

Descripción del sistema CRISPR-Cas y su aplicación como metodología de punto de cuidado en la detección del SARS-CoV-2

Esmeralda Escobar-Muciño^{1*} [ID](#), Estrella Escobar-Muciño² [ID](#), Adriana Gamboa-Pérez¹ [ID](#).

¹ Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Microbiología. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

² Escuela de Ingeniería en Mecatrónica de la Universidad Politécnica de Tlaxcala, México.

*Email autor corresponsal: esmeeem2014@gmail.com

Recibido: 19 octubre 2020. **Aceptado:** 13 diciembre 2020

RESUMEN

El virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) se propagó a nivel mundial desde diciembre del 2019, causando rápidamente la enfermedad del COVID-19 en el mundo haciendo vulnerable a la población en general. Demostrando su efecto en todas las edades, dañando muchos órganos y sistemas humanos, causando preocupación entre los individuos afectando la vida diaria y la economía mundial. Especialmente, porque no se dispone de vacunas hasta el momento, generando una necesidad sin precedentes de la creación de métodos de diagnóstico para la detección rápida, sensible y que diferencien las cepas del coronavirus. Motivo por el cual, el objetivo del presente estudio fue describir el sistema CRISPR-Cas, así como las metodologías emergentes para la identificación del SARS-CoV-2 y a su vez comparar las ventajas y desventajas de los diversos estudios publicados. Con la finalidad de obtener información de las nuevas tecnologías alternativas basadas en CRISPR-Cas, que en algunos casos han sido aprobadas por la FDA como metodologías de diagnóstico, encontradas en etapas de desarrollo y de prueba en personas enfermas con el COVID-19. Y son comparables con los métodos convencionales de detección del virus, además son un tipo de biosensor de punto de cuidado porque ofrecen un diagnóstico efectivo de la enfermedad a gran escala en personas portadoras del SARS-CoV-2.

Palabras clave: biosensor de punto de cuidado (BPC), CRISPR-Cas, estudios epidemiológicos del COVID-19 y métodos de detección alternativos del SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The severe acute respiratory syndrome virus coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spread since December 2019 causing the disease called “COVID-19” in the world, making the general population vulnerable. Proving its effect in all ages, damaging many human organs and systems, causing preoccupation among the individuals, affecting daily life and the world economy. Specially because vaccines are not available so far, generating an unprecedented need for diagnostic methods for rapid and sensitive detection that differentiates strains of the coronavirus. Reason why the objective of this study was to describe the CRISPR-Cas system, as well as the emerging methodologies for the identification of SARS-CoV-2 and compare the advantages and disadvantages of the various published studies. In order to obtain information on the new alternative technologies based on the CRISPR-Cas that in some cases have been approved by the FDA as a diagnostic methodology, in the development and testing stages in illness people with COVID-19. And are comparable with conventional virus detection methods, are a type of point-of-care biosensor because they offer an effective diagnosis of the disease on a large scale in people carrying SARS-CoV-2.

Keywords: alternative SARS-CoV-2 detection methods, CRISPR-Cas, epidemiologic studies of COVID-19, and point of care biosensor (POC).

INTRODUCCIÓN

Los coronavirus incluyen una gran familia de virus que son comunes tanto en los humanos y animales (camellos, ganado, gatos y murciélagos, entre otros). En ocasiones, los coronavirus de animales pueden infectar a los seres humanos, como ejemplo el SARS-CoV, el MERS-CoV y actualmente el SARS-CoV-2. Este último ha provocado la infección aguda del tracto respiratorio, propagándose rápidamente en todo el mundo y convirtiéndose en un problema de salud pública. Esta infección se

denomina actualmente como el COVID-19, caracterizada porque los individuos que contraen la enfermedad presentan varios síntomas (fiebre alta, dificultad para respirar, tos seca y neumonía atípica), y suele ser una infección confirmada por pruebas serológicas, PCR y tomografía computarizada (TC) de pulmón [1].

Los casos de COVID-19 se comenzaron a detectar desde el mes de diciembre del 2019. Por lo que, a principios del 2020, ya se habían

identificado un gran número de casos de neumonía causada por el SARS-CoV-2, cuyo brote en la actualidad ha afectado a varios países y causado un impacto mundial [2]. Para mayo del 2020, se reportó que los países de Lesoto, Turkmenistán y Corea del Norte no presentaban casos de COVID-19 [3].

Actualmente, a nivel mundial se reportan 55,624,562 casos confirmados y 1,338,100 muertes por COVID-19 reportadas en 54 países [4]. Mientras que, en México se reportan 1,015,071 casos confirmados y 99,528 muertes por COVID-19 [4]. Debido a que el SARS-CoV-2 se considera un virus de alto nivel de riesgo, se ha puesto especial interés en la investigación para un diagnóstico más rápido y confiable; esto plantea un desafío tanto clínico como tecnológico. Por lo anteriormente mencionado, la comunidad científica decidió compartir la información de forma abierta para agilizar las investigaciones. La pandemia amenaza con la saturación hospitalaria, lo cual ha puesto a prueba la capacidad de diagnóstico de los médicos y laboratoristas, por lo que se está en la búsqueda de un método de diagnóstico rápido, económico y eficaz [2,5]. Con base en lo anterior, los científicos han sido obligados a trabajar de manera rápida para comprender el mecanismo de infección del SARS-CoV-2, con la finalidad de establecer diagnósticos y tratamientos avanzados que sean

efectivos [6].

Actualmente, se conoce que el SARS-CoV-2 se transmite en humanos por medio de gotitas de saliva y superficies contaminadas. El virus puede persistir hasta por 9 días a temperatura ambiente, motivo por lo cual existe la necesidad de detectar el virus por el peligro que representa. Por lo anterior, se han sugerido medidas de prevención como: (i) el lavado regular de las manos con jabón durante 20 s, (ii) fortalecer el sistema inmune durmiendo de 7-8 h, (iii) ejercitarse regularmente, (iv) tener una buena nutrición, y (v) el uso de equipo protectivo como guantes, máscaras y caretas, en los lugares de trabajo y hospitales [7].

Adicionalmente, las investigaciones recientes sugieren que las personas infectadas con el SARS-CoV-2 pueden ser altamente infecciosas, mientras son asintomáticas o presintomáticas, y que una persona infectada puede transmitir el virus a 5.6 personas en promedio [7]. Sugiriendo la necesidad de ensayos de diagnóstico rápidos y sensibles para detectar el SARS-CoV-2, que utilizan preferiblemente equipo existente para facilitar la detección a gran escala [7].

Sin embargo, los esfuerzos para controlar la enfermedad se ven obstaculizados por múltiples factores, incluidos: la dificultad para producir rápidamente el número de pruebas de diagnóstico necesarias, la baja sensibilidad de

las pruebas de diagnóstico y la poca experiencia técnica necesaria para obtener resultados válidos. También, las pruebas a gran escala son esenciales, pero las estimaciones indican que los métodos de identificación actuales no son capaces de detectar un gran número de casos asintomáticos, presintomáticos, o con sintomatología leve de COVID-19 [7]. Razón por la cual, las pruebas rápidas denominadas de punto de cuidado BPC o POC (Point Of Care, por sus siglas en inglés), son capaces de operar en cualquier entorno e incluso en el hogar, son escalables, asequibles, fáciles de utilizar y surgieron como una necesidad urgente para luchar contra el COVID-19 [8].

Existen varias pruebas BPC que han sido aprobadas por la FDA (Food Drugs and Administration, por sus siglas en inglés; Administración de Drogas y Alimentos, en español), debido al incremento del número de personas sospechosas de infección, enfermas o infectadas asintomáticas por COVID-19, por ello existe la necesidad de realizar el diagnóstico de personas sospechosas de estar infectadas ya que una persona asintomática podría contagiar a un gran número de personas sin saberlo, convirtiéndose en un riesgo para la salud pública. Por ello, es tan importante desarrollar un método de diagnóstico fácil de aplicar, rápido, eficaz y económico, para poder aplicarlo a gran escala y encontrar a estos

individuos asintomáticos. Algunos métodos BPC empleados para detectar el SARS-CoV-2 están basados en RT-qPCR y detectan componentes moleculares del virus como la proteína N, ORF1ab, ORF1ab, S, MS2, E y el ORF8 [9, 10].

Como es de notarse en la actualidad, las pruebas basadas en detección de ácidos nucleicos se han utilizado ampliamente como método de referencia para el diagnóstico del COVID-19 [2]. Por lo que se han diseñado varios métodos de detección alternativos que, a las pocas semanas de la propagación del SARS-CoV-2, algunos laboratorios estadounidenses desarrollaron herramientas de diagnóstico basadas en el sistema CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated, por sus siglas en inglés; repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas regularmente, en español), para la detección del SARS-CoV-2 [6]. Otra aplicación potencial es como terapia para inhibir al virus como moléculas bifuncionales. Como ejemplo, el uso de CRISPR-Cas13 denominada “PAC-MAN” (The Prophylactil Antiviral CRISPR in huMAN cells, por sus siglas en inglés; El CRISPR profiláctico antiviral en células humanas, en español) [11]. Esta metodología tiene el objetivo de destruir el ciclo de vida del coronavirus. Mediante la degradación del ARN

genómico del SARS-CoV-2, limitando la expresión de proteínas vitales y expresión del virus en células humanas. Lo cual es contrastante con los antivirales probados contra el virus que actualmente se reportan [12, 13].

Poco después, varias pruebas de diagnóstico fueron aprobados con la finalidad de confirmar el COVID-19 (al identificar su fuente principal, el SARS-CoV-2). Además de probar los métodos en laboratorios certificados proporcionando resultados confiables por medio de pruebas clínicas para identificar personas infectadas por el virus [6].

Alternativamente, la capacidad de diagnóstico del sistema CRISPR-Cas se ayuda de tecnologías que dan ventajas en la efectividad del diagnóstico clínico. Y un gran número de investigadores han utilizado este sistema para editar y diagnosticar enfermedades en células aisladas de modelos animales [14].

Por otro lado, la primera oleada de ensayos clínicos que utilizaron el CRISPR-Cas fueron para tratar trastornos hereditarios en humanos e implicaron la edición *ex vivo* de células. Lo cual es considerado actualmente un enfoque factible y tiene el potencial para tratar trastornos sanguíneos como la anemia de células falciformes, la β -talasemia, el cáncer, algunas enfermedades en estadio temprano y en enfermedades infecciosas como la tuberculosis [14].

Hoy en día, en México se reportan casos de COVID-19 y a la par se introducen proyectos de estandarización y validación de pruebas rápidas basada en CRISPR-Cas, como una alternativa para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en pacientes enfermos [15].

Finalmente, el término “point of care” es utilizado en el ambiente hospitalario para denotar una serie de pruebas de monitoreo en personas portadoras asintomáticas (sin presentar síntomas) o enfermas de COVID-19 (ya sea con enfermedad leve o grave). El término se refiere a todas las metodologías involucradas en el manejo del paciente en el diagnóstico de la enfermedad del COVID-19, así como la identificación del SARS-CoV-2 llevado a cabo en hospitales como: la toma de muestra, la PCR y algunas de sus variantes (como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa o PCR tiempo real (RT-qPCR) y la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP)), la detección inmunológica de IgG e IgM, la TC y algunas pruebas de detección rápida alternativas como el CRISPR-Cas [16-21]. Con la intención de disminuir el número de enfermos, el tiempo de hospitalización, mejorar el uso de tratamiento con antivirales, terapias, reducir la prescripción médica, el tratamiento con antibióticos y los costos de hospitalización, aunque representa ciertos desafíos debido a que

se reportan personas dadas de alta de los hospitales, pero vuelven a decaer y a su vez pueden causar reinfección secundaria y terciaria. Tanto al personal médico, familiares y personas que han tenido contacto con los enfermos de COVID-19 [22- 24].

SISTEMA CRISPR-Cas

Fue descubierto por primera vez en *Escherichia coli* en 1987 y después se encontró el mismo sistema en varios géneros bacterianos. Siendo predominante en las arqueas en el 97% de los genomas, en comparación con las bacterias encontrando el 50% de secuencias en los genomas. Además, su papel biológico es brindar protección contra los ácidos nucleicos invasivos (como el ADN o el ARN proveniente de fagos, plásmidos y otros elementos de ADN exógenos), comportándose como un sistema inmunológico en los microorganismos [25].

Por esta razón los científicos comenzaron a tener interés y explotaron los conocimientos del CRISPR-Cas, investigando también sobre las aplicaciones de la actividad endonucleasa de la proteína Cas, siendo aceptada como una herramienta popular en el desarrollo de un amplio rango de medicamentos de significancia clínica incluyendo antivirales, y que en la actualidad ha sido propuesta para utilizar en el diagnóstico y tratamiento del SARS-CoV-2 [25, 26].

El sistema CRISPR-Cas se basa en la capacidad de producir un conjunto de secuencias de ADN derivadas del invasor conocidas como espaciador, que a su vez están flanqueadas por una región líder [27]. Los espaciadores adquiridos se agrupan en cluster conocidos como CRISPR, en donde son transcritos a partir de un solo promotor para generar un pre-cARN largo, el cual es procesado posteriormente por proteínas Cas o bien por ribonucleasas celulares. Este proceso genera ARNs pequeños conocidos como crARN maduros, cuya función es el silenciamiento de secuencias específicas. También, el crARN se asocia con un crARN transactivador (tracrRNA) para reconocer una secuencia blanco, que es una especie diferente de ARN que interactúa con el crARN para formar un gARN guía, el cual se puede encontrar en el sistema CRISPR-Cas tipo II y en el subtipo V-B. También, se sabe que los crARN se asocian a proteínas Cas para formar varios complejos efectores denominados crARN-Cas o crRNP. Por lo que la función principal del sistema CRISPR-Cas es destruir secuencias específicas de los ácidos nucleicos complementarios que son considerados invasores [28- 31].

Por otro lado, el descubrimiento y el reciente avance de las funciones de la secuencia CRISPR y las proteínas Cas asociadas al mismo, han llevado a una rápida expansión de

diferentes campos de la investigación desde hace 30 años, como se observa en la figura 1 [32]. Posteriormente, al descubrimiento del sistema CRISPR-Cas en *E. coli* se dieron a conocer las funciones y mecanismos del sistema CRISPR-Cas, estableciendo una nueva era de la inmunidad adaptativa mediada por CRISPR-Cas en el 2007. Posteriormente, se dio a conocer la primera aplicación de la tecnología CRISPR-Cas9 en 2013, revolucionando el campo de la edición de genes dirigidos a células de mamíferos, acelerando el avance de nuevas aplicaciones en otros sistemas CRISPR-Cas en

ciencias básicas y medicina clínica. También, las herramientas basadas en CRISPR/Cas9 se utilizaron por primera vez para detectar el virus Zika en 2016 y a la bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) que es resistente a la metilicina en 2017. Poco después, se dio a conocer que el Cas13a es guiado por ARN. Mientras que, el Cas12a y Cas13 son de utilidad para detectar ácidos nucleicos y han sido utilizados para el diagnóstico clínico [32- 34].

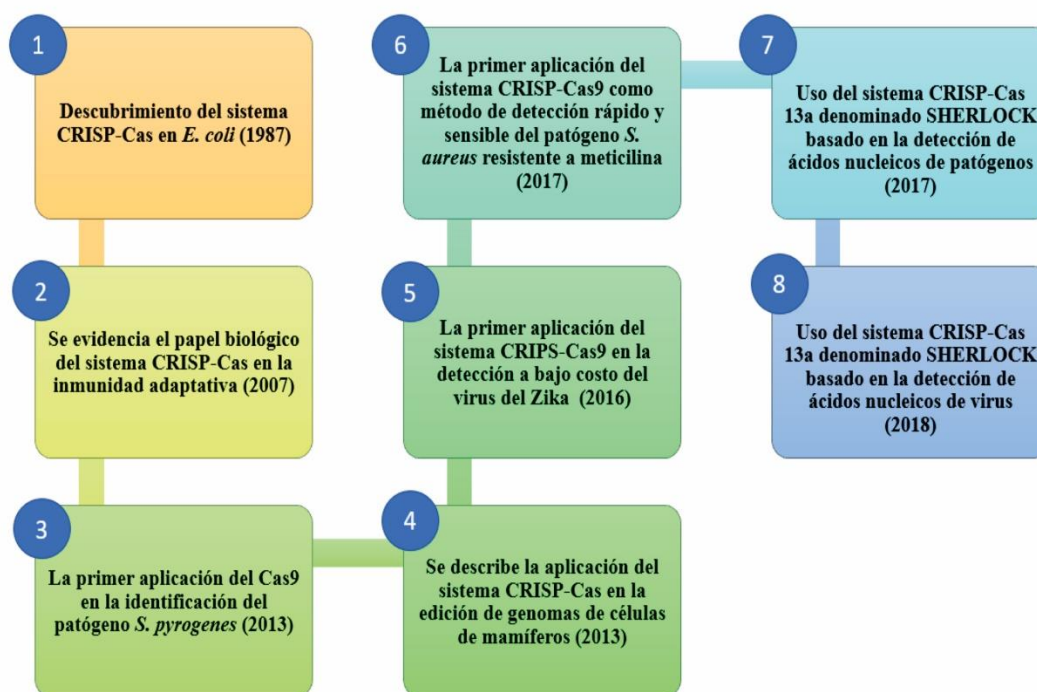


Figura 1. La historia del descubrimiento del CRISPR-Cas y su aplicación en la identificación de patógenos [32].

A continuación, se describen los sistemas CRISPR-Cas basándose en la clasificación por tipos.

Las proteínas Cas se dividen en 13 tipos: las proteínas Cas1 al Cas10 y las proteínas Cas12 al Cas14. Además, se clasifican en 6 tipos (I al VI), su papel de manera resumida se basa en la adquisición de espaciadores, la interferencia de ácidos nucleicos como dianas moleculares y la expresión de crARN. Su función principal abarca la unión a ADN y ARN no específico actuando como ADNasa, se une específicamente a regiones ricas en uracilo, actúa como exonucleasa, endonucleasa y helicasa de ADN, corta ssARN (ARN de cadena sencilla) y ssADN (ADN de cadena sencilla) no específico y ssADN específico que se encuentra cercano a la secuencia TTTN (Kumar prashant *et al.*, 2020; Michael, 2020) [35, 36].

Los principales dominios encontrados en la familia Cas son: el dominio HD (llamado así por los residuos de aminoácidos conservados de histidina (H) y/o aspartato (D)), se sabe que está involucrado en el metabolismo de ácidos nucleicos, el dominio helicasas de caja DEAD/DEAH; su propósito es desenrollar los ácidos nucleicos. A su vez, están involucradas en el metabolismo del ARN incluida; la transcripción nuclear, el empalme previo del ARNm, la biogénesis del ribosoma, el

transporte nucleocitoplasmático, la traducción, la desintegración del ARN y la expresión de genes orgánulos. Finalmente, tienen un dominio endonucleasa conocido como RuvC (estas proteínas llevan a cabo la actividad endoribonucleasa para procesar sus propios ARN guía y actividad ADNasa guiada por ARN para la escisión de ADN diana), el dominio del lóbulo de reconocimiento helicoidal alfa cuya función es de una endonucleasa guiada por ARN, el dominio correspondiente a la familia DxxTHG asociado al CRISPR y el dominio NUC que es una endonucleasa [29, 36-39].

Sustratos reconocidos por el sistema CRISPR-Cas de acuerdo con su clasificación

Comúnmente el sistema CRISPR-Cas reconoce ADN, el cual es hidrolizado por varios crRNP efectores. Los sistemas CRISPR-Cas del tipo I, II, IV y V se dirigen al ADN, mientras que los sistemas del tipo III cortan por igual el ADN y ARN. Los sistemas del tipo VI cortan el ARN y otros son específicos de ADN, mostrando dependencia del reconocimiento de una secuencia corta de 2-5 pb, llamado motivo adyacente del protoespaciador o PAM (Protospacer adjacent motif, por sus siglas en inglés; motivo adyacente de protoespaciador, en español), ubicado inmediatamente adyacente a la secuencia diana del ADN invasor. La presencia del PAM es esencial para la

degradación de ácidos nucleicos y esta secuencia está flanqueada por repetidos. Por el contrario, la función de los sistemas CRISPR-Cas del tipo III y VI es direccionar el ARN y no depende de los PAM de consenso. Sin embargo, la actividad de los sistemas del tipo III se han estudiado y se ha demostrado que son regulados por secuencias que flanquean los protoespaciadores de los ARN blanco denominadas secuencias flanqueantes de protoespaciadores [31].

Los sistemas de proteínas Cas y su descripción

El sistema Cas3

Destacó por primera vez en el 2002 cuando se realizaba un análisis *in silico* de genomas procarióticos, identificando el motivo de la helicasa de la superfamilia 2 conocido como 'COG1203' y su asociación con otras enzimas de procesamiento de ácidos nucleicos ubicadas junto a las secuencias espaciadoras de ADN repetido, característica principal del CRISPR [25].

Esto creó el término "CRISPR", para las repeticiones de ADN, y la proteína COG1203 con el tiempo se acuñó como "Cas3". Lo

anterior permitió el descubrimiento y el establecimiento de la biología y biotecnología del CRISPR, que posteriormente se describió al Cas3 como parte de un sistema de inmunidad procariota basado en la interferencia de ARN [31].

A lo largo de las investigaciones se conocieron múltiples funciones de la proteína Cas3 como: (i) la participación en la interferencia del CRISPR, (ii) función como ATPasa dependiente de ssADN y dsADN (ADN de doble cadena), pero en algunas ocasiones la actividad nucleasa no requiere de ATP, (iii) tiene un papel biológico como helicasa dependiente de ATP, con la finalidad de desenrollar los híbridos de ADN/ADN y ARN/ADN, moviéndose principalmente en dirección de 3' a 5' [29, 31]. En la figura 2 se puede observar el mecanismo de de la nucleasa Cas3 [18]. El cual se basa en que Cas3 funciona con un complejo de ribonucleoproteína conocido como "cascada". Los pares de bases en el complejo forman un bucle, propiciando el reclutamiento de Cas3 con la finalidad de degradar el ADN diana [40].

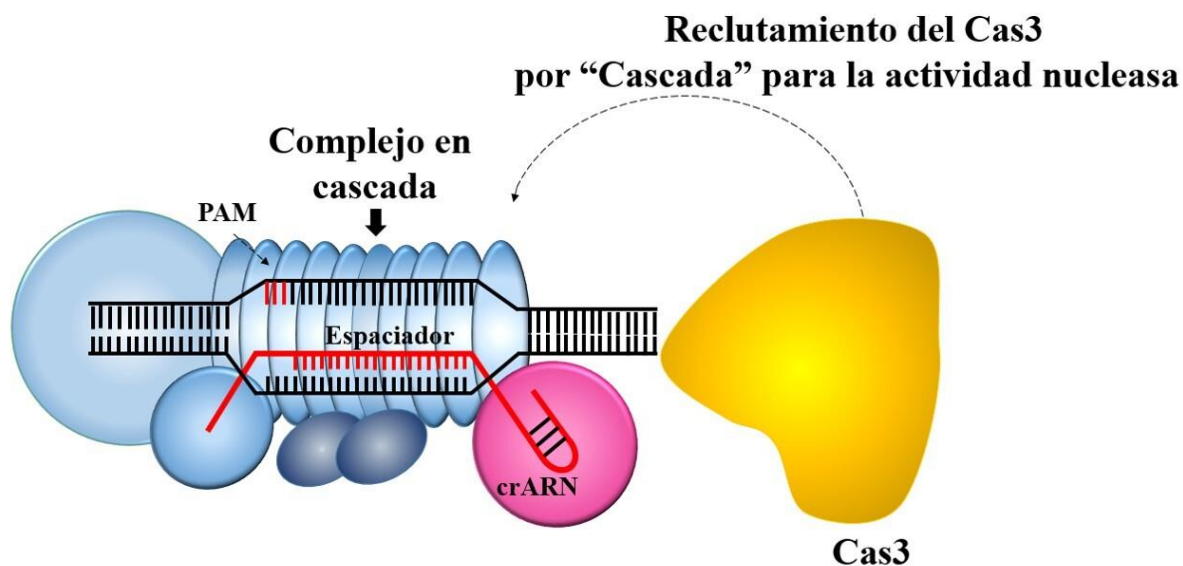


Figura 2. Representación del mecanismo de corte de la nucleasa Cas3 denominado “cascada”. Imagen modificada de [31].

La diversidad de la forma y función del complejo Cascada-Cas3 en los sistemas CRISPR del tipo 1 se hace explícita en la mayoría de los subtipos como: 1-A, 1-F y 1-U. Dentro de estos sistemas, los complejos cascada varían en composición de tres a cinco subunidades proteicas, aunque Cas5 y Cas7 son comunes en todos los subtipos, y muestran alguna variación correspondiente en las funciones catalíticas. Existen estudios comparativos donde se ha encontrado que la nucleasa Cas3 posee diferente función en algunos modelos bacterianos. Como ejemplo se ha encontrado que existen proteínas Cas3 que se fusionan a las Cas2 en los géneros *Yersinia* y *Pseudomonas*. Por otro lado, en el caso de algunas arqueas, las funciones de Cas3 son como nucleasa, translocasa y helicasa. Y estas

enzimas son codificadas por diferentes genes como el *cas3''* y *cas3'*. También, en las cianobacterias se ha reportado la proteína Cas3'' que puede fusionarse con la proteína Cas10 [41, 42]. A continuación, se describen los dominios característicos de la proteína Cas3 tomando como modelo bacteriano al termófilo *Thermobifida fusca* YX, cuyo número de acceso es 4qqw de la estructura cristalina obtenida de la base de datos de proteínas PDB (del inglés: protein data bank) [43]. En las figuras 3A, 3B y 3C se observa la estructura en cristal del monómero, dímero y tetramero del Cas3 que fue representada en lazos y listones. Así como los dominios principales de la proteína Cas3, cuya arquitectura se observa en la figura 3D. Encontrando que posee los dominios HD, DEAD/DEAH, helicasa y el

dominio C terminal. Identificando 30 estructuras [41, 44].
arquitecturas, divididas en 1347 especies y 24

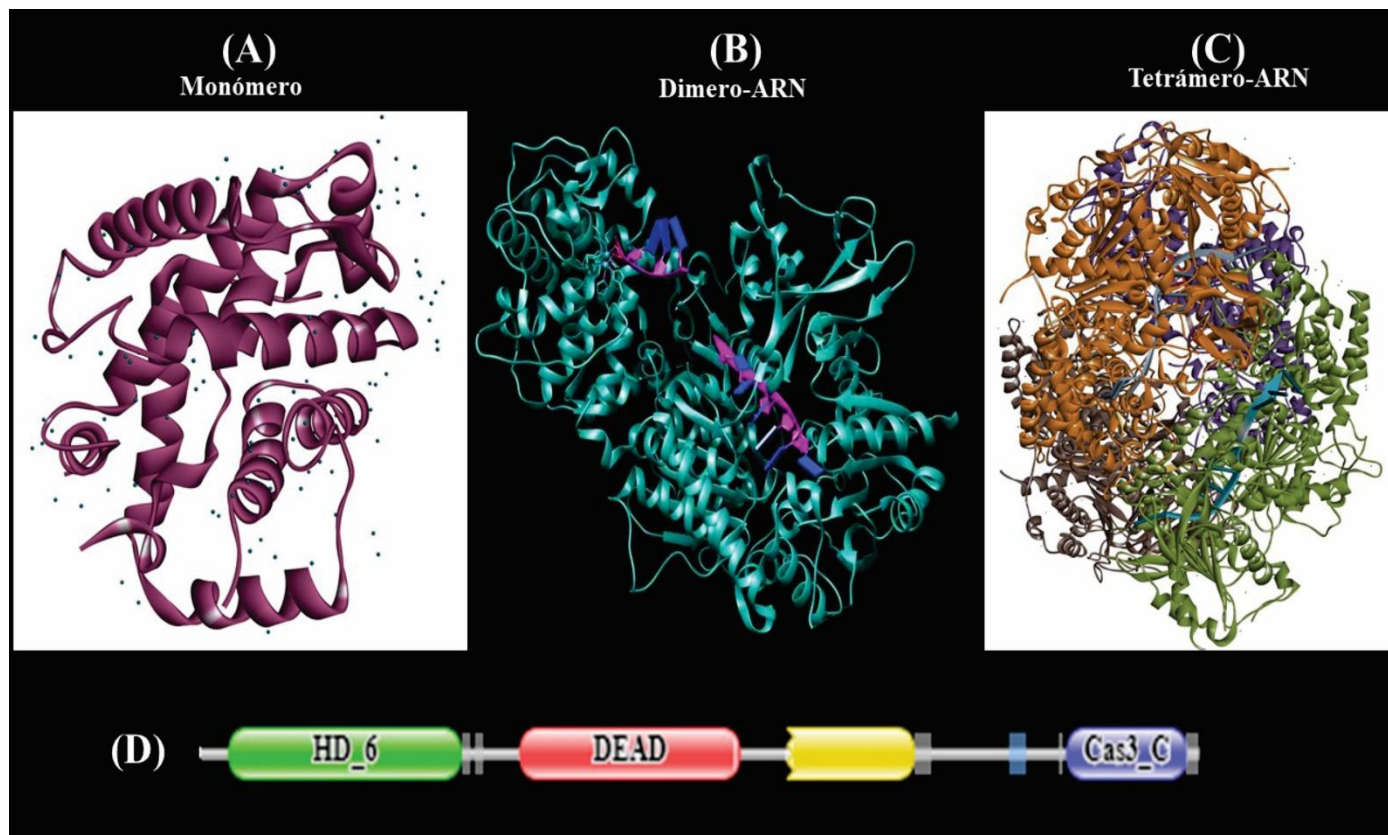


Figura 3. Representación de la estructura cristalina del sistema Cas3 (3A-3C) y sus dominios (3D). Las imágenes fueron elaboradas en el presente estudio, fueron reproducidas en Pymol 2.4, la estructura cristalina obtenida de PDB y los dominios de Pfam [43-45].

El sistema Cas9

Corresponde al sistema CRISPR del tipo II, se caracteriza porque necesita del procesamiento correcto del pre-crARN, requiere del tracrARN y una ribonucleasa 3 endógena (*rnc*). La función del tracrARN sirve como guía para el procesamiento del pre-crARN asistido por la ribonucleasa 3. Mientras que, el complejo Cas9/crARN/tracrARN corta una diana de dsADN lineal o circular complementaria al

espaciador produciendo extremos romos. Como característica principal el Cas9 es considerado inactivo en ausencia del ARN guía (ARNg). Por otro lado, el Cas9 reconoce un motivo adyacente del protoespaciador rico en 3'-G, una secuencia corresponde a TGGTG ubicada en las secuencias de repetición del CRISPR, cuya función es ayudar a distinguirlas ya que las dianas moleculares dentro del locus CRISPR bacteriano no tienen PAMs (Figura 4) [31].

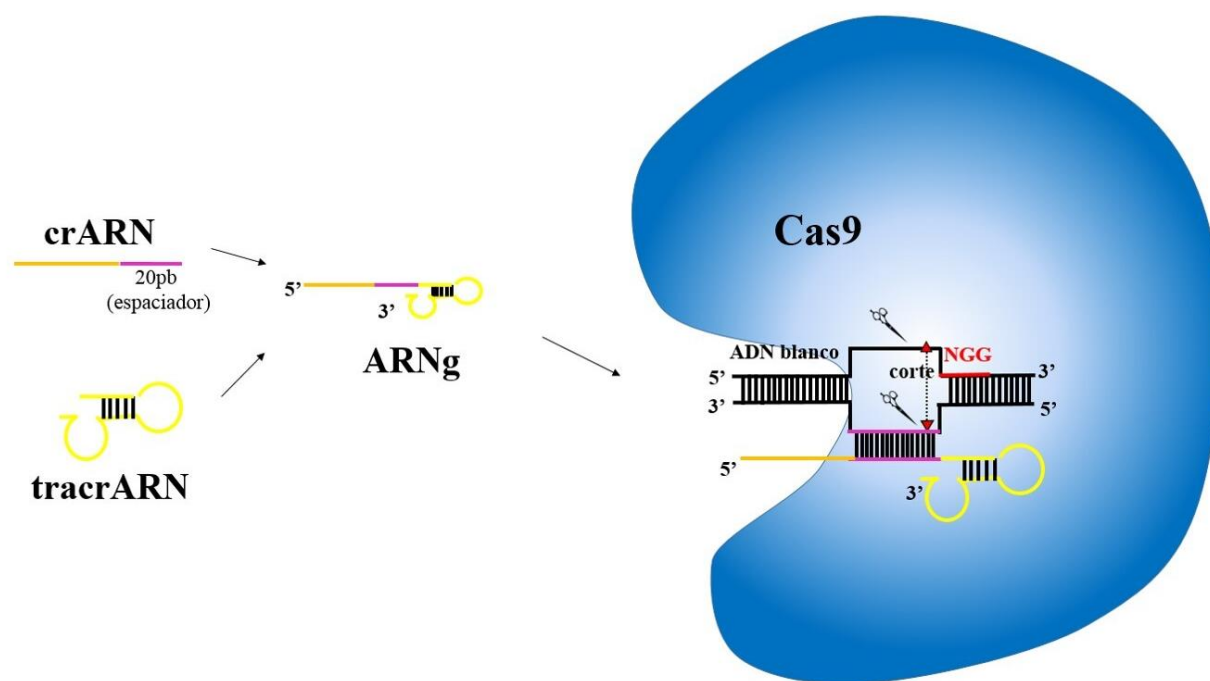


Figura 4. Representación del mecanismo de corte de la nucleasa Cas9. Imagen modificada y basada en [46- 48].

En la figura 5 se observa la estructura cristalina y los principales dominios que conforman la arquitectura de la proteína Cas9. La imagen se basó en la proteína Cas9 (PDB: 5AXW) de *S. aureus* acomplejada con sgARN y su ADN diana o PAM (TTGGGT) [45, 49, 50].

El sistema Cas12

Pertenece a la clase 2 tipo V-A (anteriormente se conocía como Cpf1), es similar a la proteína Cas9 en tamaño y forma. El Cas12a posee dos dominios nucleasa RuvC, que incluso pueden superponerse. También, contiene un dominio nucleasa en lugar del dominio HNH. La función del Cas12a es cortar tanto el ARN y ADN, antes

de que ocurra el corte de ácidos nucleicos en presencia del ARNcr producido por una primera reacción.

También, se sabe que los PAMs correspondientes a Cas12a y Cas9 están en el extremo opuesto de su propio protoespaciador. El Cas12 utiliza un método de reconocimiento de secuencias específicas, que requiere de un PAM corto dependiente de timina (T) como las secuencias: 5'-YTN-3', 5'-TTN-3' o 5'-TTTN-3'. Observando que el Cas12 es guiado por ARN único con la finalidad de cortar eficientemente el ADN diana. El sitio de corte del Cas12a está después de la base 18 ubicado en la secuencia NTS y después de la base 23 en la secuencia TS, lejos del PAM [44, 51].

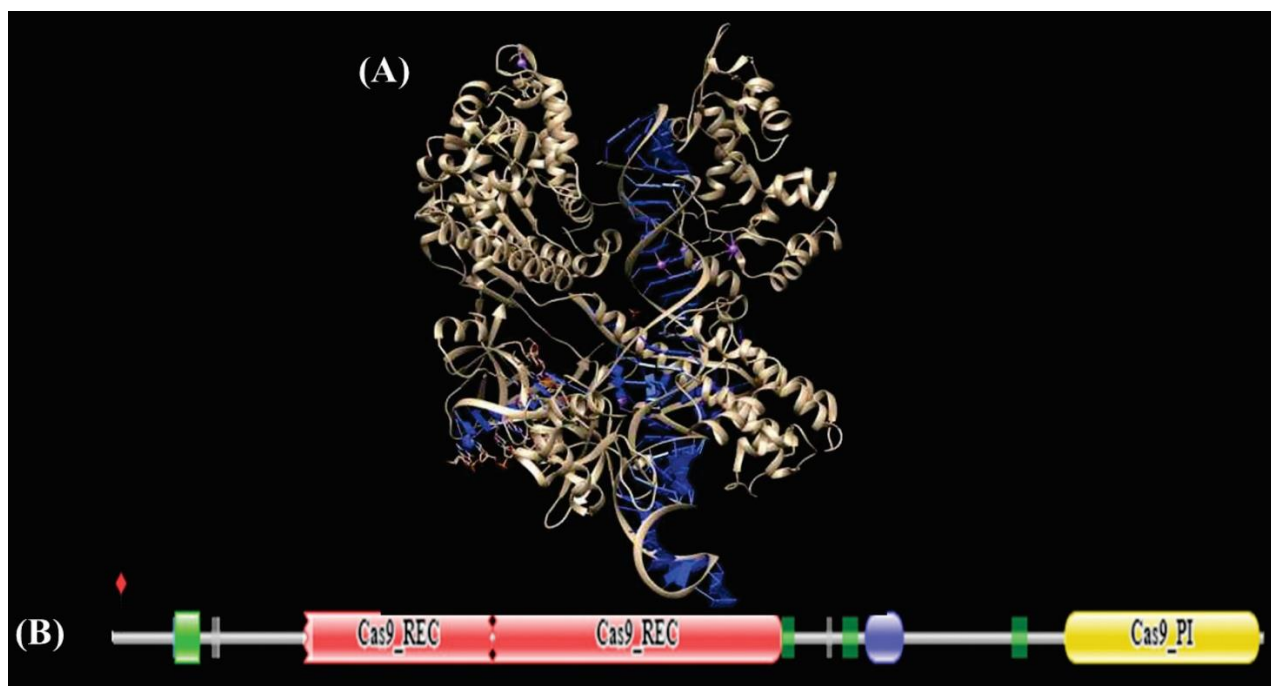


Figura 5. Representación de la estructura cristalina del sistema Cas9 (PDB: 5AXW) y sus dominios. Las imágenes fueron elaboradas en el presente estudio, fueron reproducidas en Pymol 2.4, la estructura cristalina obtenida de PDB y los dominios de Pfam [44, 45, 49, 50].

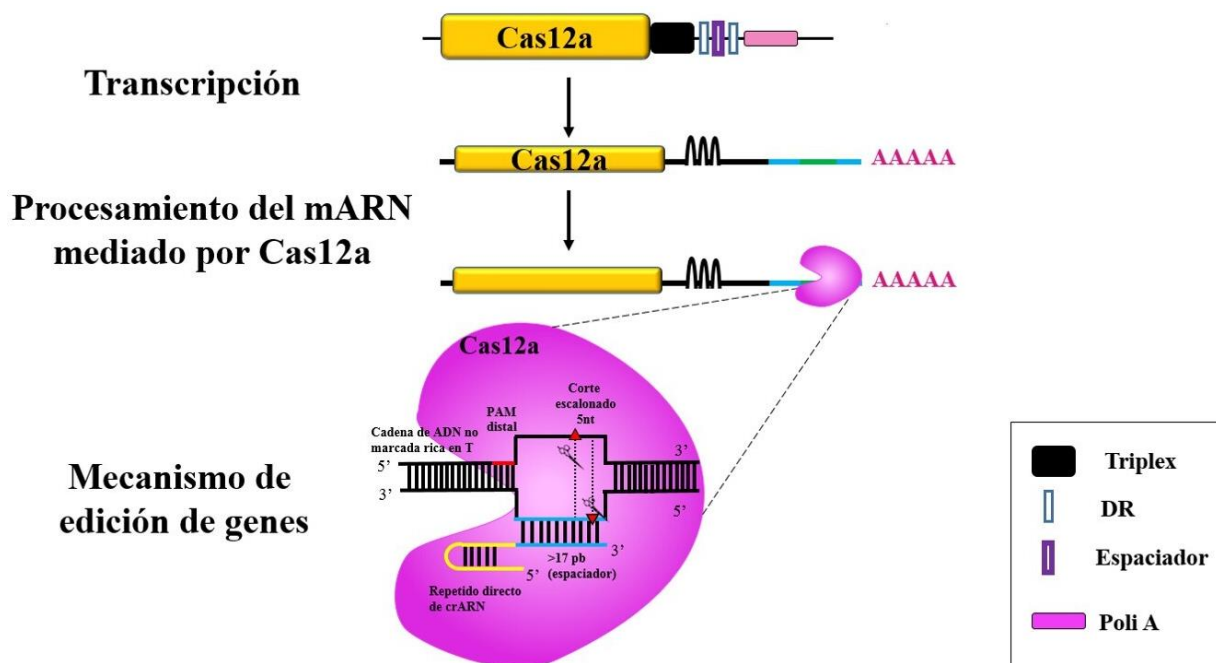


Figura 6. Representación del mecanismo de corte de la nucleasa Cas12a. Imagen basada en [51, 52].

Mientras que, un ADN escalonado con un saliente de 4 o 5 nucleótidos en la dirección 5', es generado a partir del corte de la nucleasa RuvC, puede estimular aún más la reparación de ADN por medio del sistema de unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Non-homologous DNA end joining, por sus siglas en inglés; unión de extremos de ADN no homólogo, en español). Además, se ha encontrado que la secuencia de crARN maduro tiene al menos 16 nucleótidos de longitud y alcanza la máxima eficiencia de corte en una longitud de 17-18 nucleótidos [44, 51]. En la figura 6 se observa el mecanismo de la proteína Cas12a.

Aunque los efectores de los subtipos de la nucleasa Cas 12 conocidos como V-A (Cas12a) y V-B (Cas12b) se han estudiado en detalle, las distintas arquitecturas del dominio y las secuencias RuvC de proteínas Cas12 no se han caracterizado del todo [38]. Encontrando diferencias entre las proteínas Cas12 al caracterizar las proteínas Cas12c, Cas12g, Cas12h, Cas12e y Cas12i demostrando que todas poseen actividad de interferencia del dsADN guiado por ARN. Por ejemplo, las diferencias entre las proteínas Cas12g y Cas12i; encontrando que cada una posee un tipo de corte diferente. Es decir, Cas12i tiene mayor eficiencia en el mecanismo de corte del espaciador ya sea la cadena complementaria y

no complementaria, lo que da como resultado un corte predominante de dsADN. Mientras que, la proteína Cas12g es una ribonucleasa (ARNsa) guiada por ARN con 2 actividades (ARNsa y ADNsa monocatenaria). Lo anterior demuestra la diversidad funcional debido a la evolución del CRISPR-Cas del tipo V [38, 53]. En la figura 7A se observa la estructura cristalina de la proteína Cas12 (PDB: 6GTF) de *Francisella tularensis* subsp. novicida U112 [45, 54, 55]. Y en la figura 9B, 9C y 9D se observan 3 arquitecturas y dominios correspondientes a la proteína Cas12 [44, 45].

El sistema Cas13

Recientemente, se han descubierto nuevos sistemas CRISPR-Cas con funciones novedosas. Entre estos nuevos descubrimientos se destacan los sistemas de clase 2 y tipo VI, conocidos como el CRISPR-Cas13, que utilizan una sola enzima para dirigirse al ARN utilizando una guía programable denominada crARN. La unión de Cas13 al ARN monocatenario activa la actividad de la ARNsa que corta y degrada el ARN circundante de forma no específica, conocida como actividad de corte colateral o trans. Además, los sistemas del tipo VI se han utilizado para la eliminación de ARN proveniente de agentes patógenos. Por lo que, la nucleasa Cas13 forma la base para la

edición de ARN, basada en la actividad nucleasa y la adenosina desaminasa para editar las secuencias que corta [51, 56]. En la figura 8

se representa el mecanismo molecular de las nucleasas Cas13a y Cas13b.

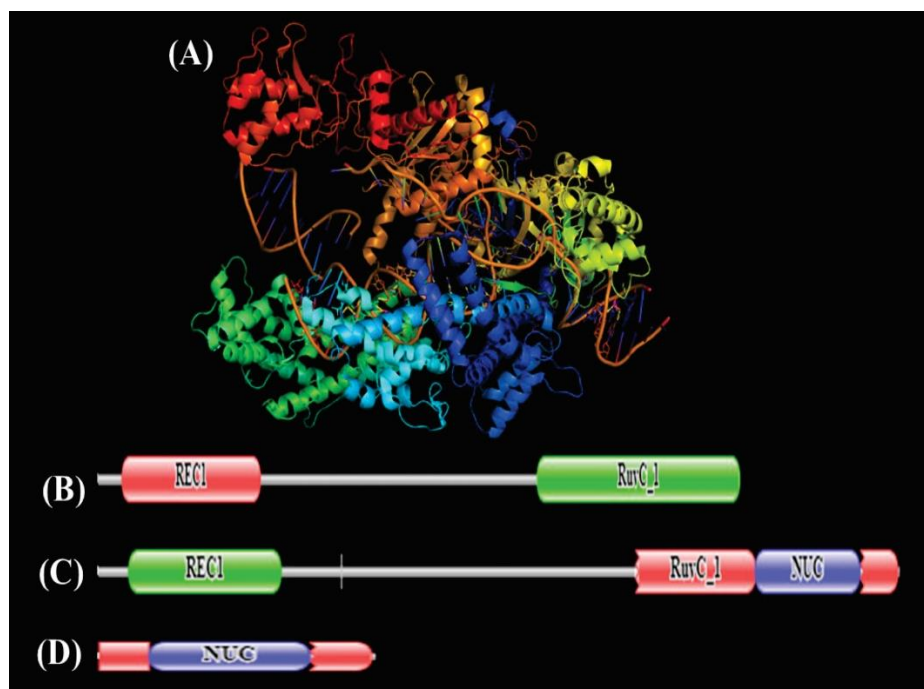


Figura 7. Estructura cristalina de la enzima Cas12 (7A) y las 3 arquitecturas representativas de la nucleasa (7B, 7C y 7D). Las imágenes fueron elaboradas en el presente estudio, fueron reproducidas en Pymol 2.4, la estructura cristalina de la proteína Cas12 fue obtenida de PDB (6GTF) y los dominios de Pfam [44, 45, 54, 55].

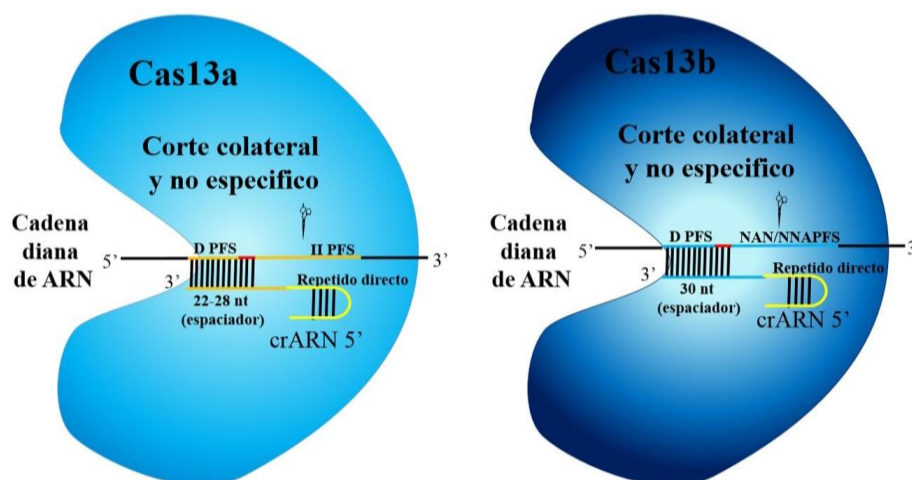


Figura 8. Representación del mecanismo de corte de las nucleasas Cas13a y Cas13b. Imagen modificada de [51].

Los sistemas CRISPR-Cas13 se dividen en cuatro subtipos según la identidad de la proteína Cas13 (Cas13a–d). Todos los miembros de la familia de proteínas Cas13 contienen dos dominios HEPN de unión a nucleótidos encontrados en procariotas y eucariotas. Cuya función es cortar el ARN mediado por ambos dominios [57]. Sin embargo, a diferencia del Cas13a, Cas13c y Cas13d, el Cas13b posee los dominios HEPN ubicados en los extremos N y C terminal de la proteína lineal, lo que sugiere que puede adoptar una conformación tridimensional única. Y la repetición directa del crARN en Cas13b se encuentra en el extremo 3', que es la orientación opuesta a la que se

encuentra en otros sistemas de Cas del tipo VI [51, 56]. En la figura 9A se muestra la estructura cristalográfica del Cas13 tomando en cuenta el modelo bacteriano *Listeria seeligeri* serovar cepa SLCC3954 (PDB: 6vrC). Y en la figura 9B se observan las arquitecturas que conforman a la proteína Cas13. Destacando que la secuencia proteínica se ha encontrado en pocas especies como: *Leptotrichia buccalis* ATCC 14201, *Leptotrichia shahii* DSM 19757, *Herbinix hemicellulosilytica*, *Lachnospiraceae bacterium* NK4A179, *Paludibacter propionicigenes* DSM 17365 y *Listeria seeligeri* ATCC 35967 [29, 45, 58].

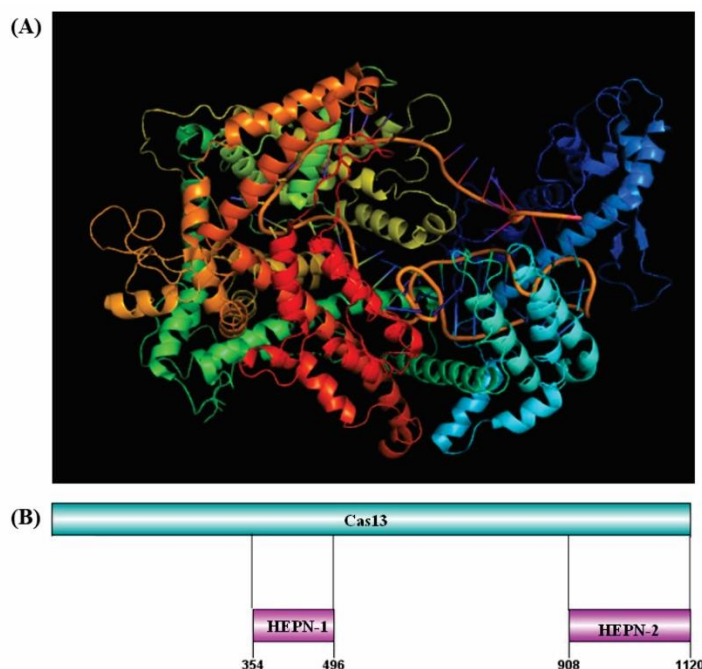


Figura 9. Estructura cristalina de la enzima cristalina del Cas13 (9A) y la replantación de los dominios de la nucleasa Cas13 (9B). Las imágenes fueron elaboradas en el presente estudio, fueron reproducidas en Pymol 2.4 y DOG 2.0. la estructura cristalina de la proteína Cas13 fue obtenida de PDB (PDB: 6vrC) y los dominios de Pfam [45, 58- 60].

Cas14

Es una familia de nucleasas guiadas por ARN excepcionalmente compactas, recientemente se identificó en arqueas extremófilas. A pesar de su pequeño tamaño, las proteínas Cas14 son capaces de cortar el ssADN [61]. Como dato interesante se han identificado 24 variantes del gen *cas14* agrupados en tres subgrupos (Cas14a-c). En general, las proteínas Cas14 tienen alrededor de 400-700 aminoácidos (aa), son aproximadamente la mitad del tamaño de las nucleasas guiadas por el dsARN de la clase 2 cuyo tamaño es de 950-1400 aa. En la figura

10 se observa el mecanismo de corte y estructura de Cas14a [21]. Observando que la nucleasa posee actividades bioquímicas únicas, encontrando que Cas14 es muy restrictiva en cuanto a la unión con el ADN del PAM. Por lo tanto, la unión al locus de ADN requiere la complementariedad entre el ARN guía y la diana de ADN, en una ubicación en la que puede interactuar con los elementos de unión al PAM de la proteína Cas. Un dato interesante es que Cas14 corta solamente ssADN y no puede cortar dsADN o ssARN [48].

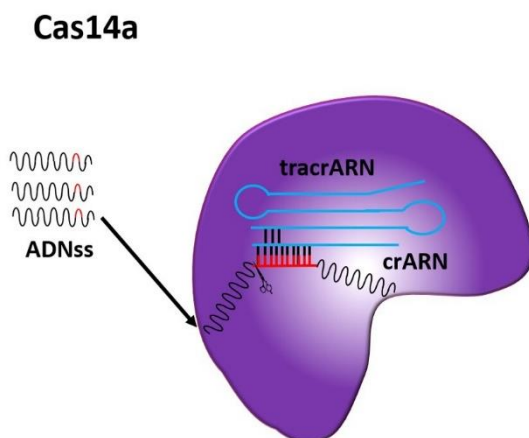


Figura 10. Representación del mecanismo de corte de la nucleasa Cas14. Figura basada en [34].

Asimismo, se ha descubierto que las proteínas Cas14 identificadas exhiben una diversidad de secuencia. También poseen un dominio de nucleasa RuvC, cuya organización es característica del sistema CRISPR-Cas de tipo V. A la fecha, no existe una estructura cristalina de la proteína Cas14, pero se han descrito a

detalle en bacterias no cultivables [62]. En la figura 11, se observan las arquitecturas representativas de la nucleasa Cas14. Encontrando mediante análisis bioinformático que existen 4 arquitecturas y dominios correspondientes a la familia Cas14 con las siguientes características: (i) existen alrededor

de 726 secuencias con la arquitectura RISPR_Cse2 que indica está asociada a la familia de proteínas Cse2 en *Pseudomonas* sp. BAY1663 (W9T7E5_9PSED). (ii) la nucleasa Cas14b presenta 9 secuencias con la arquitectura CRISPR_Cse1, CRISPR_Cse2 como ejemplo; la bacteria *Actinoalloteichus hoggarensis* (A0A221W9Y6_9PSEU). (iii) la nucleasa Cas14c, se caracteriza porque existen 8 tipos con arquitectura CRISPR_Cse2x2 como ejemplo; *Streptomyces* sp. GP55

(A0A2N3UXG3_9ACTN). (iv) las nucleasas Cas14I-E, se caracterizan porque posee un CRISPR asociado a CasB/Cse2 y (v) la nucleasa Cas14d se caracteriza porque solo existe una secuencia y arquitectura del tipo CRISPR_Cse2 como ejemplo; la bacteria *Peptoniphilus* sp. taxon 375 str. F0436 (F9MXH1_9FIRM), que posee un CRISPR asociado a las proteínas Cas7/Cse4/CasC [29, 44, 63].

Cas14

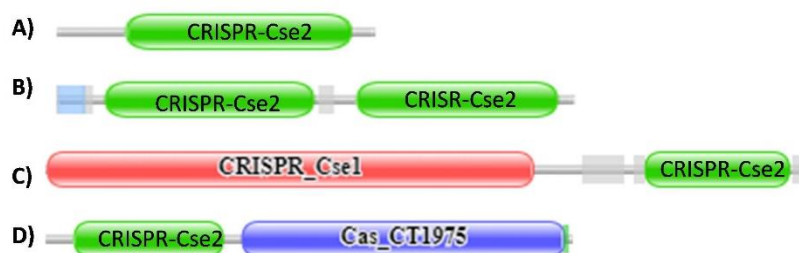


Figura 11. Comparación de las 4 arquitecturas representativas de la proteína Cas14. Imagen reproducida y obtenida de Pfam 2020 [44].

Para conocer un poco más de la proteína Cas14 del tipo V se han reportado datos metagenómicos los cuales han revelado una gran diversidad de secuencia de Cas14, encontrando que las proteínas Cas14a-c incluyen un dominio RuvC adyacente a los genes cas asociados a CRISPR. También, se

encontraron 20 sistemas adicionales de este tipo en varias bacterias no cultivables agrupadas en cinco principales familias (Cas14d-h), observando que los genes son similares al *cas14* formando clados separados en el análisis de filogenia del cas tipo V. Por otro lado, se han identificado 38 sistemas CRISPR-Cas14

pertenecientes a ocho familias (Cas14a–h) y otro sistema adicional conocido como Cas14u [62, 63]. Lo que sugiere que estas familias evolucionaron a partir de TnpB, una proteína asociada a una transposasa que es considerada el ancestro evolutivo de los efectores CRISPR del tipo V. En la figura 12 se muestra un análisis filogenético de los ancestros en común de la proteína Cas14, el cual fue elaborado en este trabajo utilizando secuencias disponibles en NCBI revisadas en 2020 [64]. Para ello, se realizó un alineamiento de las secuencias mediante Clustal W para posteriormente calcular las distancias evolutivas utilizando el método de corrección de Poisson y generar un

árbol filogenético [65].

En el análisis se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias y hubo un total de 517 posiciones en el conjunto de datos, finalmente los análisis de evolución se elaboraron en MEGA X [66]. Demostrando como resultado que hay un ancestro en común de la enzima Cas14 (secuencia de referencia), la cual tiene un parecido del 84% con otras secuencias correspondientes a la transposasa encontrada en arqueas, similar a lo que reportan Harrington y cols., 2018 [62].

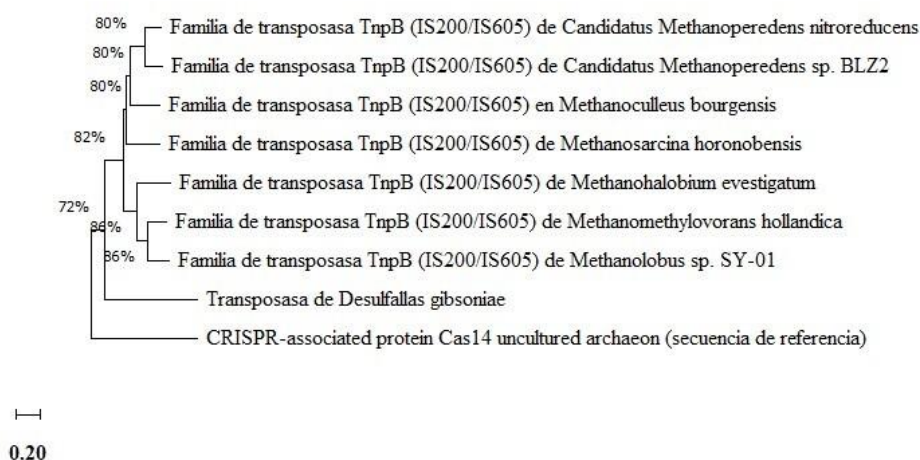


Figura 12. Árbol filogenético basado en la proteína CRISPR-Cas-14, cuyas secuencias fueron obtenidas de archaeas de la base de datos de NCBI revisado en 2020 tomando como secuencia de referencia el número de acceso correspondiente a QBM02559 [64]. El árbol filogenético fue basado en un estudio Neighbor joining [67], que comparó las secuencias TnpB, un ancestro de la proteína Cas14. La información del árbol filogenético fue obtenida en el presente estudio, con la finalidad de comprender y plasmar la información obtenida de [62].

Se sabe que el papel biológico de Cas14 es dirigirse específicamente al ssADN, sugiriendo una función en la defensa contra los virus de ssADN que se propagan por medio de intermediarios del ssADN. Este hallazgo indica que las proteínas Cas pueden llevar a cabo un corte de ADN incluso en organismos no cultivados conduciendo a la creación de valiosas tecnologías basadas en CRISPR-Cas14 y su aprovechamiento para maximizar su utilidad biotecnológica [62, 63].

Las características principales del Cas14 son que posee una actividad nucleasa dirigida al ADN monocatenario (ss), es dos veces más pequeño que Cas9 y puede conferir defensa contra virus [61]. Además, al combinar la actividad de corte de la ssADNsa de Cas14 con el método de amplificación isotérmica (DETECTR-Cas14), se puede explotar de manera prometedora para la genotipificación del polimorfismo de un solo nucleótido de ADN de alta fidelidad, y para la detección de virus de importancia clínica, ecológica y económica que infectan a los seres humanos. Por lo tanto, el sistema CRISPR-Cas14 podría adquirir una expansión de manera exponencial en el campo del diagnóstico de enfermedades infecciosas y no infecciosas [61, 62].

Aplicaciones del CRISPR-Cas

La tecnología CRISPR/Cas se ha utilizado

ampliamente como una herramienta programable para la edición de genes desde 2013, se sabe que la actividad de corte de las nucleasas en algunos casos es promiscua, lo cual fue descubierto recientemente, y se aprovechó este conocimiento para la detección de ácidos nucleicos mediante experimentación *in vitro* [2].

El CRISPR-Cas es una poderosa herramienta de edición de genes que ha dado lugar a resultados terapéuticos revolucionarios en ensayos clínicos en los últimos años. Más allá de su capacidad de actuar como “tijeras moleculares”, el CRISPR y sus proteínas asociadas (Cas) poseen propiedades que pueden ser aprovechadas para detectar ácidos nucleicos específicos en una muestra de pacientes enfermos [10].

A continuación, se describen algunos biosensores basados en los sistemas Cas3, Cas9, Cas12, Cas13 y Cas14, cuya finalidad es detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2. Y también se describen sus ventajas y desventajas como metodología de diagnóstico viral.

Detección del SARS-CoV-2

Se reportan estudios enfocados en el diagnóstico de enfermedades que combinan la RT-LAMP y el sistema CRISPR-Cas, para la detección de personas enfermas con el COVID-

19. Los cuales poseen una sensibilidad cercana a una sola copia de amplificado de los componentes moleculares del SARS-CoV-2. También otros estudios han comparado los rendimientos del diagnóstico de varias plataformas tecnológicas como; CONAN CAMERA, CRISPR/Cas12a-NEER, iSCAN, SARS-CoV-2, STOP-COVID, SHERLOCK, CRISPR-COVID entre otras. Por ello, la detección molecular del SARS-CoV-2 aparece como una opción de diagnóstico para este nuevo virus emergente causante de la enfermedad del COVID-19 [2, 68].

Biosensores basados en Cas3 usados en la detección del SARS-CoV-2

Método CONAN

La tecnología se basa en el corte de ADN monocatenario, por medio del Cas3, que ha destacado por su potencial como un método rápido que lleva alrededor de 40 min en diagnosticar la presencia del SARS-CoV-2, es de bajo costo, de gran sensibilidad, específico, y no necesita de instrumentos caros para la detección del virus. Este ensayo es comparable con Cas12 y los ensayos basados en RT-qPCR [69].

Estos hallazgos han ayudado a comprender el uso de pruebas de diagnósticos BPC en pacientes de los que se sospecha están infectados con el SARS-CoV-2 [69]. En

general el método CONAN consiste en extraer el ARN de pacientes infectados por SARS-CoV-2. La técnica se basa en la RT-LAMP, para lo cual se han diseñado los cebadores que involucran 2 tipos de reacciones de amplificación de templados a partir de la estructura de asas formada en el extremo terminal 3'. Para lograr la amplificación se usan 6 cebadores (2 externos y 4 internos), los cuales reconocen regiones de interés de la secuencia del SARS-CoV-2 de acuerdo con un criterio de identificación de genes (por lo regular la proteína S, M y N). Con la finalidad de amplificar varios genes por medio de una sola reacción [69, 70]. Posteriormente, se lleva a cabo una RT-LAMP que consiste en una RT-PCR colorimétrica que amplifica la muestra de ARN para convertirlo en ADN complementario en un tiempo de 30 min a 62 °C. Después se coloca en un tubo una reacción de 10 min a 37 °C con la enzima Cas3 y ssADN marcado con un fluoróforo que después es cortado por la nucleasa, liberando el ADN y la señal marcada con un fluoróforo. Finalmente, se lleva a cabo el revelado de la muestra por medio de la metodología de flujo lateral o LFA, cuyo resultado cuantifica el número de copias de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 en un tiempo de 2 min [69]. En la figura 13 se observa la metodología CONAN para la detección del SARS-CoV-2.

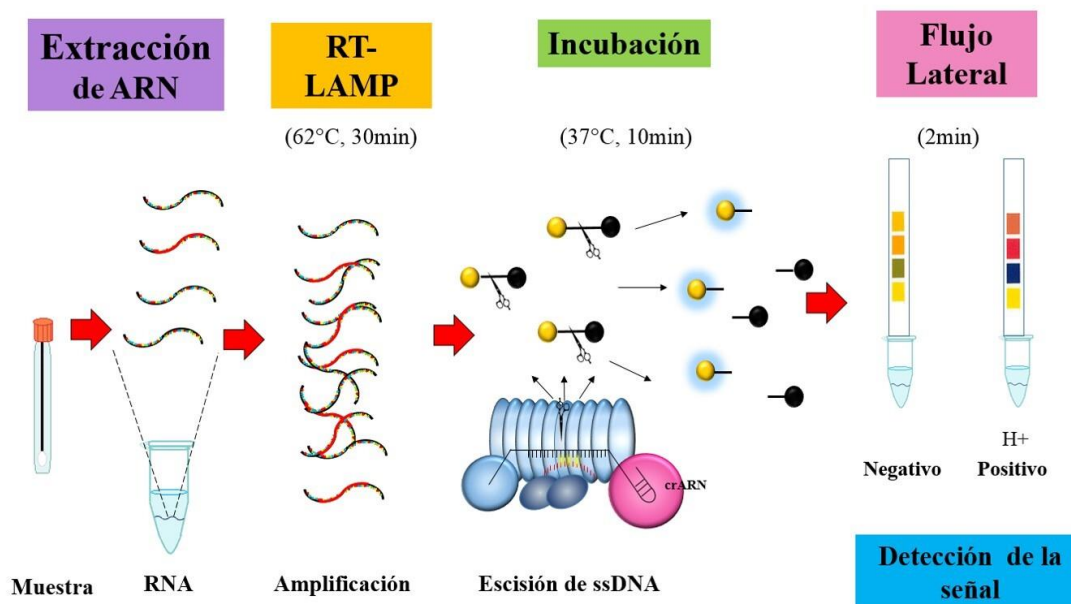


Figura 13. Metodología del biosensor CRISPR-Cas3 (CONAN) para la detección molecular del SARS-CoV-2 en pacientes enfermos. Figura modificada de [69].

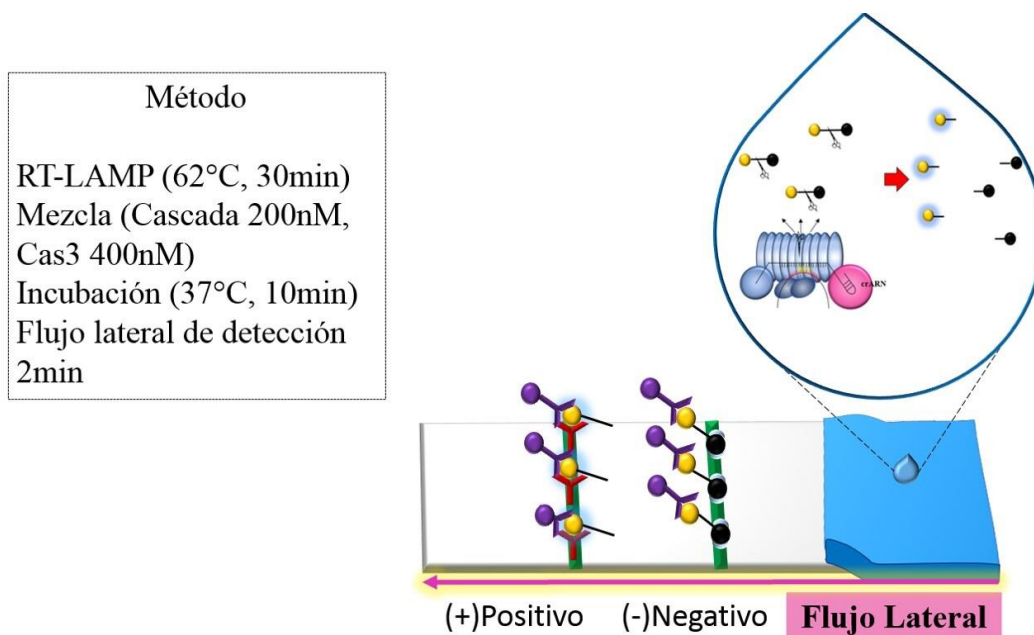


Figura 14. Revelado del biosensor CONAN basado en Cas3 diseñado para detectar el SARS-CoV-2 en pacientes enfermos. Imagen modificada de [69].

Para el revelado de la prueba se utiliza el reportero de ssADN marcado con un fluoróforo (F). Observando que, cuando Cas3 no presenta actividad nucleasa acumula nanopartículas de oro y anticuerpos anti-FITC que se observan conjugados en la primera línea (control negativo) de la tira de papel de flujo lateral. Mientras que, el reportero hidrolizado muestra una señal positiva al contacto con los componentes moleculares del SARS-CoV-2 en la segunda línea (muestra positiva) en un tiempo <2 min [69]. En la figura 14 se representa la forma de leer los resultados en tira de papel del biosensor CONAN.

Biosensores basados en Cas9 usados en la detección del SARS-CoV-2

Método CAMERA

Es considerada una metodología basada en el CRISPR-Cas9 que ha ayudado a los investigadores a realizar un seguimiento de ciertos eventos celulares, así como los cambios en la expresión génica en función de la exposición a ciertas condiciones ambientales [51].

La metodología CRISPR-Cas9 consiste en transfectar células con un plásmido a manera de inducir la expresión de otras dos moléculas: la enzima Cas9 y el sgARN. Que pueden unirse en el núcleo celular para formar una

ribonucleoproteína. La endonucleasa Cas9 es una proteína capaz de producir una ruptura en el dsADN. Además, el sgARN es una especie de ARN guía sintético, que sirve para conducir a Cas9 a un gen blanco. De esta forma, es posible editar material genético en el lugar donde se provocó la ruptura del ADN. Esta metodología se basa en la transfección de ADN por medio de un plásmido que introduce una molécula de ADN cuya función es reparar ADN de doble cadena [71].

El mecanismo del biosensor es regular la expresión de la proteína Cas9, para que esta identifique el sgARN sintético del virus para generar una respuesta, registrarla y cuantificarla. Cuando la célula reingenierada censa los componentes moleculares del virus del SARS-CoV-2, para los cuales está diseñado, se produce un estímulo como respuesta a la formación de un complejo Cas9-sgARN cuantificando la señal obtenida [51].

Existen 2 variantes del método, la primera es conocida como CAMERA 1; se basa en emplear una mezcla de plásmidos de tipo salvaje y modificados utilizándolos para crear un sistema memoria génica *in vitro* con la finalidad de detectar componentes moleculares de virus como ARN. La propuesta se basa en utilizar plásmidos modificados que se diseñaron para contener una región diana afín al complejo Cas9-sgARN. De modo que se

produzca una señal cuantificable provocada por la presencia del virus. Posteriormente, el plásmido reingenierado se degrada y se reemplaza con un plásmido de tipo salvaje. Por lo tanto, la amplitud y duración del estímulo pueden observarse analizando la proporción de plásmidos modificados con respecto a los de tipo salvaje [51].

Esta metodología se ha implementado en bacterias, observando que el par de plásmidos evaluados pueden mantenerse estables durante 144 horas y en una proporción de 10^{17} . Observando que, la proporción de los plásmidos puede cambiar. Por lo que, en general la metodología CAMERA 1 permite el registro de la amplitud de la señal en una escala de tiempo, registrando la duración de la intensidad de la señal cuantificando los plásmidos en presencia y ausencia del virus [51].

Por otro lado, la segunda variante “CAMERA 2”, se basa en la edición del genoma de la célula, asociando diferentes estímulos, lo que permite la grabación de varias señales en la misma célula. La amplitud y duración de la señal pueden evaluarse cuantificando la proporción de ADN, observando cambios de nucleótidos en la secuencia del plásmido al detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2 al secuenciar de 10 a 100 células, registrando el orden de los eventos utilizando

un diseño de ARN guía, destacando que es una técnica robusta y se puede particularizar a un estudio de células humanas simulando una infección por virus el cual puede ser detectado por CAMERA [51].

El mecanismo del método CAMERA 1 y 2 es muy parecido se basa en detectar patógenos (como virus) por medio del complejo Cas9-ARN. Debido a que el sgARN dirige a la Cas9 hacia su blanco molecular con mucha precisión. El sistema ha sido reingenierizado mediante la construcción de plásmidos, que regulan al *cas9* al agregar tetraciclina. Por otro lado, la expresión del ARN sintético es regulado por el promotor *lacO*, que activa la transcripción del sgARN al agregar IPTG. Finalmente, el plásmido reingenierado de escritura genera memoria para que la Cas9 corte la secuencia indicada para eliminar material genético proveniente de patógenos [51].

Otra metodología emergente es un ensayo de detección conocido como FnCas9 o FELUDA, cuya función es detectar secuencias de nucleótidos de los componentes moleculares del SARS-CoV-2, en un tiempo de 1h mediante la amplificación del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Permitiendo distinguir claramente entre las secuencias de 2 cepas del coronavirus (SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1). El resultado de la prueba de PCR puede revelarse mediante un ensayo de flujo lateral en una tira

de papel para distinguir muestras positivas de pacientes infectados con SARS-CoV-2. El método se ha probado en muestras suero de 110 personas resultando efectivo en la detección de los componentes moleculares del virus [72, 73].

Método FnCas9

Otra metodología emergente es un ensayo de detección conocido como FnCas9 o FELUDA, cuya función es detectar secuencias de nucleótidos de los componentes moleculares del SARS-CoV-2, en un tiempo de 1 h, mediante la amplificación del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Permitiendo distinguir claramente entre las secuencias de 2 cepas del coronavirus (SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1). El resultado de la prueba de PCR puede revelarse mediante un ensayo de flujo lateral en una tira de papel para distinguir muestras positivas de pacientes infectados con SARS-CoV-2. El método se ha probado en muestras suero de 110 personas resultando efectivo en la detección de los componentes moleculares del virus [72, 73].

Biosensores basados en Cas12 usados en la detección del SARS-CoV-2

El biosensor posee un gran potencial para la detección de ácidos nucleicos debido a su capacidad de cortar indiscriminadamente el

ssADN una vez unido al ADN diana. Sin embargo, los sistemas CRISPR/Cas12 actuales se limitan a detectar ADN en un límite de detección picomolar [74]. También, es considerada una metodología emergente de diagnóstico clínico rápido, cuantitativo, preciso y sensible para el pronóstico de la enfermedad del COVID-19 [75]. Por medio de la obtención de muestras de las vías respiratorias superiores (hisopados nasofaríngeos, hisopados orofaríngeos (garganta), hisopados nasales de lavado, aspirado nasofaríngeo y aspirado nasal de individuos pacientes sospechosos e infectados por el SARS-CoV-2 [75].

Muy recientemente se demostró que la nucleasa Cas12 es útil como una herramienta de diagnóstico *in vitro* [2]. Otro ensayo basado en la formación del complejo CRISPR-Cas12a/gARN y una sonda fluorescente se reportó y detectó amplificados del virus del SARS-CoV-2, de manera sensible en tiempo real, permitiendo diagnosticar la enfermedad del COVID-19. También, se ha demostrado que la detección de las muestras se lleva a cabo en un tiempo de detección de aproximadamente 50 min y un límite de detección de 2 copias de amplificado por muestra. Los resultados validados y comparables mediante con ensayos de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) y fueron aprobados por laboratorios certificados [7].

CRISPR/Cas12a-NER

El ensayo está basado en CRISPR/Cas12a y se utiliza como un método de diagnóstico del COVID-19. El mecanismo se basa en utilizar la nucleasa Cas12a, el ARN CRISPR (crARN), ambos dirigidos al amplificado basado en los compuestos moleculares del SARS-CoV-2 y un reportero de ssADN marcado con la proteína verde fluorescente y un quencher (Q) no fluorescente (supresor de la fluorescencia). Que es hidrolizado por Cas12a en contacto con el

ácido nucleico del SARS-CoV-2, observando a simple vista la fluorescencia resultante a 485 nm en ausencia del Q. El ensayo puede detectar 10 copias del amplificado de los genes del virus en 45 min sin utilizar instrumentos de medición y es comparable con el ensayo RT-qPCR. Encontrando que es un método simple, confiable y adecuado para el diagnóstico *in situ* del virus en personas enfermas, que es aplicable en hospitales y en comunidades aisladas (Figura 15) [64].

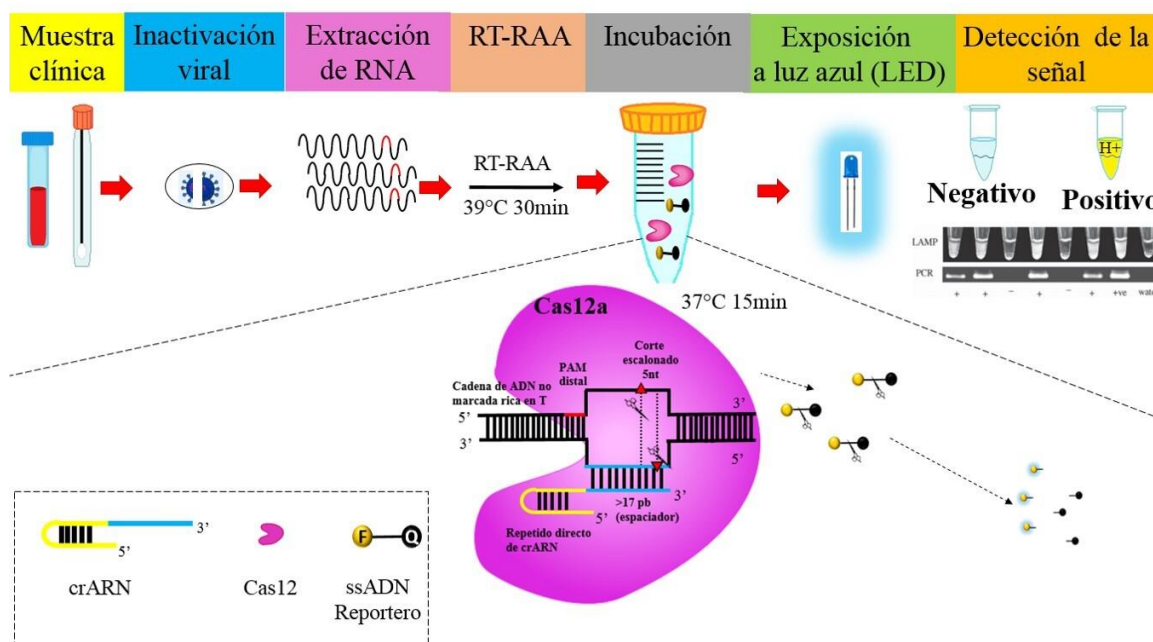


Figura 15. Metodología CRISPR/Cas12a-NER utilizada en la detección del SARS-CoV-2 en pacientes enfermos. Figura basada en [64].

iSCAN SARS-CoV-2

Es un ensayo *in vitro* específico basado en los sistemas CRISPR-Cas12 y CRISPR-Cas13, que poseen actividad contra ssADN y ARN, respectivamente. El ensayo es ampliamente

utilizado para la detección de virus, de manera eficiente, fácil, sensible, rápido, cuantificable y específico. La metodología se basa en combinar la RT-LAMP con la capacidad de detección específica del sistema CRISPR-Cas12 en

menos de 1 h y requiere de equipo sencillo. El biosensor es fácil de usar, ya que utiliza una reacción colorimétrica inmunocromatográfica de flujo lateral que hace que los resultados del ensayo sean fáciles de evaluar y aplicables a gran escala. Igualmente, busca cumplir con las características de un biosensor BPC, con la finalidad de disminuir los casos de infección, mediante la detección temprana de portadores del virus. Finalmente, la metodología ha sido validada utilizando ARN obtenido de muestras de pacientes COVID-19 positivos, lo que permite aislarlos y ponerlos en cuarentena de manera efectiva, lo que limita la propagación del virus y por lo tanto ayuda a controlar la enfermedad del COVID-19 [76].

La metodología DETECTR

El biosensor utiliza a la nucleasa Cas12 que es una ADNsa guiada por ARN que corta indiscriminadamente ssADN al unirse a una secuencia diana. Esta característica ha sido utilizada por el método denominado "DETECTR", que utiliza la activación de la nucleasa Cas12a en combinación con la amplificación isotérmica para lograr una gran cantidad de ADN sensible y específico de detección. Esta técnica se ha probado por diferentes grupos de trabajo para detectar ARN del SARS-CoV-2. El mecanismo de esta tecnología se basa en que la proteína Cas12

detecta los componentes moleculares del virus como los genes: E, N y RdRp, a partir de una extracción de ARN convencional, el cual es convertido en ADN y amplificado isotérmicamente. Posteriormente, la enzima Cas12 interactúa con el amplificado y corta un reportero de ssADN para desprender un fluoróforo, cuya señal se visualiza y cuantifica mediante un lector fluorescente o una tira de flujo lateral y necesita de poco equipo para ejecutar el protocolo para detectar los componentes moleculares del virus en muestras de pacientes enfermos. Además, de que no requiere de mucho tiempo para su elaboración, debido a que se han identificado alrededor de 10 copias de amplificado del virus en 1 hora y con alta sensibilidad [33]. En la figura 16, se representa el mecanismo de detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 del biosensor DETECTR.

Tecnología STOP-COVID

El biosensor se basa en la combinación de la amplificación isotérmica por RT-LAMP y la plataforma de detección de CRISPR conocida como SHERLOCK (S ESPECÍFICOS High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLocking, por sus siglas en inglés; reportero de desbloqueo enzimático de alta sensibilidad S-específicos, en español), catalogada como una metodología BPC. Esta prueba es sensible a la

detección del SARS-CoV-2, que es comparable con las pruebas de RT-qPCR, con un límite de detección de 100 copias de material genético amplificado. Que utiliza muestras de saliva de pacientes enfermos obtenidas por medio de hisopos nasofaríngeos. La prueba necesita de una lectura de flujo lateral, que devuelve el resultado en 70 minutos, y finalmente se lee la fluorescencia. La metodología ha sido validada en varios pacientes con COVID-19 diagnosticando correctamente a 12 pacientes

positivos y 5 negativos por medio de un estudio de 3 réplicas. El objetivo de la implementación del método STOPCovid es ayudar significativamente a los esfuerzos de monitoreo, rastreo y aislamiento de personas infectadas con el SARS-CoV-2. Especialmente en entornos de bajos recursos, evitando peligros para la seguridad de la salud pública a largo plazo y como consecuencia se facilite la reapertura efectiva de la sociedad y la economía [8, 77].

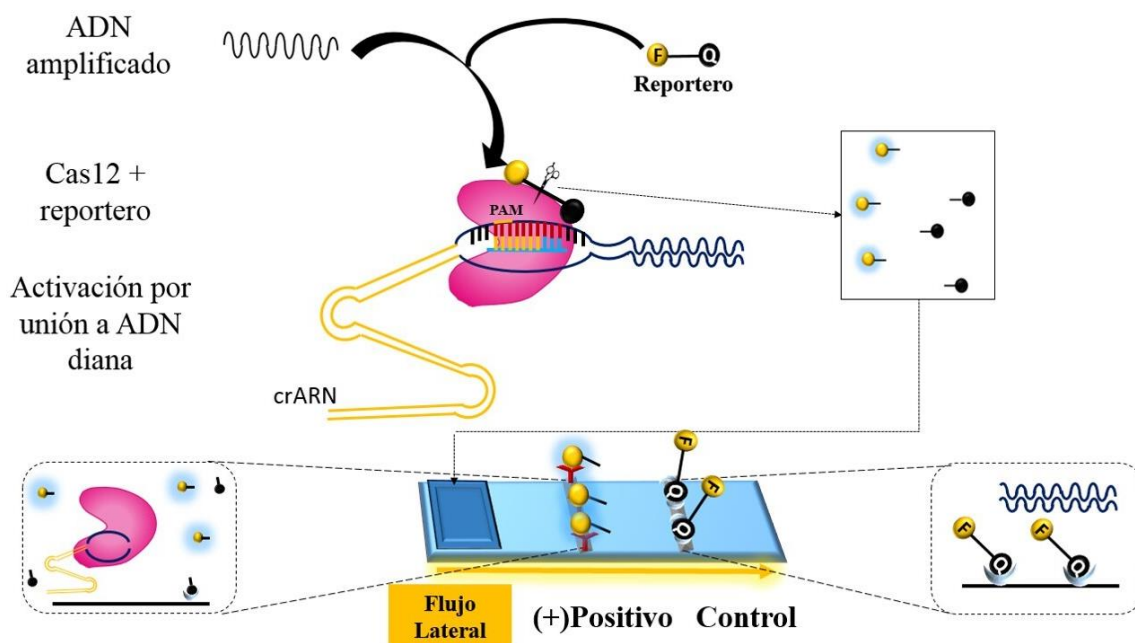


Figura 16. Mecanismo del método DETECTR utilizado para identificar el SARS-CoV-2 en muestras de pacientes enfermos. Figura basada en [33].

Otras metodologías basadas en Cas12

Se reportan metodologías similares a las anteriormente descritas como: (i) El sistema biosensor RT-LAMP/Cas12 cuyo efector es la nucleasa Cas12a, utiliza la RT-LAMP para la

amplificación de los componentes moleculares del SARS-CoV-2, con una sensibilidad de detección de hasta 20 copias, con alta especificidad y de rápida detección en un tiempo menor de 40 min a partir de una muestra

pretratada [30]. (ii) El sistema denominado “All-In-One Dual CRISPR-Cas12a o AIOD-CRISPR biosensor”, es un biosensor rápido, ultrasensible, específico y los resultados son detectados visualmente [78]. (iii) El sistema CASdetec, cuyo efector es la Cas12b, este método utiliza un método de amplificación asistida por recombinasa con transcripción inversa (RT-RAA), marcando las muestras con fluorescencia, y detectando con una sensibilidad de 1×10^4 copias/mL. Siendo considerado un método de alta especificidad, los resultados se leen a simple vista en aproximadamente 50 minutos a partir de una muestra pretratada. Y (iv) el sistema CRISPR-FDS, cuyo efector es la Cas12a, que utiliza un método de amplificación de RT-RPA con una sensibilidad de 5 copias de amplificado, que es detectado con alta especificidad y los resultados también se observan a simple vista en un tiempo menor de 1 h a partir de una muestra pretratada. Con estos hallazgos se demuestra que el sistema Cas12 es uno de los más utilizados e investigados en el campo de los biosensores para detectar el SARS-CoV-2, debido a la amplia gama de biosensores reportados [77].

Biosensores basados en Cas13 para la detección del SARS-CoV-2

Tecnología SHERLOCK

La plataforma, es conocida como un reportero

enzimático específico de alta sensibilidad (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, por sus siglas en inglés; reportero de desbloqueo enzimático específico de alta sensibilidad, en español). Es una herramienta portátil y ultrasensible basada en la plataforma CRISPR-Cas13 [30, 33]. La metodología combina la amplificación de ácidos nucleicos por medio de la enzimología CRISPR-Cas para el reconocimiento específico de secuencias de ADN o ARN blanco [79]. El amplificado proveniente de muestras de pacientes contaminados con SARS-CoV-2 activa a la enzima Cas13, que a su vez hidroliza el ARN reportero, liberando moléculas de fluorescencia para posteriormente cuantificar el producto [5, 30, 33].

La ventaja del método es que detecta el ARN del SARS-CoV-2 en un rango entre 10 y 100 copias por μL de reacción. Y para su uso solo se necesita de una lámina de flujo lateral para la cuantificación y visualización del resultado de la detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2. La prueba se puede completar en 57 minutos después del paso de la extracción de ARN y posterior amplificación en base a los genes blanco para los cuales fueron diseñados los cebadores como ejemplo los genes S y el Orf1ab [5, 33, 77].

Por otro lado, otros investigadores han mejorado el método SHERLOCK

(denominándolo "CRISPR-nCoV"), demostrado un 100% de sensibilidad en 52 muestras de pacientes [20]. Sin embargo, estos enfoques son más complejos que los basados en otras pruebas de detección que dependen de un paso de extracción de ARN y múltiples pasos de manipulación de líquidos que aumentan el riesgo de contaminación cruzada de las muestras [5]. En la figura 17, se observa la metodología de detección del biosensor SHERLOCK/CRISPR-nCoV.

Una variación del biosensor conocida como SHINE, es un híbrido de los métodos SHERLOCK y HUDSON. Es considerada una herramienta de diagnóstico sensible y específica que en un solo paso puede detectar

ARN del SARS-CoV-2 a partir de pacientes enfermos. Los resultados del biosensor se pueden visualizar con la lectura de la fluorescencia, lo cual reduce el riesgo de contaminación ya que los tubos de reacción de amplificación permanecen sellados. Y los resultados se pueden interpretar visiblemente por medio de tiras de papel mediante una aplicación de teléfono inteligente [80].

La metodología ha sido validada en 50 muestras de pacientes de origen nasofaríngeo demostrando una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% en comparación con la RT-PCR con un tiempo de respuesta de 50 minutos [80].

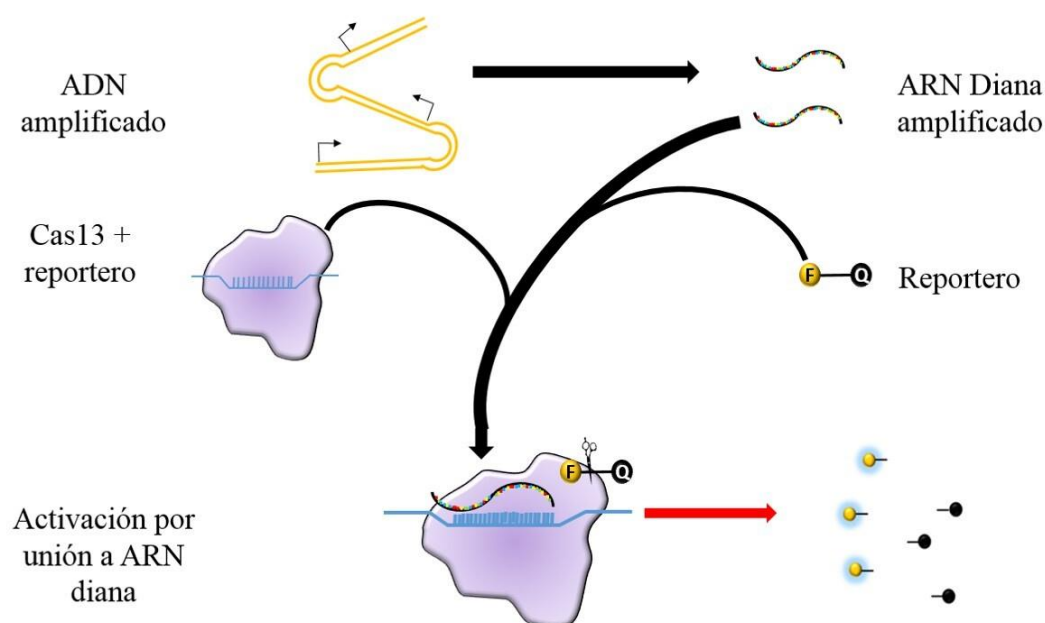


Figura 17. Metodología del biosensor SHERLOCK/CRISPR-nCoV para la detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2. Imagen modificada de [5].

Otra aplicación de la tecnología SHERLOCK es la identificación de anticuerpos y antivirales por medio de radiomarcado de moléculas. Lo cual es de importancia en la actual pandemia porque permite encontrar nuevos hallazgos que son útiles para mitigar la enfermedad del COVID-19 [26].

CRISPR-COVID

Este método permite detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2 basándose en la nucleasa Cas13a, es un ensayo que incluye amplificación isotérmica. También, esta metodología ha sido comparada con la secuenciación, la metagenómica y los resultados de RT-PCR. Encontrando que, el método es rápido, sensible y requiere de poca instrumentación en comparación con secuenciación y metagenómica [2].

A su vez, se ha reportado que la empresa “Mammoth Biosciences” creó una tecnología BPC con la intención de detectar el SARS-CoV-2. Basándose en el CRISPR-Cas13, detectando los genes E y N del virus, con un límite de detección de 70–300 copias/ μ L de amplificado y con un tiempo de respuesta aproximado de 30 min. Los resultados pueden ser visualizados en tira de papel por metodología de flujo lateral [10].

También, la empresa “Sherlock Biosciences”

reportó otra variante del biosensor tipo BPC, basada en el ensayo de flujo lateral CRISPR-Cas13, para detectar los genes S y el Orf1ab, con un límite de detección de 10–100 copias/ μ L de amplificado, con un tiempo de respuesta aproximado de 60 min. Este ensayo ha sido autorizado por la FDA como respuesta a la actual pandemia [10]. Otros sistemas biosensores basados en CRISPR-Cas13 se han reportado con una combinación de tres componentes: 1) la amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP) para detectar la presencia de un gen correspondiente al SARS-CoV-2; 2) un dispositivo Arduino portátil que funciona con baterías que calientan la muestra para permitir la amplificación del ADN y 3) la visualización a simple vista de los resultados [81].

Otros estudios, reportan el uso de un lector de fluorescencia de bajo costo para la detección de ácidos nucleicos por medio de Cas13a mediante la transcripción *in vitro*. El sistema lector se caracteriza porque es un detector de bolsillo que cuesta menos de 15 dólares que es fácil de fabricar y puede operar en entornos de bajos recursos. Está construido a partir de componentes electrónicos estándar, incluido un LED, una resistencia dependiente de la luz, láminas de filtro y piezas impresas en 3D. El biosensor alcanza un límite inferior de detección aproximado a 6.8 nM de fluoresceína,

que es suficiente para seguir las reacciones bioquímicas. A todos los ensayos se les da un seguimiento en papel de filtro, considerada una arquitectura de detección plana que ha sido creada para mejorar la recolección de señales. También, este método ha sido validado cuantificando la transcripción de ARN *in vitro* y detectando secuencias de ARN diana por medio de un ensayo de fluorescencia basado en Cas13a [82]. A su vez, el diseño del biosensor presenta dos subunidades; una unidad de detección y un cartucho de ensayo. El cartucho de ensayo empareda una tira de papel de fibra de vidrio que contiene la mezcla de reacción del sensor entre un juego de láminas de filtro de color. Después del montaje, el cartucho se inserta en la unidad de detección, que proporciona luz azul como fuente de excitación y una fotorresistencia LDR se encarga de censar luz. Las mediciones se realizan mediante un microcontrolador conocido como “Arduino Nano” por medio de un circuito electrónico simple operado desde una computadora portátil o tableta por medio del uso de un puerto USB que proporciona 5 V y <1 W de potencia [82].

Metodología basada en Cas14 para la detección del SARS-CoV-2

Entre los sistemas biosensores Cas14a se encuentra una metodología parecida al

biosensor DETECTR, basado en la detección de ssADN denominado Cas14a-DETECTR. Que permite la detección de polimorfismos de un solo nucleótido de ADN de alta fidelidad sin restricción en la detección del PAM. Inspirándose en este estudio, varios investigadores han propuesto detectar personas infectadas por ciertos virus de ADN por medio del biosensor. En la figura 18, se puede observar la metodología empleada por el biosensor, la cual amplifica ssADN por medio de 3 técnicas (PCR, RT-PCR y RT-LAMP) y los resultados pueden ser leídos visualmente en una tira de papel [30, 33, 77].

De igual modo, se ha combinado la inteligencia artificial con las pruebas de diagnóstico CRISPR-Cas, para construir un sistema de alarma de diagnóstico de patógenos (como los virus) que sea rápido, preciso, portátil y fácil de usar (Figura 19). También, se reportan los biosensores BPC que se han probado en individuos pertenecientes a comunidades, hospitales y centros de salud para detectar los patógenos infecciosos específicos de forma rápida y precisa. La lectura de los resultados puede ser detectada por un teléfono móvil por medio de una aplicación, y los datos resultantes se pueden subir a una nube para su almacenamiento y procesamiento por medio de servicio 5G [30, 83].

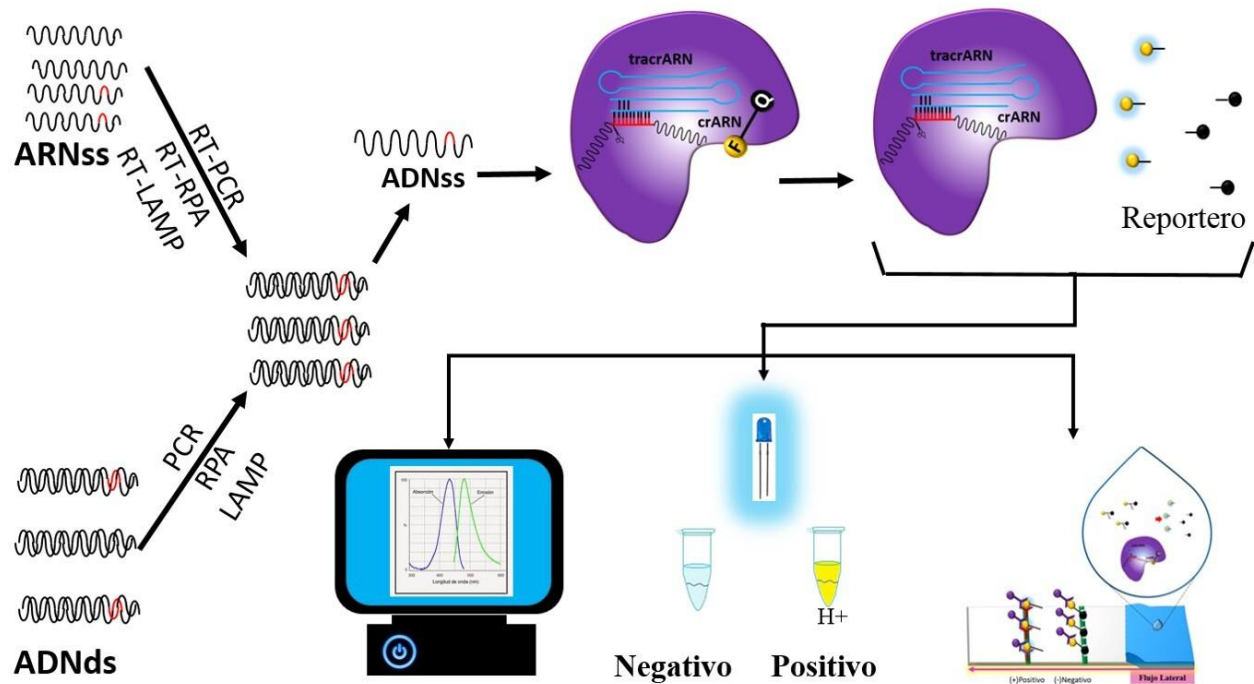


Figura 18. Diagnóstico de patógenos mediante la detección de ácidos nucleicos mediante un corte in trans por medio del sistema activo CRISPR-Cas14a. Imagen modificada de [30].

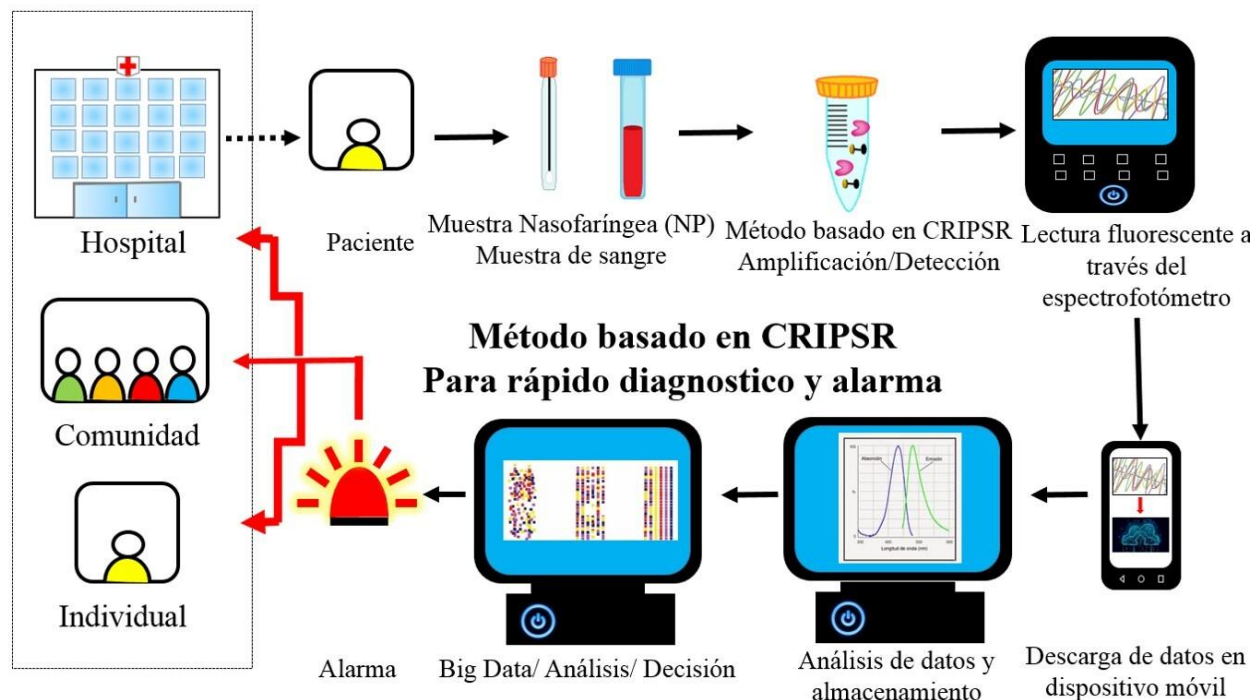


Figura 19. Diagnóstico de patógenos y alarma que utiliza un sistema de detección CRISPR-Cas. Imagen modificada de [30, 83].

Por otro lado, en la era del Big Data, actualmente se reportan sistemas más refinados para la interpretación y alerta temprana de este tipo de resultados para hacer estadística e informar sobre el estado de salud a gran escala [30, 83]. Por lo que, es posible actualizar datos de diagnóstico de patógenos y hacer sugerencias para contrarrestar enfermedades relacionadas con pandemias. También, el sistema puede alertar tempranamente sobre la cercanía de casos de personas infectadas por el virus para prevenir el riesgo de la propagación del COVID-19 [30, 83].

En la tabla 1, se comparan todos los métodos CRISPR-Cas utilizados para detectar el SARS-CoV-2.

Las metodologías CRISPR-Cas fueron comparadas con los métodos de detección PCR, RT-qPCR, RT-LAMP encontrando las características principales de cada uno de los métodos, destacando que CRISPR-Cas es una técnica de identificación de patógenos que es comparable con la RT-qPCR (estándar de oro para la identificación del SARS-CoV-2) y además, es una metodología rápida, sensible, específica y portable en comparación con los métodos con que se compara [30, 84, 85].

Diagnóstico del COVID-19

Las metodologías de CRISPR-Cas han sido validadas en pacientes asintomáticos, enfermos

y re-infectados por el virus. La mayoría de los estudios son un compendio que describen la identificación del SARS-CoV-2 reportado por edad y género. Para lo cual, se han reportado algunos estudios que permiten conocer el tamaño de muestra diferente con la intención de confirmar las metodologías basadas en CRISPR-Cas comparándolas con la RT-PCR para validar la utilidad de las pruebas en el diagnóstico de la enfermedad del COVID-19 [12, 69, 78, 99- 112]. A continuación, se describen algunas metodologías CRISPR-Cas empleadas para diagnosticar infección por SARS-CoV-2 acompañadas de sus estudios epidemiológicos correspondientes.

Como tal se han encontrado varios estudios que emplean las metodologías CRISPR-Cas como ejemplo un estudio de 62 muestras de pacientes con posible infección por el SARS-CoV-2. Como resultado, se observó que 52 pacientes fueron analizados divididos en 13 muestras obtenidas de un muestreo nasofaríngeo y 39 muestras líquidas obtenidas de un lavado broncoalveolar los cuales fueron positivos a la prueba de detección del virus. Lo anterior, ayudo a diagnosticar la enfermedad del COVID-19 basándose en el criterio epidemiológico y clínico utilizando el método de detección CRISPR-Cas13 denominado CRISPR-COVID, el cual fue comparable con las pruebas de RT-qPCR. Los primers para

Tabla 1. Principales características de los métodos de detección del SARS-CoV-2.

Método de detección	Función/ Característica del método	Amplificación (si/no)	Método de detección o (fluorescencia/color etc.)	Rango de pacientes en los que se ha evaluado la metodología	Número de copias obtenidas	Costoso	Portable
PCR/RT-qPCR	Reconocimiento de fragmento de secuencia específica de los cebadores para N, E y RdRP	Si	Gel-UV/ELISA/Tiempo Real [86-89]	55326507	10^2 - 10^5	Si	No [94, 95]
RT-LAMP	Múltiples cebadores (4 o 6) que reconocen 6 regiones del ADN blanco	Si	Gel/Turbidímetro/Tiempo Real/ Colorimétrica [90, 91]	955	10^9 - 10^{10}	No	Si [91, 96]
Cas3	Reconocimiento del PAM como 5'-AAG	Si	Colorimétrica/Fluorescencia/Tiras reactivas [69, 92]	31	10^2	No	No hay datos mostrados [69, 92]
Cas9	Reconocimiento del PAM 5'NGG, y 5'TGGTG ó 5'NAG	Si	Colorimétrica/Fluorescencia [46-48]	No hay datos mostrados	No hay datos mostrados	No	No hay datos mostrados [46-48]
Cas12	Reconocimiento del PAM corto dependiente de T, como: 5'-YTN-3', 5'-TTN-3' o 5'-TTTN-3	Si	Gel-UV/Fluorescencia [30, 93]	73	500- 15000/uL	No	No hay datos mostrados [77, 93]
AIOD-CRISPR*	Utiliza 2 rARN, una sola temperatura y no se transfiere a tubo	Si	LED/ UV [78]	8	No hay datos mostrados	No	SI [78, 102]
Cas13	Corte lateral no específico	Si	RT-qPCR/Fluorescencia [30, 82]	581	10^6	No	No hay datos mostrados [82, 97, 98]
Cas14	Solo se une a ssADN	Si	Fluorescencia/colorimétrica [62, 63]	No hay datos mostrados	No hay datos mostrados	No	Si [30, 62, 63]

*(All-In-One Dual CRISPR-Cas12a).

detectar el SARS-CoV-2 fueron diseñados en base a los genes fueron el orf1ab, N y E, que fueron utilizados para validar y comparar las pruebas CRISP-Cas y RT-qPCR [12].

Como resultados, se reportó una alta sensibilidad y especificidad a los componentes moleculares del virus por el método CRISPR-COVID, encontrando que fue capaz de detectar un 90.4% de casos positivos de individuos infectados por SARS-CoV-2 con tiempos de detección parecidos a los de una RT-PCR (1.5 h), por ello es considerada como un método útil y rápido de detección del virus [99].

Por otro lado, se reporta el método CARMEN-Cas13 que ha sido aprobado por la FDA y se sabe que combina la metodología de microarreglos para diagnosticar la enfermedad del COVID-19 en 169 humanos portadores del virus usando muestras clínicas de plasma, saliva orina y fluido nasal [100].

El estudio de Azmi y cols., reportó el uso de una tecnología basada en Cas13a para la detección del SARS-CoV-2. La tecnología ha sido denominada CASSPIT (Cas13 Assisted Saliva-bases and Smarthphine integrated testing, por sus siglas en inglés; Pruebas de saliva asistidas por la integración de teléfonos inteligentes, en español) y se ha comparado con el método de detección SHERLOCK. Ambas metodologías han sido creadas con la intención de detectar pacientes portadores del SARS-CoV-2 a partir

de la obtención de muestras de saliva, con la finalidad de obtener ARN y detectar muestras positivas por medio de un ensayo de flujo lateral, basado en inspección visual en una tira de papel. La cual puede ser analizada en un teléfono inteligente con la intención de obtener resultados rápidos y detectando de 0-200 copias de ARN mediante ambos métodos semicuantitativos. Para validar los resultados, la metodología fue comparada por RT-qPCR encontrando en 102 muestras clínicas obtenidas de la saliva que 78 pacientes mostraron resultados positivos y 24 pacientes fueron negativos analizando los genes RpdR, N, S del SARS-CoV-2 [101]. Además, se reporta una metodología similar investigada por Fozouni y cols., que utiliza un biosensor basado en Cas13a que puede detectar ARN viral en muestras nasofaríngeas de pacientes detectando el gen de la proteína N. Encontrando 5 pacientes positivos con promedios de Ct de 14.37-22.13, identificando con un número de copias por μ L en un rango de 105 a 103. Cuyos resultados se pueden fotografiar y detectar por una aplicación en un teléfono inteligente y una lámpara de fluorescencia con un filtro de 488 nm [102].

Mientras que, Joung y cols., compararon la metodología SHERLOCK y STOP-COVID, validando ambas metodologías con 12 pacientes a partir de muestras nasofaríngeas de pacientes. Reportando que por la metodología

SHERLOCK se obtuvieron 11 pacientes positivos y 1 negativo. Mientras que, se reportaron 12 pacientes positivos por metodología STOP-COVID encontrando que la técnica es más sensible en la detección del virus [103].

También, otros estudios de validación de muestras de pacientes enfermos fueron evaluados por la metodología denominada RT-AIOD-CRISPR (all-In-One Dual CRISPR, por sus siglas en inglés; CRISPR doble todo en uno, en español), que utilizó un ensayo basado en la nucleasa Cas12. Detectando que, a partir de 28 muestras se obtuvieron resultados positivos al gen N del SARS-CoV-2. Observando que fueron reproducibles y que el virus fue fácilmente detectado a simple vista por la fluorescencia en tubos [78].

Por otro lado, se reportó la metodología DETECTER basada en Cas12, la cual fue comparada con RT-qPCR en 378 pacientes de 3 hospitales con una reproducibilidad de 95 % y alta sensibilidad en comparación con la RT-qPCR. Ambas metodologías reportaron el gen N y E del SARS-CoV-2, encontrando 19 pacientes positivos; observando que 5 pacientes presentaban altos valores de intensidad de fluorescencia (10000 a 13500 AU) 2 de 9000 AU, 4 aproximadas a 4000 AU y los 10 pacientes restantes mostraron una intensidad de fluorescencia menor a 1000 AU [104].

El método RADICA (Rapid Digital CRISPR Approach, por sus siglas en inglés; Enfoque rápido del CRISPR digital, por sus siglas en español) puede cuantificar los componentes moleculares del SARS-CoV-2 a partir de muestras humanas de heces fecales, nasofaríngeas, orina y sangre. Encontrando que, es una metodología más rápida que SHERLOCK y DETECTER (ambas validadas desde inicios de la pandemia), es una técnica de detección basada en la nucleasa Cas12a y está diseñada para la búsqueda del gen N del SARS-CoV-2 [105].

El método Iscan, está basado en Cas12 reportando estandarización en 5 pacientes (obteniendo 3 pacientes positivos y 2 negativos), detectando el gen N y E del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR. Posteriormente, se validó la metodología CRISP-Cas12 en 24 pacientes a partir de muestras nasofaríngeas obteniendo 21 pruebas positivas y 3 pruebas negativas. Detectando los resultados mediante fluorescencia en tubos y a la par se detectaron bandas a simple vista mediante tira de papel por flujo lateral [106].

También, se ha reportado un estudio escalable con una población de 26134 estudiantes y 5668 profesores. Encontrando que, algunos pacientes presentaron síntomas de COVID-19 como fiebre, tos y dificultad para respirar. El estudio muestreo 1808 pacientes asintomáticos por

medio del biosensor CREST basado en CRISPR-Cas13. Siendo el primer estudio reportado a gran escala en 2 periodos de tiempo, utilizando la prueba de RT-qPCR como un control de la prueba CRISPR con la intención de confirmar casos de personas infectadas por SARS-CoV-2. Encontrando como resultado que en el primer periodo se reportaron 732 personas en una prueba de mayo a junio y para el segundo periodo muestreado en el periodo de 28 de junio y 23 julio del 2020 se muestrearon 1076 personas, encontrando 8 casos positivos a partir de muestras nasofaríngeas obtenidas de los estudiantes con promedio de edad de 21.7 años monitoreando el gen N del SARS-CoV-2 [107].

Otro reporte abordó el método FELUDA basado en Cas9 a partir de muestras obtenidas de 49 pacientes en los que se detectó carga viral, mediante los valores de Ct por metodología RT-qPCR para comparar con la metodología Cas9, observando que ambas son metodologías con alta reproducibilidad al buscar el gen N del SARS-CoV-2 en personas infectadas. Evaluando en 473 individuos con una sensibilidad del 85.3% y especificidad del 96.7%, encontrando 8 resultados falsos negativos y 10 resultados falsos positivos con un rango de detección de 10^6 copias por μL de muestra [108].

El método CRISPR-FDS (CRISPR-based

fluorescent detection system, por sus siglas en inglés; Sistema de detección fluorescente basado en CRISPR, por sus siglas en español), está basado en la nucleasa Cas12a. Por este método se evaluaron muestras nasales de 29 pacientes, de los cuales 19 muestras fueron positivas al gen N del SARS-CoV-2. Los resultados fueron validados y comparados con RT-qPCR y RT-RPA (Recombinase polymerase amplification, por sus siglas en inglés; Amplificación mediante la polimerasa recombinante, en español), demostrando potencial para el diagnóstico del COVID-19 en pacientes enfermos y que esta metodología podría ser utilizado en clínicas pequeñas [109].

Otra metodología reportada es la basada en CRISPR-Cas3, que ha sido diseñada para detectar el gen N del SARS-CoV-2. Encontrando, 10 casos positivos [visualizados](#) mediante metodología de flujo lateral, la cual fue comparable con el método DETECTER [69].

Asimismo, se reporta el uso de los biosensores basados en la nucleasa Cas10 nombrado “CRISPR-Csm”, una metodología validada en muestras clínicas nasofaríngeas obtenidas de pacientes enfermos. Con esta metodología se analizaron 24 muestras, que fueron comparadas y aprobadas por RT-qPCR y validadas por la metodología CRISPR, observando que 16 muestras fueron positivas a la presencia del gen

N del SARS-CoV-2. Los resultados se revelaron mediante metodologías de cuantificación de fluorescencia (expresada en unidades de fluorescencia) mediante un fluorímetro y por técnica colorimétrica reportando resultados positivos. Observando coloración rosa en los tubos obtenidos a partir de la reacción de RT-LAMP demostrado la reproducibilidad de ambos experimentos [110]. Finalmente, se reporta el uso del biosensor CRISPR-12a conocido como SENA (Specific Enhancer for detection of PCR-amplified Nucleid Acids, por sus siglas en inglés; Potenciador específico para la detección de ácidos nucleicos amplificados por PCR, en español) en pacientes recuperados y asintomáticos. Para lo cual, se tomaron muestras nasofaríngeas, orofaríngeas y de sangre de 139 pacientes encontrando; 2 resultados positivos, 123 resultados negativos y 12 sospechosos infectados por el virus. A su vez, la metodología fue comparada con la RT-qPCR identificando los genes E y N, demostrando que la metodología CRISPR es comparable con la RTqPCR [111].

En resumen, se ha observado que la metodología CRISPR-Cas es útil para diagnosticar pacientes portadores del SARS-CoV-2 a partir de muestras de grandes poblaciones de pacientes y los resultados son comparables con la RT-qPCR. Además, es de

utilidad debido a que permite identificar los resultados de las pruebas mediante inspección visual debido a que es un híbrido entre metodologías como la RT-LAMP, la metodología de flujo lateral y la fluorescencia. Sin embargo, se han encontrado pocos pacientes positivos en los reportes encontrados en las bases de datos. Por lo que se requiere que existan estudios basados en personas enfermas donde se utilicen muestras grandes provenientes de pacientes provenientes de hospitales abarcando diferentes comunidades. Debido a que, las técnicas han sido aprobadas por la FDA para diagnosticar COVID-19, deberían de existir más aplicaciones de los biosensores a gran escala ya que son de utilidad como metodologías de punto de atención en la actual pandemia y anteriormente han sido de utilidad en la detección de otros virus como el zika, el dengue y la influenza [20, 22- 24, 112].

CONCLUSIONES

La tecnología CRISPR-Cas ha surgido como un método innovador para la detección rápida de ácidos nucleicos, esto forma una parte integral de las aplicaciones en el diagnóstico clínico por medio de la biotecnología. Motivo por el cual, han surgido varios métodos de detección alternativos basados en la plataforma de diagnóstico CRISPR-Cas, que combinan la pre-amplificación de ácidos nucleicos con la

enzimología CRISPR-Cas, para el reconocimiento específico de secuencias de ADN o ARN provenientes de patógenos como los virus.

Estas técnicas utilizan las múltiples variantes de las enzimas nucleasas; Cas3, Cas9, Cas12, Cas13 y Cas14. Las cuales se encuentran caracterizadas hasta la fecha, teniendo descritas las funciones moleculares y los dominios principales. Además, de que se ha encontrado una gran utilidad del CRISPR-Cas en la edición de genomas, como métodos de diagnóstico molecular rápidos del tipo BPC. Cuya función es detectar personas enfermas, contribuyendo a los estudios epidemiológicos en la actual pandemia del COVID-19. Además de ayudar en el monitoreo de personas portadoras asintomáticas (sin presentar síntomas) o enfermas de COVID-19 (ya sea con enfermedad leve o grave) y a la detección de posibles reinfecciones. También, los métodos de detección contribuyen a disminuir el tiempo de estadía en hospitales, un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Por lo que, la metodología de detección basada en CRISPR-Cas ha sido ampliamente utilizada como un método de diagnóstico en personas infectadas por el SARS-CoV-2, que padecen de COVID-19. Destacando la necesidad de pruebas que sean rápidas, precisas, económicas y que se puedan implementar como punto de

cuidado. Que, a su vez informarán las decisiones sobre estrategias de control de enfermedades y ayudarán a manejar a los pacientes en los centros de salud.

El CRISPR-Cas es una metodología que ha sido aprobada por la FDA, que es comparable con los métodos convencionales de detección del SARS-CoV-2 como la RT-qPCR. En general todas las variantes de identificación CRISPR-Cas son métodos rápidos de detección, cuyos resultados se revelan en tubos y tiras de papel por medio del uso de fluoróforos que pueden ser observados a simple vista y cuantificados por un fluorímetro. También, poseen alta sensibilidad debido a que detectan una baja cantidad de copias de amplificado de algunos de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 proveniente de muestras de pacientes enfermos. Otra característica importante es que se consideran metodologías de detección que pueden ser aplicadas en un gran número de personas y son eficaces en la detección del virus.

Finalmente, la tecnología CRISPR-Cas se ha orientado al estudio de la identificación de anticuerpos y antivirales en contra del mecanismo de infección del SARS-CoV-2 y para generar protección de la sociedad en general, con la finalidad de que a futuro la enfermedad del COVID-19 pueda ser controlada y, como consecuencia, el número de

casos de muertes disminuya en todo el mundo.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- [1]. Fathizadeh H., Maroufi P., Momen-Heravi M., Dao S, Köse Ş, Ganbarov K, Kafil HS. Protection and disinfection policies against SARS-CoV-2 (COVID-19). *Infez Med.* 2020; 28(2): 185-91.
- [2]. Hou T, Zeng W, Yang M, Chen W, Ren L, Ai J, Wang X. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. *PLoS Pathog.* 2020; 16(8): 1-12.
- [3]. Atzrodt CL, Maknojia I, McCarthy RD, Oldfield TM, Po J, Ta KT, Clements TP. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. *FEBS Lett.* 2020; 287(17): 3633-3650.
- [4]. Sitio web de European Centre for Disease Prevention and Control, disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>. Revisado 5 de octubre 2020.
- [5]. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. *Nat. Methods.* 2019:1-8.
- [6]. Tsang J, LaManna CM. Open Sharing During COVID-19: CRISPR-Based Detection Tools. *CRISPR J.* 2020; 3(3): 142-145.
- [7]. Huang L, Zhang X, Zhang X, Wei Z, Zhang L, Xu J, Xu A. Rapid asymptomatic transmission of COVID-19 during the incubation period demonstrating strong infectivity in a cluster of youngsters aged 16-23 years outside Wuhan and characteristics of young patients with COVID-19: a prospective contact-tracing study. *J Infect.* 2020; 80(6):1-13.
- [8]. Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang MLW, Greninger AL. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv.*2020: 1-21
- [9]. Sitio web de Food Drugs and administration FDA. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/139937/download>. Revisado 13-10-2020.
- [10]. Santiago I. Trends and innovations in biosensors for COVID-19 mass testing. *Chem Bio Chem.* 2020; 21: 1-11.
- [11]. Straiton J. CRISPR vs COVID-19: how can gene editing help beat a virus? *Biotechniques.* 2020; 69(5):327-329.
- [12]. Zhang Y. CRISPR-Cas13 as an Antiviral Strategy for Coronavirus Disease 2019. *CRISPR J.* 2020; 3(3): 140-142.
- [13]. Nalawansha D, Samarasinghe K. Double-Barreled CRISPR Technology as a Novel



Treatment Strategy For COVID-19. ACS Pharmacol Transl Sci. 2020; 3(5): 790–800.

[14]. Gharib Mombeni E, Birhan M, Yousefi M. CRISPR/Cas9 gene editing technology and its application to the coronavirus disease (COVID-19), a review. J Life Sci Biomed. 2020; 10(1): 01-09.

[15]. Página de la UNAM de los métodos de diagnóstico CRISPR-Cas Disponible en <https://www.inmegen.gob.mx/investigacion/lineas-de-investigacion/proyecto/?id=455&l=genomica-y-enfermedades-infecciosas>. Revisado 7 de septiembre de 2020.

[16]. Hamid H, Khurshid Z, Adanir N, Zafar MS, Zohaib S. COVID-19 Pandemic and Role of Human Saliva as a Testing Biofluid in Point-of-Care Technology. Eur J Dent. 2020: 1-2.

[17]. Kalafat E, Yaprak E, Cinar G, Varli B, Ozisik S, Uzun C, Azap A, Koc A. Lung ultrasound and computed tomographic findings in pregnant woman with COVID-19. Ultrasound Obstet Gynecol. 2020; 55(6): 835-837.

[18]. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. Biology. 2020; 9(8):182.

[19]. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020; 323(22): 2249-2251.

[20]. Van Dongen JE, Berendsen JTW, Steenbergen RDM, Wolthuis RMF, Eijkel JCT, Segerink LI. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: Recent advances, challenges and opportunities. Biosens Bioelectron. 20; 166:112445.

[21]. Zhu H, Zhang H, Ni S, Korabečná M, Yobas L, Neuzil P. The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. Trends Analyt Chem. 2020; 130:1-13.

[22]. Carvalho-Schneider C, Laurent E, Lemaigen A, Beaufile E, Bourbao-Tournois C, Laribi S, Flament T., et al. Follow-up of adults with non-critical COVID-19 two months after symptoms' onset. Clin Microbiol Infect. 2020; 5:1-6.

[23]. Bongiovanni M. COVID-19 reinfection in an healthcare worker. J Med Virol. 2020: 1-3.

[24]. Singer AJ, Ardise J, Gulla J, Cangro J. Point-of-care testing reduces length of stay in emergency department chest pain patients. Ann Emerg Med. 2005; 45(6):587-91.

[25]. Laskar P, Yallapu MM, Chauhan SC. “Tomorrow Never Dies”: Recent Advances in Diagnosis, Treatment, and Prevention Modalities against Coronavirus (COVID-19) amid Controversies. Diseases. 2020; 8(30): 1-30.

- [26]. Shiri I. A theranostic approach based on radiolabeled antiviral drugs, antibodies and CRISPR-associated proteins for early detection and treatment of SARS-CoV-2 disease. *Nucl Med Commun.* 2020; 41:837–840.
- [27]. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell.* 2018; 172(6): 1239-1259.
- [28]. Dipali G. Sashital. Pathogen detection in the CRISPR–Cas era. *Genome Med.* 2018; 10(32):1-4.
- [29]. Sitio web de UniProt disponible en: <https://www.uniprot.org/>. Revisado 5 de octubre 2020.
- [30]. Wang X, Shang X, Huang X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods. *Emerg Microbes Infect.* 2020a; 9(1): 1682-1691.
- [31]. Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14 (3):321-327.
- [32]. Xiang X, Qian K, Zhang Z, Lin F, Xie Y, Liu Y, Yang Z. CRISPR-Cas systems based molecular diagnostic tool for infectious diseases and emerging 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. *J Drug Target.* 2020:1-10.
- [33]. Esbin MN, Whitney ON, Chong S, Maurer A, Darzacq X, Tjian R. Overcoming the bottleneck to widespread testing: A rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *ARN.* 2020; 26 (7): 771-783.
- [34]. Wang X, Xiong E, Tian T, Cheng M, Lin W, Wang H, Zhang G, Sun J, Zhou X. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay. *ACS Nano.* 2020;14(2):2497–2508.
- [35]. Kumar P, Malik YS, Ganesh B, Rahangdale S, Saurabh S, Natesan S, Srivastava A, Sharun K, Yatoo MI, Tiwari R, Singh RK and Dhama K. CRISPR-Cas System: An Approach With Potentials for COVID-19 Diagnosis and Therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:1-13.
- [36]. Johnson ER, McKay DB. Crystallographic structure of the amino terminal domain of yeast initiation factor 4A, a representative DEAD-box RNA helicase. *RNA.* 1999; 5(12):1526- 1534.
- [37]. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 2005;1(6):474-483.
- [38]. Swarts DC, van der Oost J, Jinek M. Structural Basis for Guide RNA Processing and Seed-Dependent DNA Targeting by CRISPR-Cas12a. *Mol Cell.* 2017; 66 (2): 221-233.
- [39]. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg

SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Sci.* 2014; 343(6176): 1247997.

[40]. Sinkunas T, Gasiunas G, Waghmare SP, Dickman MJ, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. In vitro reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. *EMBO rep.* 2013; 32(3): 385-394.

[41]. He L, St John James M, Radovic M, Ivancic-Bace I, Bolt EL. Cas3 Protein—A review of a multi-tasking machine. *Genes.* 2020; 11(2): 208.

[42]. Gong B, Shin M, Sun J, Jung CH, Bolt EL, van der Oost J, Kim JS. Molecular insights into ADN interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:16359-16364.

[43]. Huo Y, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu L, Xiao Y, Farchione MD Jr, Zhou S, Rajashankar K, Kurinov I, Zhang R, Ke A. Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Nat Struct Mol Biol.* 2014; 21(9):771-7.

[44]. Sitio Web de Pfam disponible en: <https://Pfam.xfam.org/family/PF16592>.

Revisado en 14-10-2020.

[45]. Kouranov A, Xie L, de la Cruz J, Chen L, Westbrook J, Bourne PE, Berman HM. The RCSB PDB information portal for structural genomics. *Nucleic Acids Res.* 2016; 34:302-305.

[46]. Gosavi G, Yan F, Ren B, Kuang Y, Yan D, Zhou X, Zhou H. Applications of CRISPR technology in studying plant-pathogen interactions: overview and perspective. *Phytopathol Res.* 2020;2 (1), 1-9.

[47]. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(4):347-55.

[48]. Xu W, Jin T, Dai Y, Liu CC. Surpassing the detection limit and accuracy of the electrochemical DNA sensor through the application of CRISPR Cas systems. *Biosens Bioelectron.* 2020; 155: 1-7.

[49]. Nishimasu H, Cong L, Yan WX, Ran FA, Zetsche B, Li Y, Kurabayashi A, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell.* 2015; 162(5): 1113-1126.

[50]. Nishimasu H., Ishitani R., Nureki O. 5AXW, Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9 in complex with sgRNA and target DNA (TTGGGT PAM). Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/5AXW>.

[51]. Tang Y, Fu Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell Biosci.* 2018;

8(59): 1-13.

[52]. Modelo Cas12. Disponible en: <https://bsse.ethz.ch/platt/resources/transcriptional-programming-with-sit-cas12.html>.

Revisado en 14-10-2020.

[53]. Yan WX, Hunnewell P, Alfonse LE, Carte JM, Keston-Smith E, Sothiselvam S, Cheng DR. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Sci*. 2019; 363(6422): 88-91.

[54]. Stella S, Mesa P, Thomsen J, Paul B, Alcón P, Jensen SB, Montoya, G. Conformational activation promotes CRISPR-Cas12a catalysis and resetting of the endonuclease activity. *Cell*. 2018;175(7):1856-1871.

[55]. Montoya G, Mesa P, Stella S. 6GTF: Transient state structure of CRISPR-Cpf1 (Cas12a) I5 conformation. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/6GTF>.

[56]. Slaymaker IM, Mesa P, Kellner MJ, Kannan S, Brignole E, Koob J, Strecker J. High-resolution structure of Cas13b and biochemical characterization of ARN targeting and cleavage. *Cell rep*. 2019; 26 (13): 3741-3751.

[57]. Zhang Y. CRISPR-Cas13 as an Antiviral Strategy for Coronavirus Disease 2019. *CRISPR J*. 2020; 3, (3):140.

[58]. Jia N, Meeske AJ, Marraffini LA, Patel. Cryo-EM structure of Cas13(crRNA). Disponible en:

<https://www.rcsb.org/structure/6VRC>.

[59]. DeLano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on protein crystal*. 2002; 40(1):82-92.

[60]. Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Res*. 2009;19(2):271-273.

[61]. Aquino-Jarqui G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic. *Nanomedicina*. 2019; 18:428-431.

[62]. Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, DouADN JA. Programmed ADN destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Sci*. 2018; 362(6416): 839-842.

[63]. Savage DF. Cas14: Big Advances from Small CRISPR Proteins. *Biochem*. 2019; 58(8):1024-1025.

[64]. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35:61-65.

[65]. Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. NY: Academic Press. 1965: 97-166.

[66]. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35:1547-1549.

- [67]. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4:406-425.
- [68]. Petri, K, Pattanayak V. SHERLOCK and DETECTR open a new frontier in molecular diagnostics. *CRISPR J.* 2018;1(3):209-211.
- [69]. Yoshimi K, Takeshita K, Yamayoshi S, Shibumura S, Yamauchi Y, Yamamoto M, Mashimo T. Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3. *medRxiv.* 2020: 1-30.
- [70]. Lira CR., De la Cruz PJ, Maldonado RA, Rojas Montes O. Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya. *Mens Bioquim.* 2018; 42: 92-102.
- [71]. López Casillas F. CRISPR, el sueño divino hecho realidad. *Rev Fac Med Univ Nac Auton Mex.* 2015; 58(4): 55-60.
- [72]. Azhar M, Phutela R, Kumar M, Ansari AH, Rauthan R, Gulati S, Acharya, S. Rapid, accurate, nucleobase detection using FnCas9. *medRxiv.* 2020:1-28.
- [73]. Azhar M, Phutela R, Ansari AH, Sinha, D. Sharma N, Kumar M, Patra PK. Rapid, field-deployable nucleobase detection and identification using FnCas9. *bioRxiv.* 2020: 1-28.
- [74]. Nguyen LT, Smith BM, Jain PK. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crARN enables amplified nucleic acid detection. *bioRxiv.* 2020: 1-15.
- [75]. Yuan T, Mukam O, Li Z, Chen W, Zhang Y, de Dieu Habimana J, Zeng L. A rapid and sensitive CRISPR/Cas12a based lateral flow biosensor for the detection of Epstein–Barr virus. *Analyst.* 2020; 145: 6388-6394.
- [76]. Ali Z, Aman R, Mahas A, Rao GS, Tehseen M, Marsic T, Pain A. iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus Res.* 2020; 288:198129.
- [77]. Wang X, Zhong M, Liu Y, Ma P, Dang L, Meng Q, Yang Z. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER. *Sci Bull.* 2020; 65(17): 1436–1439.
- [78]. Ding X, Yin K, Li Z, Liu C. All-in-One dual CRISPR-cas12a (AIOD-CRISPR) assay: a case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *bioRxiv.* 2020:1-5.
- [79]. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang, F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat protoc.* 2019;14(10): 2986-3012.
- [80]. Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, Boehm CK, Petros BA, Siddiqui S. Gross, R. Integrated sample inactivation, amplification,

and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020: 1-15.

[81]. Nieuwenweg AC, Van GMM, Horsting A, Hegge JW, Velders A, Saggiomo V. CRISPR-Clear: A Fieldable Detection Procedure for Potential CRISPR-Cas9 Gene Drive Based Bioweapons. *Chemrxiv*. 2019: 1-21.

[82]. Katzmeier F, Aufinger L, Dupin A, Quintero J, Lenz M, Bauer L, Styazhkin I. A low-cost fluorescence reader for in vitro transcription and nucleic acid detection with Cas13a. *PloS one*. 2019; 14(12): 1-17.

[83]. Choi JR. Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. *Front Chem*. 2020;8(517):1-10.

[84]. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26:1200–1204.

[85]. Thi VLD, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2020;12(556):1-15.

[86]. Mohan A, Chandra S., Agarwal D, Guleria R, Broor S, Gaur B, Mohan Pandey R. Prevalence of viral infection detected by PCR and RT-PCR in patients with acute exacerbation of COPD: A systematic review. *Respirology*. 2010; 15:536–542.

[87]. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, Rufino

de Sousa N, Papanicolaou N, Vondracek M., et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun*. 2020;11(1): 4812.

[88]. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf>. Revisado el 20 noviembre de 2020.

[89]. Centers for Disease Control and Prevention. Information for Laboratories: 2019-nCoV | CDC. Acceptable Commercial Primers and Probes. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html>. Revisado el 20 noviembre de 2020.

[90]. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies-A review. *Nucleosides nucleotides. Nucleic acids*. 2008; 27: 224-43.

[91]. Sánchez E, Nina M, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela R. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Rev Cs Farm y Bioq*. 2014; 2 (1):1125-1138.

[92]. Morisaka H, Yoshimi, K, Okuzaki Y., et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun*. 2019; 10 (5302): 1-13.

- [93]. Broughton JP, Deng X, Yu G., et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020; 38(7): 870–874.
- [94]. Belavi C. Desarrollo de reactivos para la detección cuantitativa del gen de fusión pml-rara mediante PCR en tiempo real. XIX encuentro de jóvenes investigadores de la UNL, Arg. Octubre 14- 15. 2015.
- [95]. Sitio web de la Secretaría de Salud México. Disponible en: <https://www.facebook.com/SecretariadeSaludMX/photos/pcb.3463004997081502/3463004587081543/>. Revisado 18 de noviembre de 2020.
- [96]. Aramburu A, Huaroto F, Reyes N. Precisión diagnóstica de pruebas basadas en amplificación isotérmica mediada en lazo de transcriptasa inversa (RT-LAMP) para SARS-CoV-2. *Serie Revisiones rápidas*, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud de Lima. 2020; 8:1-26.
- [97]. Patchsung M, Jantarug K, Pattama A., et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng.* 2020.
- [98]. Abbott TR, Dhamdhere G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, Chemparathy A, Chmura S, Heaton NS, Debs R, Pande T, Endy D, La Russa MF, Lewis DB, Qi LS. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. *Cell.* 2020;181(4):865-876.
- [99]. Hou T, Zeng W, Yang M, Chen W, Ren L, Ai J., et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. *PLoS Pathog.* 2020; 16(8): e1008705
- [100]. Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku S G, Freije CA, Metsky HC, Yang DK., et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nat.* 2020; 582: 277–282.
- [101]. Azmi I, Faizan MI, Kumar R, Yadav, S. R, Chaudhary N, Singh K, et al. A saliva-based RNA extraction-free workflow integrated with Cas13a for SARS-CoV-2 detection. *medRxiv.* 2020: 1-39.
- [102]. Fozouni P, Son S, de León Derby MD, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, et al. Direct detection of SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas13a and a mobile phone. *MedRxiv.* 2020.
- [103]. Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang MLW., et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv.* 2020
- [104]. Brandsma E, Verhagen HJ, van de Laar TJ, Claas EC, Cornelissen M, Van den AE. Rapid, sensitive and specific SARS coronavirus-2 detection: a multi-center comparison between standard qRT-PCR and CRISPR based DETECTR. *medRxiv.* 2020.
- [105]. Wu X, Chan C, Lee YH, Springs SL, Lu TK, Yu H. A Digital CRISPR-based. *medRxiv.* 2020.

- [106]. Ali Z, Aman R, Mahas A, Rao GS, Tehseen M, Marsic T., et al. iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus res.* 2020; (288):198129.
- [107]. Rauch JN, Valois E, Ponce-Rojas JC, Aralis Z, Lach RS, Zappa F., et al. Rapid CRISPR-based surveillance of SARS-CoV-2 in asymptomatic college students captures the leading edge of a community-wide outbreak. *medRxiv.* 2020.
- [108]. Azhar M, Phutela R, Kumar M, Ansari AH, Rauthan R, Gulati S., et al. Rapid, accurate, nucleobase detection using FnCas9. *medRxiv.* 2020.
- [109]. Huang Z, Tian D, Liu Y, Lin, Lyon C, Lai W, Ning B. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-Powered COVID-19 diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2020; 164: 112316.
- [110]. Santiago-Frangos A, Hall LN, Nemudraia A, Nemudryi A, Krishna P, Wiegand T, et al. Intrinsic Signal Amplification by Type-III CRISPR-Cas Systems Provides a Sequence-Specific Viral Diagnostic. *medRxiv.* 2020.
- [111]. Huang W, Yu L, Wen D, Wei D, Sun Y., Zhao H., et al. A CRISPR-Cas12a-based specific enhancer for more sensitive detection of SARS-CoV-2 infection. *medRxiv.* 2020.
- [112]. Konwarh R. Can CRISPR/Cas technology be a felicitous stratagem against the COVID-19 fiasco? Prospects and Hitches. *Front Mol Biosci.* 2020; 10(7):557377.