

Métodos de detección del SARS-CoV-2 en pacientes enfermos de COVID-19

Esmeralda Escobar-Muciño^{1*} , Estrella Escobar-Muciño² , Adriana Gamboa-Pérez¹ .

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 correspondiente: esmeeem2014@gmail.com

Recibido: 22 octubre 2020. **Aceptado:** 29 noviembre 2020

RESUMEN

El brote emergente de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) continúa extendiéndose por todo el mundo. Demostrando su efecto dañino en muchos sistemas y órganos humanos; esto es de gran preocupación para la sociedad en general afectando la vida diaria y la economía mundial. Además, de causar una necesidad sin precedentes de utilizar métodos de diagnóstico rápidos y sensibles para detectar el virus, especialmente cuando las vacunas no están disponibles. Motivo por el cual el objetivo de la presente revisión fue comparar estudios publicados para obtener información sobre los métodos de detección del SARS-CoV-2 como: la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR), la amplificación isotérmica mediada por asa con transcriptasa inversa (RT-LAMP), las pruebas serológicas y los diferentes biosensores como: (i) los biosensores colorimétricos ópticos (fluorescentes), (ii) los biosensores electroquímicos (los potenciométricos y los amperométricos), (iii) los biosensores basados en aptámeros y (iv) los polímeros de impresión molecular (PIM). Además, se resumieron las ventajas y desventajas de las plataformas que están en la etapa de desarrollo y el crecimiento como nuevas tecnologías de detección para el diagnóstico del SARS-CoV-2.

Palabras clave: inmunoglobulinas (IgG e IgM), métodos de detección, polímero de impresión molecular (PIM), RT-LAMP, RT-qPCR y SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The emerging outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) continues to spread around the world. Demonstrating its damaging effect on many systems and human organs; this is of great concern

to society likewise it affects their daily life and the world economy. Caused an unprecedented need for rapid diagnostics for rapid and sensitive detection of the virus, especially when the vaccines are not available. This study aimed to compare published studies to obtain information on the detection methods of SARS-CoV-2 such as: the RT-qPCR, the RT-LAMP, the serological tests, and the different biosensors such as: (i) the optical colorimetric biosensors (fluorescent), (ii) the electrochemical biosensors (potentiometric and amperometric), (iii) the biosensors based on aptamers, and (iv) the molecular impress polymer (MIP). Also was summarized the advantages and disadvantages of new platforms that find in the development and growth stage as new detection technologies for diagnosing the SARS-CoV-2.

Keywords: immunoglobulins (IgG and IgM), detection methods, molecular impress polymer (MIP), RT-LAMP, RT-qPCR, and SARS-CoV-2.

INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019 se dio a conocer que la enfermedad del coronavirus (COVID-19) (coronavirus disease 2019, por sus siglas en inglés) causada por la cepa del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), era capaz de infectar a los seres humanos. El descubrimiento fue por medio de un brote de neumonía en Wuhan, provincia de Hubei en China. Desde entonces, esta epidemia se extendió por todo el mundo [1]. Fue entonces que la nueva neumonía causada por el coronavirus fue nombrada COVID-19 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [2].

Posteriormente, el 30 de enero del 2020, la OMS declaró al COVID-19 como una emergencia de salud pública de interés internacional. En relación con esto el 7 de

febrero del 2020 ya se consideraban 43,103 casos confirmados con neumonía (COVID-19) en 25 países [3], para el 11 de marzo del 2020 fue declarada una pandemia que afecto la vida de millones de individuos. En consecuencia, para la fecha del 1 de mayo del 2020 alrededor de 3,321,402 personas se confirmaron como infectadas por el virus y ya había 237,180 muertes a nivel mundial [4]. Cabe agregar que, para la fecha del 28 de junio del 2020, se reportaron 9,653,066 casos diagnosticados en 214 países [5]. Para dar continuación con los datos el 21 de julio del 2020 la enfermedad se había extendido a más de 215 países, con más de 15,000,000 de personas infectadas y más de 615,000 muertes [6]. El 23 de agosto del 2020 se reportaron 23,213,489 casos de personas infectadas y 804,556 de muertes de personas

por infección del SARS-CoV-2. El número de casos siguió creciendo, encontrando que en septiembre se reportaron 23,213,489 casos de personas infectadas y 804,556 muertes por infección del SARS-CoV-2 y finalmente, para el 17 de octubre del 2020 se reportaron 39,337,397 casos de personas infectadas y 1,104,497 de muertes por infección del SARS-CoV-2 [5]. Y para la misma fecha en México se reportaron 834,910 casos de personas infectadas y 85,285 muertes por infección del virus [7].

En México se encuentran reportados principalmente estudios sobre la relación de las condiciones ambientales y la transmisión del SARS-CoV-2 como ejemplos: la temperatura, la evaporación, la precipitación y el clima regional. Se suman los estudios de Méndez-Arriaga y cols., informando que las altas temperaturas y la alta evaporación en climas tropicales son los mejores predictores de una condición desventajosa para la supervivencia del SARS-CoV-2 indicando que la incidencia del COVID-19 disminuye en regiones tropicales. A su vez, las bajas temperaturas y un ambiente seco favorecen la propagación de la infección por causa del virus, por lo que se ha sugerido evitar espacios cerrados, como por ejemplo los que se generan por aires acondicionados [8]. En algunos países como México se han hecho análisis estadísticos, con

la finalidad de hallar los principales grupos que son susceptibles a la enfermedad, encontrando que la edad media de los pacientes confirmados fue de 46 años. Observando, que la mayoría de las personas infectadas tenían entre 30 y 59 años con una tasa de incidencia más alta para los hombres que para las mujeres. También, se reportó que los pacientes que fallecieron tenían una o más comorbilidades, principalmente hipertensión arterial (HTA), diabetes y obesidad. Por lo que, la epidemiología descriptiva ha demostrado similitudes entre los casos de COVID-19 en varias regiones cuyo comportamiento es parecido al de China, lugar de origen de la infección [9].

En general, se ha observado que de la mayoría de los casos por COVID-19 se han registrado a partir de cada uno de los pacientes, procediendo al diagnóstico médico de la enfermedad e identificación del SARS-CoV-2 por el método de RT-qPCR (RT-PCR tiempo real). Observando, que los resultados obtenidos confirmaron que la edad, la diabetes, la presión arterial y la obesidad son los principales riesgos de infección y hospitalización por COVID-19 [10]. Además, la inmunosupresión, el tabaquismo, la obesidad y el asma son factores de riesgo de infección por el virus. Por lo que estos hallazgos fueron importantes en el establecimiento de políticas de salud pública y la asignación de recursos sanitarios durante la

pandemia actual en México y los demás países [10-13].

En comparación con pandemias anteriores (como la influenza), el COVID-19 ha tenido una mayor tasa de mortalidad y transmisibilidad porque se ha extendido a 200 países [14]. Esta situación forzó el surgimiento de las medidas de prevención contra el contagio del COVID-19. El principal ejemplo de estas medidas son la implementación del distanciamiento social, el aislamiento y el toque de queda en algunas ciudades del mundo. Cabe agregar que también se aceleraron el tiempo de desarrollo y producción de: antivirales, anticuerpos, terapias y vacunas; por otra parte, se revaloraron algunos antivirales y vacunas desarrollados con anterioridad que podrían ser efectivos contra el COVID-19 [15, 2, 14].

En consecuencia, las medidas de emergencia sanitaria se implementaron inmediatamente después de que la OMS declaró la pandemia, requiriendo la suspensión de las actividades no esenciales. Posteriormente, en marzo del 2020, se adoptaron las acciones de una "sana distancia" y las medidas generales de higiene. Estas acciones surgieron con el objetivo de reducir la transmisión del SARS-CoV-2 en los ciudadanos mediante la reducción de la tasa de contacto [16].

Actualmente, se siguen reportando casos de pacientes sospechosos, enfermos y muertes por

causa del virus. Lo cual podría contenerse con las terapias antivirales y detenerse hasta que la población sea inmune al SARS-Co-V-2 por medio de la vacuna [17]. De los antivirales a la fecha se reportan 164 vacunas de las cuales 41 vacunas han sido exploradas en pacientes humanos cuyo estatus corresponde a las fases I-III. Encontrando, que 122 vacunas se encuentran en fase preclínica de estudio, 35 vacunas se encuentran en fase I de estudio, 24 vacunas en fase II de estudio, 11 vacunas en fase III de estudio y 3 vacunas en fase IV de estudio. Por otro lado, se reportan un total de 364 terapias antivirales de las cuales 278 han sido probadas en humanos [6, 18]. A la fecha, hay reportes de cada una de las terapias antivirales y vacunas; las más importantes son: remdesivir, hidroxiclороquina, lopinavir, ritonavir e interferón. Pero estas terapias han demostrado tener poco o nulo efecto en pacientes hospitalizados por COVID-19. También, se reportan otros tratamientos por ejemplo el CT-P59, que se encuentra en fase 1 de investigación observando un tiempo de recuperación del 44% en pacientes con síntomas leves de COVID-19. Mientras que, el tratamiento con ivermectina y doxiciclina ha sido de utilidad en pacientes con enfermedad leve a moderada y el avidaptil ha sido reportado que ayuda a los pacientes y presentan una mayor supervivencia (81%) durante un

monitoreo de 60 días. Pero estos datos han sido reportados en un bajo número de pacientes de prueba. Sin embargo, aún existen desafíos para el desarrollo de terapias o vacunas, como la efectividad, las cuestiones regulatorias, la producción a gran escala y el despliegue al público [6, 18]. Por otro lado, en la actualidad se considera que el sistema inmunológico juega un papel importante para superar o no la enfermedad; en consecuencia, las personas inmunodeprimidas, las personas con al menos una comorbilidad o afecciones crónicas son altamente vulnerables. Para estas personas la única línea de defensa es tomar precauciones mediante el uso de los desinfectantes, las mascarillas, los estimulantes del sistema inmunológico y los medicamentos aprobados clínicamente contra el SARS-CoV-2 [6].

Las investigaciones recientes sugieren que las personas infectadas con el virus pueden ser peligrosas debido a que una persona infectada puede contagiar hasta 5.6 personas en promedio [19]. Estos resultados, sugieren la necesidad de ensayos para detectar el virus que sean rápidos y sensibles aprobados por laboratorios certificados y la FDA (Food Drugs and Administration, por sus siglas en inglés), utilizando preferiblemente el equipo existente para facilitar la detección de los componentes moleculares del virus a gran escala [19, 20]. Sin embargo, los esfuerzos para controlar la

enfermedad se ven obstaculizados por múltiples factores, incluidos: (1) la falta de capacidad de producción de pruebas diagnósticas que son de alta demanda a nivel mundial (necesarias para detectar el virus en personas portadoras); (2) la sensibilidad diagnóstica, aparentemente limitada de las distintas plataformas de pruebas moleculares e inmunológicas; (3) y la experiencia técnica necesaria para obtener resultados válidos [19]. Razón por la cual, el objetivo de este trabajo es informar y describir los diferentes métodos de detección del SARS-CoV-2 así como las ventajas y desventajas de los métodos que a continuación se describen.

Componentes moleculares del SARS-CoV-2

En cuanto al genoma del coronavirus se han descubierto las proteínas correspondientes al ORF1ab donde las proteínas más estudiadas del SARS-CoV-2 han sido nombradas como: (a) la proteasa de dominio papaína-like (NSP3), (b) la proteinasa 3CL-pro (NSP5), (c) la polimerasa directa dependiente de RNA (RdRp), (d) la helicasa, (e) la endonucleasa y (f) la metil transferasa. Mientras que, la región de las proteínas estructurales está conformada por: (a) la proteína espícula (S), (b) la proteína de envoltura, (c) la proteína de membrana (M) y (d) la proteína de nucleocápside (N). En la figura 1 se observan los principales componentes del virus del SARS-CoV-2 [21,

22]. Y su función se describe a continuación: (a) la proteasa con dominio papaína-like participa junto con el ORF nsp4 en el ensamblaje de las vesículas citoplasmáticas de doble membrana inducidas por el coronavirus, que son necesarias para la replicación viral. A su vez, antagoniza la inducción de la respuesta inmune innata del interferón tipo I al bloquear la fosforilación, la dimerización y la translocación nuclear del interferón tipo III del huésped e impide la vía de señalización NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, por sus siglas) inducida en el hospedero [23]. (b) la proteinasa 3CL-PRO o proteasa principal (Mpro) corta el extremo C-terminal de la replicasa en 11 sitios (reconociendo sustratos que contienen la secuencia [ILMVF]-Q-[SGACN]). También, puede unirse a la ADP-ribosa-1^o-fosfato (ADRP). (c) por otro lado, la Mpro, es una enzima encargada de regular la replicación viral y la transcripción [24]. (d) la proteína Nsp12 (RdRp), es utilizada por los coronavirus como una maquinaria de replicación y transcripción de proteínas estructurales que ayudan en el ensamblaje del virus en el interior de las células del huésped [25]. (e) la glicoproteína transmembranal o espícula (S), cuya función es unir el virus a la membrana celular del huésped al interactuar con el receptor ACE2 humano e internalizarse

en la célula del huésped iniciando el proceso de infección [26]. La figura 1, se detallan las estructuras principales del SARS-CoV-2.

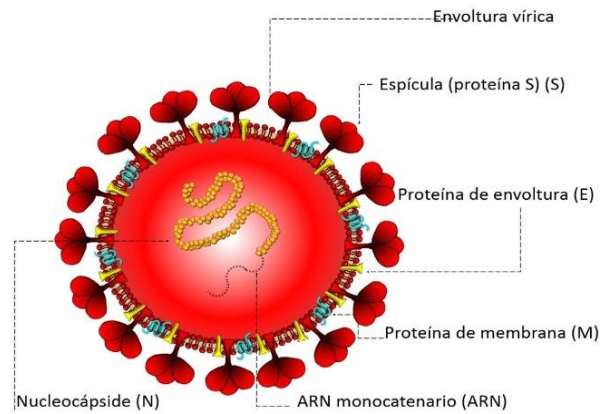


Figura 1. Descripción de los principales componentes estructurales del SARS-CoV-2. Imagen basada en [21].

Métodos de detección del SARS-CoV-2

Los estudios epidemiológicos basados en la detección del SARS-CoV-2 son de particular importancia. Existen diferentes técnicas que estudian grandes poblaciones asintomáticas y enfermas, con la finalidad de: (1) rastrear portadores asintomáticos del COVID-19 que son difíciles de identificar y aislar; (2) para asegurar que el personal (por ejemplo, el personal de salud y trabajadores en general), no se contagie con el virus; (3) para evaluar las poblaciones de alto riesgo con el propósito de proteger a las familias; (4) para estimar con precisión la propagación de la infección y medir la eficacia de las medidas comunitarias y el distanciamiento social; y por último (5) para asegurar un regreso seguro al trabajo y

proporcionar un tratamiento rápido como una estrategia para evitar la sobrecarga de la unidad de cuidados intensivos (UCI) en los hospitales [27, 28].

Para respaldar dichos esfuerzos, se necesitan enfoques de diagnóstico eficientes y de mayor rendimiento para identificar el SARS-CoV-2, como los diferentes métodos de PCR (la RT-qPCR y la RT-LAMP), los métodos inmunológicos que cuantifican las inmunoglobulinas, los biosensores colorimétricos ópticos fluorescentes, los biosensores electroquímicos como los potenciométricos y amperométricos, los biosensores basados en ácidos nucleicos como los aptámeros y los polímeros impresos molecularmente o MIP (molecularly imprinted polymer, por sus siglas en inglés) que a continuación se describen [27].

Metodología de RT-qPCR para la detección del SARS-CoV-2 en pacientes COVID-19

Los enfoques basados en la detección de ácidos nucleicos se han convertido en un método rápido y una tecnología confiable, considerada como el "estándar de oro" en la detección de patógenos como el SARS-CoV-2. La técnica se caracteriza por ser: de rápida detección, de alta sensibilidad, con alta especificidad y sirve de ayuda en el diagnóstico de una infección

temprana. Pero presenta ciertos desafíos cuando surgen nuevos patógenos, debido a que se requiere de la investigación genómica, la biología molecular y otras ciencias para crear la información suficiente para identificar el virus [29].

Actualmente, los investigadores se encuentran en la búsqueda de un protocolo fácil de aplicar, confiable y rápido. Debido a que la mayoría de los protocolos a lo largo de la historia han resultado ser efectivos y confiables, pero también son costosos, requieren de mucho tiempo y pasos para identificar patógenos. Por lo que, aplicarlos a grupos grandes de la población ha llegado a ser insostenible, limitando la cantidad de individuos que pueden analizarse diariamente por disponibilidad y costos [30]. En la actual pandemia, se reportan varios protocolos de RT-qPCR para identificar el SARS-CoV-2, que en el transcurso han sido aprobados para su uso. Estos protocolos se han desarrollado a partir de muestras de saliva de personas sospechosas de infección y pacientes enfermos de COVID-19 [30].

Actualmente, para la obtención de muestra humana se utilizan: hisopos nasofaríngeos (NP) (Nasopharyngeal, por sus siglas en inglés) y medios de transporte viral (VTM) (Viral Transport Medium por sus siglas en inglés). Como siguiente paso, se extrae el ARN a partir de la muestra de los pacientes, para

posteriormente realizar un análisis RT-qPCR para la búsqueda de los componentes moleculares del SARS-CoV-2. Por otro lado, debido a la alta demanda de los insumos de las pruebas de detección, estos han escaseado varias veces observando la falta de los hisopos NP, VTM y kits de purificación de ARN. Por tal motivo en abril del 2020, EUA autorizó el método del uso de saliva como muestra para el diagnóstico del virus, para posteriormente realizar la técnica de RT-qPCR. Asimismo, otros grupos han informado sobre pruebas directas a partir de hisopos NP en VTM por RT-qPCR. Adicionalmente, se reporta el protocolo de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign (UIUC), que involucra obtener muestras a partir de la saliva de pacientes sospechosos o enfermos de COVID-19. La muestra es recogida en tubos tipo falcón estándar de 50 ml, posteriormente la muestra se calienta para la inactivación del virus (95 °C durante 30 min), seguido de la extracción del ARN de la muestra y el análisis por RT-qPCR [30].

Por lo anteriormente expuesto, la RT-qPCR es de gran utilidad para la detección del SARS-CoV-2, basada en la detección de los componentes moleculares del virus, como por ejemplo los genes de: la RdR, la helicasa (Hel), la proteína S y la nucleocápside N. Considerándose esta metodología como uno de

los principales métodos para detectar confiablemente al agente causante de la enfermedad del COVID-19 [31, 32].

Para realizar el diagnóstico se requiere la identificación molecular del virus; esto se realiza por medio de la cuantificación de la expresión de un gen de interés. Para poder detectar la presencia del SARS-CoV-2, se utilizan fluoróforos para seguir la amplificación del material genético de interés durante la RT-qPCR, para este propósito, se usan sondas específicas para un fragmento de la secuencia del SARS-CoV-2, es decir, que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento de la secuencia del SARS-CoV-2. La fluorescencia aumenta proporcionalmente al incremento de la concentración del fragmento de interés, expresada como el número de ciclos de replicación (Ct). Por lo que la carga viral puede ser estimada por medio del método DCt (Ct sample–Ct ref). La muestra para esta técnica puede ser obtenida a partir de un hisopo nasofaríngeo de pacientes enfermos como se describió previamente [33, 34].

La ventaja de la técnica RT-qPCR es que el ARN viral se vuelve detectable desde el primer día de presentar los síntomas, donde un valor de Ct inferior a 40, se informa clínicamente como PCR positivo. Esta positividad comienza a disminuir en la semana 3, y posteriormente se vuelve indetectable al observar que el paciente

presenta mejoría. Sin embargo, se han observado casos de pacientes hospitalizados con síntomas muy graves y niveles bajos de Ct, incluso más bajos o iguales a pacientes de casos leves, por lo que el valor de Ct puede detectar la carga viral, pero no la intensidad de los síntomas presentados por los pacientes. Cabe señalar que la positividad de la prueba de PCR puede persistir por más de 3 semanas. Sin embargo, un resultado de PCR "positivo" refleja solo la detección de ARN viral y no necesariamente indica la presencia del virus activo. Pero es de gran utilidad para encontrar personas enfermas y administrar un tratamiento oportuno, por ello es muy valorada en el ambiente hospitalario en la actual pandemia [33].

Por otro lado, 2 grupos de investigación realizaron estudios de correlación de la tomografía computarizada (TC) de tórax y RT-qPCR para la detección de la enfermedad y daño pulmonar por COVID-19, cuya finalidad es realizar un diagnóstico oportuno a base de la búsqueda de indicios de enfermedad pulmonar en pacientes que contrajeron COVID-19 en un periodo de tiempo de 4 o más días. Los hallazgos de estos grupos indicaron que la TC de tórax tiene una alta sensibilidad para el diagnóstico y detección de la enfermedad pulmonar por COVID-19. Por lo que, la tomografía computarizada de tórax puede

considerarse una herramienta principal para la detección temprana en complicaciones pulmonares, y para agilizar el tratamiento por complicaciones de la enfermedad del COVID-19 [35, 36].

Problemas de estabilidad de las pruebas de RT-qPCR en pacientes COVID-19

Una de las principales utilidades de la RT-qPCR durante la actual pandemia es encontrar personas infectadas por el SARS-CoV-2 y así mantenerlas en aislamiento de las personas sanas hasta recuperarse de la etapa infecciosa del COVID-19. En particular, el aislamiento de los pacientes se puede revocar y pueden ser dados de alta después de cumplir con dos pruebas de RT-qPCR negativas que sean consecutivas y separadas por un tiempo de al menos 24 h. Sin embargo, se han reportado discrepancias en los métodos de detección debido a que el 12 de febrero del 2020 se informó que cinco pacientes infectados tenían resultados iniciales de RT-qPCR negativos o débilmente positivos. En otro caso se informaron los resultados de prueba de RT-qPCR obtenidos a partir de una muestra de frotis faríngeo de un paciente infectado, resultando positivo después de dos resultados negativos anteriores de la prueba de PCR, demostrando que existe un posible proceso de reinfección. En otros estudios se ha informado

que existe una alta tasa de falsos negativos por RT-qPCR, obtenidos de pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de COVID-19 [37, 38].

Motivo por el cual, se ha establecido que además de la RT-qPCR también deben utilizarse indicadores clínicos como las imágenes de TC, no solo para el diagnóstico y el tratamiento, sino también para el aislamiento, la recuperación, el alta, y transferencia de pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de COVID-19. Estos hallazgos sugirieron la necesidad urgente de ser más cuidadosos en la capacitación del personal relacionado con la estandarización de los procedimientos de muestreo de los diferentes sitios anatómicos, el transporte de muestras, la optimización de la técnica RT-qPCR y el diferenciar el COVID-19 de otras enfermedades respiratorias como las infecciones por gripe [37].

Detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 por RT-qPCR en individuos asintomáticos infectados

Cada vez hay más pruebas que demuestran que los individuos asintomáticos pueden propagar de manera eficiente el SARS-CoV-2, dificultando el control de la epidemia. Sin embargo, no se dispone de mucha información

sobre las características clínicas y la respuesta inmunitaria de los individuos asintomáticos infectados por el SARS-CoV-2 [39]. Por lo que, se requiere generar información que describa las características epidemiológicas, las características clínicas, la carga viral y la respuesta inmunitaria en individuos asintomáticos [39].

Otros estudios han intentado explicar el por qué se ha presentado un número tan elevado de contagios, resaltando la existencia de los individuos asintomáticos en diversas regiones del mundo. La finalidad de estos estudios es generar datos que puedan ser comparados con los obtenidos de diferentes países a partir de un grupo de pacientes experimentales. También, se ha encontrado que existen ciertas características en pacientes diagnosticados con una infección del SARS-CoV-2 que ha sido confirmada por RT-qPCR, observando que no presentan síntomas clínicos relevantes en los 14 días anteriores y durante la hospitalización. Por lo que las personas asintomáticas han sido ingresadas a los hospitales de distintas regiones del mundo con la intención de aislarlos bajo una política de evitar contagios y realizar investigación a la par para encontrar características que ayuden a conocer más de esta enfermedad [39].

Importancia de la RT-qPCR en el monitoreo de casos de pacientes re infectados por SARS-CoV-2

Después de varios meses de pandemia el número de pacientes recuperados ha aumentado, y esto ha conducido a investigar sobre la inmunidad adquirida frente a la enfermedad del COVID-19, planteándose también la posibilidad del proceso de reinfección, ambos sucesos son considerados fundamentales para anticipar la propagación viral [40]. También, se han reportado informes de pacientes re infectados con SARS-CoV-2, que después de haberse recuperado dieron nuevamente positivo a las pruebas de muestras de RT-qPCR a partir de muestras obtenidas de NP [41].

El 28 de agosto del 2020 se reportaron en 9 países un total de 24 casos de pacientes re infectados, 23 pacientes recuperados nuevamente y una muerte por COVID-19. Los rangos de tiempo entre la recuperación y la segunda infección variaron entre 13 y 147 días [42].

Por otro lado, también se reportó el caso de un paciente que presentó síntomas de infección por COVID-19, el cual se caracterizó porque provocó un caso de transmisión secundaria y tres casos de transmisión terciaria. El historial del paciente fue documentado, encontrando que entro a la UCI, debido a que se confirmó la

infección del individuo por SARS-CoV-2 por medio de RT-qPCR (mediante la detección del gen RdRP, alcanzando un umbral de detección de Ct inferior a 40, indicando un resultado positivo de RT-qPCR). También, se reportaron los estudios de TC y los estudios sanguíneos encontrando que fueron positivos a la presencia del virus. El paciente fue monitoreado del 25 de enero al 10 de febrero, se le aplicaron tratamientos antivirales como lopinavir y ritonavir, y se continuó con el monitoreo del gen RdRP, confirmando la utilidad de la técnica RT-qPCR en un ambiente hospitalario para describir el historial de la enfermedad por reinfección [43].

Finalmente, hay que destacar que el paciente superó la prueba de RT-qPCR como la mayoría de los pacientes que son negativos a la prueba en un promedio de 2.73 días de estancia hospitalaria. Pero, se ha observado que los pacientes pueden volver a recaer, por lo que se ha sugerido que se garantice la recuperación completa del paciente y así pueda salir de la cuarentena [38].

Detección por RT-qPCR de la transmisión vertical del SARS-CoV-2

Hay pocos casos reportados en la literatura que aborden estudios de mujeres embarazadas que están infectadas con el SARS-CoV-2. En la

mayoría de los casos se ha observado casos de infección en el útero y de pruebas que han comprobado infección neonatal temprana que ha resultado positiva a la presencia del SARS-CoV-2 [44]. Como ejemplo se tiene el reporte de una mujer de 41 años con antecedentes de cesáreas previas y diabetes mellitus que presentó malestar general, fiebre y disnea progresiva. Por lo que a los 4 días de presentar el malestar se realizó un frotis nasofaríngeo que resultó positivo para el SARS-CoV-2 y también se realizaron las pruebas serológicas, pero en esa etapa de monitoreo fueron negativas. Posteriormente, se reportó que la paciente inició con los síntomas de la enfermedad, desarrollando insuficiencia respiratoria por lo que necesitó de ventilación mecánica. Posteriormente, la paciente fue sometida a cesárea y se implementó el aislamiento neonatal inmediatamente después de dar a luz. Subsiguientemente, 16 horas después del parto se realizó la toma de muestra por hisopado nasofaríngeo neonatal, dando un resultado positivo a la prueba de RT-qPCR para el SARS-CoV-2, de la misma manera, se realizaron pruebas de inmunoglobulina (IgM e IgG) que fueron negativas. A la par se monitoreo a la madre, 4 días después del parto, observando que tanto la IgM e IgG maternas fueron positivas (día 9 después del inicio de los síntomas) encontrando a la paciente enferma y

el recién nacido infectado [44]. Posteriormente, se reportó otro estudio de RT-qPCR en 6 mujeres embarazadas que también transmitieron el SARS-CoV-2 a los recién nacidos, concluyendo la posibilidad de transmisión vertical del virus. Los resultados obtenidos también demostraron que la RT-qPCR es una herramienta eficaz para detectar el SARS-CoV-2 en mujeres embarazadas y recién nacidos [29, 45]. Sugiriendo que las mujeres embarazadas sean consideradas como un grupo de alto riesgo, y de preocupación por la transmisión vertical observada a los recién nacidos [44].

RT- LAMP: una prueba colorimétrica para detectar el SARS-CoV-2 en pacientes enfermos de COVID-19

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Loop-mediated isothermal amplification, por sus siglas en inglés). Es una técnica que surgió como alternativa de la RT-qPCR, por la necesidad de evaluar métodos sencillos, rápidos, baratos y probados en una gran cantidad de personas, con la finalidad de detectar posibles infecciones por el SARS-CoV-2 [46].

La técnica consiste en obtener muestras clínicas de ARN aisladas de hisopos faríngeos recolectados a partir de individuos y grupos de

alto riesgo. Una variación del método es secuenciar la muestra posterior a la reacción de amplificación RT-LAMP, esta variante ha sido probada a gran escala [46].

La técnica RT-LAMP consiste en una reacción en cadena de la polimerasa a temperatura constante (63°C) por medio de cebadores específicos para los genes: orf1ab, N y S del SARS-CoV-2 [46- 48].

Los reportes de detección del SARS-CoV-2 de RT-LAMP concluyen que el ensayo puede detectar copias de ARN genómico en un rango de 10^{-4} - 10^{-5} , en un corto período de tiempo (20-25 min), de 80-100 copias de ARN viral por mL de muestra y no se ha observado reactividad cruzada con otros coronavirus humanos [49-51].

Se ha encontrado que los ensayos de RT-LAMP tienen una sensibilidad y especificidad del 100%, en cuanto a la detección del SARS-CoV-2 en un tiempo medio de 26.28 ± 4.48 min, en un periodo de tiempo más corto que el método de PCR. Los resultados se pueden leer a simple vista, debido a que es una prueba colorimétrica que muestra el resultado de la amplificación del ARN viral sin la necesidad de un instrumento costoso o especializado [47, 51]. El método puede ser aplicado en un entorno clínico como los hospitales y centros médicos en comunidades rurales, es considerada una prueba confiable que funciona de manera

equivalente a la metodología de RT-qPCR, con la finalidad de detectar enfermedades de manera temprana y prevenir la propagación [48, 52, 53]. La figura 2 muestra la comparación de la metodología RT-qPCR y RT-LAMP. Donde se observa la toma de la muestra de un paciente enfermo por COVID-19 (Figura 2A). También, en la figura 2B se muestran los diferentes tratamientos de las muestras de saliva provenientes de pacientes para posteriormente buscar los componentes moleculares del SARS-CoV-2 por RT-PCR (Figura 2C). Mientras que, en la figura 2D, se describe el diseño de los cebadores utilizados para identificar los genes del virus por RT-LAMP leyendo los tubos al generar una coloración de la muestra positiva que identifica el virus. También, se observa la forma de leer los tubos a partir de muestras amplificadas por metodología RT-LAMP y en la figura 2E se muestra la comparación de ambos métodos; la RT-qPCR, la cual se lee en un gel de agarosa y la RT-LAMP que por motivos de rapidez se leen en tubos mediante inspección visual. Lo anterior es de utilidad debido a que la RT-LAMP destaca porque es una prueba más rápida que la RT-qPCR y ayuda a comprender porque la RT-LAMP es una propuesta alternativa a la detección del virus [54-56].

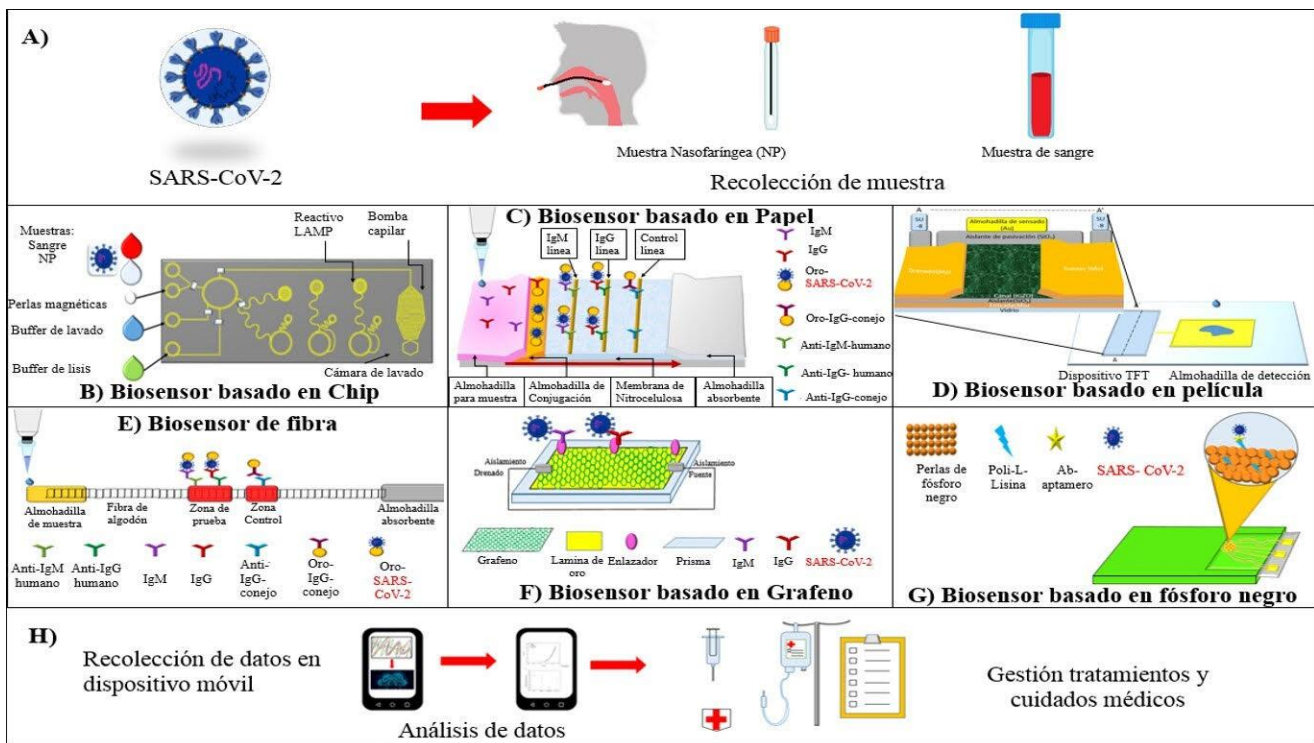


Figura 2. La comparación de las metodologías RT-qPCR y RT-LAMP. Figura basada en [54-56].

Métodos de detección serológica del SARS-CoV-2 en pacientes enfermos de COVID-19

La reciente aparición del SARS-CoV-2 ha dado lugar a una rápida proliferación de ensayos serológicos, que son herramientas cruciales para evaluar la exposición, la infección y la interacción de las proteínas humanas con los componentes estructurales del SARS-CoV-2. Y para encontrar la posible respuesta inmune humana a los componentes moleculares virus (incluidos los estudios de seroprevalencia y la determinación del estado inmunológico) [57]. Su uso e interpretación adecuados requieren de datos precisos sobre el rendimiento de los ensayos serológicos [57, 58].

En el inicio de la pandemia surgieron muchos ensayos serológicos, pero la FDA no reguló los permisos para utilizarlos, lo que resultó en una rápida expansión de las pruebas para detectar el virus en un ambiente clínico. Por lo que la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) sugirió que la serología puede ser útil en: (1) pacientes sospechosos posiblemente infectados con el SARS-CoV-2, (2) en la selección de donantes de plasma convaleciente, (3) en la evaluación de la respuesta a vacunas, y (4) en estudios epidemiológicos [57]. Por otro lado, se ha reportado que varias pruebas de este tipo, tienen desventajas porque son deficientes ya que

requieren un buen tamaño de muestra, además de que se dificulta determinar la asociación entre la respuesta de los anticuerpos y el historial clínico de una persona enferma de COVID-19. Por lo anteriormente expuesto se recomienda realizar estudios con poblaciones más grandes [39, 57]. También, se requiere incluir estudios sobre evaluaciones que cubran el espectro completo de infecciones por el SARS-CoV-2, como: las infecciones asintomáticas, las infecciones leves, los pacientes con enfermedad grave y convalecientes. Por lo que, es necesario crear estudios bien diseñados, para dilucidar los mecanismos que se correlacionan con la inmunidad protectora, siendo cruciales para orientar las políticas de salud pública y clínica [59].

Se tienen estudios de pruebas de detección de anticuerpos por medio de la cuantificación de las inmunoglobulinas IgG e IgM humanas en respuesta a los componentes estructurales del SARS-CoV-2, que estuvieron disponibles a partir de febrero del 2020. Para el 4 de marzo del 2020, se publicó la séptima edición del Protocolo de Prevención y Control de Neumonía para establecer que el nuevo coronavirus era el responsable de la enfermedad de COVID-19 gracias a los estudios serológicos combinados con las metodologías de detección como la RT-qPCR. También, la Comisión

Nacional de Salud de la República Popular de China estableció que los criterios de diagnóstico serológico fueron transmitidos por la OMS para los demás países [45, 60].

Por lo tanto, el monitoreo de la concentración de inmunoglobulinas IgM e IgG fue considerado por la FDA y la OMS como una herramienta complementaria válida para la detección del SARS-CoV-2. Esta técnica ha sido empleada como método de serodiagnóstico de la neumonía por el COVID-19. Se conoce que no es la más empleada debido a que en ocasiones puede dar reacciones cruzadas, y también falsos positivos, pero es de gran utilidad en el ambiente hospitalario [33, 37, 61]. Además, el diagnóstico serológico es especialmente utilizado en pacientes con enfermedad leve a moderada y es ampliamente utilizado para diagnosticar la enfermedad del COVID-19 después de las primeras 2 semanas de la infección por el virus. Otra utilidad del método serológico es que ha ayudado a comprender el alcance del COVID-19 en las distintas regiones del mundo, con la intención de identificar a las personas inmunes y potencialmente “protegidas” contra la infección del SARS-CoV-2. Sin embargo, no es un método de detección temprana, por lo que los resultados en algunos casos fueron obtenidos en un rango de 11-13 días, observando un máximo porcentaje de respuesta de la IgG e IgM después

de presentar los síntomas del COVID-19. El método ha sido probado en edades de 48-68 años en ambos géneros; produciéndose niveles más altos de inmunoglobulinas en la segunda y tercera semana de presentar los síntomas de la enfermedad [39].

También, se ha demostrado que durante un monitoreo de 19 días posterior al inicio de los síntomas de la enfermedad del COVID-19, los pacientes dan positivo a la prueba de la IgG. Igualmente, se observó que hubo un cambio simultáneo y secuencial en la seroconversión de IgG e IgM, observando que la concentración de ambas inmunoglobulinas se estabilizó 6 días posteriores de administrar antivirales. Por lo que las pruebas serológicas pueden ser útiles para el diagnóstico de pacientes sospechosos con resultados negativos de RT-qPCR y para la identificación de infecciones asintomáticas [39].

Por otro lado, se ha reportado el perfil de respuesta específica de las proteínas del SARS-CoV-2 al interactuar con las IgG e IgM humana. Observando que 18 a 28 proteínas predichas del virus interactúan con las inmunoglobulinas a partir de muestras de suero obtenidas de pacientes convalecientes. Encontrando que, todos estos pacientes tenían la característica principal que sus anticuerpos se unían específicamente a la proteína N y S1. Además, se identificaron respuestas de

significativas de los anticuerpos a la proteína no estructural ORF9, que puede participar en la replicación viral, actuando como una proteína de unión al ARN, además se observó que la proteína NSP5 es responsable de las escisiones ubicadas en el extremo N de la poliproteína replicasa (3CL-PRO), y que también interactuaba con las inmunoglobulinas. Finalmente, se observó en los mismos pacientes, que había una correlación positiva con la edad y el nivel del lactato deshidrogenasa (LDH), y se correlaciona negativamente con el porcentaje de linfocitos en respuesta al virus [58].

Otros estudios han permitido determinar si las personas infectadas con SARS-CoV-2 desarrollarán inmunidad a largo plazo, una vez que se han repuesto a la infección. Motivo por el cual se ha explorado la idea de monitorear el anticuerpo IgG contra el SARS-CoV-2 en algunos grupos de personas infectadas. Encontrando que, después de la infección por el virus, es poco probable que las personas produzcan anticuerpos protectores duraderos contra este virus. Lo cual fue comprobado en un ambiente hospitalario al observar la prevalencia de los anticuerpos IgM en presencia del virus en pacientes COVID-19 y se observó que la IgG aumentaba significativamente con la edad de las personas [62].

Actualmente, existe una gran variedad de

pruebas para detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2, por medio de hisopos a partir de pruebas de las mucosas. Hasta ahora, se informan 11 pruebas diagnósticas para el COVID-19, que se basan principalmente en pruebas moleculares y anticuerpos. Varios grupos de investigación y empresas están tratando de desarrollar pruebas de anticuerpos que incluyen inmunoensayos de flujo lateral como la prueba rápida de BioMedomics, y el casete de prueba rápida de Surescreen, el inmunoensayo de fluorescencia de resolución temporal como el kit de diagnóstico de Goldsite, el inmunoensayo de oro coloidal, de los cuales los más utilizados son el kit Assay Genie POC y VivaDiag COVID-19 que son pruebas de IgG-IgM y finalmente se reportaron las pruebas ELISA. Otros autores reportaron el uso de 2 diferentes ensayos serológicos como de Abbott y EUROIMMUN (EI), ambos probados en 48 pacientes confirmados positivos a la infección por SARS-CoV-2. Los kits tienen la finalidad de dar a conocer sobre la sintomatología relacionada con las pruebas serológicas, obteniendo que ambos ensayos detectan los componentes moleculares del virus. Pero son poco sensibles durante los primeros 14 días de la sintomatología, por lo que se sugiere no utilizar los kits de ensayo serológico destacando que poseen problemas de detección [57].

Si bien existe una gran variedad de pruebas de anticuerpos disponibles en el mercado, hay mucha confusión con respecto a la eficacia de tales pruebas dado el alto porcentaje de la población asintomática y el hecho de que los anticuerpos que son detectables en general se desarrollan posteriormente de la enfermedad. Por lo tanto, las propuestas de enfoques de diagnóstico serológico deberán describir su novedad en términos de proceso, sensibilidad, especificidad y escalabilidad [63].

Uso de biosensores para detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2

Un biosensor es definido por la IUPAC como un dispositivo con la habilidad de proveer información analítica cuantificable, mediante el uso de elementos de reconocimiento biológico acoplado a un sistema transductor [64]. Otra definición, señala a los biosensores como una herramienta analítica que incorpora la combinación de un elemento biológico (que crea un evento de reconocimiento), y un elemento físico (que transduce el evento de reconocimiento en una señal cuantificable). Es así como el elemento biológico (una biomolécula o analito), es detectado por especificidad, y el transductor convierte el evento de reconocimiento en una señal medible [65]. Por lo que esta técnica es ampliamente utilizada para detectar los componentes

moleculares del SARS-CoV-2 mediante métodos sencillos, de bajo costo, sensibles y escalables [63].

Por otro lado, los biosensores tienen inmensas perspectivas en el desarrollo de diagnósticos fiables y asequibles, especialmente en países en desarrollo y recursos limitados [66]. En cuanto a legislación la OMS validó muchos biosensores y ensayos comerciales para la detección del SARS-CoV-2 a partir de muestras de pacientes sospechosos y enfermos de COVID-19 [63].

En el momento actual de la pandemia los biosensores han resultado de utilidad porque pueden detectar la presencia del SARS-CoV-2. Pueden hacerlo mediante una sinergia con las herramientas moleculares y la detección de señales por medio de sensores como: los biosensores colorimétricos ópticos (fluorescentes), los electroquímicos (potenciométricos y amperométricos), y los biosensores basados en aptámeros [67-70].

En general, los biosensores son dispositivos fáciles de emplear, sensibles, que ahorran costos y pueden proporcionar una alta precisión en la detección de virus. El uso de los biosensores es una tecnología y herramienta efectiva en la investigación del SARS-CoV-2. Es una tecnología eficiente para el diagnóstico de COVID-19, detectando los elementos estructurales del virus en personas enfermas; y

además ayuda en la búsqueda de inhibidores del virus. Por lo anterior, se ha propuesto su uso en un ambiente hospitalario para la detección del SARS-CoV-2 como un método de rutina [71]. Algunos ejemplos de biosensores relacionados con la detección e identificación de los inhibidores del SARS-CoV-2 se describen a continuación: (i) El biosensor de plasmón de superficie localizado (PSL) acoplado a fluorescencia, cuyo mecanismo se basa en combinar un inmunoensayo tipo sándwich, con la técnica PSL con la finalidad de detectar la proteína N del SARS-CoV-2. Las ventajas del biosensor son: que es fácil de operar, es sensible, cuantitativo y se puede utilizar para el diagnóstico precoz de enfermedades clínicas [72]. (ii) El biosensor basado en luciferasa, se basa en la detección de las proteínas papain-like y la proteasa 3C-Like del SARS-CoV-2 y su identificación se hace por medio de un fluorómetro [73]. (iii) El biosensor de plasmón con doble función es capaz de detectar los compuestos del coronavirus basándose en una hibridación de cDNA-RNA que es detectada por resonancia de plasmones. Las secuencias virales que detecta este biosensor son: la proteína de M, la proteína N y la proteína S. Cabe agregar que las ventajas de este biosensor son: que es sensible, rápido, útil para el diagnóstico de la detección del SARS-CoV-2, censa en tiempo real y ayuda a mejorar la

precisión de un diagnóstico en el ambiente hospitalario [74, 75]. (iv) El biosensor basado en transistores de efecto de campo (FET), cuyo principio se basa en recubrir láminas de grafeno del FET, con un anticuerpo específico contra alguna proteína del SARS CoV-2, como ejemplo: la proteína S, la cual puede ser detectada por el biosensor. Las ventajas del biosensor son: que es un método de diagnóstico inmunológico altamente sensible para el SARS-CoV-2, que no requiere pretratamiento de la muestra, detecta en tiempo real, es ultrasensible, de bajo costo y con capacidad de miniaturización [70]. (v) El biosensor basado en RT-PCR combinada con 3 sensores de nanopartículas, el cual es capaz de ensamblarse al dominio de unión de la proteína S del SARS-CoV-2, por medio de anticuerpos [76]. (vi) Los biosensores basados en papel han atraído la atención por: su rentabilidad, facilidad de fabricación, biodegradabilidad, funcionalidad y fácil modificación. Con estas características, pueden realizar pruebas rápidas de diagnóstico en lugares lejanos. Las tiras de papel de flujo lateral, en particular, se han utilizado ampliamente para la detección de pacientes sospechosos y enfermos por COVID-19. Están diseñados para detectar IgG e IgM en muestras de sangre, suero y plasma del paciente. Cada tira reactiva generalmente consta de: (1) una almohadilla de muestra para agregar las

muestras del paciente, (2) una almohadilla que contiene antígeno contra el SARS-CoV-2 conjugado con nanopartículas de oro, formando un complejo de oro-SARS-CoV-2, y también contiene complejo IgG de conejo-oro (control), (3) una membrana de nitrocelulosa que consta de una línea de control recubierta con anti-IgG de conejo, (4) una línea de prueba recubierta con IgG anti-humana, (5) una línea de prueba recubierta con IgM anti-humana y (4) una almohadilla que absorbe los desechos. El mecanismo del biosensor se basa en registrar la presencia de IgM o IgG obtenida a partir de las muestras de los pacientes, observado que los anticuerpos reaccionan con el antígeno oro-SARS-CoV-2 para formar un complejo, que se mueve a través de la membrana de nitrocelulosa e interactúa con el anti-IgM o IgG en sus respectivas líneas de prueba. Por otro lado, el complejo IgG de conejo reacciona con la IgG anti-conejo que se encuentra en la línea de control para producir un color rojo visible como resultado. También, los resultados de la IgM positiva y una IgG negativa se pueden observar en ambas líneas e indican una infección primaria o aguda. Mientras que, una IgG positiva con una IgM negativa muestra una etapa secundaria o posterior de la infección [67]. (vii) El biosensor de Zhu y cols., es utilizado para la detección de los compuestos moleculares del SARS-CoV-2. Para realizar la

detección primero se realiza la extracción de ARN a partir de muestras de personas sospechosas de estar infectadas. Posteriormente de realizar una RT-LAMP, la muestra se pasa a un chip de detección, en el cual se encuentran anticuerpos adheridos a una superficie que ayudan a detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2. La presencia positiva de estos es revelada por medio de un colorante indicador rojo carmesí, que se encuentra cubierto por unas nanopartículas que interacciona con los componentes del virus: en este caso particular, la proteína M, la proteína N y la proteína S. Esta técnica se caracteriza porque es sensible, se realiza en un solo paso, los resultados del diagnóstico son fáciles de interpretar y de bajo costo [77]. (vii) Además, se ha desarrollado un biosensor electroquímico que detecta el ARN/cADN viral. Es un método propuesto para el diagnóstico de COVID-19, que utiliza un microcontrolador “Arduino UNO”, en su sistema de detección o sensor que recupera los datos amperimétricos. El biosensor permite el uso de tabletas y teléfonos inteligentes para comunicarse por medio de WiFi y una pantalla led compatible con Arduino para visualizar datos, lo anterior para facilitar del diagnóstico portátil y el desarrollo de sensores miniaturizados [78]. (viii) Asimismo, se han desarrollado herramientas biosensoras para demostrar la contaminación

del aire con el SARS-CoV-2, como un prototipo de respuesta a los riesgos para la salud tras el brote de la epidemia [79]. (ix) Otros autores, reportan un sistema sensor basado en LoT (Internet of Things, por sus siglas en inglés), que se lleva en la mano y sirve para detectar y diagnosticar personas infectadas por medio de un dispositivo que lleva un sensor de temperatura, frecuencia cardiaca (diseñados en una placa Arduino) y posicionamiento GPS para registrar y recuperar datos. Con el objetivo de enviar predicciones a los familiares y al Sistema Nacional de Salud (SNS), para apoyar en el reporte de casos y los enfermos y familiares sean contactados lo antes posible para realizar la prueba de detección del virus. El sistema ha sido probado en 300 personas sugiriendo utilizar Lot como estrategia para evitar la propagación del virus. Este tipo de biosensores está clasificado como de punto de atención o POC [80]. (x) Otro reporte indica la creación del sistema biosensor que tiene la finalidad de detectar citocinas en la sangre, para cuantificar y comprender el proceso de la tormenta de citocinas [28]. (xi) En este orden de ideas se puede citar un biosensor el cual se ha diseñado modificando la membrana celular de mamíferos, con un anticuerpo a base de la proteína S1 del SARS-CoV-2, un biosensor conocido como “un anticuerpo quimérico humano”. El biosensor se caracteriza porque es

selectivo, ultrarrápido (3 min) y con un límite de detección de 1 fg/m, no se han observado reacciones cruzadas contra la proteína N del SARS-CoV-2. Además, el biosensor se configuró en una plataforma lista para usar, incluye un dispositivo de lectura portátil operado por medio de un teléfono inteligente o tableta. De esta manera, el biosensor se puede utilizar en el ambiente hospitalario para hacer cribados de antígenos de superficie que detectan algunos componentes moleculares del SARS-CoV-2 sin procesamiento previo de las muestras, ofreciendo una posible solución al monitoreo oportuno y eventual para el control de la pandemia actual [81]. (xii). Por otro lado, se ha propuesto la detección del SARS-CoV-2 por medio de una tecnología de vanguardia que utiliza el enfoque de la biología sintética *in vitro* mediante el diseño de riborreguladores sintéticos de novo. Con la finalidad de detectar la presencia de genes relacionados con el SARS-CoV-2, desencadenando la traducción de ARNm de la proteína verde fluorescente (sfGFP), lo que da como resultado la salida de fluorescencia verde para detectar visualmente el virus y cuantificar la señal. Siendo un

biosensor de diagnóstico fácil de ejecutar y de bajo costo [82]. Así mismo, se ha encontrado que el uso de nanoestructuras avanzadas diseñadas a partir de materiales orgánicos puede mejorar la sensibilidad y la especificidad. En resumen, hay que destacar que existen muchos métodos de detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2, que son efectivos y se basan en varias plataformas y tecnologías. A continuación, en la figura 3 se muestra la metodología de los biosensores más usados para la detección del SARS-CoV-2 a partir de muestras de personas enfermas de COVID-19 (Figura 3A) [67, 72, 83, 84].

También, se incluyen los biosensores POC, como el biosensor basado en chip (Figura 3B), en papel (Figura 3C), en película (Figura 3D), en fibra (Figura 3E), en grafeno (Figura 3F), en fósforo negro (Figura 3G) y finalmente, la forma de recolectar datos mediante un celular o tablet (Figura 3H) para obtener datos estadísticos e informar directamente sobre un caso de enfermedad COVID-19 [67, 72, 83, 84].

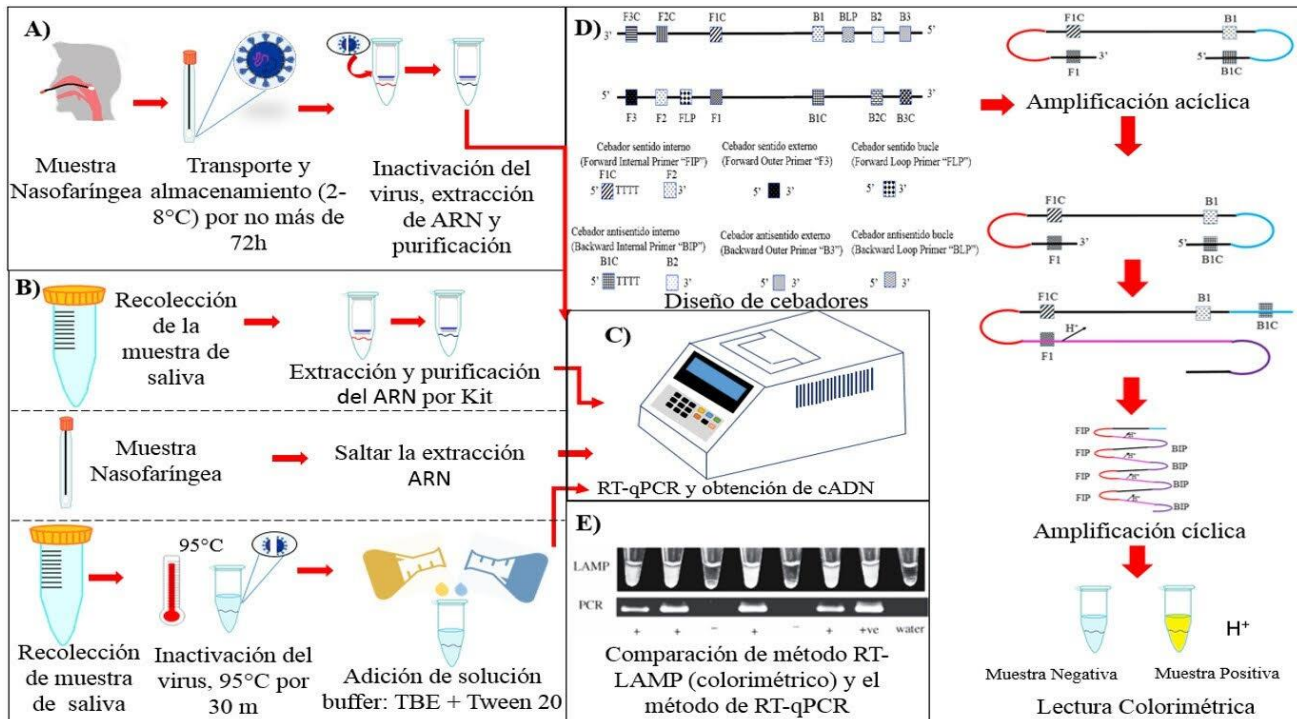


Figura 3. Los diferentes biosensores del tipo POC utilizados en la detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 y el diagnóstico médico del COVID-19. Imagen basada en [67, 72, 83, 84].

Biosensores basados en aptámeros para la detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2

Los aptámeros se acuñaron en 1990 a partir de la palabra 'aptus' (una palabra latina que significa "encajar"). En general los aptámeros se pueden diseñar específicamente mediante la activación o la modificación de una superficie mediante tratamiento químico para inducir enlaces y sitios de acoplamiento a biomoléculas. Las principales características de los aptámeros son la alta reproducibilidad, la pureza, la estabilidad en condiciones ambientales adversas, la gran capacidad de unión con biomoléculas, y son poderosas herramientas moleculares para la detección y el

diagnóstico de algunos virus [69].

Además, los aptámeros se han propuesto para la identificación de virus con alta afinidad mediante un sistema aptasensor. Así mismo, se ha encontrado que el uso de nanoestructuras avanzadas diseñadas a partir de materiales orgánicos, pueden mejorar la sensibilidad y la especificidad para diagnosticar algunos virus. Esperando reducir los efectos de los factores de interferencia en los aptá-sensores para detectar virus en general [63].

Los aptámeros son conocidos como sondas biológicas multipotentes, aunque por definición son secuencias de ácidos nucleicos como (DNA y RNA) e incluso péptidos que son dirigidos a los compuestos moleculares del SARS-CoV-2.

Como ejemplo, la proteína N que es una biomolécula estructural abundante en el virus. El aptámero detecta el virus por medio de un marcador de diagnóstico, con precisión y alta sensibilidad en pacientes sospechosos y enfermos de COVID-19 [69, 76, 85].

Una de las características generales de los aptámeros es que deben poseer una afinidad a la biomolécula blanco por debajo de los 5 nM [76]. También, han demostrado que los aptámeros son candidatos bivalentes para el diagnóstico y el descubrimiento de algunas terapias antivirales [76, 85]. Además, destacan porque son herramientas moleculares poderosas para la detección del SARS-CoV-2 y el diagnóstico del COVID-19 [76].

La técnica de detección del virus por medio de aptámeros, consiste en utilizar algunos pares de aptámeros que pueden unirse a la proteína N del SARS-CoV-2. Lo que sugiere una interacción tipo sándwich, que mediante la técnica ELISA y tiras inmunocromatográficas de oro coloidal, se puede detectar la concentración de la proteína N en picomoles (pM) [76].

Finalmente, se reportan los aptámeros denominados “Pinpoint”, que han sido diseñados para la detección del SARS-CoV-2, los cuales se encuentran en etapa de desarrollo, pero se sabe que brinda resultados en menos de 1 min, lo cual es un gran avance en la detección de los compuestos moleculares del virus en

pacientes sospechosos y enfermos de COVID-19 por medio de los aptámeros [69].

Detección de los componentes moleculares del SARS-CoV-2 por medio de polímeros moleculares impresos (PIM)

En vista de las circunstancias imperantes en todo el mundo por la pandemia actual, es evidente que existe una gran demanda de un kit de prueba para detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2. Estos métodos deben poseer una alta selectividad, sensibilidad, ser relativamente económicos, robustos, fácil de usar y reproducibles. Resultando en tratamientos tempranos de los pacientes infectados [63, 86]. Si bien, se han desarrollado una gran variedad de bioensayos y biosensores, todavía se requieren biosensores de bajo costo, desechables o reutilizables que puedan detectar rápidamente y con precisión los componentes moleculares del virus. Por lo que, el uso de la tecnología PIM es una alternativa como elemento de biorreconocimiento [63, 86].

Por definición los PIM, son receptores sintéticos que tienen sitios de reconocimiento a los componentes moleculares del SARS-CoV-2; siendo complementario a la forma y orientación de la una molécula diana perteneciente al virus para la cual fue diseñada [63, 86].

Por lo que, la impresión de biomoléculas

incluidos los péptidos, las proteínas, los virus completos o partes de ellos implica grandes desafíos [87].

En general los PIM deben pasar ciertas pruebas de calidad como: (i) la caracterización en términos de tamaño y distribución de las partículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y (ii) el efecto de impresión y la selectividad de las moléculas. Esta última prueba consiste en realizar experimentos de unión utilizando los dominios de unión a los componentes del virus mediante ensayos *in silico* e *in vitro*. Y en el caso de los anticuerpos basados en PIM se hace una última prueba de hemocompatibilidad [87].

Una de las ventajas clave de los PIM son la alta selectividad, la estabilidad a largo plazo y la rentabilidad. Los PIM se usan a menudo para la detección selectiva de virus, son sensibles y distinguen entre los subtipos del coronavirus [63].

El mecanismo de detección de los PIM consiste en diseñar y sintetizar un polímero, que es afín a alguna biomolécula del SARS-CoV-2, y utilizar un electrodo cubierto con una capa del polímero formando una cavidad para que la biomolécula del SARS-CoV-2 se acople y sea detectada por el biosensor [63]

También, se ha desarrollado una técnica complementaria basada en anticuerpos monoclonales fabricados a partir de

biomateriales poliméricos, basándose en la tecnología PIM. Donde la síntesis del PIM implica la polimerización de monómeros funcionales alrededor de la plantilla elegida, que luego se extrae, lo que da como resultado una red polimérica porosa caracterizada por la presencia de cavidades de unión que se ajustan al tamaño, la forma y las funcionalidades de los compuestos moleculares de un virus. Además, como son materiales sintéticos, los PIM son fisicoquímicamente estables en una amplia gama de condiciones, son de bajo costo, reproducibles y de fácil preparación. Dadas estas características, los PIM pueden recomendarse como una alternativa válida a los anticuerpos convencionales que han sido propuestos para detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2 [87].

Otra función de los PIM es que a futuro podrían utilizarse como agentes terapéuticos en el tratamiento de del COVID-19 [87].

Por otro lado, se reporta el sensor monoclonal basado en PIM reportado por Puoci y cols., cuyo principio de la detección consiste en que los anticuerpos son capaces de unirse de manera selectiva a una porción de la proteína S del SARS-CoV-2 para bloquear su función y, por lo tanto, el proceso de infección [87].

También, el biosensor propuesto por Wang y cols., se caracteriza porque está basado en polímeros de nanopartículas que tienen buena

estabilidad química; las nanopartículas son fotoestables y poseen propiedades ópticas controlables. Finalmente, las nanopartículas fluorescentes se han utilizado ampliamente en el diseño de los PIM, como sondas destinadas para diversas aplicaciones. Entre ellas, el diagnóstico molecular de patógenos como virus que ha sido adoptado en análisis médicos y biológicos, en ambiente hospitalario, demostrando su utilidad [88].

CONCLUSIONES

Los métodos de diagnóstico *in vitro* enfocados en la detección del patógeno humano SARS-CoV-2 han cambiado significativamente con el desarrollo y la disponibilidad de las nuevas tecnologías descritas. Tras la revelación de la pandemia actual, estos métodos fueron probados en pacientes enfermos experimentales, dentro de la unidad de cuidados intensivos con la finalidad de obtener información, facilitar la identificación del virus y proseguir con el tratamiento de los pacientes COVID-19.

Esta revisión es una descripción resumida de las técnicas usadas para el diagnóstico por infección de SARS-CoV-2, como: la RT-qPCR, la RT-LAMP y algunas plataformas modernas basadas en biosensores que detectan los componentes moleculares del virus en la actual pandemia. En conclusión, la RT-qPCR es una

metodología reconocida como el estándar de oro para el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2. Además, la RT-LAMP es una técnica colorimétrica rápida y alternativa que es comparable con la RT-qPCR, en la cual puede leerse el resultado en forma más rápida demostrando su eficacia en la detección del virus. Por otro lado, los biosensores son otras propuestas para encontrar una forma eficaz de detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2. Las ventajas de algunos biosensores son que facilitan la detección inmediata del virus, son portátiles, poseen la capacidad de miniaturización, son ultrasensibles y baratos. Algunas desventajas de los biosensores son que en algunos casos requieren mayor maquinaria y capital, en comparación con otras técnicas de identificación como las técnicas serológicas y RT-qPCR.

Por otro lado, hay algunos ejemplos de biosensores utilizados para la detección del SARS-CoV-2 conocidos como de punto de atención o POC que se utilizan para obtener datos estadísticos, para ayudar a informar sobre personas enfermas y prevenir la propagación de la enfermedad; sugiriendo su aplicación en un entorno hospitalario para prevenir la propagación del SARS-CoV-2. Algunos ejemplos de estos biosensores son: (i) los ensayos de biosensores ópticos (fluorescentes),

(ii) los biosensores electroquímicos (potenciométricos y amperométricos), (iii) los biosensores de papel, y (iv) aquellos que utilizan sensores Lot con tecnología Arduino. Además, se ha implementado el uso de nanomateriales en tecnología como los aptasensor para su uso bivalente en la hibridación de ácidos nucleicos para detectar los componentes moleculares del SARS-CoV-2. Asimismo, son escasos los reportes encontrados sobre el uso de aptámeros para su uso como candidatos para diagnosticar y descubrir terapias antivirales contra el virus. Finalmente, a la fecha la tecnología PIM es la única propuesta para la detección del SARS-CoV-2 que no se ha logrado experimentar en pacientes infectados, pero existen experimentos *in vitro* que comprueban su utilidad y efectividad en la búsqueda del virus, causante de la actual pandemia.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

[1]. Fiorino S, Zippi M, Gallo C, Sifo D, Sabbatani S, Manfredi R, Leandri P. The rationale for a multi-step therapeutic approach based on antivirals and drugs with

immunomodulatory activity in patients with coronavirus-SARS2-induced disease of different severity. Preprint. 2020:1-18.

[2]. Ling CQ. Traditional Chinese medicine is a resource for drug discovery against 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2). *J Integr Med.* 2020;18(2): 87-88.

[3]. Vellingiri B, Jayaramayya K, Iyer M, Narayanasamy A, Govindasamy V, Giridharan B, Ganesan S Venugopal A, Venkatesan D, Ganesan H, Rajagopalan K, Rahman PKSM, Cho SG, Kumar NS, Subramaniam MD. COVID-19: A promising cure for the global panic. *Sci Total Environ.* 2020; 725:1-19.

[4]. Smith TR, Patel A, Ramos S, Elwood D, Zhu X, Yan J, Xu Z. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat Commun.* 2020; 11(1):1-13.

[5]. Sitio web de la Universidad Johns Hopkins. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Revisado el 23 de agosto 2020.

[6]. Talebian S, Wallace GG, Schroeder A, Stellacci F, Conde J. Nanotechnology-based disinfectants and sensors for SARS-CoV-2. *Nat Nanotechnol.* 2020; 15: 618–621.

[7]. Sitio web de la ONU. Disponible en: <https://coronavirus.onu.org.mx/>). Revisado el 17 de octubre de 2020.

[8]. Méndez-Arriaga F. The temperature and

regional climate effects on communitarian COVID-19 contagion in Mexico throughout phase 1. *Sci Total Environ.* 2020; 735:1-23.

[9]. Suárez V, Quezada MS, Ruiz SO, De Jesús ER. Epidemiology of COVID-19 in Mexico: from the 27th of February to the 30th of April 2020. *Rev Clín Esp (English Edition).* 2020:1-8.

[10]. Berumen J, Schmulson M, Alegre J, Guerrero G, Olaiz G, Wong-Chew RM. Risk of infection and hospitalization by COVID-19 in México: a case-control study. *MedRxiv.* 2020:1-26.

[11]. Hernández-Garduño E. Obesity is the comorbidity more strongly associated for COVID-19 in México. A case-control study. *Obes Res Clin Pract.* 2020;14(4):375–379.

[12]. De León-Martínez LD, Palacios-Ramírez A, Rodríguez-Aguilar M, Flores-Ramírez R. Critical review of social, environmental and health risk factors in the mexican indigenous population and their capacity to respond to the COVID-19. *Sci Total Environ.* 2020; 733:1-6.

[13]. Mendez-Dominguez N, Alvarez-Baeza A, Carrillo G. Demographic and Health Indicators in Correlation to Interstate Variability of Incidence, Confirmation, Hospitalization, and Lethality in Mexico: Preliminary Analysis from Imported and Community Acquired Cases during COVID-19 Outbreak. *Int J Environ Res*

Public Health. 2020;17(12):1-11.

[14]. Rosales-Mendoza S. Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19?. *Expert Opin Biol Ther.* 2020; 20(6):545–548.

[15]. Block P, Hoffman M, Raabe IJ, Dowd JB, Rahal C, Kashyap R, Mills MC. Social network-based distancing strategies to flatten the COVID-19 curve in a post-lockdown world. *Nat Hum Behav.* 2020; 4:588–596.

[16]. Acuña-Zegarra MA, Santana-Cibrian M, Velasco-Hernández JX. Modeling behavioral change and COVID-19 containment in Mexico: A trade-off between lockdown and compliance. *Math Biosci.* 2020; 325:1-10.

[17]. Qiu Y, Wu D, Ning W, Zhang J, Shu T, Huang C, Li R. Postmortem tissue proteomics reveals the pathogenesis of multiorgan injuries of COVID-19. *Res square.* 2020:1-23.

[18]. Sitio web de biorrender. Disponible en: <https://biorender.com/covid-vaccine-tracker/details/v-0CV3/bacille-calmette-guerin-bcg>. Revisado el 15 de junio 2020.

[19]. Huang L, Zhang X, Zhang X, Wei Z, Zhang L, Xu J. 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.* 2020a;80(6):1-13.

[20]. Santiago I. Trends and innovations in biosensors for COVID-19 mass testing. *ChemBioChem.* 2020; 21:1-11.

[21]. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020:1-5.

[22]. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique, R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020. 24: 91-98.

[23]. Michalska K, Kim Y, Jedrzejczak R, Maltseva NI, Stols L, Endres M, Joachimiak A. Crystal structures of SARS-CoV-2 ADP-ribose phosphatase (ADRP): from the apo form to ligand complexes. *bioRxiv.* 2020:1-24.

[24]. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, Duan Y. Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020; 582:1-24.

[25]. Gao Y, Yan L, Huang Y, Liu F, Zhao Y, Cao L, Ge J. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Sci.* 2020;368(6492):779-782.

[26]. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):81-292.

[27]. Ben-Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M. Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 26:1248-1253.

[28]. Russell SM, Alba-Patiño A, Baron E, Borges M, González-Freire M, de la Rica, R. Biosensors for managing the COVID-19 cytokine storm: challenges ahead. *ACS Sensors.* 2020; 5:1506–1513.

[29]. Dashraath P, Jeslyn WJL, Karen LMX, Min LL, Sarah L, Biswas A. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2020:521-531.

[30]. Ranoa DRE, Holland RL, Alnaji FG, Green KJ, Wang L, Brooke CB, Burke MD. Saliva-based molecular testing for SARS-CoV-2 that bypasses RNA extraction. *BioRxiv.* 2020:1-35.

[31]. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, Choi GKY. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2020:58(5);1-33.

[32]. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting

the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(5):453-454.

[33]. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020 323(22):2249-225.

[34]. Zhou Y, Guo S, He Y, Zuo Q, Liu D, Xia, M. COVID-19 is distinct from SARS-CoV-2-negative community-acquired pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10 (322):1.

[35]. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. *Radiol.* 2020; 296: 32–40.

[36]. Yang W, Yan F. Patients with RT-PCR-confirmed COVID-19 and normal chest CT. *Radiol.* 2020;295(2):1.

[37]. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, Zhang Y. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* 2020: 92(9):1518-1524.

[38]. Yuan J, Kou S, Liang Y, Zeng J, Pan Y, Liu L. PCR assays turned positive in 25 discharged COVID-19 patients. *Clin Infect Dis.* 2020:1-12.

[39]. 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.

[40]. Duggan NM, Ludy SM, Shannon BC, Reisner AT, Wilcox SR. Is novel coronavirus 2019 reinfection possible? Interpreting dynamic SARS-CoV-2 test results through a case report. *Am J Emerg Med.* 2020:1-3.

[41]. Roy S. COVID-19 Reinfection: Myth or Truth?. *SN Comp Clin Med.* 2020:1-4

[42]. Sitio web de bnonews disponible en: <https://bnonews.com/index.php/2020/08/covid-19-reinfection-tracker/>. Revisado el 17 de octubre de 2020.

[43]. Lim J, Jeon S, Shin HY, Kim MJ, Seong YM, Lee WJ. Case of the index patient who caused tertiary transmission of COVID-19 infection in Korea: the application of lopinavir/ritonavir for the treatment of COVID-19 infected pneumonia monitored by quantitative RT-PCR. *J Korean Med Sci.* 2020;35(6):1-6.

[44]. Alzamora MC, Paredes T, Caceres D, Webb CM, Valdez LM, La Rosa M. Severe COVID-19 during pregnancy and possible vertical transmission. *Am J Perinatol.* 2020; 37(8): 861–865.

[45]. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, Long X. Antibodies in infants born to mothers with COVID-19 pneumonia. *JAMA.* 2020;323(18):1848-1849.

[46]. 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.

[47]. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 26:773-779.

[48]. Yang W, Dang X, Wang Q, Xu M, Zhao Q, Zhou Y. Rapid detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription RT-LAMP method. *MedRxiv.* 2020:1-25.

[49]. Kim H, Kang M, Park E, Chung DR, Kim J, Hwang ES. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *Biochip J.* 2019;13(4):341-351.

[50]. Park GS, Ku K, Baek SH, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, Maeng JS. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays targeting SARS-CoV-2. *J Mol Diagn.* 2020;22(6):729-735.

[51]. Wei S, Kohl E, Djandji A, Morgan S, Whittier S, Mansukhani M, Suh Y. Field-deployable, rapid diagnostic testing of saliva samples for SARS-CoV-2. *medRxiv.* 2020; 1-10.

[52]. Huang WE, Lim B, Hsu CC, Xiong D, Wu

W, Yu Y, Chang H. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb biotechnol.* 2020b;13(4):950-961.

[53]. Osterdahl M, Lee K, Ni Lochlainn M, Wilson S, Douthwaite S, Horsfall R. Detecting SARS-CoV-2 at point of care: Preliminary data comparing Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to PCR. *MedRxiv.* 2020:1-9.

[54]. Sánchez E, Nina M, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *CON-CIENCIA Farm y Bioq,* 2014;2(1):1125-138.

[55]. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, Peiris JM. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006;52(2), 303-306.

[56]. 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. *RNA.* 2020: 1-21.

[57]. San Tang M, Case JB, Franks CE, Chen RE, Anderson NW, Henderson JP. Association between neutralizing antibodies to SARS-CoV-

- 2 and commercial serological assays. *BioRxiv*. 2020:1-27.
- [58]. Jiang HW, Li Y, Zhang HN, Wang W, Yang X, Qi H. SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses. *Nat Commun*. 2020 ;11(1) :1-11.
- [59]. Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN. Test performance evaluation of SARS-CoV-2 serological assays. *MedRxiv*. 2020:1-28.
- [60]. Sitio web de la OMS. Disponible en: https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?gclid=Cj0KCQjw8rT8BRCbARIsALWiOvSvUyPINM7ZSZ7hRb48L_ULyvyXd4E_5_BYPuxhPT_1Ai9cyDmbaYaArOKEALw_wcB. Revisado en agosto 2020.
- [61]. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, Wei X. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020:1-5.
- [62]. Liu T, Wu S, Tao H, Zeng G, Zhou F, Guo F, Wang X. Prevalence of IgG antibodies to SARS-CoV-2 in Wuhan-implications for the ability to produce long-lasting protective antibodies against SARS-CoV-2. *MedRxiv*. 2020; 92:1518-1524.
- [63]. Jalandra R, Yadav AK, Verma D, Dalal N, Sharma M, Singh R. Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. *Biomed Pharmacother*. 2020; 129:1-10.
- [64]. Xu Z, Chen X, Dong S. Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices. *Trends Analyt Chem*. 2006;25(9):899-908.
- [65]. Pisoschi AM. Biosensors as bio-based materials in chemical analysis: a review. *J Biobased Mater Bio*.2013;7(1):19-38.
- [66]. Nag P, Sadani K, Mukherji S. Optical fiber sensors for rapid screening of COVID-19. *Trans of the Indian Nat Acad of Engr*. 2020;5(2):233-236.
- [67]. Choi JR. Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. *Front Chem*. 2020 ;8(517):1-10.
- [68]. Huang JC, Chang YF, Chen KH, Su LC, Lee CW, Chen CC, Chou C. Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in human serum using a localized surface plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2009b;25(2):320-325.
- [69]. Kumar R, Nagpal S, Kaushik S, Mendiratta S. COVID-19 diagnostic approaches: different roads to the same destination. *Virus Dis*. 2020;31(2):97-105.
- [70]. Seo G, Lee G, Kim MJ, Baek SH, Choi M, Ku KB, Kim SJ. Rapid detection of COVID-19

causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS nano*. 2020; 4:5135–5142.

[71]. Javaid M, Haleem A, Vaishya R, Bahl S, Suman R, Vaish A. Industry 4.0 technologies and their applications in fighting COVID-19 pandemic. *Diabetes Meta Syndr*. 2020;14(4):419–422.

[72]. Huang Y, Dong X, Liu Y, Li LJ, Chen P. Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities. *J Mater Chem*. 2011c; 21:12358-12362.

[73]. Kilianski A, Mielech AM, Deng X, Baker SC. Assessing activity and inhibition of middle east respiratory syndrome coronavirus papain-like and 3C-like proteases using luciferase-based biosensors. *J Virol*. 2013;87(21):11955-11962.

[74]. Sípová H, Zhang S, Dudley AM, Galas D, Wang K, Homola J. Surface plasmon resonance biosensor for rapid label-free detection of microribonucleic acid at subfemtomole level. *Anal Chem*. 2010; 82(24):10110-5.

[75]. Qiu G, Gai Z, Tao Y, Schmitt J, Kullak-Ublick GA, Wang J. Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS Nano*. 2020b 26;14(5):5268-5277.

[76]. Zhang X, Qi Q, Jing Q, Ao S, Esbin Zhang Z, Ding M, Zhang Z. Electrical probing of COVID-19 espicula protein receptor binding domain via a graphene field-effect transistor. *arXiv*. 2020b. 1-20.

[77]. Zhu X, Wang X, Han L, Chen T, Wang L, Li H, Mei X. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticles-based biosensor for diagnosis of COVID-19. *MedRxiv*. 2020:1-19.

[78]. Tripathy S, Singh SG. Label-free electrochemical detection of DNA hybridization: A method for COVID-19 diagnosis. *Trans of the Indian Nat Acad of Engr*. 2020; 25:1-5.

[79]. Laštovička-Medin G. Visualizing “coronavirus”: Engaging with invisible threats through prototyping air pollution demonstration tool with Arduino. In 2020 9th Mediterranean Conference on Embedded Computing (MECO). 2020;1-5.

[80]. Cacovean D, Ioana I, Nitulescu G. IoT System in diagnosis of COVID-19 patients. *Inform Econom*. 2020;24(2):75-89.

[81]. Mavrikou S, Moschopoulou G, Tsekouras V, Kintzios S. Development of a portable, ultra-rapid and ultra-sensitive cell-based biosensor for the direct detection of the SARS-CoV-2 S1 spike protein antigen. *Sensors*. 2020;20(11):1-12.

- [82]. Koksaldi IC, Ahan RE, Kose S, Haciosmanoglu N, Kehribar ES, Gungen MA. SARS-CoV-2 detection with de novo designed synthetic riboregulators. *MedRxiv*. 2020:1-9.
- [83]. Giouroudi I, Georgios K. Recent advances in magnetic microfluidic biosensors. *Nanom*. 2017;7(7):171.
- [84]. Wang YW, Chen TY, Yang TH, Chang CC, Yang TL, Lo YH, Huang JJ. Thin-Film Transistor-based biosensors for determining stoichiometry of biochemical reactions. *PLOS ONE*. 2016; 11(12):1-8.
- [85]. Torabi R, Ranjbar R, Halaji M, Heiat M. Aptamers, the bivalent agents as probes and therapies for coronavirus infections: A systematic review. *Mol Cell Probes*. 2020; 53:1-9.
- [86]. Chatterjee TN, & Bandyopadhyay, RA. Molecularly imprinted polymer-based technology for rapid testing of COVID-19. *Trans of the Indian Nat Acad of Engr*. 2020; 5:225–228.
- [87]. Puoci F. “Monoclonal-type” plastic antibodies for COVID-19 treatment: What is the idea?. *J Funct Biomater*. 2020;11(2):1-4.
- [88]. Wang YF, Pan MM, Yu X, Xu L. The recent advances of fluorescent sensors based on molecularly imprinted fluorescent nanoparticles for pharmaceutical analysis. *Curr Med Sci*. 2020;40(3):407-421.