



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Trabaja bibliográfico: Técnicas de detección del coronavirus:
SARS-CoV-2**

**Traballo bibliográfico: Técnicas de detección do coronavirus
SARS-CoV-2**

Literature review: Detection techniques for the SARS-CoV-2

Nerea González Puente

Curso: 2019 – 2020. Convocatoria: Julio

*Director: Dr. Manuel Becerra Fernández
Codirectora: Dra. María Isabel González Siso*

La Dra. María Isabel González Siso y el Dr. Manuel Becerra Fernández, como tutores académicos de la alumna Nerea González Puente, estudiante del Grado en Biología, autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado: “Trabajo bibliográfico: Técnicas de detección del coronavirus: SARS-CoV-2”, para su defensa ante el tribunal evaluador.

A Coruña, 23 de Julio de 2020

RESUMEN

El SARS-CoV-2 apareció en Wuhan (provincia de Hubei, China) a finales de diciembre de 2019. Este nuevo virus es el causante de la enfermedad infecciosa del síndrome respiratorio agudo severo altamente transmisible conocida hoy en día como COVID-19. Los coronavirus pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae* en la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirale*, y el SARSCoV-2 en concreto pertenece al género *Beta-coronavirus*. El presente trabajo tiene como finalidad determinar las características de las diferentes técnicas empleadas en la actualidad para la detección del SARS-CoV-2 mediante la descripción de las mismas, así como conocer diversas alternativas que se encuentran bajo investigación y determinar las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas a la hora de emitir un diagnóstico. Para ello, se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos científicos en diferentes bases de datos así como páginas webs y libros generales del tema a abordar. La infraestructura sanitaria y la capacidad de proporcionar un diagnóstico rápido han surgido como cuestiones indispensables para contener el nuevo brote de SARS-CoV-2. Actualmente la técnica estándar empleada es la RT-qPCR, basada en la detección del material genético. Esta presenta una gran sensibilidad y especificidad, aunque el tiempo hasta la obtención de los resultados es relativamente largo. Al mismo tiempo se están utilizando test rápidos de detección de anticuerpos de flujo lateral tanto para emitir un diagnóstico como para realizar estudios de seroprevalencia. Los test rápidos de detección de antígenos de flujo lateral fueron descartados por su baja sensibilidad y nuevos test de su misma índole se encuentran en fase de desarrollo. Al mismo tiempo multitud de grupos de investigación trabajan en el diseño de nuevas técnicas. A día de hoy la mejor forma de detectar el virus es mediante la combinación de la RT-qPCR y los test serológicos rápidos. Mientras, se esperan nuevos avances tecnológicos a corto plazo.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, diagnóstico, técnicas rápidas de detección, RT-qPCR.

RESUMO

O SARS-CoV-2 apareceu en Wuhan (provincia de Hubei, China) a finais de decembro de 2019. Este novo virus é a causa da enfermidade infecciosa do síndrome respiratorio agudo grave altamente transmisible hoxe coñecida como COVID-19. Os coronavirus pertencen á subfamilia *Orthocoronavirinae* da familia *Coronaviridae* do orde *Nidovirale*, e o SARSCoV-2 en concreto pertence ao xénero *Beta-coronavirus*. O obxectivo deste traballo é determinar as características das diferentes técnicas empregadas actualmente para detectar o SARS-CoV-2 describíndoas, así como coñecer varias alternativas que están a investigarse e determinar as vantaxes e os inconvenientes de cada un deles ao facer un diagnóstico. Para iso, realizouse unha rigurosa busca de artigos científicos en diferentes bases de datos, así como en páxinas web e libros xerais sobre o tema a tratar. A infraestructura sanitaria e a capacidade de diagnóstico rápido xurdiron como preguntas indispensables para conter o novo brote de SARS-CoV-2. Na actualidade a técnica estándar empregada é RT-qPCR, baseada na detección de material xenético que conta cunha gran sensibilidade e especificidade, aínda que o tempo para obter os resultados é relativamente longo. Ao mesmo tempo, estanse a facer probas

rápidas de detección de anticorpos de fluxo lateral tanto para facer un diagnóstico como para realizar estudos de seroprevalencia. Descartáronse as probas rápidas de detección de antíxenos de fluxo lateral debido á súa baixa sensibilidade e novas probas da mesma natureza están en fase de desenvolvemento. Ao mesmo tempo, multitude de grupos de investigación están a traballar no deseño de novas técnicas. A mellor forma de detectar o virus a día de hoxe é combinando RT-qPCR con probas serolóxicas rápidas. Mentres tanto, espéranse novos avances tecnolóxicos a curto prazo.

Palabras chave: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, diagnóstico, técnicas de detección rápida, RT-qPCR.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 appeared in Wuhan (Hubei Province, China) in late December 2019. This new virus is the cause of the highly contagious severe acute respiratory syndrome infectious disease known today as COVID-19. Coronaviruses belong to the subfamily *Orthocoronavirinae* in the family *Coronaviridae* of the order *Nidovirales*, and SARSCoV-2 in particular belongs to the genus *Beta-coronavirus*. The present work aims to determine the characteristics of the different techniques currently used for the detection of SARS-CoV-2 by describing them, as well as to know several alternatives that are under investigation and to determine the advantages and disadvantages of each of them when making a diagnosis. For this purpose, an exhaustive search of scientific articles in different databases as well as web pages and general books on the subject to be addressed was carried out. Health infrastructure and the ability to provide a rapid diagnosis have emerged as indispensable issues to contain the new outbreak of SARS-CoV-2. Currently the standard technique used is RT-qPCR, based on the detection of genetic material. It has a high sensitivity and specificity, although the time to obtain the results is relatively long. At the same time, rapid lateral flow antibody detection tests are being used both to make a diagnosis and to carry out seroprevalence studies. Rapid tests for the detection of lateral-flow antigens were discarded because of their low sensitivity and new tests of the same kind are in development. At the same time, many research groups are working on the design of new techniques. Nowadays the best way to detect the virus is by combining RT-qPCR and rapid serological tests. Meanwhile, new technological advances are expected in the short term.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, diagnosis, rapid detection techniques, RT-qPCR.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Origen y antecedentes históricos	1
1.2. Reservorios primarios y huéspedes de los coronavirus	2
1.3. Filogenia	2
1.4. Estructura del SARS-CoV-2	3
1.4.1. Estructura proteica	3
1.4.2. Estructura del genoma viral	4
1.5. Ciclo de replicación	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
4. RESULTADOS	8
4.1. Técnicas actualmente en uso	9
4.1.1. Técnica molecular: RT-qPCR	9
4.1.2. Inmunoensayos	10
4.1.2.1. Test rápidos de detección de anticuerpos	11
4.1.2.2. Test rápidos de detección de antígenos	13
4.2. Alternativas para la detección del virus	14
4.2.1. ddPCR	14
4.2.2. RT-LAMP	14
4.2.3. Tecnología basada en la utilización de la ADN polimerasa del fago phi29	15
4.2.4. Dispositivos biosensores	15
5. DISCUSIÓN	16
6. CONCLUSIONES	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22
7.1. Artículos y libros	22
7.2. Páginas web	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen y antecedentes históricos

El SARS-CoV-2 apareció en Wuhan (provincia de Hubei, China) a finales de diciembre de 2019. Este nuevo virus es el causante de la enfermedad infecciosa del síndrome respiratorio agudo severo altamente transmisible conocida hoy en día como COVID-19 (Reina, 2020; Shereen et al., 2020). La Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan informó el 31 de diciembre de 2019 sobre la existencia de un grupo de casos que padecían un cuadro de neumonía de etiología desconocida, y cuyos pacientes tenían en común el haber visitado un mercado de marisco, pescado y animales vivos en la ciudad de Wuhan (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2020). Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron que algunas personas habían contraído la infección sin haber estado en el mercado de mariscos. Estas observaciones pusieron de manifiesto la capacidad de propagación de humano a humano del nuevo virus, que posteriormente se informó en más de un centenar de países de todo el mundo (Shereen et al., 2020). El 7 de enero de 2020, las autoridades chinas identificaron como agente causante del brote un nuevo tipo de virus de la familia *Coronaviridae* que inicialmente se denominó 2019-nCoV, y que posteriormente fue renombrado como SARS-CoV-2 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Gorbalenya et al., 2020; OMS, 2020). Tras la rápida expansión de la COVID-19 a numerosos países, el 11 de marzo de 2020 la Organización Mundial de la Salud declaró la pandemia mundial (OMS, 2020).

Los coronavirus fueron descritos por primera vez en 1966 a partir de las secreciones nasales de un paciente con rinitis (Acter et al., 2020). Son una subfamilia de virus ARN monocatenario de longitud variable (26-32 kb), de pequeño tamaño (65-125 nm de diámetro). Aunque sus huéspedes naturales son animales como aves y diversos mamíferos, son capaces de transmitirse e infectar al ser humano, tratándose así de una zoonosis (Acter et al., 2020). En 2003 surgió en la provincia de Guangdong, el virus SARS-CoV que causó en la población china un síndrome respiratorio agudo severo y que más tarde se expandió a diversos países causando 8000 personas infectadas. Casi una década más tarde, en 2012 apareció el MERS-CoV causando el síndrome respiratorio de Oriente Medio. La OMS informó de que este virus había infectado a 2428 personas (Shereen et al., 2020). Los coronavirus que causan patologías en el ser humano (HCoV) pueden producir cuadros clínicos diferentes en cuanto a su gravedad. Mientras que algunos integrantes del subgrupo *Alfa-coronavirus* producen infecciones respiratorias leves o moderadas como el resfriado común que muestra un patrón estacional de invierno, otros causan afecciones de mayor gravedad como los producidos por el SARS-CoV y el MERS-CoV anteriormente mencionados (Acter et al., 2020; Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2020). Los brotes de ambos virus han demostrado la posibilidad de transmisión de animales a humanos y entre humanos. Hasta 2019 se conocían tan sólo estos dos casos de coronavirus que también habían causado una epidemia en la población humana (Reina, 2020) y es probable que nuevos brotes de CoV sean inevitables en el futuro debido a los cambios del clima y la ecología, y al incremento de las interacciones de los humanos con los animales. Por este motivo, la necesidad de desarrollar técnicas de diagnóstico, terapias y vacunas eficaces contra los CoV es de gran importancia (Chen et al., 2020).

1.2. Reservorios primarios y huéspedes de los coronavirus

Determinar la fuente de origen es importante a la hora de poder desarrollar estrategias preventivas para la contención de la infección. Tras encontrar similitudes genómicas del SARS-CoV-2 con el SARS-CoV se determinó que los murciélagos del género *Rhinolophus sp.* consisten en el reservorio natural más probable de ambos, sin embargo, del primero todavía no se ha identificado el huésped intermedio (Trilla, 2020; Shereen et al., 2020; Walls et al., 2020). En cuanto al SARS-CoV los investigadores determinaron como huéspedes secundarios a la civeta de las palmeras y al perro mapache para la transmisión zoonótica de dicho virus (Walls et al., 2020). Por otra parte, el MERS-CoV tiene como huésped primario el camello, aunque también se detectó en los murciélagos del género *Pipistrellus sp.* y *Perimyotis sp.* sugiriendo que los murciélagos son los huéspedes clave y el medio de transmisión del virus (Shereen et al., 2020).

1.3. Filogenia

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae* en la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales*. Esta subfamilia se subdivide en cuatro géneros: *Alfa-coronavirus*, *Beta-coronavirus*, *Gamma-coronavirus* y *Delta-coronavirus*. Normalmente, los dos primeros infectan mamíferos y los otros dos aves y peces, aunque también es posible que infecten mamíferos. El estudio de la secuencia del genoma de SARS-CoV-2 ha demostrado que pertenece al género *Beta-coronavirus* (Chen et al., 2020). El análisis del árbol filogenético del nuevo coronavirus (Figura 1) ha revelado que el SARS-CoV-2 pertenece, junto con SARS-CoV y Bat-SARS, a un clado diferente del MERS-CoV, y está filogenéticamente más relacionado con los coronavirus Bat-SARS aislados en China de los murciélagos de herradura (*Rhinolophus sp.*) entre 2015 y 2018, que al SARS-CoV. Este hallazgo sugiere que SARS-CoV y MERS-CoV han sufrido una evolución viral diferente, involucrando a los murciélagos como reservorio primario (Petrosillo et al., 2020).

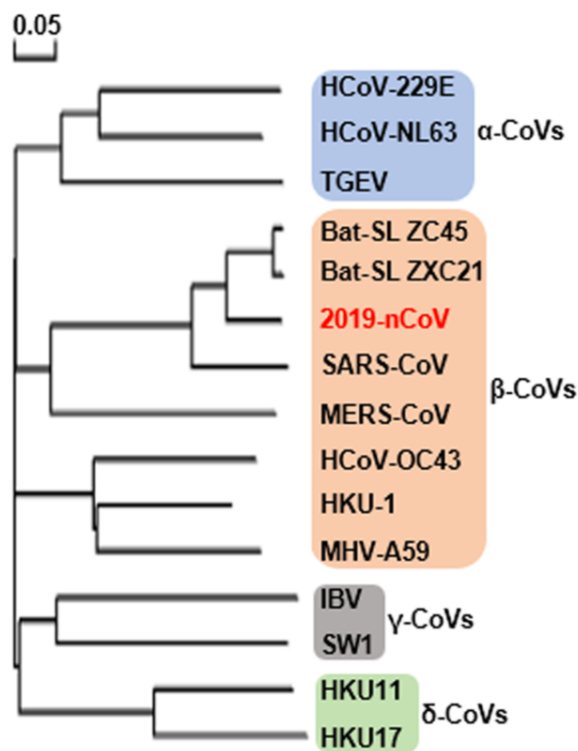


Figura 1. Árbol filogenético del coronavirus. Modificado de Chen et al., (2020).

El género *Alfa-coronavirus* incluye el coronavirus humano 229E (HCoV-229E) y el NL63 (HCoV-NL63), así como el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). El género *Beta-coronavirus* incluye varios subgrupos, de los que destacamos los coronavirus humanos HCoV-OC43 y HKU1, así como MERS-CoV, SARS-CoV, y el nuevo SARS-CoV-2 que aparece en rojo en la

Figura 1, escrito con la nomenclatura inicial 2019-nCov. Por otra parte, el género *Gamma-coronavirus* incluye todos los coronavirus aviares identificados hasta 2009 y el género *Delta-coronavirus* incluye coronavirus identificados por la Universidad de Hong Kong (HKU) (Chen et al., 2020).

1.4. Estructura del SARS-CoV-2

1.4.1. Estructura proteica

El SARS-CoV-2 se caracteriza por poseer cuatro glucoproteínas estructurales principales (Figura 2), la glucoproteína espiga o proteína S, la glucoproteína de envoltura (proteína E), la glucoproteína de membrana (proteína M) y la proteína nucleocápside (proteína N), además de diferentes proteínas accesorias (ORFs). La espiga o proteína S es una proteína transmembrana que forma parte de la porción externa del virus y que tiene aproximadamente un peso molecular de 150 kDa. Se caracteriza por formar homotrímeros que sobresalen en la superficie viral, otorgándole el aspecto de corona característico de esta familia de virus. Su función es facilitar la unión de la envoltura del virus a las células huésped al interactuar con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) expresada en las células del tracto respiratorio inferior (Astuti, 2020; Walls et al., 2020). La proteína S es escindida por la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) con la cooperación de la furina de la célula hospedadora en dos subunidades funcionales S1 y S2 (Drak A., 2020). La subunidad S1 es la responsable de la unión al receptor de la célula huésped y la subunidad S2 se encarga de la fusión de las membranas viral y celular (Astuti, 2020; Walls et al., 2020). Por su parte, la nucleocápside también conocida como proteína N está estructuralmente unida al material de ácido nucleico del virus (Astuti, 2020). Su función es mediar el ensamblaje viral interactuando con la proteína M y con el genoma (Naqvi et al., 2020). Otro componente importante que forma parte de este virus es la glucoproteína de membrana o proteína M ya que determina la morfología de la envoltura del virus y tiene la capacidad de unirse al resto de proteínas estructurales. La unión con la proteína M ayuda a estabilizar la nucleocápside y promueve la finalización del ensamblaje viral al estabilizar el complejo proteína N-ARN, dentro del virión interno. El último componente por destacar es la envoltura o proteína E, que constituye la proteína más pequeña de la estructura del SARS-CoV-2. Su papel es fundamental en cuanto a la producción y maduración del virus (Astuti, 2020).

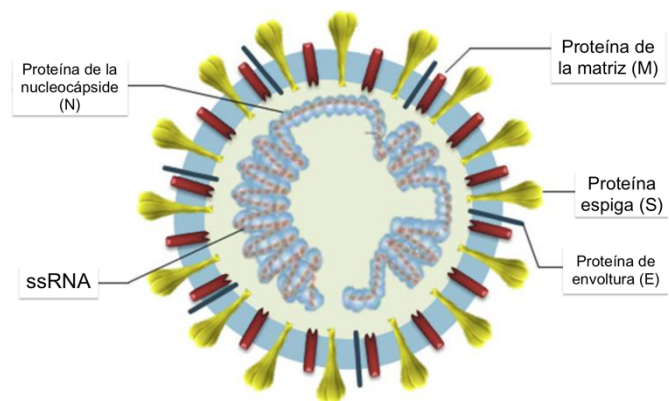


Figura 2. Estructura de SARS-CoV-2. Modificado de Chen et al., (2020).

1.4.2. Estructura del genoma viral

El genoma del SARS-CoV-2 es un ARN monocatenario de sentido positivo (perteneciente a la clase IV según la clasificación de Baltimore) con una caperuza 5' y una cola poli-A 3' (Naqvi et al., 2020). El genoma recién secuenciado del SARS-CoV-2 (Genbank: [MN908947](#)) fue compartido por las autoridades chinas el 12 de enero de 2020 en la plataforma Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) (Wu et al., 2020). Su composición genética la conforman entre trece y quince marcos de lectura (ORF) que contienen aproximadamente 30.000 nucleótidos y es muy similar a los genomas de SARS-CoV y Bat-SARS (Naqvi et al., 2020; D'Cruz et al., 2020). Presenta un contenido en guanina-citosina del 38%. El orden de sus genes está altamente conservado en sentido 5'-3' tal y como se puede observar en la Figura 3. El primer gen se encarga de la replicación y de la transcripción. Este se traduce en dos grandes poliproteínas no estructurales (1a y 1b) mediante dos marcos de lectura abiertos. Seguidamente se encuentran los genes de las proteínas estructurales S, E, M y N y del resto proteínas accesorias (ORF3, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF10 y ORF14) (Tu et al., 2020; Naqvi et al., 2020).

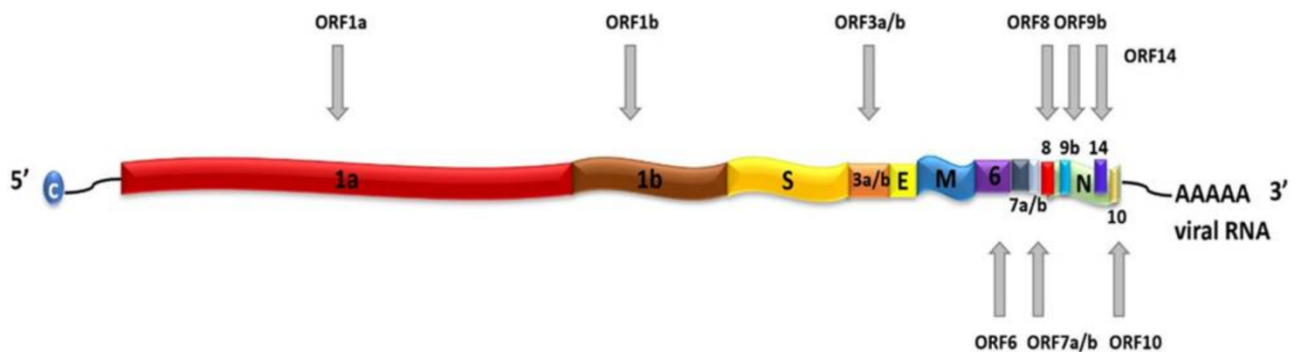


Figura 3. Representación esquemática del genoma de SARS-CoV-2 (D'Cruz et al., 2020).

La proteína estructural de mayor importancia como objetivo terapéutico es la glucoproteína espiga (S) ya que es la que se une a la célula hospedadora, pero la mayoría de las proteínas integradoras del genoma de SARS-CoV-2 tienen una función conocida (Tabla 1).

La comparación genómica entre SARS-CoV y SARS-CoV-2 ha demostrado que solo hay 380 sustituciones de aminoácidos entre SARS-CoV-2 y coronavirus similares al SARS, concentrados principalmente en los genes de proteínas no estructurales, mientras que se han encontrado 27 mutaciones en genes que codifican la proteína S responsable de la unión al receptor y la entrada celular. Estas mutaciones podrían explicar la aparente menor patogenicidad del SARS-CoV-2 en comparación con el SARS-CoV, pero se requieren más estudios (Petrosillo et al., 2020). Asimismo, un evento de recombinación genética en la región de unión al receptor (RBD) de la proteína S puede haber mejorado su capacidad de transmisión con respecto al SARS-CoV (Shereen et al., 2020).

Tabla 1. Proteínas asociadas con los 14 ORF de SARS-CoV-2 y su función (D’Cruz et al., 2020).

Gen	Proteína	Función
ORF1a	Replicasa poliproteína 1a	Transcripción y replicación viral
ORF1b	Replicasa poliproteína 1ab	Transcripción y replicación viral
S	Glucoproteína de espiga (S)	Entrada a la célula huésped
ORF3a	Proteína 3a	Forma un canal de iones de potasio en la membrana de la célula huésped y ayuda al ensamblaje del virión
E	Proteína E	Ensamblaje de los viriones y morfogénesis
M	Proteína de membrana (M)	Ensamblaje de los viriones y morfogénesis
ORF6	Proteína 6	Antagonista del interferón
ORF7a	Proteína 7a	Activa la liberación de citoquinas proinflamatorias para la patogénesis viral
ORF7b	Proteína 7b	Proteína estructural y accesoria
ORF8	-	Desconocido (interactúa con la proteína E)
N	Nucleoproteína (N)	Empaquetamiento genómico, transcripción y ensamblaje de viriones
ORF9b	Proteína no caracterizada 14	Desconocida
ORF10	Proteína 9b	Desconocida
ORF14	Proteína ORF10 hipotética	Expresión desconocida

1.5. Ciclo de replicación

Acoplamiento y entrada

La unión de la porción soluble de la proteína espiga (S), es decir, de su parte más externa, a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) es el primer paso de la infección de los neumocitos tipo II presentes en los alveolos, en los cuales se encuentra dicho receptor celular. Para lograr la entrada del virus en la célula, este emplea las dos subunidades de la glucoproteína espiga (S). La subunidad 1 (S1) es la responsable de la propia unión al receptor y la subunidad 2 (S2) se encarga de la fusión de la membrana viral y celular (Rabi et al., 2020). Cuando esta unión tiene lugar, el complejo resultante es procesado proteolíticamente por la serin-proteasa transmembrana tipo II (TMPRSS2) propia de la célula hospedadora con ayuda de furina (Drak A., 2020). Como consecuencia ocurre la escisión de ECA2 y la activación de la glucoproteína espiga. Así, en la membrana de la célula hospedadora se abre un poro por donde el virus penetra en la misma (Rabi et al., 2020).

Replicación y transcripción

Una vez en su interior, el ARN viral es liberado en el citoplasma y este se une al ribosoma de la célula huésped. Así, comienza la traducción del gen de la replicasa del ARN genómico. Los coronavirus codifican dos o tres proteasas que escinden la poliproteína de la replicasa en las poliproteínas no estructurales 1a y 1b. Muchas de ellas se ensamblan en el complejo replicasa-transcriptasa

denominado ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), cuya función es llevar a cabo la replicación del ARN genómico de sentido positivo y la transcripción de los ARNs subgenómicos como genes o ARN mensajero (Rabi et al., 2020; Malik, 2020; Acter et al., 2020).

Ensamblaje y liberación

Posteriormente, las glucoproteínas estructurales S, M y E recién formadas, se insertan en el retículo endoplasmático y se combinan con la proteína N mediante interacciones proteína-proteína dirigidas mayormente por la proteína M. Los genomas virales son encapsulados por la proteína N, que migrarán en las vesículas hacia la membrana plasmática como viriones y, en última instancia serán liberados por exocitosis como virus maduros los cuales serán capaces de infectar nuevas células huésped cerrando el ciclo de replicación (Figura 4), que culminará con la recuperación o el fallecimiento de la persona infectada (Rabi et al., 2020; Malik, 2020; Acter et al., 2020).

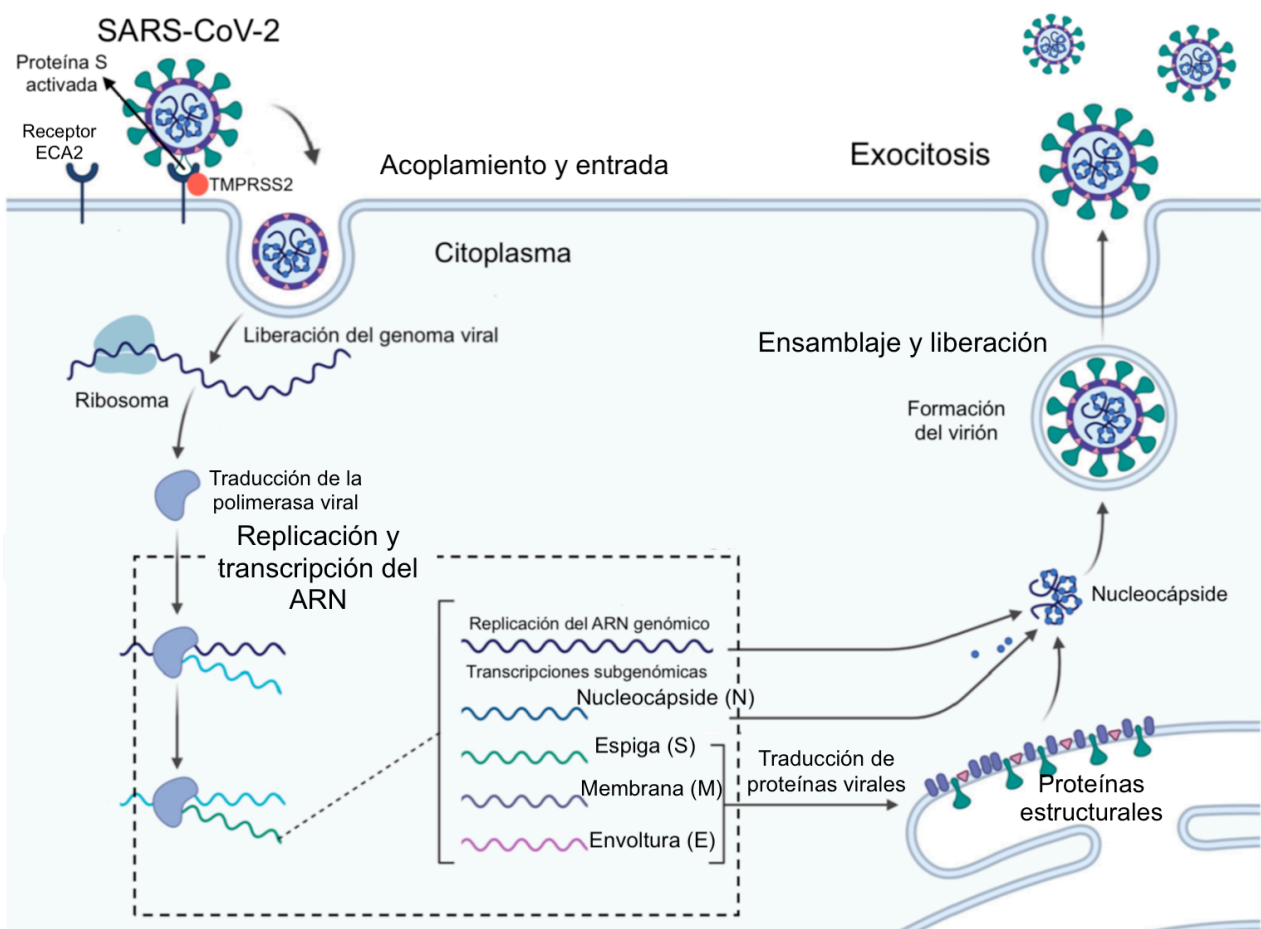


Figura 4. Ciclo de replicación de SARS-CoV-2. Modificado de Acter et al., 2020.

La entrada viral y la infección celular desencadenan la respuesta inmune del huésped, y la cascada inflamatoria es iniciada por las células presentadoras de antígeno (APC). El proceso comienza con la presentación del antígeno extraño a las células CD_4^+ -T-colaboradores (Th1), y continúa con la liberación de la interleucina 12 para estimular aún más la célula Th1. Las células Th1 estimulan las células CD_8^+ -T-killer (Tk) que se dirigirán a cualquier célula que contenga el antígeno extraño. Además, las células Th1 activadas estimulan a las células B para que produzcan anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión (Rabi et al., 2020).

El problema de salud pública que ha supuesto la COVID-19 a nivel mundial ha hecho de vital importancia el diagnóstico oportuno y preciso de la infección por SARS-CoV-2 para proporcionar un tratamiento adecuado a los pacientes, para limitar su propagación y en última instancia para eliminar el virus de la sociedad humana. Para ello, en la actualidad se están desarrollando diferentes técnicas las cuales se describen en el presente trabajo. Además, también se incluyen técnicas ya existentes de gran importancia para el diagnóstico de esta enfermedad infecciosa.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es la determinación de las características de las diferentes técnicas empleadas en la actualidad para la detección del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 mediante la descripción de las mismas, así como conocer diversas alternativas que se encuentran bajo investigación y determinar las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas a la hora de emitir un diagnóstico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En primera instancia se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos científicos en bases de datos como PubMed Central (PMC), Scopus y WoS (Web of Science), en NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) y en Google Scholar para tratar de conocer aspectos básicos del virus como su origen, estructura y ciclo de replicación. Posteriormente se utilizaron también para la búsqueda de artículos sobre el tema a abordar, empleándose términos con carga semántica referentes al título del trabajo como SARS-CoV-2, COVID-19, técnicas de detección, RT-qPCR, test inmunológicos entre otras, tanto en español como en inglés. Aproximadamente el 70% de los artículos seleccionados han sido revisados y así se referencian en la bibliografía, aunque debido a la gran cantidad de artículos de interés no ha sido posible revisar su totalidad. Otra metodología empleada ha sido observar la bibliografía utilizada en los propios artículos para profundizar en algunos temas más concretamente. Se emplearon también varios libros de la Biblioteca de la Facultad de Ciencias de la UDC, para tratar los temas más generales de las técnicas de diagnóstico. Además, se consultaron diversas páginas webs como la de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), así como algunas fichas técnicas *online*. Asimismo, he visualizado un webinar organizado por el CSIC emitido en directo el 3 de junio de 2020.

4. RESULTADOS

La infraestructura sanitaria y la capacidad de proporcionar un diagnóstico rápido han surgido como cuestiones indispensables para contener el nuevo brote de SARS-CoV-2. Entre los días 11 y 12 de febrero de 2020, la OMS (Organización Mundial de la Salud) en colaboración con el GloPID-R (La Colaboración Global de Investigación para la Preparación de Enfermedades Infecciosas) identificaron como una de las prioridades movilizar la investigación sobre el diagnóstico rápido de pruebas de punto de atención o “*point of care*” para su utilización a nivel comunitario. Así, hasta la fecha del presente trabajo, la investigación ha puesto total atención en dar respuesta a la necesidad urgente de acceder a diagnósticos precisos y normalizados para SARS-CoV-2. Los distintos países han aplicado diferentes estrategias de ensayo, lo que refleja la variabilidad de diagnósticos y reactivos, y la importancia de los distintos sistemas de salud. En este trabajo se describen las pruebas de diagnóstico de los brotes de COVID-19 y el uso estratégico de las mismas. El tipo de muestra indicado va a depender de la técnica a emplear. Las más requeridas son muestras nasofaríngeas u orofaríngeas recogidas con hisopos o sangre total capilar, aunque también pueden tomarse esputos (en caso de ser expectorado por el paciente), lavados broncoalveolares, orina y heces (Shormin & Yusuf, 2020).

Por otra parte, la calidad de las técnicas diagnósticas es fundamental para garantizar una óptima sensibilidad y especificidad. En la actualidad, el Centro Europeo para la prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) está trabajando en estrecha cooperación con la Comisión Europea, las autoridades de los Estados miembros, la organización no gubernamental FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) y la OMS en la validación en curso de estas pruebas rápidas e informarán a los países de la UE (Unión Europea) y del EEE (Espacio Económico Europeo) sobre los resultados. Estos guiarán a la determinación de qué pruebas son más adecuadas para cada situación (Shormin & Yusuf, 2020). Según la Directiva IVD 98/79/CE, para colocar la marca CE (Conformidad Europea) en los dispositivos de diagnóstico COVID-19, el fabricante debe especificar las características de funcionamiento del dispositivo y declarar su conformidad con los requisitos de seguridad y funcionamiento enumerados en la directiva. Asimismo, los autodiagnósticos destinados a ser utilizados por los propios pacientes también deben ser evaluados, aunque en este caso por un tercer organismo. Tanto el rendimiento como la precisión y sensibilidad de las pruebas puede variar en los laboratorios de rutina en comparación con el estudio de rendimiento realizado por el fabricante. Por consiguiente, la validación clínica del rendimiento diagnóstico de las pruebas rápidas para COVID-19 debe realizarse mediante la comparación con una prueba estándar en un número significativamente representativo de pacientes antes de introducirlas en la rutina de los laboratorios clínicos. Una vez validadas serán beneficiosas para el control de la pandemia, siempre que la producción y distribución del dispositivo sea masiva para complementar las pruebas moleculares y apoyar la capacidad de pruebas descentralizadas ya existentes. El ECDC recomienda seguir la guía técnica de la OMS sobre el análisis de las muestras clínicas disponible en: www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance-publications. El asesoramiento del ECDC para las pruebas del SARS-CoV-2 se puede consultar en www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus/laboratory-support. El ECDC actualizará su orientación cuando disponga de más información sobre pruebas rápidas validadas y pruebas sobre su rendimiento (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020).

4.1. Técnicas actualmente en uso

4.1.1. Técnica molecular: RT-qPCR

La prueba diagnóstica molecular estándar para detección de COVID-19 es la RT-qPCR que está basada en la detección del material genético del virus (D’Cruz et al., 2020). La RT-qPCR o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real es una variante de la PCR a tiempo real (también denominada PCR cuantitativa o qPCR) en la que se retrotranscribe una hebra de ARN en ADN complementario utilizando una enzima denominada transcriptasa inversa. Posteriormente se inicia el proceso de amplificación mediante una PCR a tiempo real, que está basada en la amplificación de fragmentos de ADN del virus a partir de un reducido número de copias del material genético, mediante ciclos consecutivos de incrementos y descensos de temperaturas, y además se cuantificará simultáneamente el producto de amplificación de ADN (Sambrook & Russell, 2001). Para ello se requiere, un molde de ADN, dos cebadores específicos (directo y reverso), dNTPs, un tampón de reacción y la enzima DNA polimerasa termoestable. Se ha de añadir también una sonda marcada con un fluoróforo (sondas TaqMan™ o similar) que permite medir la tasa de generación del producto (Sambrook & Russell, 2001). Se realiza en equipos especializados como los termocicladores LigthCycler® o análogos provistos de sensores de fluorescencia. Cada medición del fluoróforo se realiza después de cada ciclo de amplificación. Tras la secuenciación del genoma, que fue compartida por las autoridades chinas (Wu et al., 2020; Genbank: [MN908947](#)), ha sido posible diseñar varios conjuntos de cebadores y sondas específicos para SARS-CoV-2 en diferentes países para llevar a cabo la amplificación del genoma por PCR, los cuales fueron publicados por la OMS. Estos cebadores están dirigidos a diferentes zonas de la secuencia genética del virus siendo el gen E (gen de proteína de envoltura) y el gen RdRp (gen de ARN polimerasa dependiente de ARN) los objetivos de mayor sensibilidad (D’Cruz et al., 2020).

Para realizar esta técnica en primer lugar es necesario el aislamiento del virus a partir de un frotis de las vías respiratorias superiores y/o inferiores recogidas generalmente con un hisopo nasofaríngeo u orofaríngeo, pudiendo ser también muestras de lavado broncoalveolar, aspirados traqueales y esputo. A continuación, se lleva a cabo la extracción y purificación del ARN vírico (Figura 5a). La muestra purificada se somete a transcripción reversa para la obtención de ADN complementario (Figura 5b) y seguidamente es amplificado mediante la PCR a tiempo real (Figura 5c) (D’Cruz et al., 2020; Udugama et al., 2020). En cuanto a la posterior interpretación de los resultados, se determina previamente el valor del umbral de ciclo (C_T), que puede variar según el protocolo. El umbral de ciclo se define como la intersección entre una curva de amplificación y la línea de umbral y corresponde con el número de ciclos de replicación necesarios para producir una señal fluorescente (ThermoFisher Scientific, 2016). Después de un determinado número de ciclos de amplificación se obtiene una gráfica en un programa informático (Figura 5d). Se consideran resultados positivos con presencia de ARN vírico aquellas muestras con un umbral superior al determinado previamente, obteniéndose una curva sigmoidea (en forma de "S") que indica en qué ciclo comienza la amplificación. Por el contrario, si el resultado es negativo, la curva no sobrepasará el umbral de fluorescencia detectada indicando la ausencia del virus en la muestra analizada (Shormin & Yusuf, 2020). La positividad de los resultados puede comenzar con anterioridad a la aparición de los síntomas y comienza a disminuir en la tercera semana, posteriormente se vuelve indetectable (Tabla 2). Sin embargo, se han dado casos en pacientes

gravemente enfermos en los que la positividad de la PCR ha persistido durante más de tres semanas, cuando en los casos más leves cabría esperar un resultado negativo. Es importante destacar que un resultado positivo refleja la detección de ARN viral, pero no indica necesariamente la presencia de virus viables. Se requieren calibradores externos para estimar la concentración del analito desconocido. Las imperfectas eficiencias de amplificación afectan a los umbrales de ciclo, que a su vez limitan la precisión para la cuantificación absoluta. En la práctica clínica se han detectado casos en los que el resultado de la prueba RT-qPCR concluyó negativo y sin embargo, los signos y síntomas del paciente sugerían infección de SARS-CoV-2, confirmándose la sospecha al cabo de cinco o seis días mediante una nueva RT-qPCR, momento en el que la carga viral fue superior (Suo et al., 2020).

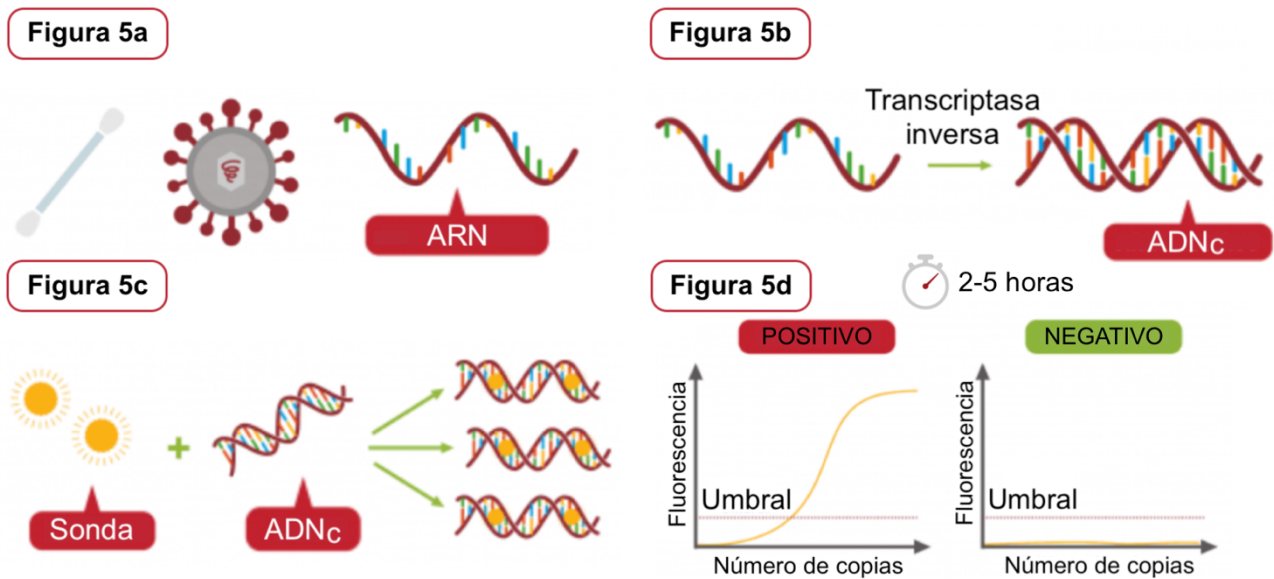


Figura 5. Esquema de la RT-qPCR desde la recogida de la muestra hasta la obtención de los resultados. Modificado de Andy Brunning©/Compound Interest 2020.

4.1.2. Inmunoensayos

Los inmunoensayos son un conjunto de técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio en los que las sustancias sujeto de estudio (el analito) son antígenos (Ag) o anticuerpos (Ac) que se unirán a anticuerpos monoclonales purificados o a antígenos recombinantes respectivamente. Se trata de pruebas conocidas como punto de atención o “*point of care*”, es decir, aquellas que pueden realizarse fuera de un laboratorio. Estas son requeridas para realizar pruebas a gran escala como en el caso actual. Aunque están bajo estudio exhaustivo, actualmente se dispone de dos modalidades: inmunoensayos basados en la detección de anticuerpos e inmunoensayos basados en la detección de antígenos (Shormin & Yusuf, 2020).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son polipéptidos que circulan en el torrente sanguíneo producidos en vertebrados en respuesta a cualquier compuesto biológico de carácter antigénico y constituyen los principales mediadores de la respuesta humoral. Están formados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, ambas idénticas entre si, que están unidas covalentemente por enlaces

disulfuro. Cada cadena presenta una región variable, con una secuencia aminoacídica específica del anticuerpo en cuestión (paratopos), mediante la que se establece la unión con los epítomos o determinantes antigénicos, y una región constante, característica de la especie que corresponda. Cuando el anticuerpo es degradado enzimáticamente, este se separa en dos fragmentos, la región Fab que está constituida por la región variable de las cadenas pesadas y ligeras y la región Fc, que se corresponde con las regiones constantes. Existen diferentes isotipos de anticuerpos que difieren en la estructura de la cadena pesada (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) (Abbas et al., 2018; Peragón & Peinado, 2019).

4.1.2.1. Test rápidos de detección de anticuerpos

Se basan en la detección de anticuerpos generados en el organismo de la persona infectada, es decir, se trata de un método indirecto. Ante la exposición a agentes víricos infecciosos, el sistema inmune humano responde desencadenando una respuesta de defensa basada en la producción de anticuerpos que confieren cierta inmunidad ante posteriores reinfecciones. Dichos anticuerpos suelen tener como diana determinantes antigénicos clave en el agente patógeno, por ejemplo, las proteínas estructurales del virus. Esta tecnología consiste en detectar cualitativamente los anticuerpos IgM y/o IgG empleando el principio de inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA) a partir de una muestra de sangre capilar recogida empleando una lanceta y una pipeta Pasteur. Existen diferentes técnicas o soportes para la realización de este test pero la mayoría presentan el mismo fundamento y están basadas en el marcaje con oro coloidal. Se trata de dispositivos portátiles en forma de casete que incluyen una tira reactiva constituida por una membrana de nitrocelulosa y una zona donde se deposita la muestra de sangre capilar total, suero o plasma del paciente (Figura 6). La tira reactiva contiene los antígenos recombinantes virales ya sean proteínas S o proteínas E inmovilizados, los anticuerpos monoclonales específicos anti-IgM humano o anti-IgG humano conjugados con oro coloidal en la zona de detección de la IgM y de la IgG respectivamente, y de igual manera los anticuerpos correspondientes en el área de control de calidad. Así, la muestra migra por absorción hasta toparse con las nanopartículas de oro coloidal unidas a los antígenos y a los anticuerpos secundarios contra el anticuerpo humano, que marcarán el analito a detectar en caso de haberlo. Al cabo de pocos minutos se obtiene el resultado de forma visual en la zona de detección como consecuencia del complejo de unión antígeno viral-anticuerpo humano-anticuerpo secundario. Un resultado positivo de anticuerpos indica la unión entre los antígenos virales y los anticuerpos del paciente. Esto genera una señal colorimétrica púrpura que permite interpretar el resultado de forma sencilla (Wen et al., 2020; Pan et al., 2020).

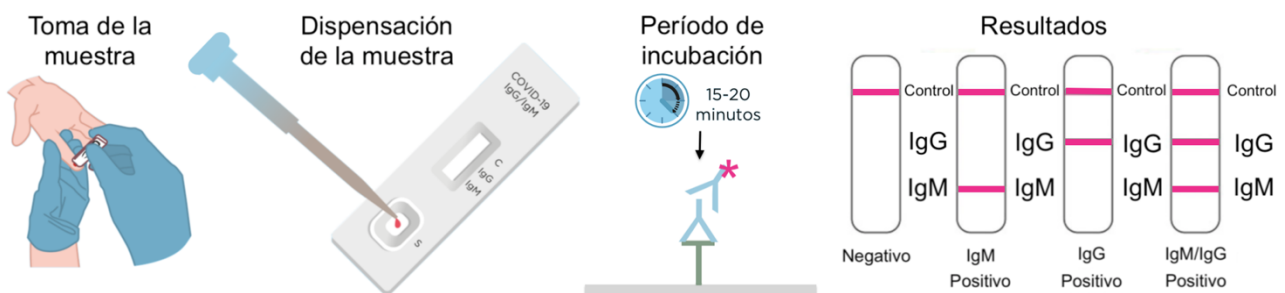


Figura 6. Procedimiento de los test serológicos. Modificado de la Fundación Española del Corazón.

Para este ensayo no se requiere una fase activa de la infección, es decir, no es necesario que el virus se encuentre en el organismo. Por ende, es un método útil para el diagnóstico de COVID-19, pero también para la realización de estudios epidemiológicos, ya que permite medir los niveles de anticuerpos con el tiempo y además permite diferenciar entre distintos tipos de anticuerpos, que se corresponden con distintas etapas de la infección: las inmunoglobulinas M (IgM) que indican un proceso agudo de la infección, es decir, una fase temprana de la misma, y las inmunoglobulinas G (IgG), las más abundantes en suero, indican bien infección primaria tardía, o bien una respuesta a la fase aguda de una infección secundaria (Abba et al., 2018). Según la Sociedad Española de Inmunología (SEI) las IgM son detectables a partir de siete días después de haber contraído la infección y las IgG, tras 14 o 15 días, aunque algunos autores afirman que es posible detectarlos antes. Los títulos de anticuerpos presentes en el organismo van a depender de la respuesta inmune de cada paciente (Figura 7, Tabla 2). En definitiva, los test serológicos pueden proporcionar información valiosa tanto para diagnosticar masivamente una infección activa como una infección resuelta. En el caso de SARS-CoV-2, puede ser una herramienta de gran utilidad debido al número tan elevado de pacientes asintomáticos y al periodo de incubación relativamente largo (de aproximadamente de 14 días) antes de la aparición de síntomas (Pan et al., 2020).

Una alternativa a los test rápidos es el empleo de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), que difieren de los métodos clásicos en que el complejo antígeno-anticuerpo es reconocido al analizar un marcador enzimático conjugado con un reactivo, generalmente un anticuerpo. Según los resultados de un estudio reciente de Zhao et al., (2020) en el que se emplearon kits de ELISA, la utilización complementaria de la RT-qPCR y la detección de anticuerpos específicos, incrementa el porcentaje de diagnóstico al máximo tras 15 días desde el inicio de los síntomas.

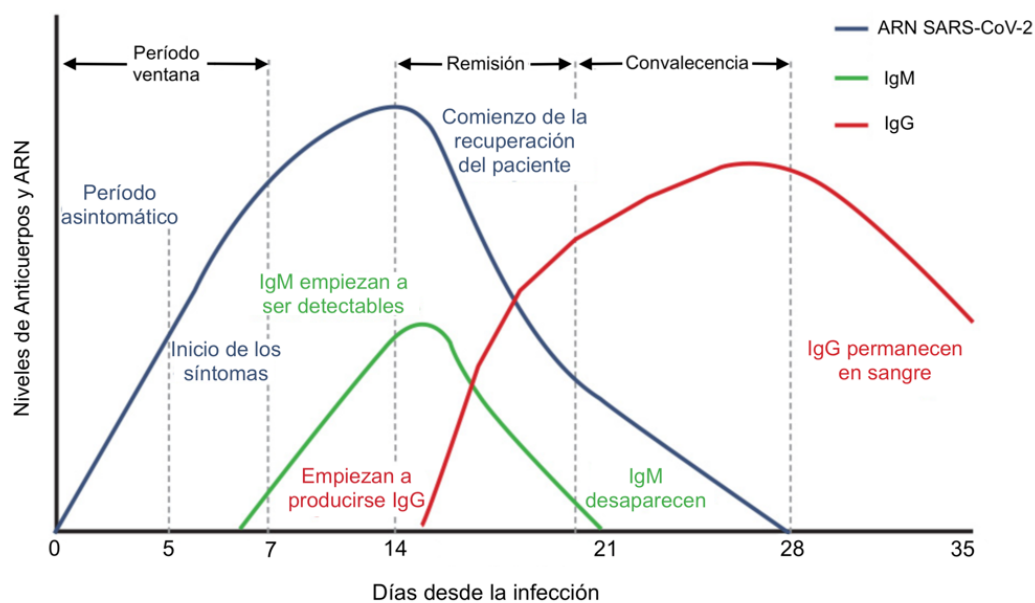


Figura 7. Evolución de los niveles de anticuerpos y ARN durante el curso de la COVID-19. Modificado de Laboratorio de Análisis Bioquímicos Guemes.

Tabla 2. Diagnóstico inmunológico y presencia de ARN de SARS-CoV-2 (Sociedad Española de inmunología).

Resultados			Significado clínico
RT-qPCR	IgM	IgG	
-	-	-	Negativo
+	-	-	Fase inicial (primeros 7 días)
+	+	-	Fase aguda (entre 7-13 días)
+	+	+	Fase activa con posible buen pronóstico por IgG
+	-	+	Fase final o posible recurrencia
-	+	-	Fase activa de entre 7-13 días con falso negativo de RT-PCR (carga viral disminuida)
-	+	+	Fase activa de más de 14 días con buen pronóstico por IgG (carga viral disminuida)
-	-	+	Fase de resolución de infección

4.1.2.2. Test rápidos de detección de antígenos

Se trata de un método directo en el que se pretende detectar el virus como entidad individual mediante sus antígenos virales, es decir, las proteínas que conforman el virus (Shormin & Yusuf, 2020). Son ensayos de flujo lateral o tiras reactivas portátiles constituidas por materiales derivados de la celulosa, de índole similar a las descritas en el subapartado anterior, pero en este caso contienen adsorbidos dichos anticuerpos específicos, los cuales reconocerán la sustancia diana al entrar en contacto con los mismos. Generalmente esta estrategia se basa en la detección de las proteínas estructurales como la proteína S, para poner de manifiesto moléculas virales completas o la proteína N, para detectar fragmentos del virus mediante el uso de anticuerpos específicos, y por este motivo la especificidad y sensibilidad del ensayo dependen directamente de la calidad y disponibilidad de los anticuerpos específicos. Es una técnica sencilla, con un fundamento muy similar a los test serológicos, tal y como se ilustra en la Figura 8. En este caso la muestra biológica a partir de la que se realiza la prueba es una muestra nasofaríngea recogida empleando un hisopo. Una vez tomada la muestra, se introduce el hisopo en un tubo con una solución reactiva proporcionada por el kit que contendrá anticuerpos monoclonales específicos conjugados con oro coloidal contra la sustancia diana (los antígenos virales que presuntamente están en la muestra). Así, en el caso de que el virus este presente se formará un complejo antígeno-anticuerpo marcado que dará una señal colorimétrica. A continuación, se realiza una transferencia directa de unas gotas de dicha solución sobre la tira reactiva, que también contiene otros anticuerpos específicos en la zona de detección. En caso de que el virus se encuentre presente en la muestra se unirá al anticuerpo adherido en la tira reactiva y como consecuencia se formará un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. El resultado se da en pocos minutos por un cambio colorimétrico detectable a simple vista en la zona de detección de la tira reactiva (Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, 2020). En la actualidad existen varias casas comerciales como Coris BioConcept que distribuyen anticuerpos para distintas proteínas de SARS-CoV que también reconocen el SARS-CoV-2, los cuales se están utilizando para poner a punto nuevos test de detección,

aunque ya se disponen también de test comercializados para la detección de SARS-CoV-2 específicamente.

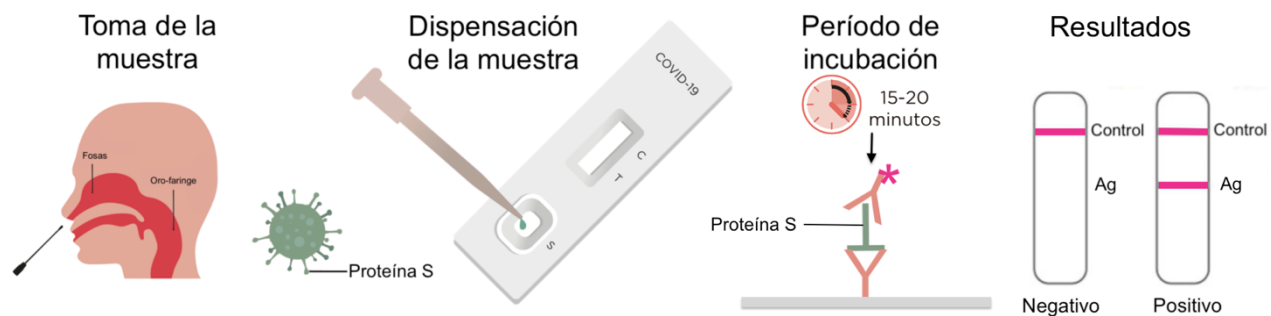


Figura 8. Procedimiento de los test de antígenos. Modificado de la Fundación Española del Corazón.

4.2. Alternativas para la detección del virus

4.2.1. ddPCR

La ddPCR o PCR digital de gotas de alto rendimiento permite la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos en una muestra determinada. Esta técnica ha sido desarrollada por Hindson en 2011 basándose en la PCR digital tradicional, la cual combina una dilución limitante, PCR de punto final y la estadística de Poisson. La ddPCR es un método que utiliza gotas de agua en aceite, del mismo modo que se realiza en la PCR digital de alto rendimiento, pero bajo una metodología más práctica y de menor coste. Se trata de dividir una muestra de 20 μL en los que se incluyen los cebadores y las sondas TaqMan™ en 20,000 gotas de aceite monodispersas, que se someten a un termociclado PCR hasta el punto final y seguidamente se hace la lectura de la amplitud de fluorescencia mediante citometría de flujo (Hindson et al., 2011).

4.2.2. RT-LAMP

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es un método de amplificación de ácidos nucleicos isotérmico. Actualmente se encuentra en fase de desarrollo para la detección de SARS-CoV-2 (Udugama et al., 2020). Diferentes laboratorios han desarrollado y probado clínicamente pruebas de transcripción inversa LAMP (RT-LAMP) para SARS-CoV-2 (Yu et al., 2020; Yang et al., 2020; Yan et al., 2020). En esta técnica se emplean entre cuatro y seis cebadores, reconociendo entre seis y ocho sitios distintos de la secuencia diana respectivamente. En concreto, se emplean dos cebadores internos (FIP y BIP) y dos cebadores externos (F3 y B3). Además, se pueden utilizar también dos cebadores de bucle, uno hacia delante (LF) y otro hacia atrás (LB) con el fin de acelerar la eficiencia de amplificación y detección. Una ADN polimerasa inicia la síntesis de la nueva cadena mientras que los cebadores forman bucles para facilitar y acelerar las posteriores rondas de amplificación (Udugama et al., 2020; Kashir & Yaqinuddin, 2020). Como su propio nombre indica esta técnica se lleva a cabo a una sola temperatura y no necesita equipos de laboratorio especializados para proporcionar sensibilidades analíticas similares a la PCR (Udugama et al., 2020). En las pruebas

de diagnóstico de LAMP, se añade una muestra a un tubo y el ADN amplificado se detecta por la producción de una fuerte reacción colorimétrica (Udugama et al., 2020).

4.2.3. Tecnología basada en la utilización de la ADN polimerasa del fago phi29

Es un proyecto de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) que pretende aplicar una versión mejorada de la ADN polimerasa del fago phi29 (phi29pol), descubierta en 1985 por Smith (Smith, 1985; Henry & Debarbieux, 2012). Según Luis Blanco esta enzima presenta una singular capacidad a la hora de amplificar el ADN, ya que puede multiplicar por miles o millones de veces el material genético independientemente de su tamaño e incluso de una muestra dañada. Esto sugiere que será un método ultrasensible que podrá contribuir a la mejora de la detección de la infección de COVID-19. El objetivo es desarrollar un dispositivo portátil que permita diagnosticar la enfermedad utilizando un procedimiento isotérmico de amplificación de forma sencilla, rápida (en menos de 30 minutos) y fiable, prescindiendo del proceso de termociclado. Además, se pretende adaptar esta metodología para detectar el virus tanto en el ambiente como en superficies con la finalidad de controlar la pandemia. Hasta la fecha no se tienen más datos sobre este proyecto (CNIO, 2020; CSIC, 2020).

4.2.4. Dispositivos biosensores

Existen diferentes técnicas alternativas en distintas fases de desarrollo que usan dispositivos biosensores. Son dispositivos integrados y autónomos constituidos por un chip sensor en contacto con la molécula biológica selectiva. En la superficie del sensor se pueden colocar antígenos, anticuerpos o sondas de ADN específicos para la sustancia, molécula o patógeno a detectar. Al ser capturada la molécula diana se producen cambios fisicoquímicos que son detectados por el transductor e inmediatamente procesados en un valor numérico cuantificable. Los biosensores ópticos son un tipo específico de biosensores para la detección genómica, basados en tecnología microelectrónica. Se utilizan para la detección directa de los fragmentos del ARN del virus, sin necesidad de llevar a cabo ciclos de amplificación que retrasan la obtención de los resultados (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2020).

Actualmente, en España se está desarrollando el proyecto CoNVat (liderado por Laura Lechuga), en el que se está trabajando para poner a punto una nueva plataforma biosensora basada en nanotecnología óptica (nanofotones) para proporcionar un diagnóstico de COVID-19 de forma rápida sin necesidad de equipamiento complejo y laboratorios centralizados (Figura 9). Es un proyecto financiado por la Unión Europea y liderado por el Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) en colaboración con la Universidad de Barcelona (UB), la Universidad Aix-Marsella (AMU) en Francia y el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INMI) en Italia. Esta tecnología que todavía se encuentra en fase de desarrollo consiste en un microchip con guías de onda interferométricas que podría ofrecer una buena alternativa a la RT-qPCR ya que ofrece una alta sensibilidad y precisión permitiendo la detección del virus además de la cuantificación de la carga viral, obteniéndose un resultado en un tiempo inferior a 30 minutos y no requieren amplificación. En este proyecto se contemplan dos estrategias: (i) la identificación del ARN vírico mediante sondas de ADN complementarias a las secuencias específicas del ARN. Así, se detecta la presencia de SARS-CoV-2 mediante hibridación selectiva con el material genómico del virus; (ii) detección directa del

virus mediante anticuerpos muy específicos unidos a la superficie del sensor, que reconocerán de forma muy selectiva la proteína S, capturando así moléculas completas de SARS-CoV-2. Esta unión se monitoriza en tiempo real, proporcionando una respuesta directamente proporcional a la carga viral en la muestra, es decir, se trata de un método de detección y cuantificación de respuesta rápida. Para este ensayo se requerirán muestras nasofaríngeas o saliva. Para leer el resultado de luz emitida se precisa equipamiento sofisticado, aunque también se está trabajando en miniaturizarlo y comercializar un dispositivo portátil (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2020).

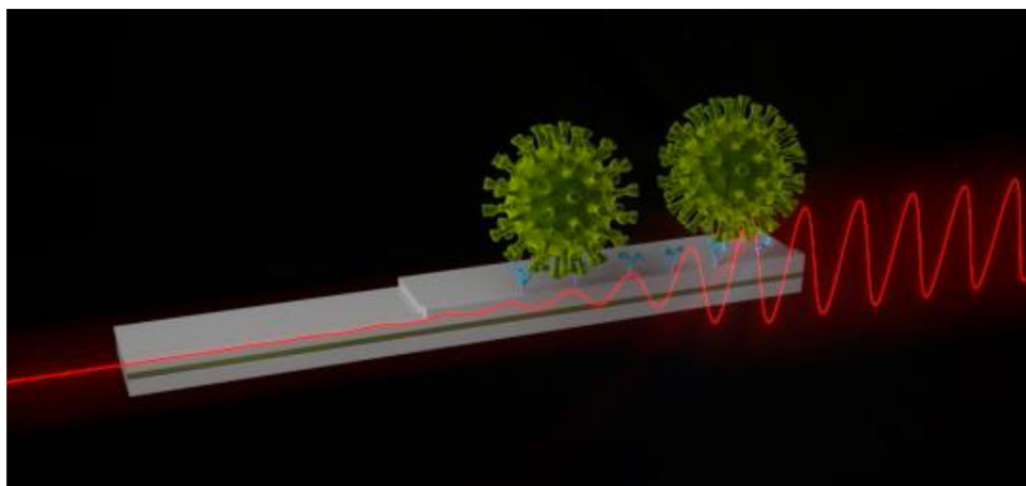


Figura 9. Ilustración del biosensor nanofotónico para la detección de SARS-CoV-2 (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2020).

La plataforma Salud Global del CSIC ha puesto en marcha multitud de proyectos nacionales y europeos de investigación para la detección del SARS-CoV-2 que permitirán comprender mejor la transmisión del virus, su dinámica y sus características clínicas y epidemiológicas (CSIC, 2020).

5. DISCUSIÓN

Todas las técnicas de detección de SARS-CoV-2 presentan ventajas e inconvenientes y así se resumen en la Tabla 3. Por su parte la RT-PCR como prueba diagnóstica para COVID-19 tiene una gran sensibilidad (D’Cruz et al., 2020). La PCR está muy bien establecida y es empleada de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios clínicos, es de fácil producción y comercialización, y escalable a multitud de kits. Además, las secuencias diana pueden ser aquellas que se requieran, siempre y cuando se conozca la secuencia genómica a detectar. La precisión con la que se seleccione el fragmento diana del genoma a detectar determinará su alta especificidad, ya que se pretende que sea una zona exclusiva del virus sujeto de estudio. Cabe destacar que esta técnica puede detectar el ARN viral aproximadamente dos días antes de la aparición de los síntomas y hasta pasados entre 14 y 21 días o incluso 30 días en casos clínicamente graves y también portadores asintomáticos. Sin embargo, también presenta limitaciones. Cuando la carga viral es demasiado baja, coincidiendo con los primeros días de infección, no es capaz de detectar el virus y además es una técnica relativamente

larga ya que se tarda entre dos y cinco horas en obtener un resultado. Esto conlleva una limitación cuando el volumen de muestras a analizar es alto como es el caso de la pandemia (Lippi et al., 2020). Con el fin de paliar esta limitación, Health Services Laboratories, un laboratorio londinense, ha desarrollado un ensayo de RT-qPCR simplificado en el que se elimina el proceso previo de extracción del ARN viral y puede ejecutarse en un termociclador a tiempo real empleando cebadores y sondas específicas. Se ha visto que este ensayo tiene una sensibilidad del 98% (Grant et al., 2020).

Por otra parte, la RT-qPCR es una técnica laboriosa que se ha desarrollado en laboratorios de bioseguridad de nivel 2, que requiere equipamiento especializado de coste variable según sus prestaciones y de personal altamente cualificado para minimizar la contaminación en los procesos de aislamiento, extracción y purificación del material genético, que conllevaría problemas de reproducibilidad y fiabilidad, pudiendo obtenerse tanto falsos positivos como negativos. Sin embargo, un estudio de Suo et al., (2020) mostró que un cierto número de falsos negativos son inevitables debido a la baja carga viral que puedan poseer las muestras, lo que puede comprometer el diagnóstico, tratamiento temprano y prevención de la transmisión de la COVID-19. Para minimizar los falsos negativos obtenidos en la RT-qPCR, gran parte de este grupo de investigadores han estudiado una novedosa técnica como uso complementario a la RT-qPCR, la PCR digital de pequeñas gotas (ddPCR) para la detección del ácido nucleico SARS-CoV-2, empleando ocho conjuntos de cebadores y sondas emitidos por diferentes instituciones (el Centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades, la Universidad de Hong Kong, o la Universidad de Berlín). Tras la comparación de los resultados obtenidos de realizar a las mismas muestras una RT-qPCR y una ddPCR, se determinó que en esta última la detección del virus en muestras con baja carga viral fue mayor, ya que el límite de detección de las ddPCR es significativamente inferior al de la RT-qPCR. No obstante, la ddPCR también presenta limitaciones considerables. Es una técnica dos veces más larga que la RT-qPCR y actualmente también presenta mayor coste. Además, no registra la amplificación en puntos específicos al igual que la qPCR, si no que mide la cantidad de ADN al completarse la amplificación, es decir, a punto final. Este estudio concluyó que la RT-qPCR es adecuada para el diagnóstico de SARS-CoV-2 a gran escala en muestras con una carga viral normal, aunque la ddPCR es más sensible y precisa en muestras en las que la carga viral es baja (Liu et al., 2020).

Además, numerosos estudios han demostrado la aplicación exitosa de LAMP (RT-LAMP) para detectar el ARN de SARS-CoV-2 a niveles significativamente bajos, demostrando que fueron suficientes entre una y diez copias de ARN del coronavirus para ser detectado con éxito mediante esta técnica lo que sugiere una alta sensibilidad del ensayo incluso mayor a la RT-qPCR (Kashir & Yaqinuddin, 2020). Esta tecnología aporta la ventaja de realizar una amplificación en condiciones de poco calor y destaca por ser más rápida que la RT-qPCR, (ya que se obtienen resultados en una hora) y su alta especificidad, esto es por la capacidad de los cebadores de reconocer hasta ocho regiones distintas del genoma (Njiru, 2012). Sin embargo, también presenta desventajas y una de ellas es la complejidad de la metodología ya que requiere un riguroso diseño de cebadores (Kashir & Yaqinuddin, 2020). Esta técnica ya se ha empleado con anterioridad para el estudio del MERS-CoV determinándose una alta sensibilidad de la misma (Shirato et al., 2014; Shirato et al., 2018).

La utilización de la ADN polimerasa del fago phi29 es una novedosa alternativa todavía en fase de desarrollo que permitiría la detección masiva de contagiados por SARS-CoV-2, incluyendo a los

asintomáticos, en menos de 30 minutos. Esta técnica se está diseñando para ser realizada *in situ* y sin necesidad de equipamiento especializado, lo que mejoraría las capacidades de detección del ARN del virus SARS-CoV-2 en la actualidad, ya que se minimizaría el tiempo de obtención de resultados y se facilitaría la logística de envío de muestras al laboratorio (CNIO, 2020; CSIC, 2020).

Los biosensores poseen una gran cantidad de ventajas. Destacan por su uso descentralizado, es decir, pueden realizarse fuera de los laboratorios de análisis, tanto en centros de atención primaria o terciaria como en urgencias de cualquier hospital, esto se debe en parte a que puede ser manejado por personal no especializado. Asimismo, posee una elevada sensibilidad equiparable a la RT-qPCR, ofreciendo un resultado cuantitativo en pocos minutos, el cual puede ser correlacionado con la cantidad de materia genómico del virus presente en la muestra analizada, y por tanto de la carga viral. Además, según el tipo de biosensor, puede proporcionar medidas en tiempo real, sin necesidad de amplificar señales o de usar marcajes ya sean colorimétricos o fluorescentes. Finalmente, cabe destacar su elevada versatilidad en cuanto a la variedad de análisis que puede realizar. Esto es debido a la posibilidad de tener microchips sensores que contengan distintos receptores inmovilizados como sondas ADN, proteínas o anticuerpos. Los biosensores ópticos todavía no se encuentran en el mercado ya que están bajo un exhaustivo desarrollo. También destacan por su extraordinaria sensibilidad evitando la amplificación, sin embargo, se necesita equipamiento sofisticado para la lectura del resultado (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2020).

En cuanto a los test serológicos de flujo lateral, una de sus principales ventajas es la rápida obtención de los resultados, aproximadamente entre 10 y 20 minutos desde la extracción de las muestras. En este caso las muestras requeridas son sangre capilar, lo que implica una extracción sencilla y mínimamente invasiva que contrasta con el frotis nasofaríngeo u orofaríngeo requerido tanto para la PCR como para los test rápidos de antígenos. Esta técnica está bien establecida y es adaptable a diferentes formatos de diagnóstico una vez disponibles los antígenos adecuados para preparar los test. Su formato posibilita la producción a gran escala y puede ser comercializado a bajo coste. No requiere de equipamiento complejo ni de personal especializado para su análisis (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2020). Además, estos test permiten conocer qué inmunoglobulinas están presentes en la muestra analizada ya sean IgM y/o IgG. A pesar de que los resultados que aportan son cualitativos, es decir, positivo o negativo, se puede distinguir en qué fase de la infección se encuentra el paciente. La presencia de las IgM revela que el sistema inmunitario del paciente ha activado sus mecanismos de defensa, aunque confieren una inmunidad débil y transitoria. La aparición de las IgG sugieren inmunidad eficaz ante una posible reinfección, si bien es cierto que actualmente se desconoce la cantidad necesaria para conferir la inmunidad ni cuánto tiempo permanecen en el organismo (Martínez et al., 2020). La principal desventaja que presentan es su limitada sensibilidad durante la primera semana de infección, por lo que hay altas posibilidades de falsos negativos y es por ello por lo que no están indicados para un diagnóstico precoz. El sistema inmunológico necesita un tiempo para activarse y generar los anticuerpos (entre dos y tres días, aunque puede variar según el estado de salud de cada persona). Por este motivo, la variabilidad inherente de la respuesta inmune de cada individuo tiene una importante influencia en los resultados. Además, también tienen el problema de reproducibilidad de lote a lote (Deeks et al., 2020).

Como en el caso anterior, los test de detección de antígenos de flujo lateral también se caracterizan por proporcionar resultados rápidamente, (entre 10 y 20 minutos desde la toma de muestras hasta la lectura de los resultados), lo que permite simplificar la logística del proceso en comparación con la RT-qPCR. Es una técnica que si se dispone de los reactivos necesarios (anticuerpos específicos), es fácilmente adaptable. Al no requerir instrumentación compleja ni personal altamente cualificado, es posible utilizarla tras la toma de la muestra *in situ*. Conlleva un bajo coste y es factible su producción masiva. Esta técnica, si posee una sensibilidad adecuada podría detectar al virus desde el primer día que se encuentra en el organismo infectado. Sin embargo, la limitación es precisamente que la sensibilidad es limitada y existe una alta probabilidad de falsos negativos, ya que cuando la carga viral es baja, esta tecnología no es capaz de detectar el virus. Así, solamente se detectan menos del 50% de pacientes que sí están infectados. Según Laura Lechuga ningún test de estas características que se ha puesto en el mercado cuenta con un buen nivel de sensibilidad ni selectividad, y la razón de ello radica en que diseñar un buen anticuerpo frente a antígenos virales no es tarea sencilla. Por ello, a día de hoy no es el método más adecuado para realizar un rastreo de los contagios. Actualmente, se están desarrollando nuevos kits para paliar esta limitación (Foundation for Innovative New Diagnostics, 2020). Además, también se ha visto un problema de reproducibilidad entre lotes con su consiguiente problema de falsos positivos y negativos. Los resultados de esta prueba son cualitativos (positivo o negativo), no aporta información adicional según la cantidad de virus que está presente en el organismo estudiado (Ministerio de Ciencia e Innovación, 2020).

Las técnicas inmunoquímicas también pueden ser llevadas a cabo en laboratorios centralizados, como por ejemplo los inmunoensayos enzimáticos o luminiscentes convencionales tipo ELISA, que en general ofrecen resultados más fiables, reproducibles y sensibles y además pueden ser automatizados. Un estudio reciente en el que se compararon tres inmunoensayos de flujo lateral (dos de ellos con bandas separadas para IgM e IgG y un tercero que detecta anticuerpos totales en una sola banda) con un ELISA comercial reveló mejores resultados para el ensayo ELISA (Martínez et al., 2020).

Tabla 3. Comparativa de las ventajas e inconvenientes de las técnicas diagnósticas actualmente en uso y diversas alternativas.

	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Técnicas actualmente en uso para la detección de SARS-CoV-2		
RT-qPCR	<ul style="list-style-type: none"> -Segura y fiable -Alta sensibilidad y especificidad -Ofrece resultados cuantitativos a tiempo real 	<ul style="list-style-type: none"> -No detecta baja carga viral (en los cinco primeros días aproximadamente) -Logística compleja en cuanto al tratamiento de las muestras -Se necesita equipamiento sofisticado y personal cualificado -Técnica larga (entre 2 y 5 horas)
Test rápidos de anticuerpos de flujo lateral	<ul style="list-style-type: none"> -Rápida, masiva y descentralizada -Bajo coste -Sugiere una visión aproximada de la etapa de infección en la que se encuentra la persona infectada -Extracción y manipulación sencilla de la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> -No detecta el virus en la etapa temprana de la infección. No ofrecen un diagnóstico precoz -Reproducibilidad cuestionable de lote a lote
Test rápidos de antígenos de flujo lateral	<ul style="list-style-type: none"> -Rápida, masiva, descentralizada -Bajo coste -Extracción y manipulación sencilla de la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja sensibilidad y especificidad (entorno al 50%) -Reproducibilidad cuestionable de lote a lote
Técnicas en desarrollo para la detección de SARS-CoV-2		
dd-PCR	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad y especificidad 	<ul style="list-style-type: none"> -Técnica muy larga -Alto coste -Lectura del resultado a punto final
Phi29pol	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad -Técnica rápida y descentralizada 	<ul style="list-style-type: none"> -Todavía no está disponible
RT-LAMP	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad y especificidad -No necesita ciclos de temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> -Riguroso diseño de cebadores que incrementa la complejidad de la técnica
Biosensores	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad -Uso descentralizado (a excepción de los biosensores ópticos) -Ofrecen resultados cuantitativos a tiempo real -Técnica rápida 	<ul style="list-style-type: none"> -Todavía no están disponibles
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad y reproducibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> -Técnica centralizada con requerimiento de equipamiento específico

6. CONCLUSIONES

Las propiedades más relevantes por las que deben destacar las técnicas de detección del SARS-CoV-2 son la sensibilidad y la especificidad, así como el tiempo en el que se tarda en obtener los resultados cuando se necesitan respuestas rápidas. La importancia de que dichos resultados sean cualitativos o cuantitativos dependerá del fin con el que se use la técnica. En caso de pretender un cribado de la población sería suficiente con que los resultados fueran cualitativos garantizando que estos sean inequívocos. Sin embargo, si se pretende conocer la carga viral de la muestra para otros fines se requerirá una técnica que aporte un resultado cuantitativo. Aunque actualmente la técnica de referencia para identificar y confirmar casos de COVID-19 es la RT-qPCR, hoy en día es recomendable su combinación con técnicas rápidas de detección de anticuerpos para dar un resultado más fiable. La interpretación del mismo debe realizarse con cautela y atendiendo a los signos y síntomas del paciente. Las técnicas serológicas pueden utilizarse como un instrumento de diagnóstico adicional pero también pueden ayudar a la investigación de un brote en curso y a la evaluación retrospectiva de la tasa de infección, y por tanto a los estudios de carácter epidemiológico. Por su parte, los test rápidos de detección de antígenos fueron descartados por su baja sensibilidad. A día de hoy no existen test de antígenos en el mercado con suficiente sensibilidad como para emitir un diagnóstico fiable. Asimismo, la investigación de nuevas técnicas es necesaria para aportar mejoras al diagnóstico temprano de la COVID-19 y al seguimiento de los casos confirmados. En la actualidad existen numerosas y diversas líneas de investigación para la detección del SARS-CoV-2, tanto en España como en el resto del mundo. Así, todas las técnicas son interesantes y complementarias ya que todas las propuestas dan un valor añadido al diagnóstico.

Conclusions

The most relevant properties for which SARS-CoV-2 detection techniques should be highlighted are sensitivity and specificity, as well as the time taken to obtain results when rapid responses are required. Whether these results are qualitative or quantitative will depend on the purpose for which the technique is used. If population screening is intended, it would be sufficient if the results were qualitative, ensuring that they are unambiguous. However, if the viral load of the sample is to be known for other purposes, a technique that provides a quantitative result will be required. Although RT-qPCR is currently the reference technique for identifying and confirming cases of COVID-19, it is now recommended to combine it with rapid antibody detection techniques to give a more reliable result. The interpretation of this technique should be done with caution and taking into account the signs and symptoms of the patient. Serological techniques can be used as an additional diagnostic tool but can also assist in the investigation of an ongoing outbreak and in the retrospective assessment of the infection rate, and therefore in epidemiological studies. Rapid antigen detection tests have been ruled out because of their low sensitivity. To date, there are no antigen tests on the market with sufficient sensitivity to provide a reliable diagnosis. Likewise, research into new techniques is necessary to bring improvements to the early diagnosis of COVID-19 and the follow-up of confirmed cases. At present, there are numerous and diverse lines of research for the detection of SARS-CoV-

2, both in Spain and in the rest of the world. Thus, all techniques are interesting and complementary since all proposals give an added value to the diagnosis.

7. BIBLIOGRAFÍA

7.1. Artículos y libros

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología Celular y Molecular*. (9ª ed). Barcelona: Elsevier.
- Acter, T., Uddin, N., Das, J., Akhter, A., Choudhury, T. R., & Kim, S. (2020). Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency. *Science of the Total Environment*, 730, 138996.
- Astuti, I., & Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 407-412.
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423.
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. (2020). *Información Científico-Técnica: Enfermedad por coronavirus, COVID-19*. Ministerio de Sanidad. Madrid
- D’Cruz, R. J., Currier, A. W., & Sampson, V. B. (2020). Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 468.
- Deeks, J. J., Dinnes, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Spijker, R., Taylor-Phillips, S., Adriano, A., Beese, S., Dretzke, J., Ferrante di Ruffano, L., Harris, I. M., Price, M. J., Dittrich, S., Emperador, D., Hooft, L., Leeftang, M. M., & Van den Bruel, A. (2020). Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, CD013652.
- Drak Alsibai, K. (2020). Expression of angiotensin-converting enzyme 2 and proteases in COVID-19 patients: A potential role of cellular FURIN in the pathogenesis of SARS-CoV-2. *Medical Hypotheses*, 143, 109893.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). *An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU / EEA* (Technical report).

- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penza, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – A statement of the Coronavirus Study Group. *Nature Microbiology*, *5*, 536–544.
- Grant, P. R., Turner, M. A., Shin, G. Y., Nastouli, E., & Levett, L. J. (2020). Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT-PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*.
- Henry, M., & Debarbieux, L. (2012). Tools from viruses: Bacteriophage successes and beyond. *Virology*, *434*(2), 151-161.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., ... Colston, B. W. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, *83*(22), 8604–8610.
- Kashir, J., & Yaqinuddin, A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*, *141*, 109786.
- Lippi, G., Simundic, A. M., Plebani, M. (2020). Potencial preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *58*(7), 1070–1076.
- Liu, X., Feng, J., Zhang, Q., Guo, D., Zhang, L., Suo, T., Hu, W., Guo, M., Wang, X., Huang, Z., Xiong, Y., Chen, G., Chen, Y., & Lan, K. (2020). Analytical comparisons of SARS-CoV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 1175–1179.
- Malik, Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian Journal of Pathology*, *42*(1), 3–11.
- Martínez, M., Navalpotro, D., Tormo, N., Olmos, R., Moreno, M., Ocete, M. D., & Gimeno, C. (2020). Comparison of commercial lateral flow immunoassays and ELISA for SARS-CoV-2 antibody detection. *Journal of Clinical Virology*, *129*, 104529.
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(10), 165878.

- Njiru, Z. K. (2012). Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnostics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1572.
- Pan, Y., Li, X., Yang, G., Fan, J., Tang, Y., Zhao, J., Long, X., Guo, S., Zhao, Z., Liu, Y., Hu, H., Xue, H., & Li, Y. (2020). Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *The Journal of Infection*, 81(1), e28–e32.
- Peragón, J., & Peinado, M. A. (2019). *Biología molecular y celular: Técnicas y fundamentos*. Universidad de Jaén.
- Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G., & Petersen, E. (2020). COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clinical Microbiology and Infection*, 26(6), 729–734.
- Rabi, F. A., Al Zoubi, M. S., Al-Nasser, A. D., Kasasbeh, G. A., & Salameh, D. M. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens*, 9(3), 231.
- Reina, J. (2020). El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica que amenaza al mundo. *Vacunas*, 21(1), 17-22.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24, 91–98.
- Shirato, K., Semba, S., El-Kafrawy, S. A., Hassan, A. M., Tolah, A. M., Takayama, I., Kageyama, T., Notomi, T., Kamitani, W., Matsuyama, S., & Azhar, E. I. (2018). Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 258, 41–48.
- Shirato, K., Yano, T., Senba, S., Akachi, S., Kobayashi, T., Nishinaka, T., Notomi, T., & Matsuyama, S. (2014). Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virology Journal*, 11(1), 139.
- Shormin, M., & Yusuf, M. A. (2020). Laboratory Detection of Covid19 Cases: A Systematic Review. *Bangladesh Journal of Infectious Diseases*, 7(Supplementary 1), S11–S17.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-1317.

- Suo, T., Liu, X., Feng, J., Guo, M., Hu, W., Guo, D., Ullah, H., Yang, Y., Zhang, Q., Wang, X., Sajid, M., Huang, Z., Deng, L., Chen, T., Liu, F., Xu, K., Liu, Y., Zhang, Q., Liu, Y., ... Chen, Y. (2020). ddPCR: A more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 1259–1268.
- Trilla, A. (2020). Un mundo, una salud: La epidemia por el nuevo coronavirus COVID-19. *Medicina Clinica (Barcelona)*, *154*(5), 175–177.
- Tu, Y. F., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., Lai, W. Y., Yang, D. M., Chou, S. J., Yang, Y. P., Wang, M. L., & Chiou, S. H. (2020). A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2657.
- Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V. Y. C., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. B., & Chan, W. C. W. (2020). Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*, *14*(4), 3822–3835.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veessler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.e6.
- Wen, T., Huang, C., Shi, F. J., Zeng, X. Y., Lu, T., Ding, S. N., & Jiao, Y. J. (2020). Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. *The Analyst*. Advance online publication.
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*, 265–269.
- Yan, C., Cui, J., Huang, L., Du, B., Chen, L., Xue, G., Li, S., Zhang, W., Zhao, L., Sun, Y., Yao, H., Li, N., Zhao, H., Feng, Y., Liu, S., Zhang, Q., Liu, D., & Yuan, J. (2020). Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clinical Microbiology and Infection*, *26*(6), 773-779.
- Yang, W., Dang, X., Wang, Q., Xu, M., Zhao, Q., Zhou, Y., Zhao, H., Wang, L., Xu, Y., Wang, J., Han, S., Wang, M., Pei, F., & Wang, Y. (2020). Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method. *MedRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*.
- Yu, L., Wu, S., Hao, X., Dong, X., Mao, L., Pelechano, V., Chen, W. H., & Yin, X. (2020). Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical Chemistry*, *66*(7), 975-977.

Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., He, Q., Li, Z., He, B., Zhang, T., ... Zhang, Z. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. Advance online publication.

7.2. Páginas web

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. (2020). *El Instituto de Salud Carlos III financia un proyecto del CNIO y del CSIC para la detección masiva, precoz y “a pie de calle” del SARS-CoV-2*. Consultado 12 julio 2020. <https://www.cnio.es/noticias/noticias-cnio/proyecto-cnio-csic-deteccion-masiva-sars-cov2>.

Compound Interest. (2020). *How do the tests for coronavirus work?* Consultado 7 julio 2020. <https://www.compoundchem.com/2020/03/19/covid-19-testing>.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2020a). *La plataforma Salud Global del CSIC lanza 12 proyectos científicos para abordar la pandemia del coronavirus*. Consultado 13 julio 2020. <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/la-plataforma-salud-global-del-csic-lanza-12-proyectos-cientificos-para-abordar>.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2020b). *Un proyecto del CSIC y el CNIO usará la ADN polimerasa del virus phi29 para detectar el coronavirus SARS-Cov-2*. Consultado 12 julio 2020. <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/un-proyecto-del-csic-y-el-cnio-usara-la-adn-polimerasa-del-virus-phi29-para>.

Coris BioConcept. (2020). *COVID-19 Ag Respi-Strip* (Ficha técnica). Consultado 17 julio 2020. https://www.alatheia.cl/wp-content/uploads/2020/05/d-ifu-23_covid-19_respi-strip_ES.pdf.

CSIC Comunicación (2020, 3 junio). *Webinar del CSIC: Nuevos métodos de diagnóstico del coronavirus* [Video]. YouTube. <https://youtu.be/ABK1Oyrx6PI>.

European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). *Laboratory support for COVID-19 in the EU/EEA: Testing for SARS-CoV-2 virus*. Consultado 11 julio 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus/laboratory-support>.

Foundation for Innovative New Diagnostics. [online] Disponible en https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=immunoassays#diag_tab [Consultado 10 de julio].

- Fundación Española del Corazón. (2020). *Tests de diagnóstico e inmunidad y secuelas de la COVID-19 en cardiopatas*. Consultado 6 julio 2020. <https://fundaciondelcorazon.com/blog-impulso-vital/3552-tests-de-diagnostico-e-inmunidad-y-secuelas-de-la-covid-19-en-cardiopatas.html>.
- GenBank. (2020). *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome*. Consultado 20 junio 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>.
- Instituto Guatemalteco de Seguridad Social. (2020). *Protocolo para la utilización de pruebas de detección de antígeno de SARS-CoV-2*. Consultado 18 julio 2020 <https://www.igssgt.org/wp-content/uploads/2020/06/protocolo-para-la-utilizacio%CC%81n-de-pruebas-para-la-deteccio%CC%81n-de-anti%CC%81geno-de-sars-cov-2.pdf>.
- Laboratorio de Análisis Bioquímicos Guemes. (2020). *Interpretación de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2*. Consultado 18 julio 2020. <https://www.labguemes.com.ar/web/interpretacion-de-pruebas-diagnosticas-para-sars-cov-2>.
- Ministerio de Ciencia e Innovación. (2020). *Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19: Clasificación, características, ventajas y limitaciones*. Consultado 15 junio 2020. <https://www.ciencia.gob.es/stfls/MICINN/Ministerio/FICHEROS/TecnicasDiagnosticoCOVID19-ICN2.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *COVID-19: Cronología de la actuación de la OMS*. Consultado 22 junio 2020. <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-04-2020-who-timeline--covid-19>.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Orientación nacional y técnica — Enfermedad por coronavirus (COVID-19)*. Consultado 11 julio 2020. <http://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance-publications>.
- Sociedad Española de Inmunología. (2020). *Anticuerpos anti-SARS-CoV-2*. Consultado 12 julio 2020. <https://www.inmunologia.org/Upload/Documents/1/5/2/1529.pdf>.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Real-time PCR: Understanding Ct*. Consultado 8 julio 2020. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>.