edu.pe/items/ad55bf34-47b4-4eaf-aeb9-af98f9ee28a8>
 13. Alejandro JL, Paredes J, Veliz T. Infección por Citomegalovirus en el embarazo: Factores de riesgo, diagnóstico y prevención. *Rev Científica Arbitr Multidiscip PENTACIENCIAS* [Internet]. 2023;5(1):307–23. Disponible en: <https://editorialalema.org/index.php/pentaciencias/article/view/448/578>
 14. Hidalgo-Villavicencio GA, Merchán-Villafuerte KM. Prevalencia y epidemiología de infecciones congénitas en el primer trimestre de embarazo, atendidas en el laboratorio de análisis clínico Paján. *MQRInvestigar*. 2023;7(4):2106–25.
 15. Izquierdo G, Sandoval A, Abarzúa F, Silva M, Torres JP, Yamamoto M, et al. Recommendations for the diagnosis and management of cytomegalovirus infection in pregnant women and newborns. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2021;86(6):591–622.
 16. Cañarte Fienco AA, Álava Vélez GA, Medina Solis KB, Castro Jalca AD. Infección por Citomegalovirus: evolución de la sintomatología y prevención de la enfermedad. *Rev Científica Higía la Salud*. 2023;8(1):27.
 17. Padrón López RM, Hernández Marín A, Leshner Gordillo JM. Historia Y Aplicaciones De La Reacción En Cadena De La Polimerasa En El Diagnóstico Clínico. Vol. 28, *Kuxulkab'*. 2022. p. 23–32.
 18. Rodríguez Pérez C, Rodríguez Pérez C, Carreño Ruiz SD, Martínez Rodríguez M, Martínez Rodríguez M, Ortiz Ojeda RF. PCR como técnica molecular más utilizada en el diagnóstico del virus del dengue. Revisión sistemática. *LATAM Rev Latinoam Ciencias Soc y Humanidades*. 2023;4(1):3444–55.
 19. Monk CH, Youngquist BM, Brady AD, Shaffer JG, Hu TY, Ning B, et al. Development of a CRISPR-Cas12a rapid diagnostic for human cytomegalovirus. *Antiviral Res* [Internet]. 2023;215:1–18. Disponible en: [doi:10.1016/j.antiviral.2023.105624](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105624).%0ADevelopment
 20. Gonzabay K. Prevalencia, factores de riesgo y diagnóstico de infección por citomegalovirus en mujeres embarazadas. *Rev Científica Arbitr Multidiscip PENTACIENCIAS* [Internet]. 2024;6(1):175–86. Disponible en: [doi:10.1016/j.antiviral.2023.105624](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105624).%0ADevelopment

21. Torres Alvarado KE. Retinitis Por Citomegalovirus En Pacientes Con Vih-Sida Tesis Guate Xx. Guatemala, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2020. p. 2–87.
22. Puhakka L, Pati S, Lappalainen M, Lönnqvist T, Niemensivu R, Lindahl P, et al. Viral shedding, and distribution of cytomegalovirus glycoprotein H (UL75), glycoprotein B (UL55), and glycoprotein N (UL73) genotypes in congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* [Internet]. 2020;125(2020):104287. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104287>
23. Peinador M. Aproximación diagnóstica a la infección por CMV. *Grup Patol Infecc AEPap* [Internet]. 2022;1–12. Disponible en: <https://aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido/documentos-del-gpi%0AINTRODUCCIÓN>
24. Rojas-Cordero E, Rodríguez-Sevilla M, Herrera-Muñoz Á, Karkashian-Córdoba J. Cargas virales en pacientes trasplantados y genotipificación de Citomegalovirus. *Acta Med Costarric*. 2021;63(2):78–87.
25. Coşkun A, Gökahmetoğlu S, Özmen P, Karakükcü M, Kaynar L, Kuşkucu M, et al. Determination of Genotypes in Cytomegalovirus (CMV) Strains Obtained from Pediatric and Adult Immunocompromised Patients. *J Basic Clin Heal Sci* [Internet]. 2023;7(1):270–6. Disponible en: <https://doi.org/10.30621/jbachs.1095228>
26. Bottino P, Pastrone L, Curtoni A, Bondi A, Sidoti F, Zanotto E, et al. Antiviral Approach to Cytomegalovirus Infection: An Overview of Conventional and Novel Strategies. *Microorganisms*. 2023;11(10):2372.
27. Dong N, Cao L, Zheng D, Su L, Lu L, Dong Z, et al. Distribution of CMV envelope glycoprotein B, H and N genotypes in infants with congenital cytomegalovirus symptomatic infection. *Front Pediatr*. 2023;11.
28. Turner DL, Mathias RA. The human cytomegalovirus decathlon: Ten critical replication events provide opportunities for restriction. *Front Cell Dev Biol*. 2022;1–34.
29. Rozman B, Nachshon A, Levi Samia R, Lavi M, Schwartz M, Stern-Ginossar N. Temporal dynamics of HCMV gene expression in lytic and latent infections. *Cell Rep* [Internet]. 2022;39(2):110653. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110653>
30. Caragliano E, Bonazza S, Frascaroli G, Tang J, Soh TK, Grünewald K, et al. Human cytomegalovirus forms phase-separated compartments at viral genomes to facilitate

- viral replication. *Cell Rep.* 2022;38(10):110469.
31. Wang HY, Valencia SM, Pfeifer SP, Jensen JD, Kowalik TF, Permar SR. Common polymorphisms in the glycoproteins of human cytomegalovirus and associated strain-specific immunity. *Viruses.* 2021;13:1106.
 32. Asif S, Khan M, Waqar Arshad M, Shabbir MI. PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. *Res Mol Med.* 2021;9(2):81–102.
 33. Yang CH, Cheng YH, Yang EC, Chuang LY, Lin Y Da. Multiobjective optimization-driven primer design mechanism: towards user-specified parameters of PCR primer. *Brief Bioinform.* 2022;23(3):1–13.
 34. Diz Mellado OM. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto.* 2020;3(30):88–111.
 35. Mardalisa, Suhandono S, Yanti N, Rozi F, Nova F, Primawati. Bioinformatic analysis in designing mega-primer in overlap extension PCR cloning (OEPC) technique. *Int J Informatics Vis.* 2021;5(2):139–43.
 36. Masnaini M, Achyar A, Chatri M, Putri DH, Ahda Y, Irdawati. Primer Design and Optimization of PCR Methods for Detecting Mixed Rat Meat in Food Samples. En: *Advances in Biological Sciences Proceedings of the 3rd International Conference on Biology, Science and Education (IcoBioSE 2021)* [Internet]. Atlantis Press; 2023. p. 282–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2991/978-94-6463-166-1_37
 37. Guo J, Starr D, Guo H. Classification and review of free PCR primer design software. *Bioinformatics.* 2020;36(22–23):5263–8.
 38. Shahzad S, Afzal M, Sikandar S, Afzal I. Polymerase Chain Reaction. En: Jamal F, editor. *Genetic Engineering - A Glimpse of Techniques and Applications*. 1a ed. IntechOpen; 2020. p. 1–20.
 39. Ehtisham M, Wani F, Wani I, Kaur P, Nissar S. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian J Contemp Dent.* 2016;4(2):30.
 40. Mitin V, Mitina I. Some aspects of primer design for real time PCR with SYBR ® Green as a dye. *J Eng Sci.* 2020;27(4):191–6.
 41. Mekonnen P. The Role of Thermochemistry in Chemical Reactions. *Glob J Lif Sci Biol Res.* 2023;09(04):1–2.
 42. Dreier M, Berthoud H, Shani N, Wechsler D, Junier P. SpeciesPrimer: A bioinformatics pipeline dedicated to the design of qPCR primers for the quantification of bacterial species. *PeerJ* [Internet]. 2020;8(e8544). Disponible en:

- <https://peerj.com/articles/8544/>
43. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif* [Internet]. 2017;14:19–28. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
 44. Farrel R. RT-PCR: a science and an art form. En: *RNA Methodologies A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 6a ed. York: Elsevier; 2022. p. 223–300.
 45. Falconi Ontaneda F, Zaporta Ramos J, Ramos Campi YC, Cedeño Cajas GM. Iniciadores utilizados en la identificación de virus de papiloma humano por PCR: una revisión. *Anatomía Digit*. 2023;6(4.3):707–26.
 46. Hendling M, Pabinger S, Peters K, Wolff N, Conzemius R, Barišić I. Oli2go: An automated multiplex oligonucleotide design tool. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W252–6.
 47. Johnston AD, Lu J, Ru K lin, Korbie D, Trau M. PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(209):1–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36612-9>
 48. Integrated DNA Technologies. How to check PCR primers for primer design issues | IDT [Internet]. IDT. 2018 [citado el 18 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-can-i-check-my-pcr-primers-using-the-oligoanalyzer-program-to-ensure-there-are-no-significant-primer-design-issues->
 49. Rajalakshmi S. Different types of PCR techniques and its applications. *Int J Pharm Chem Biol Sci* [Internet]. 2017;7(3):285–92. Disponible en: www.ijpcbs.com
 50. Khalil MI. Different types of PCR. *Glob Sci Journals* [Internet]. 2021;9(2):758–68. Disponible en: <https://flow-robotics.com/news/different-types-of-pcr-and-their-function/>
 51. Wang K, Li H, Xu Y, Shao Q, Yi J, Wang R, et al. MFEprimer-3.0: Quality control for PCR primers. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:W610–3.
 52. Berg C, Friis MB, Rosenkilde MM, Benfield T, Nielsen L, Luttichau HR, et al. Development of highly efficient protocols for extraction and amplification of cytomegalovirus DNA from dried blood spots for detection and genotyping of polymorphic immunomodulatory genes. *PLoS One*. 2019;14(9):1–14.
 53. Noorbakhsh S, Farhadi M, Haghighi F, Minaeian S, Hasanabad MH. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection in Tehran, Iran, using guthrie cards. *Iran J Microbiol*. 2020;12(3):198–203.
 54. Khodamoradi S, Shahhosseiny MH, Mohammadian T, Ferdousi A. Evaluation of

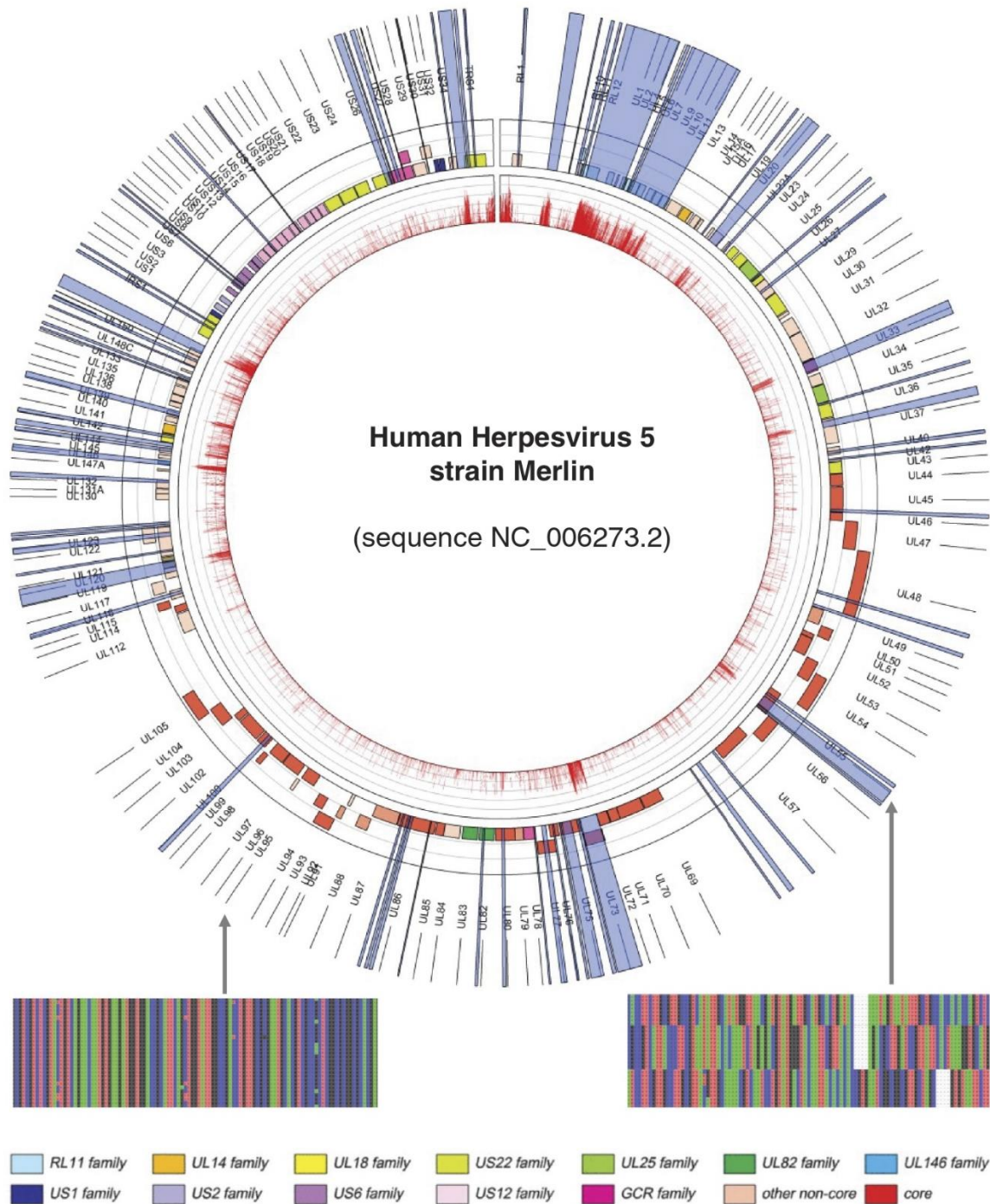
- Role of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 and Cytomegalovirus in Alzheimer's Disease. *Med Lab J*. 2021;15(4):39–44.
55. Dong N, Cao L, Su L, Lu L, Dong Z, Xu M, et al. Human cytomegalovirus envelope glycoprotein B, H, and N polymorphisms among infants of Shanghai area in China. *J Med Virol*. 2020;92(12):3674–81.
 56. Vasiljevic T, Jankovic M, Tomic A, Bakrac I, Radenovic S, Miljanovic D, et al. Significance of Cytomegalovirus gB Genotypes in Adult Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Insights from a Single-Centre Investigation. *Pharmaceuticals*. 2024;17:428.
 57. Streck NT, Espy MJ, Ferber MJ, Klee EW, Razonable RR, Gonzalez D, et al. Use of next-generation sequencing to detect mutations associated with antiviral drug resistance in cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*. 2023;61(10):1–9.
 58. Torii Y, Horiba K, Kawada J ichi, Haruta K, Yamaguchi M, Suzuki T, et al. Detection of antiviral drug resistance in patients with congenital cytomegalovirus infection using long-read sequencing: a retrospective observational study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2022;22(1):1–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07537-6>
 59. Tai-Schmiedel J, Karniely S, Lau B, Ezra A, Eliyahu E, Nachshon A, et al. Human cytomegalovirus long noncoding RNA4.9 regulates viral DNA replication. Vol. 16, *PLoS Pathogens*. 2020. 1–31 p.
 60. Rajendiran P, Saravanan N, Ramamurthy M, Sankar S, Aruliah R, Nandagopal B, et al. Standardization of an in-house multiplex real-time polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, cytomegalovirus, herpes simplex Virus 1 and 2, and *Treponema pallidum* infection among pregnant women. *Indian J Public Health*. 2021;65:369–74.
 61. Meyer L, Sharon B, Huang TC, Meyer AC, Gravel KE, Schimmenti LA, et al. Analysis of archived newborn dried blood spots (DBS) identifies congenital cytomegalovirus as a major cause of unexplained pediatric sensorineural hearing loss. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg* [Internet]. 2017;38(5):565–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjoto.2017.06.002>
 62. Chu C, Yu S, Min F, Sun L, Liu M, Meng Q. Establishment and application of a point-of-care testing and diagnosis method for early immediate expression gene IE1 of cytomegalovirus in maternal urine based on isothermal amplification. *Virus Res*

- [Internet]. 2023;337:199229. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199229>
63. Nanev S, Kaori K, García de Figueiredo G, Yamamoto A, Mussi-Pinhata MM, Kashima S, et al. Development and Optimization of a Sensitive TaqManW Real-Time PCR With Synthetic Homologous Extrinsic Control for Quantitation of Human cytomegalovirus Viral Load Svetoslav. *J Med Virol.* 2016;1–9.
 64. Deng J, Wang Q, Zhang J, Ma Y, Qi Y, Liu Z, et al. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded circular RNAs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:980974.
 65. Hernandez-Alvarado N, Bierle CJ, Schleiss MR. Droplet Digital PCR (ddPCR) Does Not Enhance the Sensitivity of Detection of Cytomegalovirus (CMV) DNA in Newborn Dried Blood Spots Evaluated in the Context of Newborn Congenital CMV (cCMV) Screening. *Int J Neonatal Screen.* 2024;10(1):1–14.
 66. Vankova OE, Brusnigina NF, Novikova NA. NGS Technology in Monitoring the Genetic Diversity of Cytomegalovirus Strains. *Sovrem Tehnol v Med.* 2023;15(2):41–6.
 67. Jiang XJ, Zhang J, Xiong Y, Jahn G, Xiong HR, Yang ZQ, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein polymorphisms and increasing viral load in AIDS patients. *PLoS One.* 2017;12(5):1–14.
 68. Caurio CFB, Allende OS, Kist R, Vasconcellos ICS, Rozales FP, Reck-Kortmann M, et al. Cost minimization analysis of an in-house molecular test for cytomegalovirus in relation to a commercial molecular system. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2020;24(3):191–200. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.04.015>
 69. Liu MH, Guo X, Sun ML, Li JL, Liu SH, Chen YZ, et al. Rapid detection of human cytomegalovirus by multienzyme isothermal rapid amplification and lateral flow dipsticks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024;14(July):1–10.
 70. Bilenoglu O, Altindis M, Öz E, Yücel-öz Y, İrigül-sönmez Ö, Ünal CB. Detailed polymorphism study on cytomegalovirus DNA polymerase gene to reveal the most suitable genomic targets for quantitative Real-time PCR. *Bosn J Basic Med Sci* [Internet]. 2015;15(3):28–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2015.494>
 71. Ávila da Rocha AC, Rodrigues GM, Da Silva Hellwig AH, Pereira DC, Volpato FCZ, Barth AL, et al. Ganciclovir Resistance-Linked Mutations in the HCMV UL97 Gene:

- Sanger Sequencing Analysis in Samples from Transplant Recipients at a Tertiary Hospital in Southern Brazil. *Diagnostics*. 2025;15:1–12.
72. Charles O, Venturini C, Gantt S, Atkinson C, Griffiths P, Goldstein R, et al. Genomic and geographical structure of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2023;120(30):e2221797120. Disponible en: <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2216830120/-/DCSupplemental>.<https://doi.org/10.1073/pnas.2216830120>
 73. Zeng H, Chen K, Ma C, Zhu B, Chuan J, Zhang S, et al. High-throughput primer design by scoring in piecewise logistic model for multiple polymerase chain reaction variants. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25561-z>
 74. Bustin S, Mueller R, Nolan T. Parameters for Successful PCR Primer Design. En: Biassoni R, Raso A, editores. *Quantitative Real-Time PCR Methods and Protocols*. Second Edi. 2020. p. 5–22.
 75. Sharma M. Basic Concepts of Primer Designing: A Minireview. *Int J Latest Trends Eng Technol* [Internet]. 2021;17(4):10–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21172/1.174.03>
 76. Fulghum B, Tanker SH, White RA. DeGenPrime provides robust primer design and optimization unlocking the biosphere. *Bioinforma Adv*. 2024;(044):1–10.
 77. Yuan J, Yi J, Zhan M, Xie Q, Zhen TT, Zhou J, et al. The web-based multiplex PCR primer design software Ultiplex and the associated experimental workflow: up to 100-plex multiplicity. *BMC Genomics*. 2021;22(835):1–17.
 78. Naegele K, Lautenschlager I, Gosert R, Loginov R, Bir K, Helanterä I, et al. Cytomegalovirus sequence variability, amplicon length, and DNase-sensitive non-encapsidated genomes are obstacles to standardization and commutability of plasma viral load results. *J Clin Virol* [Internet]. 2018;104:39–47. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.013>
 79. Leuzinger K, Hirsch HH. Amplicon size and non-encapsidated DNA fragments define plasma cytomegalovirus DNA loads by automated nucleic acid testing platforms: A marker of viral cytopathology? *J Med Virol*. 2023;95(10).
 80. Ye L, Qian Y, Yu W, Guo G, Wang H, Xue X. Functional Profile of Human Cytomegalovirus Genes and Their Associated Diseases: A Review. *Front Microbiol*. 2020;11(September):1–13.

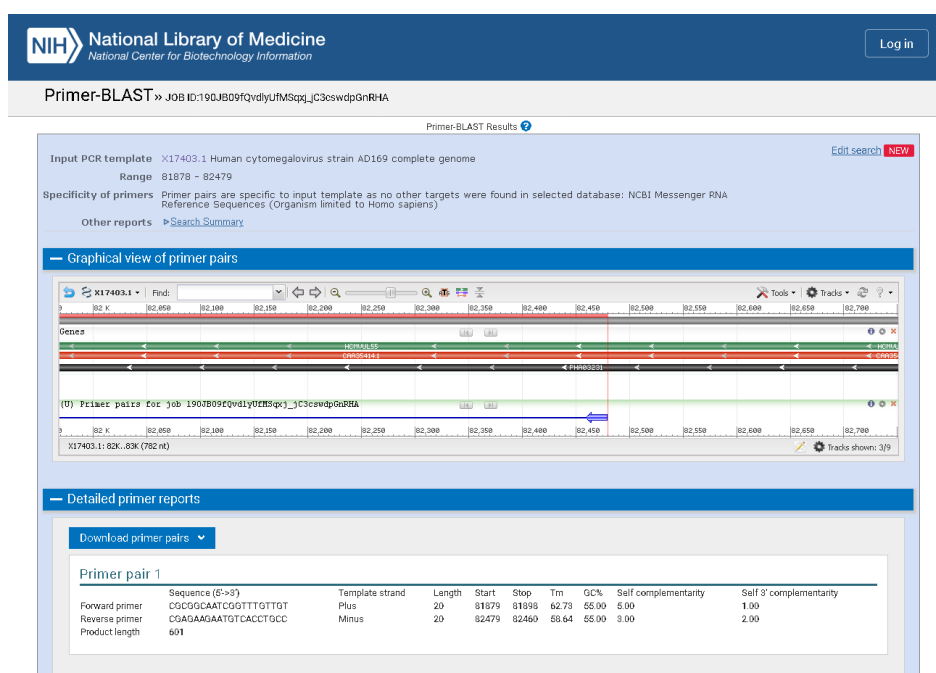
ANEXOS

Anexo 1. Representación circular del genoma de HCMV que ilustra la variabilidad nucleotídica y las zonas con múltiples alelos.

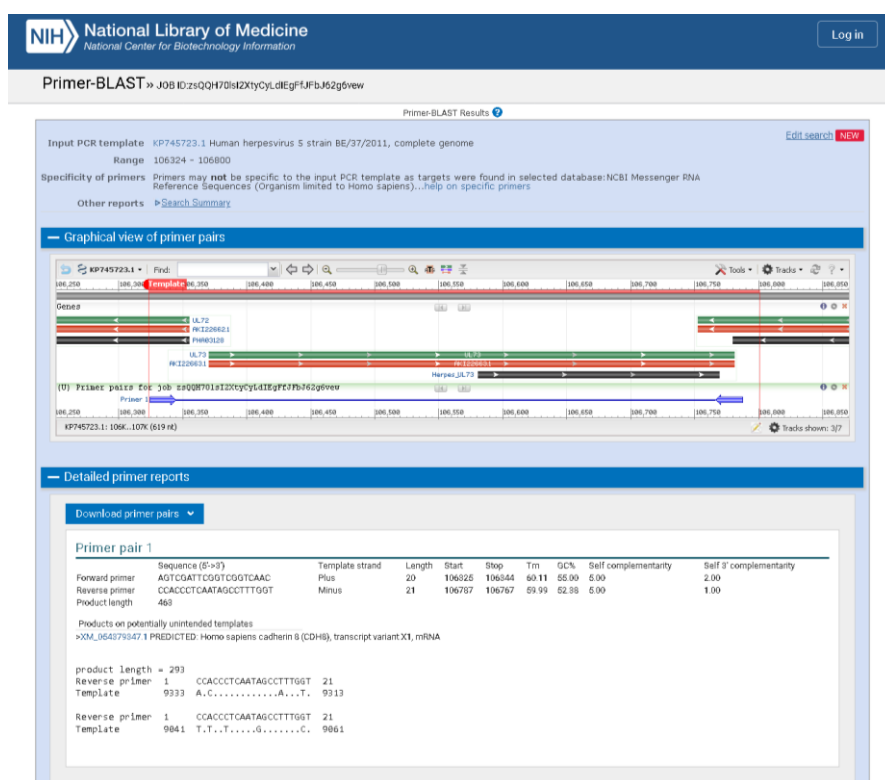


Fuente: <https://doi.org/10.1073/pnas.2221797120>

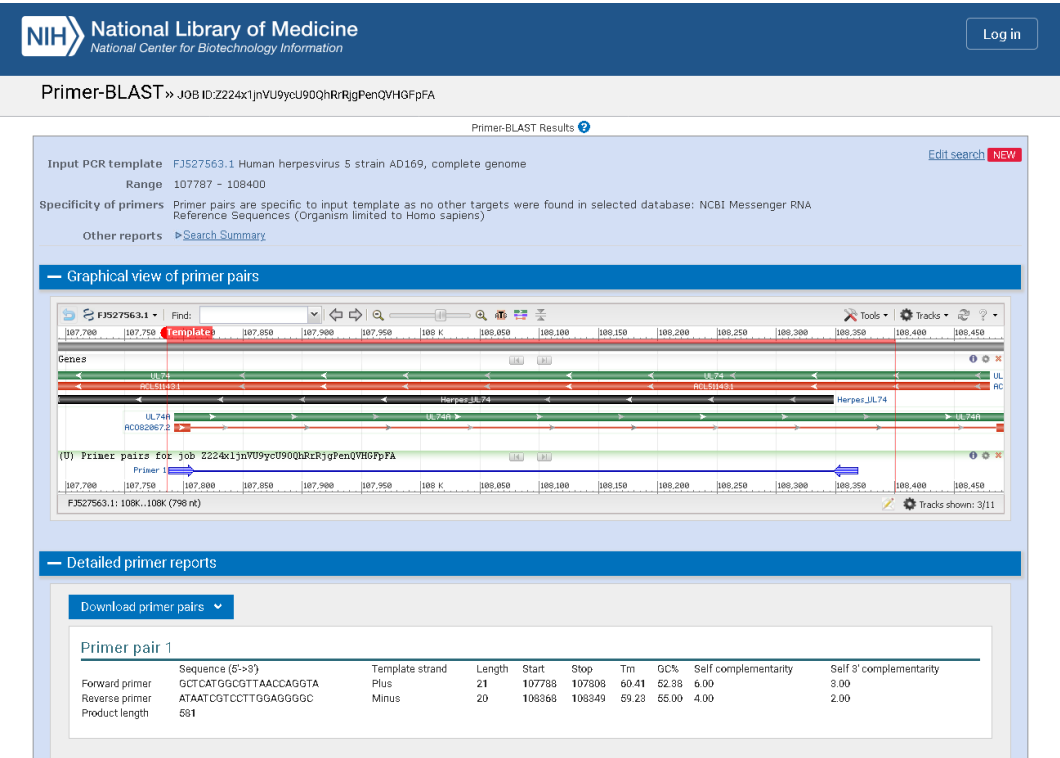
Anexo 2. Resultados de Primer Blast en la determinación de parámetros técnicos del par de cebadores número 6.



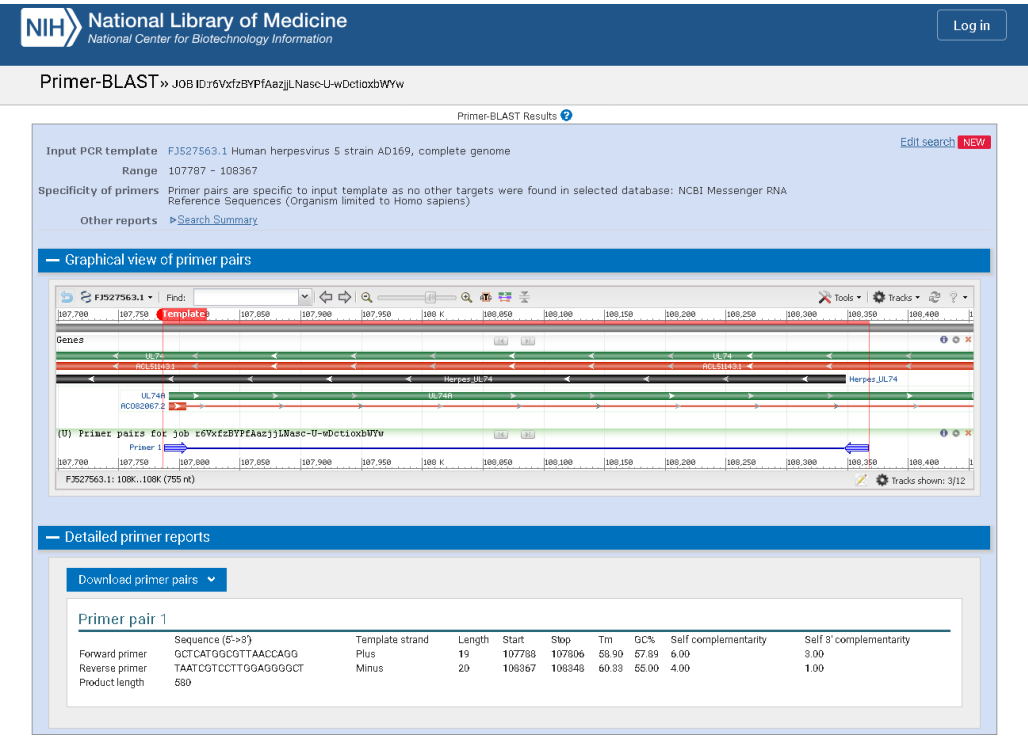
Anexo 3. Resultados de Primer Blast en la determinación de parámetros técnicos del par de cebadores número 40.



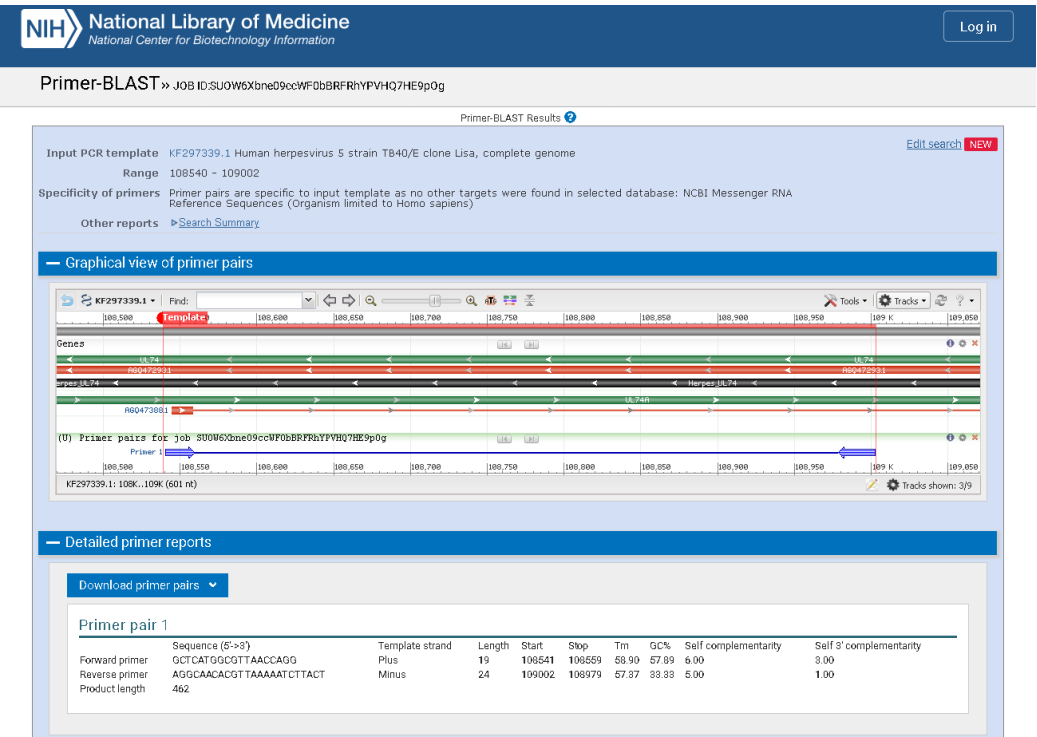
Anexo 4. Resultados de Primer Blast en la determinación de parámetros técnicos del par de cebadores número 42.



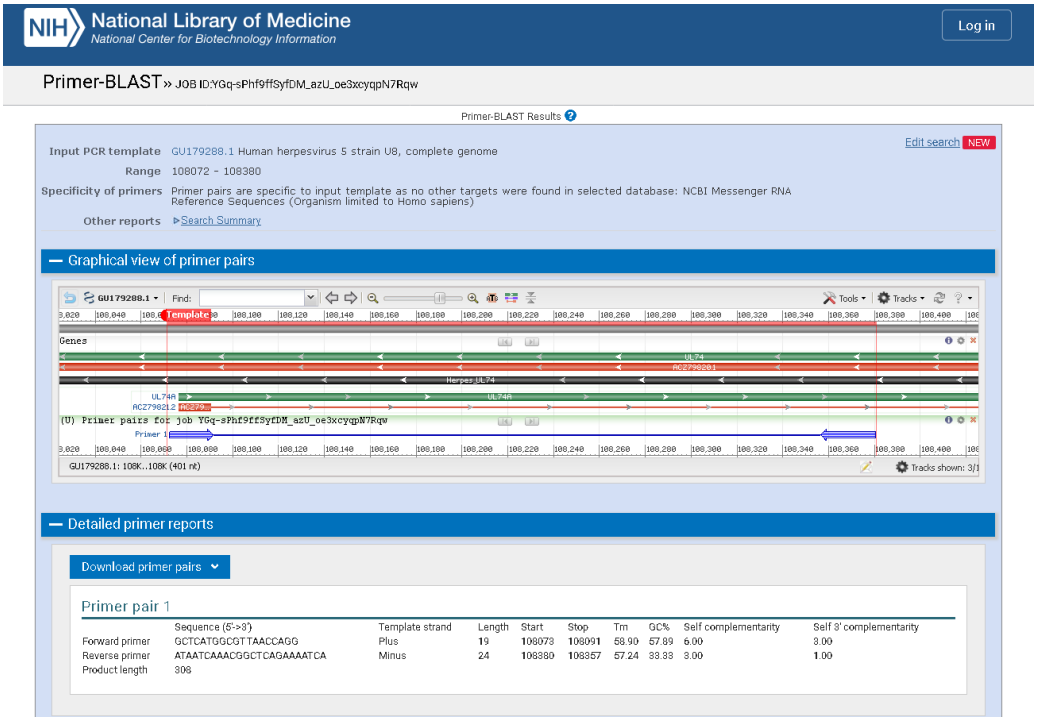
Anexo 5. Resultados de Primer Blast en la determinación de parámetros técnicos del par de cebadores número 45.



Anexo 6. Resultados de Primer Blast en la determinación de parámetros técnicos del par de cebadores número 46.



Anexo 7. Resultados de Primer Blast en la determinación de parámetros técnicos del par de cebadores número 47.



Anexo 8. Categorización de pares de cebadores.

| Item | Longitud de 18 a 36 pb | Base en el extremo 3' con G o C | Contenido en G/C de 40 a 60% | T° melting de 42 a 65 °C | $\Delta G \geq -9$ kcal/mol | Contenido en G/C de 40 a 60% | Amplificación de 80 a 200 pb | Ausencia de estructuras secundarias | N° parámetros técnicos optimos cumplidos/9 | Clasificación |
|------|------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--|---------------|
| 1 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 7 | Óptimo |
| 2 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 7 | Óptimo |
| 3 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 7 | Óptimo |
| 4 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 5 | Subóptimo |
| 5 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | No | 6 | Subóptimo |
| 6 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 4 | No óptimo |
| 7 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 4 | No óptimo |
| 8 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 4 | No óptimo |
| 9 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 7 | Óptimo |
| 10 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 8 | Óptimo |
| 11 | Sí | Sí | No | Sí | No | No | No | — | 4 | No óptimo |
| 12 | Sí | Sí | No | Sí | No | No | No | — | 4 | No óptimo |
| 13 | Sí | Sí | No | No | No | No | No | — | 3 | No óptimo |
| 14 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 15 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 8 | Óptimo |
| 16 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 17 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 8 | Óptimo |
| 18 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 8 | Óptimo |
| 19 | Sí | No | No | Sí | No | No | Sí | Sí | 4 | No óptimo |
| 20 | Sí | Sí | No | Sí | No | No | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 21 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 22 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 23 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 24 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|-----------|
| 25 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 26 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 8 | Óptimo |
| 27 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 8 | Óptimo |
| 28 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 5 | Subóptimo |
| 29 | Sí | No | Sí | No | No | Sí | No | Sí | 4 | No óptimo |
| 30 | Sí | No | No | No | No | No | Sí | Sí | 3 | No óptimo |
| 31 | Sí | No | No | Sí | No | No | No | Sí | 3 | No óptimo |
| 32 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |
| 33 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 6 | Subóptimo |
| 34 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | — | 5 | Subóptimo |
| 35 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | — | 5 | Subóptimo |
| 36 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | No | 6 | Subóptimo |
| 37 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 6 | Subóptimo |
| 38 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 5 | Subóptimo |
| 39 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 7 | Óptimo |
| 40 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 4 | No óptimo |
| 41 | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 7 | Óptimo |
| 42 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 4 | No óptimo |
| 43 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 5 | Subóptimo |
| 44 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 5 | Subóptimo |
| 45 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | — | 4 | No óptimo |
| 46 | Sí | No | No | Sí | No | No | No | — | 2 | No óptimo |
| 47 | Sí | No | No | Sí | No | No | No | — | 2 | No óptimo |
| 48 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | No | Sí | 5 | Subóptimo |
| 49 | Sí | No | Sí | No | No | Sí | Sí | Sí | 5 | Subóptimo |
| 50 | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí | 6 | Subóptimo |