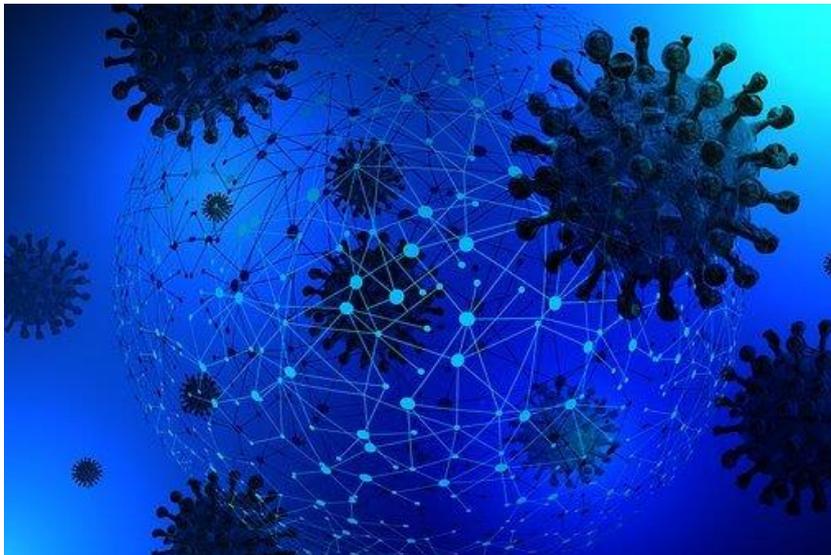


Trabajo Fin de Grado

HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS DE SARS-COV-2 EN LA ACTUALIDAD: ¿CUÁL ES LA MEJOR OPCIÓN?



Autora: Magdalena Amanda García Díaz

Tutor: Jacob Lorenzo Morales

Cotutora: Aída Elizabeth Córdoba Lanús

Convocatoria: septiembre 2021

ÍNDICE:

RESUMEN:	2
ABSTRACT:	2
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1 Toma de muestra biológica	8
4.2 Métodos de diagnóstico	11
4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR):	12
4.2.2. Métodos de detección de antígenos:	13
4.2.3 Métodos de detección de anticuerpos:	14
4.2.4. Otros métodos:	16
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFÍA:	21

RESUMEN:

El Coronavirus de tipo 2 causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) es un patógeno emergente que ha provocado una pandemia mundial. Esta enfermedad puede transcurrir de forma asintomática o manifestarse en varios grados de gravedad e incluso provocar la muerte, destacando mayoritariamente la afectación del sistema respiratorio. Los métodos diagnósticos son fundamentales para controlar la pandemia, las infecciones y optimizar la atención clínica. La correcta toma de muestra es de vital importancia para cualquiera de los métodos utilizados. En este trabajo se hace una revisión bibliográfica y se exponen los diferentes métodos diagnósticos que se están utilizando con mayor frecuencia, destacando sus ventajas e inconvenientes y analizando las nuevas alternativas que existen.

PALABRAS CLAVE: diagnóstico COVID-19, diagnóstico SARS-CoV-2, COVID-19, SARS-CoV-2.

ABSTRACT:

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is an emerging pathogen that has caused a global pandemic. It produces a disease that can range from asymptomatic to death, mainly highlighting respiratory symptoms. Diagnostic methods are essential to control the pandemic, infections and optimize clinical care. An adequate sampling is of vital importance for any of the methods used. In this work a bibliographic review was done to evaluate the different diagnostic methods that are being used more frequently, highlighting its advantages and disadvantages, and analyzing the new alternatives that exist.

KEYWORDS: COVID-19 diagnosis, SARS-CoV-2 diagnosis, COVID-19, SARS-CoV-2.

1. INTRODUCCIÓN

Los coronavirus son un grupo diverso de virus zoonóticos que infectan a aves y a algunos mamíferos (incluidos camélidos, murciélagos, civetas, ratas, ratones, perros y gatos). En humanos pueden causar infecciones respiratorias de diverso grado (desde leves hasta graves) [1,2].

Los coronavirus han causado 3 brotes epidémicos a gran escala en los últimos 20 años. El primero fue el causado por el síndrome agudo respiratorio severo (SARS), el segundo por el síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS) y actualmente por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Este último es un coronavirus altamente transmisible y patógeno que produce una enfermedad denominada “enfermedad por coronavirus 2019” o COVID-19, (del inglés *Coronavirus Disease 2019*). En enero de 2020, La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el brote de SARS-CoV-2 como emergencia internacional de salud pública y el 12 de marzo del 2020 declaró dicho brote como pandemia mundial [1,3,4,5].

El SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario en sentido positivo con envoltura. El genoma del SARS-CoV-2 es similar al del SARS-CoV en un 88% y al MERS-CoV en un 50% aproximadamente (identidad de secuencia). El genoma completo presenta de 26 a 32 Kb de longitud. En sentido 5´-3´ como podemos observar en la figura 1, el genoma comprende 14 marcos de lectura abiertos (ORF). Dos tercios codifican al menos 16 proteínas no estructurales (que forman el complejo de la replicasa) y el tercio restante va a codificar 9 proteínas accesorias (ORF) y 4 proteínas estructurales que forman la partícula viral. Las proteínas estructurales comprenden la nucleocápside (N), rodeada por una envoltura donde se insertan las proteínas pico (S), las proteínas de membrana (M) y las proteínas de envoltura (E) tal y como se muestra en la figura 2. Cada una de estas proteínas va a tener una función (Tabla 1) [2,3].

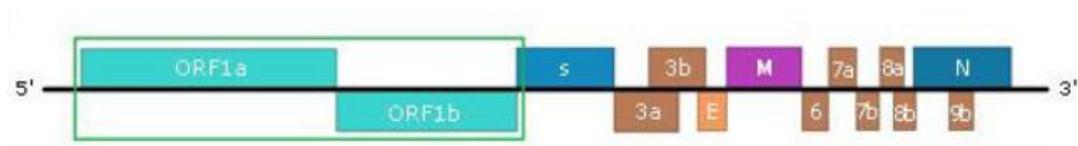


Figura 1: Representa el diagrama de forma esquemática de la secuencia de ORF en el ARN viral [2].

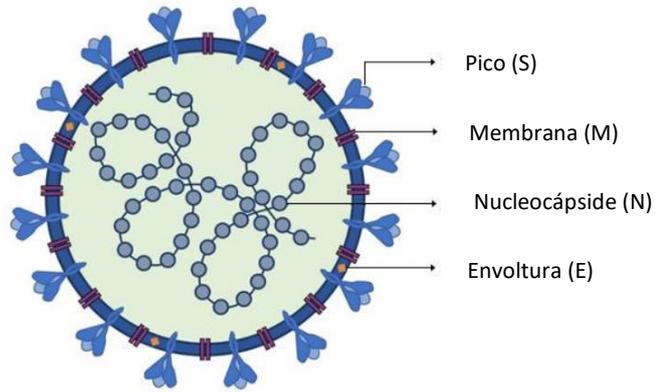


Figura 2: Representa el diagrama de forma esquemática del SARS-CoV-2. Adaptada de Sotomayor-Lugo et al. [2].

Tabla 1: Función de las diferentes proteínas.

Proteína	Función
Proteína S	Media la unión a los receptores de la célula huésped y es considerada el objetivo para los anticuerpos que van a neutralizar el virus (la proteína S del SARS-CoV-2 varía mucho de la del SARS-CoV puesto que comparten menos del 75% de identidad de nucleótidos).
Glicoproteína de membrana (M)	Es importante para generar el virus
Proteína E	Se adhiere a la proteína M formando la envoltura viral. La proteína N junto con el genoma del ARN forman la nucleocápside

Adaptado de Harrison et al. [3] y Yüce et al. [4]

El SARS-CoV-2 interactúa desde un primer momento con el receptor ACE2, el cual se encuentra altamente expresado en los neumocitos tipo II. Se establece un vínculo entre el sistema renina angiotensina y la patogénesis viral. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) se encarga de convertir la angiotensina I en angiotensina II (potente péptido vasoconstrictor involucrado en la inflamación y la fibrosis). La angiotensina II es hidrolizada por ACE2 desencadenando una cascada de efectos que contrarrestan la fibrosis. El desequilibrio producido es debido al daño inflamatorio [6].

La forma de transmisión mayoritaria es mediante el aire por gotas ($> 5\mu\text{m}$) o en forma de aerosoles que contienen las partículas virales. Otra forma de transmisión es persona a persona a través del contacto directo. Hasta el momento, la investigación de la transmisión a partir de fómites sugiere que es poco frecuente. Otras vías en estudio como la fecal-oral no han demostrado resultados importantes (Figura 3) [3,7].

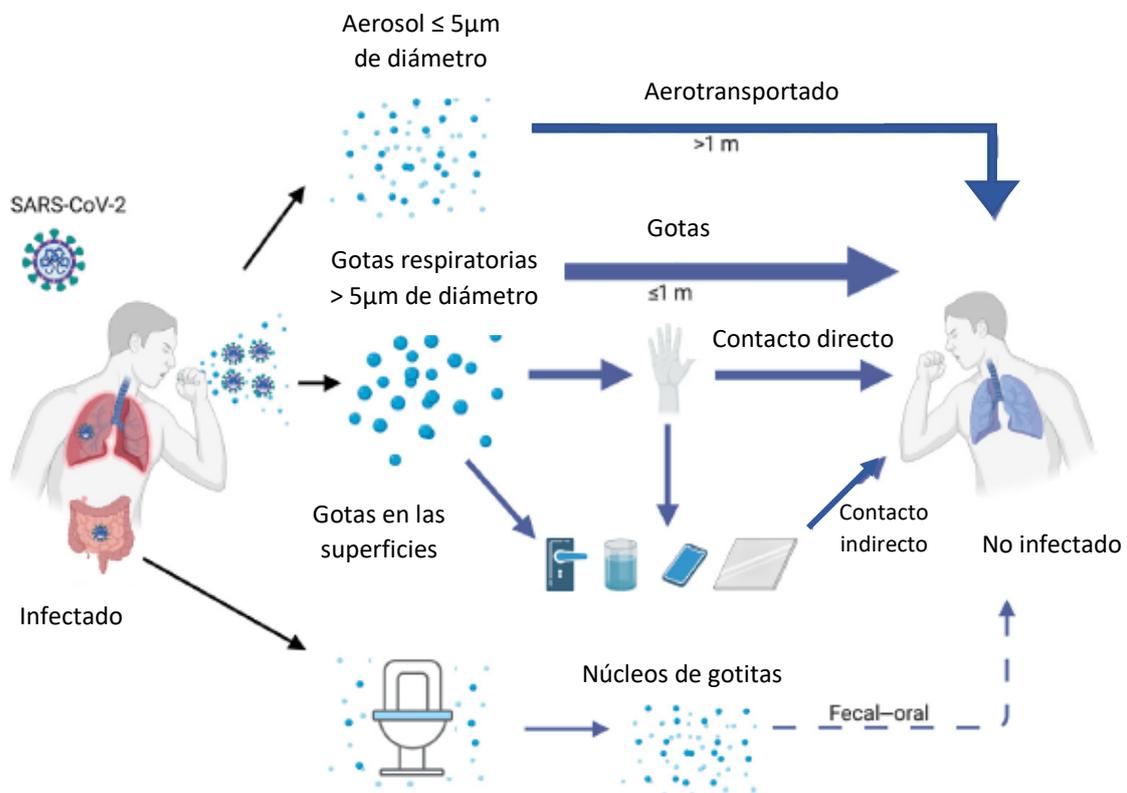


Figura 3: Vías de transmisión del SARS-CoV-2. Las flechas continuas representan las vías de transmisión confirmadas, mientras que las líneas discontinuas muestran las vías todavía sin confirmar. Adaptado de Harrison et al. [3].

La clínica puede abarcar desde una infección asintomática hasta una insuficiencia respiratoria grave que puede provocar la muerte. Los síntomas más frecuentes son fiebre (83% de los pacientes con COVID-19), tos (82%) y disnea (31%) aunque según ha ido avanzando la pandemia, no sólo se ha observado afectación respiratoria, sino también manifestaciones a medio y largo plazo como por ejemplo inflamación del miocardio o el desarrollo de una enfermedad pulmonar grave que conduce a fibrosis pulmonar. Todo esto nos proporciona

información sobre la gran variabilidad de manifestaciones clínicas, donde destaca la mayor probabilidad de sufrir una insuficiencia respiratoria o una evolución más prolongada de la enfermedad en las personas mayores de 60 años. Otro factor que agrava la enfermedad es la presencia de comorbilidades, observándose una tasa mayor de mortalidad en las personas que las padecen al contraer la COVID-19, independiente de la edad [3,6,8,9].

El periodo de incubación es rápido (5-6 días). Los títulos de SARS-CoV-2 alcanzan su máximo en la primera semana de la enfermedad (muestras respiratorias). Pese a que el ARN viral persiste en el tracto respiratorio superior más de un mes tras iniciar la enfermedad, la duración del virus viable es relativamente corta, notificándose cargas virales altas en el momento de la aparición de los síntomas o poco después (3-5 días), seguido de una disminución paulatina. No se observan diferencias significativas entre las cargas virales al inicio de la infección entre personas sintomáticas y asintomáticas, no obstante, en personas asintomáticas el virus desaparece más rápido. El tiempo medio de diseminación viral se asoció positivamente con la edad en las muestras obtenidas del tracto respiratorio superior [9,10].

El tiempo medio para detectar el ARN del SARS-CoV-2 es de 17 días, observándose diferencias que van a depender del tipo de muestra (Tabla 2) [10].

Tabla 2: Diferencias entre el tiempo medio para la detección del ARN en SARS-CoV-2.

Tipo de muestra	Tiempo medio de detección ARN (SARS-CoV-2)
Vía respiratoria superior	17 días (máximo de 83 días)
Vía respiratoria inferior	14,6 días (máximo de 59 días)
Heces	17,2 días (máximo de 35 días)

Adaptado de Cevik et al. [10]

Se identificó y secuenció el virus SARS-CoV-2 a principios de enero de 2020, permitiendo así el rápido desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en la detección de ácido nucleico viral. El diagnóstico temprano y el aislamiento de los

casos positivos ha demostrado ser vital para controlar la propagación del virus [1,11].

A lo largo de la pandemia, se han observado variaciones en el genoma del SARS-CoV-2. Inicialmente apareció una variante denominada D614G, más transmisible y misma gravedad. A partir de ahí, se han descrito múltiples variantes donde destacan algunas que se consideran variantes preocupantes (COV, del inglés Variants of Interest) asociadas a una mayor transmisión o virulencia, capacidad de evadir la detección o reducción de la neutralización por anticuerpos obtenidos (Tabla 3) [12].

Tabla 3: Variantes preocupantes en la actualidad, lugar y fecha de aparición.

COV actuales según OMS (22 junio 2021)	Lugar de aparición	Fechas de aparición
Alfa (B.1.1.7)	Reino Unido	Diciembre 2020
Beta (B.1.351)	Sudáfrica	Diciembre 2020
Delta (B.1.617.2)	India	Diciembre 2020
Gamma (P.1)	Brasil	Enero 2021

Adaptada de Aleem et al. [12].

Debido a todo esto, podemos observar que incluso un intercambio de un solo aminoácido puede afectar drásticamente a la capacidad del virus para evadir el sistema inmune, por lo que, tanto los métodos diagnósticos como las dianas terapéuticas y preventivas deben ir adecuándose a los cambios del SARS-CoV-2 [12].

2. OBJETIVOS

- 1- Realizar una revisión bibliográfica sobre el estado actual del conocimiento de la COVID-19.
- 2- Identificar los diferentes métodos de diagnóstico de SARS-CoV-2 utilizados en los laboratorios autorizados. Ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

3- Determinar entre los posibles nuevos métodos de diagnóstico aquellos que reúnen características adecuadas en cuanto a rapidez, especificidad y sensibilidad para su futura implementación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en las principales bases de datos, mayoritariamente en PubMed (del centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI), además de informes técnicos de entidades como: OMS, ISCIII y Ministerio de Sanidad. Se ha incluido la información disponible desde la aparición de este nuevo coronavirus (finales del 2019) a la actualidad utilizando como palabras clave: diagnóstico COVID-19, diagnóstico SARS-CoV-2, COVID-19, SARS-CoV-2, estructura SARS-CoV-2, transmisión SARS-CoV-2, variantes SARS-CoV-2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas autorizadas por el Ministerio de Sanidad en España están basadas en la detección de antígenos y de ARN viral mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o una técnica molecular equivalente. La elección de la prueba dependerá del ámbito de realización, procedencia del sospechoso, disponibilidad y días de evolución de los síntomas. No son pruebas de diagnóstico de infección activa las serológicas. Los tests de autodiagnóstico tampoco se considerarán pruebas de confirmación de diagnóstico, no obstante, tras un resultado positivo se considerarán sospechosos y deberán ser confirmados mediante una de las pruebas citadas anteriormente [13].

De los resultados obtenidos tras la revisión de los diferentes informes técnicos y artículos científicos destacan los apartados que se tratarán a continuación.

4.1 Toma de muestra biológica

Para obtener resultados óptimos en las pruebas de detección del virus, la calidad de la muestra de partida ha demostrado ser muy importante. El éxito va a depender de la detección de la presencia de biomoléculas (ARN viral, antígenos, anticuerpos, ...), por lo tanto, independientemente de la técnica utilizada, hay que poner especial cuidado según el origen de la muestra (sangre, suero, esputo,

exudado nasal, heces, orina), con los métodos de recolección y el procesamiento de la muestra (Figura 4) [14].

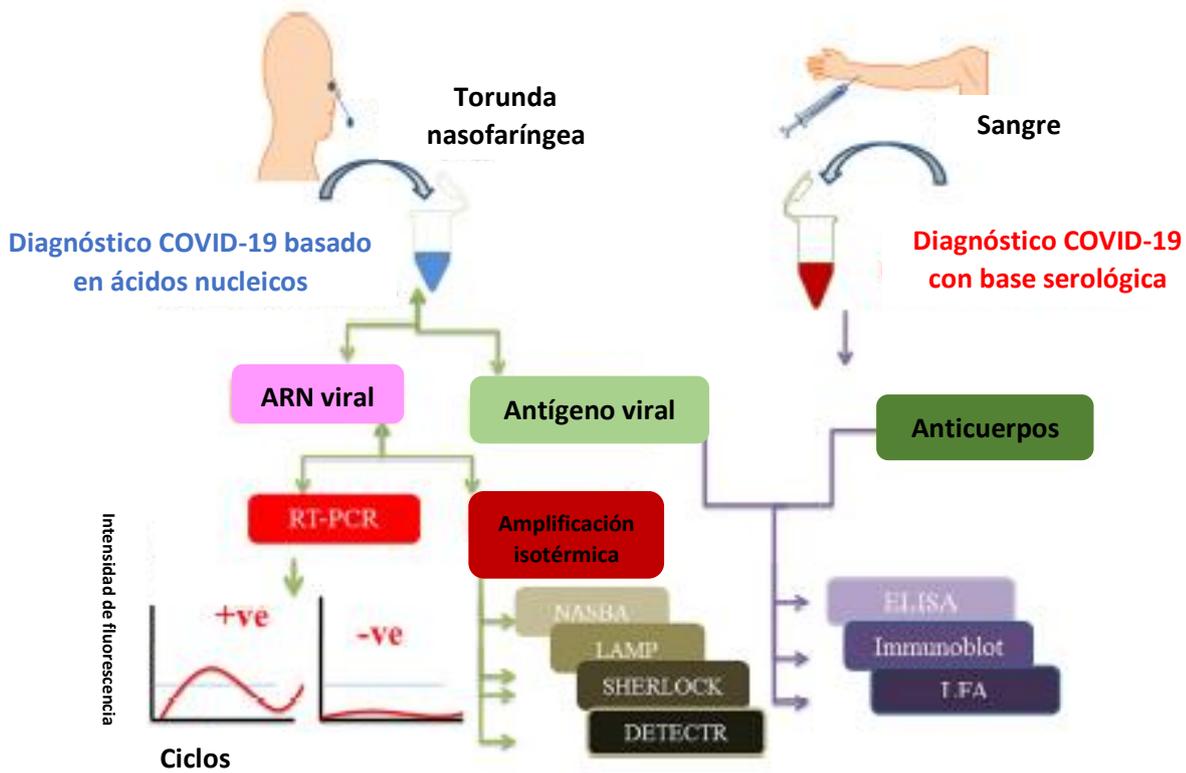


Figura 4: Esquema para la recolección de las muestras con diferentes enfoques diagnósticos para la detección de SARS-CoV-2. Adaptado de Islam et al. [15].

El principal tipo de muestra que se utiliza para diagnosticar la COVID-19 es la recogida de las vías respiratorias superiores, ya sea nasofaríngea u orofaríngea. Las muestras alternativas como la saliva son más simples de recoger y menos invasivas, pudiendo utilizarse para evitar muestreos inadecuados asociados a muestras de hisopos respiratorios, o muy útiles para cribados poblacionales. Las muestras deben ser tratadas en laboratorios equipados con herramientas e instrumentos especializados [4,14].

Para la recogida de muestras de pacientes intubados se podrán utilizar de forma alternativa la aspiración traqueal, el lavado broncoalveolar (BAL) no broncoscópico o la broncoscopia. Esta última no está recomendada por el elevado riesgo de infección para el personal sanitario debido a la exposición al aerosol [9].

Se han analizado otros tipos de muestras para la detección del virus, pero no con un fin diagnóstico, sino que se utilizan para estudiar la posible infección a través de dichas vías (Tabla 4).

Tabla 4: Detección de SARS-CoV-2 en otros tipos de muestras para el estudio de su transmisión por diferentes vías.

Tipo de muestra	Descripción
Lavado con gárgaras	Es una alternativa más segura para los sanitarios y posiblemente más sensible que los frotis de garganta [16].
Muestras fecales	Se sugiere la toma de estas muestras para determinar la suspensión de las medidas preventivas en la transmisión de la COVID-19 tras un diagnóstico positivo, ya que se ha observado que la presencia de SARS-COV-2 en heces aumenta hasta 5 semanas después de haber obtenido un resultado negativo en una muestra respiratoria. Se requieren más investigaciones [17].
Muestras de sangre o suero	Se utilizan en pruebas para la detección de anticuerpos donde se rastrea la progresión de la enfermedad, la inmunidad del paciente. También es útil en estudios epidemiológicos [14].
Muestras de leche materna	No está clara la transmisión del SARS-CoV-2 a través de esta vía ya que hay pocos estudios realizados. Investigaciones recientes no han encontrado evidencia de este coronavirus en la leche materna humana, pero el tamaño de dicha muestra fue pequeño [18].
Muestras de semen	Se analizaron estas muestras debido a que la ACE-2 se expresa abundantemente en los testículos y en el tracto reproductivo masculino que podría explicar una transmisión sexual. Algunos estudios sugieren que la COVID-19 no se transmite sexualmente por

	los hombres, ya que este coronavirus está ausente en el semen y en los testículos tanto en la fase aguda como en la de recuperación [19].
Muestras de lágrimas y secreciones conjuntivales	El tejido ocular también es un sitio potencial para la replicación viral debido a que, al igual que en el semen, se expresa la ACE-2. Estudios refieren la positividad en estas muestras del 7,5% de los pacientes con resultados positivos [20,21].

Se han desarrollado métodos de agrupamiento o *pool* de muestras (entre 5 y 10) que aumentan el rendimiento de las pruebas manteniendo la alta sensibilidad. Son útiles para realizar cribados poblacionales [22,23].

Para poder explicar la presencia de falsos negativos se debe comprender que el valor predictivo de las pruebas varía con el tiempo, por lo que es importante el momento del muestreo. Otros factores que pueden estar implicados en los falsos negativos pueden ser: toma incorrecta de muestra, error en su manipulación por el personal, etc. [1,24,25].

4.2 Métodos de diagnóstico

Los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos son los más utilizados para la detección del SARS-CoV-2, siendo el estándar actual la detección a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) [4].

Otro tipo de pruebas muy utilizadas son las serológicas, las cuales no detectan directamente la presencia del virus, sino moléculas del sistema inmunológico. En los métodos de detección de antígenos se detectan las inmunoglobulinas (IgM, IgG) y en los métodos de detección de anticuerpos se detectan los anticuerpos totales contra las proteínas N y S. Se consideran adecuadas para el diagnóstico indirecto, pero pueden ser insuficientes debido a que las cantidades de anticuerpos producidos durante los primeros días de la infección pueden ser indetectables, por lo tanto, éstos son útiles para respaldar las técnicas actuales de RT-PCR así como para llevar un seguimiento de las personas que han tenido el virus o para realizar un cribado masivo en toda la población [4,14,26].

4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR):

RT-PCR es una técnica de alta sensibilidad con la que se obtienen resultados en poco tiempo y con un alto rendimiento [4].

La RT-PCR conlleva 3 pasos, el primero es la lisis de SARS-CoV-2 para aislar su material genético en la muestra, el segundo la transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y el tercer paso consiste en la amplificación de regiones específicas del ADNc y su detección óptica a tiempo real (se utilizan cebadores específicos y sondas de hidrólisis marcadas con fluorescencia) [4,14].

Para el primer paso, la extracción del ARN viral de la muestra de estudio hay diferentes métodos: columnas de sílice individuales o sistemas automatizados con partículas magnéticas (que van del procesamiento desde 16 a 96 muestras a la vez). Es de vital importancia realizar una correcta y eficiente extracción. Comúnmente se utilizan controles internos de ARN [27].

Los kits de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 incluyen: enzimas de transcripción inversa y amplificación, dos o tres conjuntos de cebadores, sondas para la amplificación de las regiones específicas del genoma viral y reactivos autorizados para los controles (positivo, negativo). Diversos estudios han encontrado diferencias en la sensibilidad del ensayo dependiendo del cebador y la sonda utilizados, observando mayores diferencias en las muestras con baja carga viral [4,14].

La sensibilidad de esta técnica también va a depender de la cantidad de ARN que presente la muestra. La prueba arroja resultados positivos o negativos, pero no da información de pacientes que ya se han recuperado, de la misma forma que puede no dar un resultado positivo en los primeros días de la infección debido a la baja carga viral en el tracto respiratorio superior [4].

La RT-PCR se considera actualmente el “estándar de oro” en la detección de infecciones activas causadas por SARS-CoV-2 por su sensibilidad a la hora de detectar directamente zonas del genoma viral en vez de biomarcadores secundarios como son los anticuerpos o antígenos [4,14].

Este método tiene una limitación y es el número restringido de pruebas que se pueden realizar al día, lo que hace que, aunque sea el método más fiable, no pueden obtenerse datos consistentes sobre la prevalencia de la COVID-19 en el país [4].

4.2.2. Métodos de detección de antígenos:

Un antígeno es una partícula, fragmento o molécula que puede activar el sistema inmunológico y, por consiguiente, inducir la producción de anticuerpos para matar a los patógenos y protegernos. Estas pruebas lo que detectan son componentes virales (la glicoproteína S, la proteína M o la proteína N liberada), pero también pueden detectar el virus directamente (sin amplificación térmica a diferencia de la PCR). Este método, al igual que la PCR, sólo va a detectar la infección viral activa, presentando una sensibilidad del 68% y una especificidad del 100% [4].

Se han desarrollado pruebas de diagnóstico rápido de antígenos para detectar el SARS-CoV-2. Estas pruebas están diseñadas para detectar proteínas virales en hisopos nasales o faríngeos en tan sólo 15 minutos, proporcionando resultados muy específicos y con una lectura directa a través de una tarjeta de prueba (tiras de LFA) (Figura 5), siendo eficaz en los 5 primeros días tras iniciar los síntomas. También se utiliza la detección de antígenos a través de la técnica ELISA para obtener una mayor sensibilidad y alto rendimiento [4,26,28].



Figura 5: Imagen de un test de antígenos comercializado en España [29].

Diao et al. [30] desarrollaron un ensayo LFA inmunocromatográfico fluorescente para la detección de la proteína nucleocápside (N) del SARS-CoV-2. En este

ensayo se utilizan anticuerpos anti-N de ratón para crear la línea de prueba y anticuerpos IgG anti-conejo como control. En este ensayo la muestra se ha obtenido a través de exudado nasofaríngeos y orina.

4.2.3 Métodos de detección de anticuerpos:

Un anticuerpo (también denominado inmunoglobulina (Ig)) es una proteína que produce el sistema inmunológico en respuesta a un antígeno. Los anticuerpos poseen una región para unirse a un tipo específico de antígeno y poder eliminarlo del cuerpo. Existen 5 clases de anticuerpos (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE). El IgM es el primer anticuerpo que se produce tras la infección y el IgG es el más abundante y común en suero. Con este método se va a detectar IgM, IgG o anticuerpos totales contra las proteínas N y S [4,26].

4.2.3.1 Inmunoensayo tipo ELISA

Las técnicas más utilizadas han sido el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y ensayos de tipo de flujo lateral (LFA). Requiere de una muestra de sangre a partir de una punción venosa [4,28].

La sensibilidad de estas pruebas va a depender del tiempo que ha pasado desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de la toma de la muestra. Si tomamos la muestra el día 7 tras el inicio de la enfermedad, la seroprevalencia acumulada de IgM será del 44% aproximadamente y la de IgG del 56%, sin embargo, obtendremos un 95% en ambas si la toma de muestra se recoge el día 20 para IgM o el día 16 para IgG (Figura 6). También vamos a encontrar diferencia en el tiempo de disminución de dichas inmunoglobulinas, pudiendo observarse una disminución de IgM a partir del día 28 tras la infección mientras que los niveles de IgG se pueden mantener hasta 7 semanas. Independientemente de todo esto, se deben medir los niveles de ambas inmunoglobulinas ya que se han visto casos en los que los resultados han sido positivos sólo para una de ellas [26].

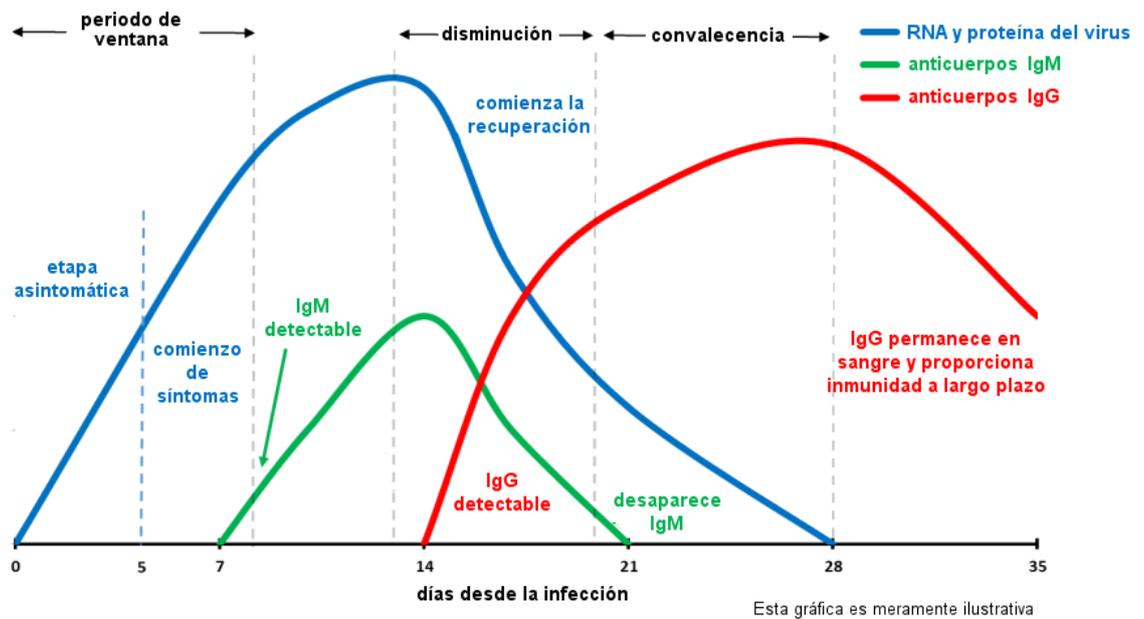


Figura 6: Dinámica de aparición de IgM e IgG en una infección por SARS-CoV-2 [31].

4.2.3.2 Test rápido de anticuerpos

Se han desarrollado kits para analizar los anticuerpos de forma rápida, con unas gotas de sangre tras la punción en el dedo proporcionando resultados en 15 minutos (Figura 7) [26].



Figura 7: Test rápido de anticuerpos para detectar COVID-19 [32].

Los métodos de detección de antígenos y de anticuerpos no son adecuados para el diagnóstico de la COVID-19 en fase aguda, ya que durante la primera semana de la enfermedad son negativos. Este método sólo debe utilizarse para el rastreo de contactos, detección de infecciones o inmunidad previas, evaluación

retrospectiva de la extensión de los brotes y para el cribado o diagnóstico de los pacientes asintomáticos [26].

Existen diferencias entre las pruebas de diagnóstico de COVID-19 nombrados anteriormente (Figura 8).

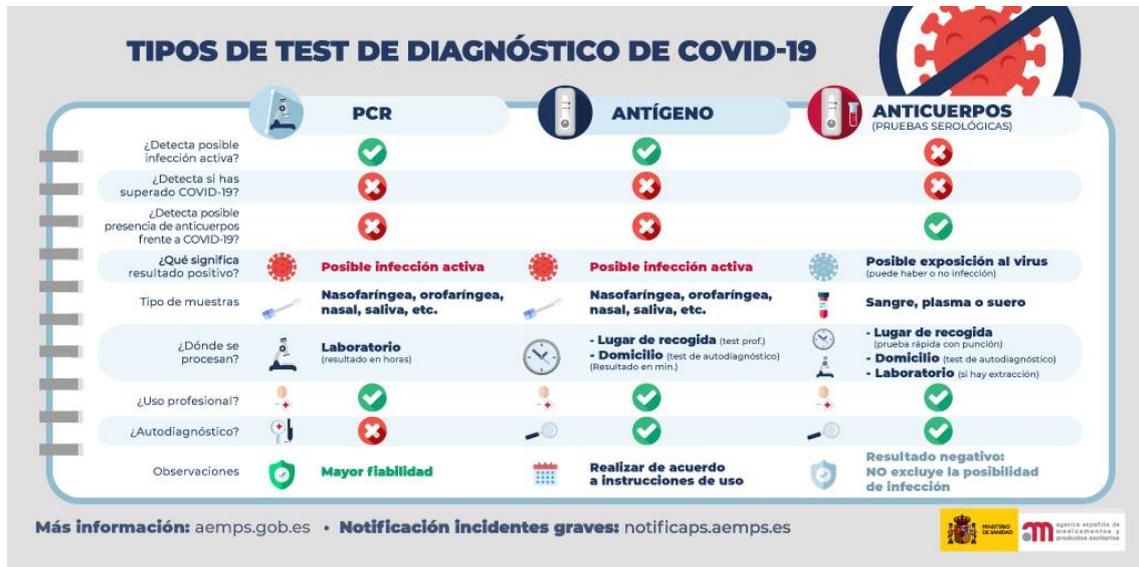


Figura 8: Comparativa entre la prueba de PCR, pruebas de antígenos y de anticuerpos [33].

4.2.4. Otros métodos:

- Existen otros métodos alternativos a la RT-PCR basados en la amplificación de ácidos nucleicos como son la PCR digital (dPCR) o la amplificación isotérmica (RT-LAMP) (Tabla 5) [14].

Tabla 5: Métodos alternativos a la RT-PCR.

Técnica	Descripción
PCR digital (dPCR)	En este caso se utiliza la amplificación del punto final para cuantificar de forma directa la carga viral. Es menos susceptible a los inhibidores de la amplificación en la matriz de la muestra. Por todo esto, se recomendaría en situaciones donde tras la realización de una RT-PCR se obtienen resultados negativos debido a la baja carga viral o a la degradación del ARN [14].

<p>PCR digital en gotas (ddPCR):</p>	<p>Este método es una variante del anterior y consiste en dividir la muestra en múltiples gotas, sirviendo cada una de ellas como un reactor independiente para la PCR [14].</p>
<p>Amplificación isotérmica:</p>	<p>Encontramos métodos como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) o la amplificación de la polimerasa recombinasa (RPA). Ambos métodos se han postulado como adecuados para utilizarlos en pruebas de punto de atención (POC), cuando la realización del diagnóstico de enfermedades infecciosas se puede realizar al lado del individuo sin necesidad de envío a un laboratorio especializado [14].</p> <p>LAMP es una técnica mucho menos costosa, altamente específica y más rápida que la RT-PCR. Consiste en la amplificación selectiva de los ácidos nucleicos diana manteniendo una temperatura constante (normalmente 60°C). Se utilizan entre 4 y 6 cebadores específicos y no se requiere desnaturalización inicial del molde [15].</p> <p>Lin Yu et al. han fusionado la transcripción inversa con la técnica LAMP (RT-LAMP) consiguiendo un método útil en la detección directa de SAR-CoV-2. Los ensayos basados en RT-LAMP que se dirigen al gen S del SAR-CoV-2 han mostrado una sensibilidad del 88,89% y una alta consistencia si se compara con la RT-PCR. Otra ventaja de este método es la reducción del tiempo de diagnóstico, en esta técnica podemos obtener resultados en 1 hora [15].</p>

- **CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats):**

En español significa repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas y es bastante conocido como

herramienta para editar genes, pero también se ha utilizado para la detección rápida de patógenos como el SARS-CoV-2 (14)(15).

El sistema inmunológico adaptativo CRISPR-Cas (Figura 9) está formado por un ARN guía (ARNg) y una nucleasa asociada a CRISPR (Cas). A su vez, el ARNg consta de una secuencia de nucleótidos que se denomina CRISPR RNA (crRNA) complementaria a la secuencia diana. La presencia de una secuencia de ARN diana complementaria al ARNcr hace que se active la nucleasa Cas 13, esta última es la que realiza una escisión dirigida (corta etiquetas informadoras de ARN que posteriormente van a liberar una señal fluorescente) y también desencadena una actividad de ARNasa no específica que provoca la degradación del ARN cercano. Existen otros sistemas CRISPR-Cas como Cas12 que se dirigen al ADN [14].

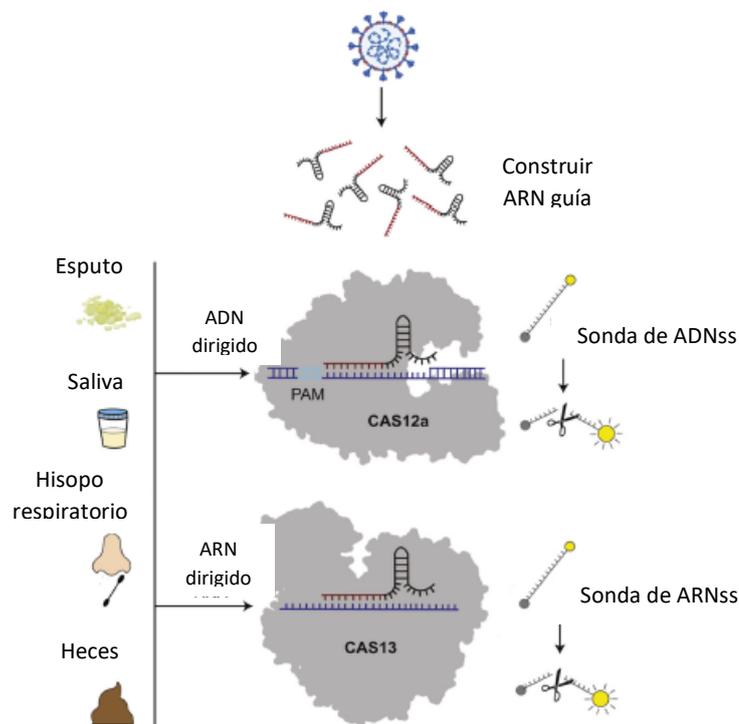


Figura 9: Esquema de un ensayo de diagnóstico molecular que utiliza el sistema CRISPR/Cas. Adaptada de Jayamohan et al. [14].

Este método utiliza proteínas disponibles fácilmente, termocicladores de bajo coste y asequibles, lo que hacen que sea un método sencillo y que se puede utilizar en sitios con mínimas infraestructuras [15].

Por otro lado, la utilización de pruebas radiológicas para el diagnóstico de la COVID-19 se dirigen a determinadas situaciones [9]. Algunas de las pruebas radiológicas más utilizadas se encuentran recogidas en la tabla 6.

Tabla 6: Diferentes métodos radiológicos que pueden utilizarse para completar un diagnóstico de SARS-CoV-2.

Técnica radiológica	Descripción
Tomografía computarizada (TC)	Presenta una sensibilidad alta (86-97%) en pacientes con RT-PCR positiva, pero su sensibilidad es menor (50%) en pacientes que presentan síntomas no respiratorios. Tras la observación de las imágenes obtenidas en personas con COVID-19 se encontraron opacidades en vidrio deslustrado (mayoritariamente en lóbulos periféricos e inferiores y áreas de consolidación lobulares múltiples y subsegmentarias bilaterales). El número de segmentos pulmonares afectados se relaciona con la gravedad de la enfermedad. La TC es más precisa en la detección de lesiones parenquimatosas. Este método es útil cuando se realiza de forma combinada con pruebas de exudado naso u orofaríngeo en personas con alta sospecha clínica de COVID-19 que han dado un resultado negativo en la prueba para la detección inicial del ácido nucleico viral [9,1].
Radiografía de tórax convencional	Su sensibilidad es baja (59%) y se ha utilizado en casos muy limitados para el diagnóstico de SARS-CoV-2 [9].
Ecografía:	Presenta una especificidad muy baja, pero, aunque se ve condicionada por factores como la gravedad de la enfermedad, peso del paciente o habilidad del operador, su sensibilidad es del 75%. Desarrolla un papel importante en el seguimiento de la enfermedad ya que detecta características de la enfermedad pulmonar intersticial (líneas B y consolidaciones subpleurales), siendo capaz de

	identificar las lesiones subpleurales más pequeñas y los derrames pleurales [9].
--	--

En la actualidad no se puede afirmar cuál es la mejor estrategia diagnóstica radiológica. La utilización debe reservarse a pacientes que presenten un cuadro clínico indefinido o para la realización de un diagnóstico diferencial, ya que no es razonable utilizarlo en toda la población debido al tiempo, al coste y a la exposición a la radiación. Estos métodos complementan el diagnóstico molecular, sobre todo en fases tardías o avanzadas de la enfermedad. También son útiles en estudios retrospectivos [1,9].

5. CONCLUSIONES

1. Tras realizar una revisión bibliográfica sobre el estado actual de la COVID-19 se ha observado que existen diversos métodos para su diagnóstico. La elección del método de diagnóstico dependerá en gran medida del momento de la infección viral en la que se encuentre el paciente.
2. En la actualidad, la prueba estándar de oro para diagnóstico de COVID-19 es la RT-PCR, pues es la más específica y sensible.
3. La RT-PCR presenta varias desventajas destacando el hecho de que debe llevarse a cabo en laboratorios equipados y especializados, presenta un número limitado de pruebas diarias y un coste elevado.
4. Los métodos de detección de antígenos se presentan como alternativa, ya que reducen el tiempo de diagnóstico, pero son menos sensibles que la RT-PCR.
5. Existen diferentes métodos diagnósticos alternativos que podrían solventar las desventajas de los anteriores y podrían ser utilizados en punto de atención primaria. Podemos destacar la dPCR ya que detectaría la baja carga viral o la degradación del ARN. La prueba LAMP porque es mucho menos costosa y más rápida que la RT-PCR o la RT-LAMP por su alta sensibilidad y reducción del tiempo de diagnóstico (1h), y CRISPR porque puede utilizarse en lugares con mínimas infraestructuras.

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):141-154.
2. Sotomayor Lugo F, Corbacho Padilla JM, Valiente Linares AM, Benítez Cordero Y, Viera González T. General aspects about the structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Rev Cubana Inv Bioméd [Internet].* 2020 [citado 4 Ago 2021]; 39(3):[aprox. 0 p.]. Disponible en: <http://www.revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/867>
3. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-1115.
4. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron.* 2021;172:112752.
5. Schöler L, Le-Trilling VTK, Eilbrecht M, Mennerich D, Anastasiou OE, Krawczyk A, et al. A Novel In-Cell ELISA Assay Allows Rapid and Automated Quantification of SARS-CoV-2 to Analyze Neutralizing Antibodies and Antiviral Compounds. *Front Immunol.* 2020;11:573526.
6. Delpino MV, Quarleri J. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the Renin-Angiotensin System Favors Lung Fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:340.
7. Salian VS, Wright JA, Vedell PT, Nair S, Li C, Kandimalla M, et al. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol Pharm.* 2021;18(3):754-771.
8. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:587269.
9. Pascarella G, Strumia A, Piliago C, Bruno F, Del Buono R, Costa F, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med.* 2020;288(2):192–206.
10. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and

infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021;2(1):e13-e22.

11. Axell-House DB, Lavingia R, Rafferty M, Clark E, Amirian ES, Chiao EY. The estimation of diagnostic accuracy of tests for COVID-19: A scoping review. *J Infect*. 2020;81(5):681–697.

12. Aleem A, Akbar AB, Slenker AK. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). StatPearls Publishing [Internet]. 2021. [citado 4 Ago 2021]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34033342/>

13. Ministerio de Sanidad. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19 [Internet]. Instituto de Salud Carlos III; actualizado Julio 2021 [citado 4 Ago 2021]. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCoV/documentos/COVID19_Estrategia_vigilancia_y_control_e_indicadores.pdf

14. Jayamohan H, Lambert CJ, Sant HJ, Jafek A, Patel D, Feng H, et al. SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem*. 2021;413(1):49-71.

15. Islam KU, Iqbal J. An update on molecular diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:560616.

16. Saito M, Adachi E, Yamayoshi S, Koga M, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, et al. Gargle lavage as a safe and sensitive alternative to swab samples to diagnose COVID-19: A case report in Japan. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):893-894.

17. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(5):434-435.

18. Groß R, Conzelmann C, Müller JA, Stenger S, Steinhart K, Kirchhoff F, et al. Detection of SARS-CoV-2 in human breastmilk. *Lancet*. 2020;395(10239):1757-1758.

19. Song C, Wang Y, Li W, Hu B, Chen G, Xia P, et al. Absence of 2019 novel coronavirus in semen and testes of COVID-19 patients. *Biol Reprod*. 2020;103(1):4-6.
20. Meduri A, Oliverio GW, Mancuso G, Giuffrida A, Guarneri C, Venanzi E, et al. Ocular surface manifestation of COVID-19 and tear film analysis. *Sci Rep*. 2020;10(1):20178.
21. Atum M, Boz AAE, Çakır B, Karabay O, Köroğlu M, Öğütlü A, et al. Evaluation of conjunctival swab PCR results in patients with SARS-CoV-2 infection. *Ocul Immunol Inflamm*. 2020;28(5):745-748.
22. Ben-Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M, et al. Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(9):1248-1253.
23. Schmidt M, Hoehl S, Berger A, Zeichhardt H, Hourfar K, Ciesek S, et al. FACT- Frankfurt adjusted COVID-19 testing- a novel method enables high throughput SARS-CoV-2 screening without loss of sensitivity [Internet]. *bioRxiv*. 2020 [citado 4 Ago 2021]. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.28.20074187v1.full.pdf>
24. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med*. 2020;173(4):262-267.
25. Wang X, Yao H, Xu X, Zhang P, Zhang M, Shao J, et al. Limits of Detection of 6 Approved RT-PCR Kits for the Novel SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Clin Chem*. 2020;66(7):977-979.
26. Gao J, Quan L. Current status of diagnostic testing for SARS-CoV-2 infection and future developments: A review. *Med Sci Monit*. 2020;26:e928552.
27. Richter A, Plant T, Kidd M, Bosworth A, Mayhew M, Megram O, et al. How to establish an academic SARS-CoV-2 testing laboratory. *Nat Microbiol*. 2020;5:1452-1454.

28. Gobierno de España. Diagnóstico COVID-19 ¿qué pruebas existen y para qué sirven? [Internet]. [Consultado 4 Ago 2021]. Disponible en: <https://umivale.es/dam/web-corporativa/Documentos-prevenci-n-y-salud/docs-y-fotos-coronavirus/diagnostico-covid-19-pruebas-que-existen-y-para-que-sirven.pdf>
29. Cinfa. Aprobada la venta sin receta en farmacias de los tests de antígenos de autodiagnóstico Covid-19 [internet]. Pamplona: 20 Jul 2021 [Consultado 4 Ago 2021]. Disponible en: <https://www.cinfa.com/noticia/aprobada-la-venta-sin-receta-en-farmacias-de-los-tests-de-antigenos-de-autodiagnostico-covid-19/>
30. Diao B, Wen K, Chen J, Liu Y, Yuan Z, Han C, et al. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein. In bioRxiv [internet]. 2020. [citado 4 Ago 2021]; Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.07.20032524v2>
31. Life Length. Métodos de detección de Covid-19 [Internet]. [Consultado 4 Ago 2021]. Disponible en: <https://lifelength.com/es/metodos-de-deteccion-de-covid-19/>
32. Echazarreta B. ¿Son fiables los test de autodiagnóstico de Covid que venderán las farmacias? [Internet]. ABC; 22 Jul 2021 [Consultado 4 Ago 2021]. Disponible en: https://www.abc.es/sociedad/abci-fiables-test-autodiagnostico-covid-venderan-farmacias-202011131117_noticia.html
33. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. ¿Sabes que hay diferentes test de diagnóstico #COVID19 dependiendo de su objetivo? Mira en esta #infografía las características y utilidades de cada #TestCOVID. En caso de duda: Consulta a personal sanitario/farmacéutico. Preguntas y respuestas <http://bit.ly/pruebasCOVID> [tuit]. 27 Jul 2021 [Consultado 4 Ago 2021]. Disponible en: <https://twitter.com/AEMPSGOB/status/1419930561611763712/photo/1>