



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Trabajo
de
Fin
de
Grado

Métodos diagnósticos para el SARS-CoV-2: una
revisión de la literatura

Métodos diagnósticos para o SARS-CoV-2: unha
revisión da literatura

Diagnostic procedures for SARS-CoV-2: a literature
review

Autor: Álvaro Villa Latas

Tutor: Carlos García Riestra

Cotutor: Germán Bou Arévalo

Departamento: Microbiología

Junio de 2021

Trabajo de Fin de Grado presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la
Universidad de Santiago de Compostela para la obtención del Grado en Medicina

INDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	4
2.1 Generalidades sobre el coronavirus SARS-CoV-2.....	5
3. Materiales y métodos.....	8
4. Objetivos.....	9
5. Métodos diagnósticos.....	9
5.1 RT-PCR.....	11
5.2 Técnicas antigénicas.....	16
5.3 Técnicas de anticuerpos.....	22
5.4 Cultivo viral.....	24
5.5 Tomografía computarizada.....	26
5.6 Ecografía pulmonar.....	29
5.7 Otras técnicas moleculares.....	35
5.7.1 Detección de material genético en aguas residuales.....	35
5.7.2 Sensores biológicos (Biosensors).....	36

5.8. Otras técnicas.....	40
6. Nuevas variantes y pruebas diagnósticas.....	42
7. Referencias.....	45

1. Resumen

El SARS-CoV-2 es una nueva cepa de coronavirus que apareció en China a finales del año 2019. Desde entonces se han ido desarrollando múltiples técnicas diagnósticas para conseguir su detección. Aunque a día de hoy el método diagnóstico de elección es la RT-PCR, han ido surgiendo otros métodos alternativos que la complementan e incluso expanden su capacidad, así como la información aportada. Desde los más conocidos como los tests de antígeno y los de anticuerpos hasta otros menos empleados o menos frecuentes como los biosensores y VOCs e incluyendo también las pruebas de imagen, en este artículo se analizan los pros y contras de cada uno de ellos, sus particularidades y sus ámbitos de aplicación. También se comenta el impacto que han tenido las nuevas variantes en cuanto al diagnóstico y que avances se han tenido que implementar para su identificación.

2. Introducción

El coronavirus es un tema que ha adquirido mucha relevancia tanto a nivel médico como a nivel socio-económico en el último año. A pesar de que se han realizado muchos avances a lo largo de esta pandemia para intentar esclarecer tanto mecanismos epidemiológicos como fisiopatológicos y de índole diagnóstico-terapéutica, hay muchos aspectos que a día de hoy permanecen desconocidos. Asimismo, se han conseguido realizar múltiples avances en

relación al diagnóstico de la enfermedad que han permitido mejorar considerablemente su detección respecto al inicio de la pandemia.

2.1 Generalidades sobre el coronavirus SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus RNA de la familia de los coronavirus, concretamente perteneciente a los β -coronavirus. Su genoma es muy similar a los otros coronavirus, siendo un 79,7% similar al SARS-CoV y un 90% y 96 % similar a los genomas del Pangolin-CoV y Bat-CoV, respectivamente (de ahí la hipótesis actual de su origen en el murciélago) (1).

Dentro de las proteínas más relevantes que tiene este virus tenemos la proteína S (con papel en la adhesión), la proteína N (que forma la nucleocápside), la proteína M (que conforma la matriz) y la E (que forma la pequeña envoltura). Existen más proteínas, así como dominios proteicos (como el NSP2 y 3) que podrían tener aplicación en la búsqueda de fármacos antivirales y antígenos vacunales (2).

El virus se transmite por una combinación de gotas y aerosoles, lo que le permite sobrevivir horas en el aire y días en las superficies. A pesar de ello, se ha demostrado que la infectividad en superficies disminuye a partir de la primera hora y es prácticamente nula a partir de los 4-5 días. Sin embargo, este no es el único mecanismo de transmisión, ya que también se ha observado transmisión por vía fecal-oral y por contacto directo (2,3,4).

Profundizando más en la cuestión de la propagación mediante aerosoles, este dilema ha ido esclareciéndose al ir avanzando la pandemia gracias a la aparición de múltiples estudios. Uno de ellos es el estudio de Santarpia et al. (2020), en el cual se analizaron 163 muestras (de aire y de superficies) de las habitaciones de 13 pacientes infectados. Todas estas habitaciones contaban con sistemas de presión negativa y las muestras se analizaron mediante RT-PCR. Del total de las muestras, 126 fueron positivas (lo que representa un 77.3%). Las muestras de aire fueron positivas en un 63.2% de los casos y las de superficies y objetos personales arrojaron resultados positivos en un 76.5%. La carga viral de las muestras se encontró que fue considerablemente variable, comprendiéndose entre 0-1.75 copias/ μ L. No fueron capaces de cultivar de manera efectiva las muestras, aunque la carga viral hallada en las muestras era baja. Una cuestión interesante es que solamente un 57.9% de los pacientes refirió la presencia de tos en los tres días previos a la obtención de las muestras, lo que refuerza la hipótesis de una importante capacidad de transmisión de los pacientes asintomáticos (5).

Retomando la patogenia, una vez que el virus entra en contacto con la mucosa del árbol respiratorio (y otras mucosas) se produce una etapa de adhesión mediada por la proteína S y el ECA2, empleando TMPRSS2 (una serin proteasa) como un facilitador de dicha unión, permitiendo disminuir mucho las cantidades de ECA2 necesarias para que ocurra.

Tras la adhesión, el virus entra en la célula y se libera su RNA, comenzando así la replicación viral, formándose glucoproteínas que se adhieren al aparato de Golgi y luego forman las partículas virales al unirse con la nucleocápside. Finalmente se produce la liberación de los nuevos virus. Entre los efectos fisiopatológicos, el virus tiene la capacidad de producir SDRA (síndrome de distress respiratorio del adulto), leucopenia, anomalías leucocitarias y una cascada de citokinas especialmente importante (L-2, IL-7, IL-10, G-CSF, TNF- α entre otros) (1). Se ha observado también capacidad de afectar al tracto gastrointestinal, así como a nivel dermatológico, neurológico así como otros fenómenos como miocarditis o trombosis, tratándose por tanto de una enfermedad no sólo pulmonar sino sistémica.

El periodo de incubación medio de la enfermedad es de unos 5-6 días. Desde el momento de contacto con el virus, el antígeno S comienza a ser detectable a partir de las 24 horas, mientras que el RNA vírico se detecta más tardíamente, alcanzando un pico a partir de los 4 días (3). Los anticuerpos son variables en esta enfermedad y aunque algunos pacientes presentan IgM al inicio que posteriormente cambia a IgG, esto no ocurre en otros, pero lo comentaremos en más detalle en el apartado correspondiente.

3. Materiales y métodos

Se realizaron múltiples búsquedas en el buscador de Pubmed así como en múltiples revistas (Nature, Journal of Clinical Virology, entre otras) y en webs como www.radiopedia.org para las cuestiones de técnicas de imagen. Dado que los artículos referentes al coronavirus son todos completos y gratuitos, no se necesitó realizar filtrado de esa cuestión. Se realizó revisión de 80 artículos predominantemente en inglés y en español, de los cuales 45 fueron seleccionados y el resto descartados por contener información no relevante a la búsqueda o por información repetida o desactualizada. Los términos de búsqueda incluyeron los referidos a las pruebas (PCR, RT-PCR, biosensor, antigen test, antibody test, screening, CT scan, LUS, entre otros) combinados con los del virus (SARS-CoV-2, coronavirus, novel coronavirus, COVID-19 y COVID), seleccionando revisiones, metanálisis y revisiones sistemáticas dando lugar a unos 3480 artículos de los cuales se revisaron 150 mediante la lectura de los resúmenes para determinar la relevancia de su contenido. En esta revisión bibliográfica se incluyen 45 de estos artículos por resultar más claros y/o completos.

Para ciertos conceptos como la base de las técnicas, conceptos como el CRISPR y funcionamiento de biosensores se realizaron búsquedas adicionales menos amplias para obtener información más concreta.

Respecto a las imágenes, todas han sido citadas acorde a los requisitos de los autores, con la excepción de las imágenes de realización propia.

4. Objetivos

El objetivo de este trabajo es detallar los métodos de diagnóstico existentes para la enfermedad por el virus SARS-CoV-2, desde los más convencionales hasta otros más novedosos. El propósito es aportar una visión global de los beneficios e inconvenientes de cada uno, las razones de empleo de cada uno de ellos e introducir algunos de los avances que se están realizando en el campo del diagnóstico.

5. Métodos diagnósticos

Los métodos diagnósticos se dividen en tres grupos: los que detectan virus o porciones del virus, los que detectan la respuesta inmune y los que detectan las consecuencias patológicas del virus sobre el cuerpo humano. Asumimos para la mayoría de este trabajo que tratamos con el Sars-CoV-2 al que nos enfrentamos al comienzo de la pandemia, dedicándoles a las nuevas variantes un apartado especial al final.

Previamente a la discusión de los diferentes métodos diagnósticos me gustaría recordar ciertos términos estadísticos de valoración de pruebas diagnósticas:

Def. Sensibilidad (S). La probabilidad de que un enfermo dé positivo en un test, o dicho de otro modo, la complementaria de la probabilidad de hallar un falso negativo.

$$S = \text{Prob (+) / Prob (Enf)} = VP / (VP + FN)$$

Def: Especificidad (E). La probabilidad de que un sano dé negativo en un test, o dicho de otro modo, la complementaria de la probabilidad de hallar un falso positivo.

$$E = \text{Prob}(-) / \text{Prob}(\overline{\text{Enf}}) = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

Def: Valor predictivo positivo (VPP). La probabilidad de que un positivo esté enfermo.

$$\text{VPP} = \text{Prob}(\text{Enf}) / \text{Prob}(+) = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})$$

Def: Valor predictivo negativo (VPN). La probabilidad de que un negativo esté sano.

$$\text{VPN} = \text{Prob}(\overline{\text{Enf}}) / \text{Prob}(-) = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})$$

Def: Valor predictivo global (VPG). La probabilidad de que un paciente haya sido clasificado correctamente.

$$\text{VPG} = (\text{VP} + \text{VN}) / (\text{VP} + \text{VN} + \text{FN} + \text{FP})$$

Siendo VP: verdaderos positivos, VN: verdaderos negativos, FP: falsos positivos, FN: falsos negativos

En líneas generales una prueba inicial de diagnóstico debe tener una elevada sensibilidad (para minimizar el número de falsos negativos, cuyo propósito es que se escape un número mínimo de falsos negativos, a pesar de que ello supone un incremento de falsos positivos) que después sea confirmada mediante una prueba muy específica (disminuir los falsos positivos, ya que de lo contrario serían sometidos a tratamientos innecesarios y potencialmente dañinos). Cuando hablamos de una prueba

de cribado o *screening* es fundamental tener un elevado VPN, el problema de los cribados es que siempre hay que tener en cuenta la prevalencia de la enfermedad que vamos a cribar ya que tanto el VPN como el VPP se modifican con la prevalencia (no sería lo mismo cribar para diabetes entre los pacientes de un servicio de neumología que en uno de endocrinología, donde la prevalencia en el segundo es mucho mayor).

5.1 RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es en el momento actual la técnica diagnóstica *gold standard* para demostrar la infección por el Sars-CoV-2. Esta técnica consiste en la amplificación de material genético, esencialmente en “fotocopiar” DNA. Para ello necesitamos una muestra a analizar, nucleótidos, cebadores, una DNA polimerasa (con sus cofactores) y un pH y temperatura adecuados (proporcionados por una solución tampón y un termociclador). En cada ciclo se incrementa la temperatura hasta desnaturalizar el DNA, luego se enfría ligeramente para unir los cebadores, a los cuales se adhiere la polimerasa que realizará las copias de cada una de las dos hebras empleando los nucleótidos. En este proceso el número de copias que obtenemos en el ciclo n es del orden de 2^n (en el primero 2, en el segundo 4 y en el 34... 17.179.869.184 copias!). Este es el método de realización de una PCR cuando la muestra a analizar es de DNA, pero dado que nuestro virus es un virus RNA y las PCR multiplican el DNA debemos utilizar una variante de esta técnica. Esta no es otra que es una RT-PCR o

reverso PCR, la cual hace uso de una transcriptasa inversa que le permite a partir del RNA viral obtener un DNA que se puede luego amplificar con la técnica previamente descrita.

La muestra tomada es también importante, siendo las más aceptadas las muestras nasofaríngeas, orofaríngeas, narinas y muestras invasivas del árbol respiratorio. Otras muestras como las muestras en heces son menos consistentes a nivel individual, aunque si que tienen un papel a nivel poblacional, como ya veremos más adelante (1).

Además las PCR se pueden realizar en tiempo real, o qPCR (ver figura 1). En estas PCR se puede cuantificar el número de copias mediante diferentes métodos, que se suelen basar en el empleo de una sustancia fluorocromógena que produce fluorescencia al realizar una reacción. Esta fluorescencia es la que permite determinar el número de copias en cada ciclo.

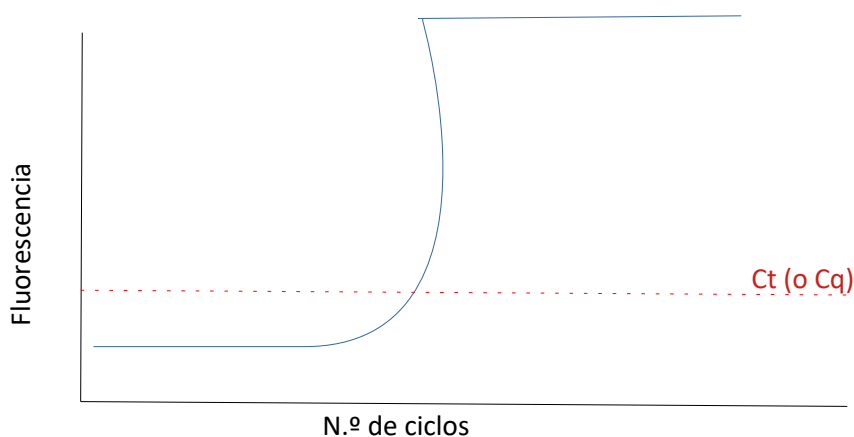


Fig 1. Gráfica de qPCR. Distinguimos dos fases: una fase inicial exponencial y una final de meseta que corresponde con el agotamiento de los sustratos.

Los genes más frecuentemente empleados en el caso del Sars-CoV-2 son ORF1ab/RdRp, E, S, y N, sin que existan diferencias significativas en su capacidad de diagnóstico al utilizar distintos sets comerciales (6). En lo que si existe variación es en el umbral mínimo de detección entre los sets, con unos detectando un mínimo de 0.025 copias/ μ L (PerkinElmer) hasta otros que detectan unas 10 copias/ μ L (Thermo-Fisher) (6). Además, la qPCR también tiene dos parámetros que es importante conocer: el límite de detección y el umbral mínimo de ciclo (C_t o C_q). El límite de detección es la mínima capacidad de analito que un proceso es capaz de detectar mientras que el umbral mínimo de ciclo es el número de ciclos de PCR al que hay que someter una muestra para que alcance el límite de detección. El umbral de ciclo es inversamente proporcional a la cantidad de muestra inicial o, lo que es lo mismo, cuando el C_t toma valores mayores nos indica que han tenido que tener lugar un mayor número de ciclos para obtener un número de copias que alcancen el límite de detección.

Por otra parte, lo que medimos mediante pruebas diagnósticas no es un valor estático en el tiempo sino que varia a medida que lo hace la enfermedad. De esta manera la especificidad va cambiando a medida que pasan los días, siendo el número de falsos negativos máximo en los primeros cuatro días desde la exposición aunque caen y alcanzan mínimos sobre el octavo día (7). Por ello, se suelen alcanzar C_t s suficientes para llegar al límite de detección entre 1-3 días tras el comienzo de los síntomas (aceptando ese periodo de incubación estándar de 5-6 días). Es fundamental tener todo esto en cuenta, no solo en relación al Sars-CoV-2 sino también para otras

enfermedades, puesto que siempre es necesario valorar la probabilidad pre-test de padecer la enfermedad, para poder repetir la PCR en caso de que esa sospecha sea muy elevada.

Otra cuestión relevante en relación a las PCR es el tema de la persistencia de valores positivos a pesar de haberse resuelto la enfermedad. La PCR no es una prueba que nos indique si el sujeto es contagioso o no, el único método que nos da esa información de manera directa es el cultivo. Sin embargo, la qPCR nos permite estimar la infectividad de una manera indirecta. En el estudio realizado por Guillaume poliquin et al (8), se realizaron cultivos y qPCR a las mismas muestras. Lo que observaron es que por encima de C_t de 24 ciclos y/o tiempos de más de 8 días desde el comienzo de los síntomas los investigadores no fueron capaz de obtener un cultivo viral positivo (8). Esto nos permite en cierta manera estimar el riesgo de transmisión que tiene un enfermo en base a su carga viral (aunque es problemático de sistematizar porque los valores de C_t no son estándares). Este estudio plantea una cuestión importante en relación a la persistencia de positividad en las PCR en enfermos que han pasado la enfermedad, ya que existen casos en los que se observa este fenómeno. ¿Estos positivos persistentes son infecciosos? Una posible respuesta nos viene dada por otro estudio en el cual se analizaron retrospectivamente muestras de 7608 pacientes recuperados de la enfermedad mediante qPCR durante la estancia y posteriormente al alta (9). Lo que hallaron fue que un 46.9% de ellos presentaba qPCRs positivas con $C_t \geq 24$ una vez que cesaron los síntomas y 14.7% seguían siéndole a los 60 días (pero

con C_t aún mayores, del rango de 39.2-43.6) (9). Esto apunta a que en pequeño porcentaje de pacientes persiste una eliminación de partículas virales a largo plazo pero que con los datos disponibles actualmente no suponen un riesgo de contagio ya que no se han conseguido cultivar muestras de cargas virales tan bajas.

Una cuestión añadida son el tema de la detección de asintomáticos/paucisintomáticos. El primer problema que encontramos es la disminución de la probabilidad pre-test de enfermedad, ya que al no desarrollar síntomas o ser muy leves no incitan sospecha que termine en la realización de la prueba. Además, estos pacientes pueden contagiar a otros sin que se sospeche, lo cuál representa otro problema añadido desde el punto de vista epidemiológico. Por otra parte un asintomático sólo puede ser definido de una manera retrospectiva, ya que en el momento no podemos distinguir un verdadero asintomático de un presintomático que aún está en fase preclínica. Aproximadamente un 40% (variando entre el 30 y 50% según los metanálisis consultados) de los pacientes infectados por el virus no presentan síntomas (incluidos asintomáticos y presintomáticos) (10, 11, 12).

Al ir avanzando la pandemia, la carga de trabajo del laboratorio se ha ido incrementando y en consecuencia aparecieron sistemas automatizados de procesado de las muestras (Hamilton, Samplix, Qiagen y muchos más) que permiten el manejo diario de un mayor número de muestras disminuyendo el trabajo manual. Algunos pueden procesar volúmenes de 1536 muestras en 24 horas, como el Cobas 6800.

En resumen, sus principales ventajas radican en su teórica especificidad del 100% (aunque existen posibles errores por mala recogida de muestra o mal procesamiento técnico, pero por su definición de prueba *gold standard* se le asigna un valor de especificidad del 100% a pesar de que en realidad esta especificidad sería más baja) así como su elevada sensibilidad. Sin embargo, se trata de una prueba relativamente costosa (entre 10-15 euros por cada test, sin contar el precio de un termociclador, de unos 90.000 euros), lenta (de 2 a 5 horas, aunque existen tests point of care que obtienen resultados en 20-40 minutos, como los de LIAT (Roche), VITA (Menarini), GenXpert (Cepheid) y Bosch) y, como ya hemos dicho previamente, un resultado positivo no se relaciona con la infectividad del virus ya que solo detecta copias del virus y no copias viables (remediable en cierta manera mediante la qPCR).

5.2 Técnicas antigénicas

Las técnicas de identificación basadas en antígeno son un conjunto de técnicas diagnósticas que emplean métodos de detección de los antígenos S y N (mayoritariamente) del Sars-CoV-2 mediante inmunocromatografía, ELISA, ensayos de flujo lateral y otros métodos que incluyen combinaciones de los previos con otros. Estas técnicas tiene una serie de ventajas claras frente a la PCR: mayor rapidez (5-15 minutos), no necesita un personal tan cualificado para su realización o interpretación y un bajo coste. Sin embargo, presentan un mayor número de falsos negativos, ya que

tienen menor sensibilidad que las PCR. Además los primeros tests de antígeno para el Sars-CoV-2 que surgieron tenían bastantes problemas de falsos positivos por reactividad cruzada con otros virus respiratorios (debido a que usaban antígenos comunes), lo que originaba problemas adicionales (13).

Los test de antígeno que se emplean en la actualidad ya no presentan los problemas de reactividad cruzada que tenían los previos, aunque su especificidad y sensibilidad es menor que la PCR. De hecho la mayoría de estos test mejoran sus resultados a mayor carga viral de la muestra, como el test LUMIPULSE, cuya sensibilidad y especificidad para muestras de 10-100 copias/ μL es de 55.2% y 99.6% con un área bajo la curva ROC de 0.848 pero con unos resultados peores en las muestras de menos de 10 copias/ μL . Su concordancia con la PCR para más de 100 copias/ μL es del 100%, para 1-100 copias/ μL del 85% y para 1-10 copias/ μL del 33% (14).

Existen muchos test de antígenos distintos, pero me gustaría comentar brevemente alguno que tiene un mecanismo diferente al habitual y/o con peculiaridades interesantes:

- Test de antígeno ultrasensible de Watabe e Ito:

Este test consigue elevar considerablemente la sensibilidad mediante una técnica que consiste en acoplar un “sandwich” de ELISA con un proceso llamado ciclo de thio-NAD para identificar la proteína S.

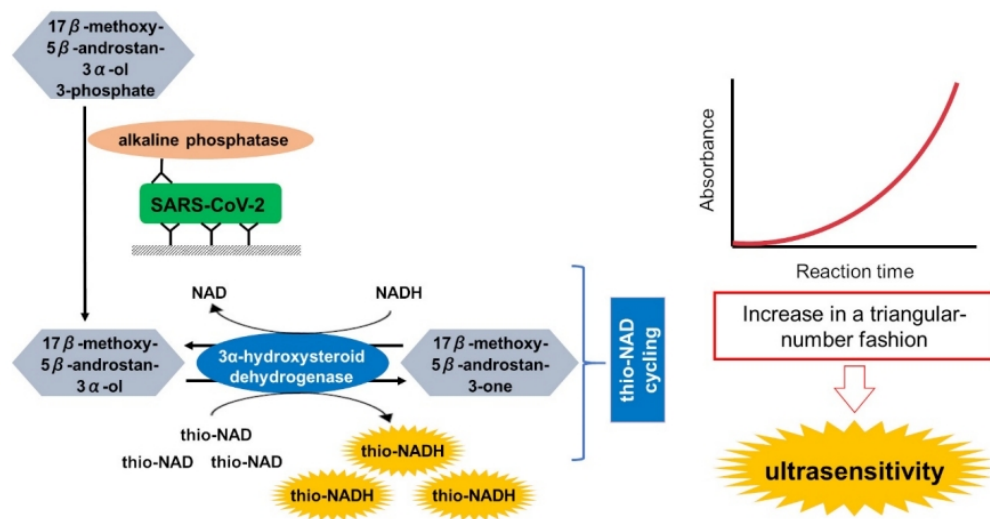


Imagen 1. Esquema del funcionamiento del sandwich ELISA con ciclo de thio-NAD, realizado por Watabe e Ito et al. (15)

Un sandwich ELISA es básicamente lo que nos viene a decir el propio nombre: consiste en la introducción de la muestra con el antígeno en un recipiente que contiene un anticuerpo anclado a él, lavamos el exceso de muestra e introducimos otro anticuerpo (que no interacciona con el anticuerpo anclado pero sí con el antígeno) que en este caso va unido a un enzima que cataliza una reacción que produce como su producto el sustrato del ciclo de thio-NAD. Esto consiste en una serie de reacciones redox que acaban produciendo thio-NADH, que al final se cuantifica mediante su capacidad de absorción de una radiación de 405 nm de longitud de onda (15).

Este método según el estudio de Etsuro Ito et al. ha mostrado un umbral de detección de 10^4 RNA copias por ensayo frente al umbral de la RT-qPCR de 4.2×10^6 copias por hisopo (15). El límite de detección que proporcionan en el

artículo es el que tiene lugar a los 60 minutos de comenzar el ciclado, ya que a los 10 minutos su límite es de 10^5 copias por ensayo. Además al tratar de detectar la proteína S no tiene reactividad cruzada con otros virus. La sensibilidad del test es comparable a la de las PCR (15).

Este método parece prometedor por sus resultados, pero aún no tiene estudios en muestras de pacientes con el virus (emplearon la proteína S de manera aislada en vez de usar el virus completo), con lo que la validez externa del estudio es limitada. Además, al ser el propio autor el creador de su producto, existe un conflicto de interés importante que convendría ser evaluado por una tercera parte más imparcial.

- Test de PANBIO (Abbott): se trata de un test de antígeno *point of care* basado en un inmunoensayo en oro coloidal, que obtiene resultados con una alta sensibilidad y especificidad en unos 15 minutos. Se trata de un test cualitativo. Según el fabricante la sensibilidad y especificidad son muy elevadas, estando por encima del 90%, aunque existen variaciones en función de la muestra tomada (16). Sin embargo algunos metanálisis reportan una sensibilidad media del 75.1% (con un IC al 95% entre 57.3% y 87.1%) y especificidad media del 99.5% (con un IC al 95% entre 98.7% y 99.8%) para sintomáticos (16). Respecto a su capacidad de identificar asintomáticos, es bastante menor con una sensibilidad media del 48.9% (con un IC al 95% entre 35.1 y 62.9) pero

manteniendo una elevada especificidad (16). Los valores predictivos de este test también varían con la prevalencia, desde un 89% a un 97% de VPP y desde un 98.7% a un 94.1% de VPN para prevalencias de el 5% y el 20% en sintomáticos, respectivamente (valores predictivos globales del 97% y del 95%). En asintomáticos estos resultados son peores, con un VPP del 11% hasta el 34% y un VPN del 99.7% al 99% para prevalencias del 0.5% al 2%, respectivamente (valores predictivos globales del 97% y del 97%) (16). En los asintomáticos no confirma la enfermedad pero tiene un elevado VPN, que permitiría descartarla en un porcentaje elevado de casos. Estos test tienen una sensibilidad elevada para valores de C_t bajos, que es lo que ocurre en los primeros 5-7 días tras el inicio de síntomas (16). Además, el precio no es muy elevado, siendo de unos 4.5 euros por cada test.

- Test de Standard Q (SD Biosensor, Roche): se trata de otro test *point of care*, este basado en ensayo de flujo lateral, con tiempos y sensibilidades reportadas por el fabricante muy similares al de Abbott. En metanálisis este test presentó una sensibilidad y especificidad similares al de Abbott en sintomáticos pero que mejora su sensibilidad en los asintomáticos respecto al mismo: un 69.2% con un IC de 38.6% a 90.9% (16). También supera bastante en VPP al de Abbott en asintomáticos, aunque sigue siendo relativamente bajo (16). Su precio es de aproximadamente 3.5 euros cada test.

Respecto a la capacidad del test de antígeno para el cribado poblacional, tiene las ventajas de la rapidez y bajo coste, pero su sensibilidad y VPP se reduce en los asintomáticos, con lo cual en el momento de realización de este trabajo, no está recomendado su empleo como cribado aunque el testeo seriado se podría emplear para obtener una medida de la evolución de brotes y sobre la situación epidemiológica de comunidades (17). Hay que tener cuidado en los sintomáticos, cuyos resultados negativos deben de confirmarse mediante PCR según la CDC.

Como resumen, se trata de test rápidos (minutos para obtener el resultado), de sensibilidad moderada (más elevada en los nuevos), de especificidad alta, baratos en comparación a la PCR y fácilmente interpretables. Sin embargo su sensibilidad es muy dependiente de la carga viral y su capacidad diagnóstica así como de triaje mejora en zonas de alta prevalencia, donde se encuentren pacientes sintomáticos con altas cargas virales. Su mayor rentabilidad diagnóstica es durante la primera semana desde el comienzo de los síntomas, ya que los niveles de antígeno van disminuyendo a partir de esta (siendo a partir de entonces más efectiva la RT-PCR). Por ahora se pueden emplear como triaje de pacientes con probabilidad pre-test alta (en zonas de elevada prevalencia), con posterior confirmación mediante PCR.

5.3 Técnicas de anticuerpos

Las técnicas de detección de anticuerpos son un conjunto de procedimientos que permiten detectar los anticuerpos IgM, IgG y menos frecuentemente IgA.

Los test de anticuerpos, al igual que los de antígeno, se pueden dividir en tests rápidos (cualitativos) y tests serológicos (cuantitativos). Los rápidos se basan mayoritariamente en la inmunocromatografía y los serológicos se basan en el ELISA.

Las inmunoglobulinas en el Sars-CoV-2 comienzan su producción sobre los 2-3 días del contagio en forma de IgM y posteriormente realizan un cambio a una forma IgG más específica, que en algunos estudios comunican que puede ocurrir tan tempranamente como al cuarto día, pero que de media tardan unos 12-15 días (18). La IgM hace un pico máximo a las 2-5 semanas y a partir de entonces disminuye hasta desaparecer (18). Respecto a la dinámica de estas inmunoglobulinas a largo plazo, se cree que el tiempo de duración de estas inmunoglobulinas es de meses, siendo unos 70-90 días para IgA y más de 6 meses para IgG, aunque esto es menor para aquellos pacientes que contaban con unas cifras IgG inferiores al inicio del cuadro y en inmunodeprimidos (19). Los pacientes que presentan niveles elevados de inmunoglobulinas al diagnóstico además tienen una menor disminución de los niveles a largo plazo, aunque también existen diferencias en la disminución de la capacidad de reactividad de las diferentes inmunoglobulinas (siendo las más afectadas por este orden IgM>IgG>IgA) (18, 19).

El cambio de inmunoglobulina es un fenómeno peculiar en el Sars-CoV-2, ya que la sensibilidad de la IgM para determinar infección aguda es baja (20). Sin embargo, la sensibilidad de la IgG mejora al transcurrir más tiempo desde el inicio de los síntomas (19, 20). Aún así, la detección de anticuerpos es un método complementario de diagnóstico, ya que un porcentaje importante de pacientes debutan con ambas inmunoglobulinas negativas al inicio de la enfermedad (20). También se ha observado el caso opuesto de enfermos que presentan ambas inmunoglobulinas positivas desde el primer momento (20).

En el metanálisis realizado por Jing Li et al. analizaron diferentes estudios con respecto al uso de inmunoglobulinas (21). Los resultados, a pesar de que los estudios eran heterogéneos en cuestión al método de detección de los anticuerpos, son de una sensibilidad variable en función de que inmunoglobulinas fueran las positivas. Dado que las características inmunes de la infección son bastante atípicas, ellos sugieren considerar cualquier combinación que contenga alguna inmunoglobulina positiva como un test positivo (21).

Respecto a su empleo como método de cribado poblacional se han comunicado variaciones importantes en el VPP de los mismos en función de la prevalencia de la zona, variando desde el 33% de VPP con prevalencias tan bajas como del 1%, al 60-90% si se eleva al 3-10% y finalmente entre el 90-100% cuando sobrepasamos el 10% de prevalencia (22).

Un tema que ha sido bastante comentado, especialmente desde el inicio de la pandemia, es la posibilidad de reinfección. Es importante diferenciar la reinfección como tal de la presencia de un falso negativo previo. Aunque existe la probabilidad de padecer una reinfección verdadera (no de falso negativo previo con verdadero positivo posteriormente), esta es rara, sólo hay documentados unos pocos casos en el mundo de este fenómeno (al menos en el momento de realización de este artículo) (23).

En resumen, se trata de pruebas rápidas, poco costosas pero que dadas las características de la enfermedad y de la reactividad particular del virus con nuestro sistema inmune se deben de emplear en el contexto del resto de pruebas, dada la elevada probabilidad de falsos negativos. Actualmente se emplean para la realización de estudios de seroprevalencia y en casos de pacientes que presentan PCRs negativas de manera repetida (24).

5.4 Cultivo viral

A pesar de que la RT-PCR se considera el *gold standard* para el diagnóstico del COVID-19, esta prueba y el resto de las que comentamos previamente no son capaces de demostrar la infectividad del virus. El cultivo es capaz de demostrarla, entendiendo por infectividad el crecimiento viral en la muestra tisular a cultivar.

Un cultivo viral es un método lento y costoso que no se emplea como método diagnóstico, teniendo un mayor papel en el ámbito de la investigación. Se realiza

aislando en la muestra los virus de microorganismos mediante centrifugación, recogiendo el sobrenadante y procediendo a su inoculación en muestras de distintas estirpes celulares. Una vez realizado esto, es preciso que se reproduzca el virus en dichas células, proceso que puede llevar días e incluso semanas. La línea celular que más se emplea para el cultivo del Sars-CoV-2 es la célula Vero, que procede del riñón del mono verde africano o *Chlorocebus sp.*. La mayoría de las células que se replican tienen un límite del número de veces que son capaces de hacerlo (límite de Hayflick) antes de alcanzar la senescencia debido al acortamiento de los telómeros con cada división, aunque existen excepciones: las células madre, las células cancerígenas, las estirpes modificadas para evitar la senescencia y las estirpes de células “inmortales” que ocurren naturalmente (como es el caso de las Vero). Una vez realizado todo el proceso de cultivo, es posible determinar si ha tenido lugar crecimiento celular mediante análisis antigénico o mediante cambios citopáticos celulares (variables según el tipo de virus a cultivar) (25).

Como ya comentamos en el apartado de PCR en el estudio realizado por Guillaume poliquin et al demuestran que cuando el Ct de la qPCR es mayor de 24 o el tiempo desde la aparición de los síntomas es mayor de 8 días la probabilidad de crecimiento del virus en el cultivo es muy baja (8). De hecho la OR de cultivo positivo disminuía un 32% y un 37% por cada ciclo incrementado en el Ct y por cada día incrementado desde la aparición de los síntomas, respectivamente (8).

5.5 Tomografía computarizada

La CT es una técnica radiológica que resulta fundamental en la detección del coronavirus porque al igual que la ecografía nos proporciona información acerca del daño producido por el patógeno, sobretodo a nivel pulmonar.

La base del funcionamiento del CT son los rayos X. Se trata de radiaciones de tipo ionizante que interaccionan con los diferentes tejidos absorbiéndose de distintas maneras permitiendo su visualización y distinción. El CT va realizando múltiples cortes emitiendo radiación desde distintos ángulos permitiéndonos ver una imagen bidimensional que distingue los elementos en profundidad y no una simple proyección como es el caso de la radiografía simple.

Es importante tener en cuenta que la neumonía del coronavirus es una neumonía atípica, siendo ahora mismo la causa más frecuente de esta. Además, no hay hallazgos patognomónicos, ya que otros microorganismos e incluso otras enfermedades pueden presentar hallazgos similares (neumonías organizadas, neumonías atípicas por virus, fibrosis pulmonar, neumonía eosinófila crónica, neumonía por *Pneumocystis jirovecii*...) (26).

Existen múltiples hallazgos que se pueden observar en el CT pulmonar en el contexto de la enfermedad por Sars-CoV-2:

- Imagen en vidrio deslustrado: es la que se observa con mayor frecuencia, en la mayoría de los estudios en el 98% de los pacientes (27). Su patogenia está relacionada con una ocupación parcial del alvéolo que permite ver los vasos a través. Con frecuencia se asocia a un engrosamiento intersticial pulmonar. Su presentación más típica es bilateral, de predominio periférico, basal y con frecuencia afectación multilobular (26, 27).
- Imagen en consolidación: la siguiente en frecuencia, entre el 2-64% de los pacientes (27). Se halla relacionada con la ocupación de espacio de la vía por líquido y en caso de acompañarse de broncograma pasa a denominarse neumonía organizada. Se considera la siguiente etapa cronológica de evolución junto al crazy paving aunque también podría indicar una sobreinfección bacteriana. En general presenta un peor pronóstico y es de aparición tardía, en torno a los 9-13 días (26, 27).
- Imagen en “crazy paving pattern”: presente en el 5-36% de los pacientes (27). Consiste en un engrosamiento de los septos sobre un fondo de vidrio deslustrado. Ocurre por la inflamación intersticial como respuesta a los pocos días del inicio de la infección si tiene lugar progresión (26).
- Otros: aunque menos frecuentemente y siendo menos típicos también se observan hallazgos como: fibrosis, nódulos, cambios vasculares y pleurales,

signo del halo y halo inverso, linfadenopatías, bronquiectasias por tracción, derrame, engrosamiento pleural...

Estos hallazgos son importantes porque denotan una evolución de la enfermedad en el tiempo. En los primeros días predominan unas imágenes de infiltrados agudos en vidrio deslustrado que evolucionan posteriormente hacia el engrosamiento intersticial (crazy paving) o consolidación (si progresa la enfermedad) o hacia la resolución.

Aproximadamente la mitad de los pacientes asintomáticos presentan algún tipo de hallazgo en el CT (26).

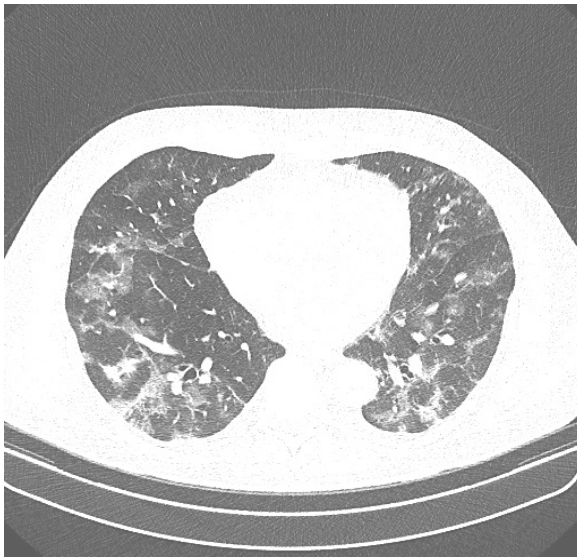


Imagen 2. Neumonía bilateral por Sars-CoV-2. Se observan infiltrados en vidrio deslustrado y engrosamiento septal de predominio periférico y basal. Caso cortesía del Dr Antonio Rodrigues de Aguiar Neto, Radiopaedia.org, rID: 85091 (26)

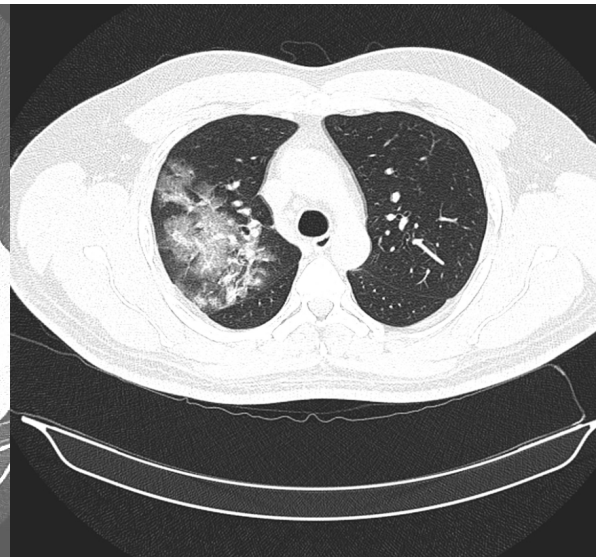


Imagen 3. Neumonía por Sars-CoV-2 en la que se aprecia la “crazy paving pattern”, resultado del conjunto de los infiltrados en vidrio deslustrado y el engrosamiento septal sobrepuesto. Caso cortesía del Dr Antonio Rodrigues de Aguiar Neto, Radiopaedia.org, rID: 76975 (26)

Pero a parte de los hallazgos radiológicos, ¿como de buena prueba es el CT para la detección de la enfermedad? En primer lugar es importante dejar claro que el diagnóstico del Sars-CoV-2 es un diagnóstico microbiológico, no de imagen ya que como ya mencionamos antes, las imágenes no son totalmente específicas ni patognomónicas de la enfermedad. En segundo lugar, es importante el contexto clínico del paciente y la prevalencia de la enfermedad en la población así como la necesidad de reservar el CT para pacientes graves, dado que no es una prueba inocua. Finalmente destacar que para mejorar la capacidad diagnóstica las sociedades radiológicas han dado lugar a scores que nos clasifican la probabilidad de que los hallazgos correspondan al actual coronavirus. Algunos de estos scores son: CO-RADS, COVID-RADS y el score de la Sociedad Norteamericana de Radiología (RNSA) (26).

5.6 Ecografía pulmonar

La ecografía pulmonar es una técnica que se basa en el uso de ondas acústicas y su comportamiento en los tejidos humanos. La base de este método consiste en la diferente propagación de estas ondas al transmitirse por los distintos tejidos. Estos pueden comportarse como propagadores de ondas o ecogénicos (principalmente líquidos) o como no propagadores o anecogénicos (hueso, metales, algunos contrastes). Además el aire presenta una gran dificultad de propagación de dichas ondas, al ser su velocidad de propagación menor que en el agua, lo cual supone un

empeoramiento de la calidad de la imagen, lo cual supone un gran problema en el pulmón.

Mientras que en otros órganos la ecografía tiene una interpretación de base más anatómica, en el pulmón esta se basa más bien en la presencia o ausencia de ciertos artefactos. En las imágenes de la ecografía pulmonar nos encontramos en primer lugar con la piel, tejido graso subcutáneo, músculo y costilla. Al ser el pulmón fundamentalmente aire no podemos observar estructuras anatómicas que normalmente observaríamos en un CT (a no ser que tengamos un derrame, entonces sí que podríamos visualizar el pulmón anatómicamente). En la ecografía de un pulmón normal puede identificarse la “línea pleural” (no es realmente la pleura, si no que se trata de los alvéolos pulmonares llenos de aire que generan una serie de líneas hiperecogénicas) que se deslizan una sobre la otra (28). Este deslizamiento nos indica que no tenemos aire en el espacio pleural, se conoce como *sliding sign* y se encuentra ausente en los neumotórax (29). Detrás de esta línea pleural se observa una sombra acústica y a continuación aparecen las llamadas líneas A (que son múltiples ecos de la línea pleural y por tanto artefactos por reverberación de vuelta a la sonda al interactuar con los tejidos), que van paralelas a la línea pleural (28). El otro artefacto importante son las líneas B, que aparecen cuando los ultrasonidos se topan con septos engrosados o cisuras con líquido y cuya intensidad va disminuyendo progresivamente (28). Estas líneas B se encuentran transversales y en menor número con respecto a las líneas A y son especialmente visibles en las bases pulmonares (28). En resumen en el

pulmón normal tenemos línea pleural, líneas A e intercaladamente se puede observar alguna línea B, pero siempre en menor número que las líneas A.

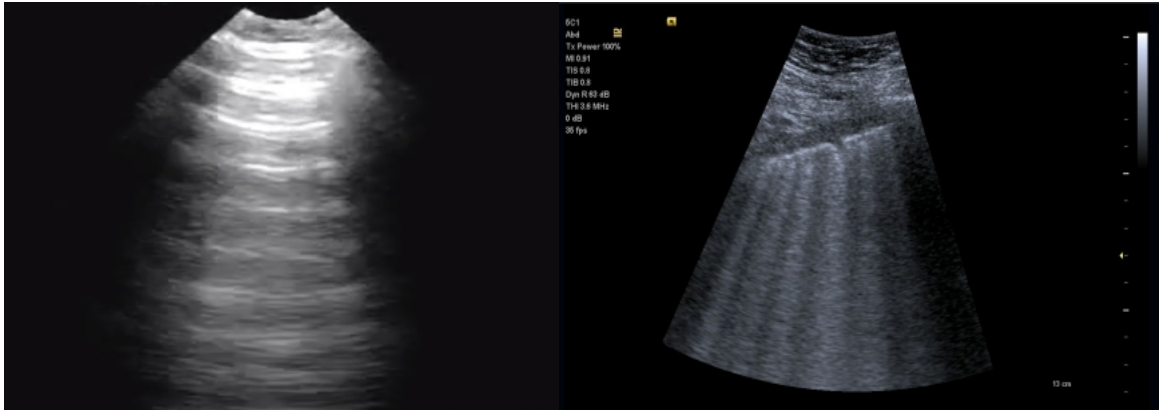


Imagen 4. Ecografía pulmonar normal. Se observan línea pleural y líneas A. Caso cortesía del Dr David Carroll, Radiopaedia.org. From the case rID: 61382 (26).

Imagen 5. Ecografía pulmonar de un paciente COVID. Se observan múltiples líneas B e irregularidades de la línea pleural con ausencia de líneas A (30).

Existen muchos otros artefactos en la ecografía pulmonar patológica pero nos centraremos en los más frecuentes que se relacionan con la enfermedad producida por este coronavirus. Es importante reiterar que no hay ningún hallazgo de imagen patognomónico para el COVID-19, pero estos son los más frecuentes:

- Presencia de más de 3 líneas B por espacio intercostal o ausencia de líneas A: nos indica engrosamiento septal (líneas B7, o separadas 7mm entre sí que dejan entrever líneas A. Se pueden ver en los SDRA o patologías intersticiales)

o edema (líneas B3, separadas 3mm entre sí, aboliendo las líneas A) (29, 30, 31).

- Consolidaciones: el pulmón consolidado se asemeja ecográficamente a la imagen hepática (hepatización pulmonar) que acontece por la atelectasia alveolar debido a la sustitución del aire alveolar por líquido. Esta consolidación se acompaña de líneas B que la rodean y un refuerzo posterior en forma de cola de cometa. Además aparece el signo del desflecamiento (límite profundo irregular) (29, 31)
- Derrames: permiten observar mejor el pulmón, debido a que el líquido permite mejorar la conducción del sonido. También aparecen otros signos como el signo del brazo de medusa, signo del cuadrado, signo de la pleura desflecada y signo del sinusoide (29, 31).

Existen distintos métodos de cuantificar la afectación pulmonar en la ecografía de manera sistemática. Algunos son genéricos, como el protocolo BLUE (que permite evaluar rápidamente la situación pulmonar en base a líneas A, B, deslizamientos, consolidaciones y derrames para orientar hacia edema, neumonía, neumotórax, TEP, asma y EPOC) y otros más específicos para el COVID-19, como el LUS (Lung Ultrasound Score) (31).

Puntuación	Hallazgos ecográficos por zona
0	Líneas A presentes solas o con <3 líneas B
1	Líneas B múltiples espaciadas
2	Líneas B coalescentes con o sin pequeñas consolidaciones subpleurales
3	Consolidación pulmonar

Tabla 1. Score LUS. Se analizan 12 áreas entre ambos pulmones asignándoles un valor entre 0 y 3. El score se relaciona con la gravedad y parece correlacionarse con el pronóstico, aunque son necesarios estudios más amplios para poder recomendarlos de forma más sistemática (31).

En el estudio realizado por Giorgio Bosso et al. analizaron la ecografía en pacientes hospitalizados por infecciones respiratorias, dividiéndolos en dos grupos: A (infectados por el Sars-CoV-2) y B (otros microorganismos diferentes del coronavirus), ambos sintomáticos (31). En este estudio emplearon la ecografía y la compararon con otros parámetros para estimar el pronóstico y ver si eran capaces de diferenciar los del grupo A del B empleando estos métodos. Lo que hallaron fue que la ecografía no solo era capaz de diferenciar a los pacientes A de los B (con un $p < 0.00001$ y por tanto significativo) si no que además aquellos pacientes con una peor puntuación en el LUS morían con mayor frecuencia, con una puntuación media más desviación típica de 15.6 ± 4.5 en supervivientes respecto a 20.9 ± 6 en los que posteriormente fallecieron ($p < 0.01$). Otros marcadores que significativamente

diferenciaron A de B fueron la cuantía de la leucocitosis, la PCR, AST y fibrinógeno (31).

Como resumen, la ecografía pulmonar tiene una gran cantidad de ventajas: bajo coste, no exposición a radiaciones ionizantes, facilidad de aprendizaje, posibilidad de realización a pie de cama (útil en pacientes en ventilación mecánica o dificultad para el uso del CT) y su precocidad en la detección (en algunos estudios se observan hallazgos ecográficos previos a la RT-PCR, además la ecografía muestra hallazgos antes que la placa de tórax) (26, 31). Los inconvenientes son: la necesidad de personal formado en la interpretación (aunque es más sencillo de interpretar que un CT), la capacidad diagnóstica baja cuando no tenemos una probabilidad pre-test alta y el ser una prueba muy observador-dependiente.

5.7 Otras técnicas moleculares

5.7.1 Detección de material genético en aguas residuales

Aunque se podría haber comentado en el interior de los apartados previos, considero que se trata de una técnica que está adquiriendo mucha relevancia últimamente en relación con la capacidad de analizar brotes poblacionales.

El método consiste en la detección del RNA vírico que proviene de las heces y orina en las aguas residuales. Este tipo de métodos de detección de material genético viral ya se emplearon en el pasado para controlar brotes de Salmonella, Polio, hepatitis A y para estudios de microbiota intestinal humana desde un punto de vista comunitario.

Las muestras se obtienen mediante centrifugación y filtrados que permiten obtener un sobrenadante que luego es sometido a qPCR. Esto permite cuantificar el material genético y posteriormente realizar una estimación de la población que está afectada (aunque esto es bastante variable, ya que la eliminación de virus por heces presenta bastante variación entre pacientes y también a lo largo de la enfermedad) (32, 33).

Se ha observado que con estas mediciones es posible predecir incrementos en la incidencia poblacional de casos, aunque existe mucha fluctuación si se toman múltiples muestras diarias, con lo que es preferible tomarlas en periodos de varios días, que permiten dar una visión de la tendencia evolutiva (32).

También se ha constatado que mientras que las agua residuales no procesadas presentan restos del material genético viral (al igual que en los ríos y en aguas tratadas la carga viral es mínima), ninguna de estas muestras pudieron ser cultivadas en laboratorio (34).

En conclusión, este tipo de método podría servir como una manera mas eficiente de predecir brotes que un cribado aleatorio de un segmento poblacional y más fiable que ingresos o muertes (35). Es relativamente barato y sencillo de ejecutar, pero existe una dinámica bastante variable en las mediciones y depende de las instalaciones de procesado de cada región (35).

5.7.2 Sensores biológicos (Biosensors)

Un sensor biológico es un dispositivo que emplea una combinación de un método de biorreconocimiento para identificar a patógenos con un sistema transductor. El biorreconocimiento es un proceso que emplea una sonda para la detección de un componente del patógeno, siendo algunas técnicas que lo emplean la PCR y ELISA. El sensor también utiliza una técnica de biorreconocimiento, pero al contrario que las previamente mencionadas que consumen algún sustrato para su realización (nucleótidos, anticuerpos, cebadores...) los biosensores no necesitan reponer reactivos o sustratos ni preparar la muestra (en la mayoría de los casos el propio sensor la puede preparar separando componentes por discrepancia de tamaños, magnetismo,

centrifugación...) (36). En la figura 2 se puede observar un muy simplificado esquema de la estructura de un biosensor.

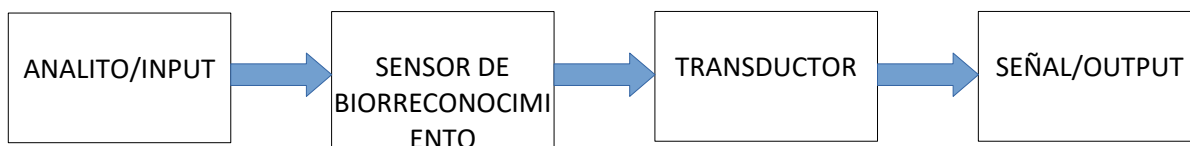


Figura 2. Elementos de un biosensor. Los analitos suelen ser bacterias, virus, protozoos... Los sensores pueden ser anticuerpos, proteínas, bacteriófagos, haptámeros... Existen múltiples tipos de transductores: mecánicos, químicos, en formas planares, poliméricas, arrays e incluso nanoestructuras. Finalmente las señales pueden ser obtenidas mediante potenciometría, amperimetría, conductometría, impedancia...

Estos biosensores se han aplicado principalmente para bacterias (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *Legionella*...) pero también para algunos virus, especialmente el virus de la gripe (36). Con respecto a su empleo en el coronavirus, algunos son:

- RT-LAMP y RT-LAMP-NBS: estas son dos técnicas que buscan suplir algunas de las desventajas de las RT-PCR. La RT-LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification combined with Reverse Transcription*) permite amplificar el material genético sin necesidad de variar la temperatura como hace la PCR (de ahí el nombre de isotérmica) empleando pares de cebadores, unos internos y otros externos que actúan en las regiones loop de la secuencia. Esta técnica se puede acoplar a un sistema de tinciones para el diagnóstico visual o mediante turbidimetría, obteniéndose resultados en menos de una hora. Los test desarrollados que usan RT-LAMP para el Sars-CoV-2 (en concreto el test

iLACO del grupo de X. Yin et al.) son bastante específicos, con pocos falsos negativos (25/248, aunque al contrastar estos falsos negativos con una qPCR presentaban cargas virales muy bajas, con C_t de 35) (37). El RT-LAMP-NBS incluye un biosensor de nanopartículas que mejora considerablemente las limitaciones, permitiendo un límite de detección de 12 copias por reacción respecto al de 60 copias del RT-LAMP (37).

- Sensores basados en CRISPR: el método CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) se basa en un método de defensa que poseen las bacterias frente a ácidos nucleicos que no son propios como los víricos. Este proceso tiene dos componentes: el RNACr y las endonucleasas Cas. Cuando un patógeno invade la célula, esta adquiere material genético de ella en forma de secuencia espaciadoras (complementarias de algunos virus), que se añaden al promotor de CRISPR. A continuación se transcribe la secuencia y se forma en RNACr que se añade al Cas formando el complejo CRISPR/Cas que permite la delección mediante el corte la próxima vez que se encuentre con esa secuencia. Esto tiene aplicación médica debido a que nos permite obtener un sistema de corte muy específico que nos permite editar el genoma de manera más precisa que los métodos clásicos, bien sea para eliminar, sustituir genes o aislar secuencias (38). En el caso de su aplicación diagnóstica, se incorpora a la endonucleasa un método de detección, de manera que si detecta la secuencia y la corta nos daría un resultado positivo. Algunos

ejemplos son los sensores de Mammoth Biosciences y Sherlock Biosciences, ambos son test *point of care*, que obtienen resultados en 30-60 minutos y con límites de detección de entre 10-300 copias/ μ L (frentes a las qRT-PCR que tienen un límite de detección de 0.33-10 copias/ μ L) (39).

- Sensores de FET-grafeno: este tipo de biosensor se basa en una capa de grafeno a la que hay adherida anticuerpos contra un antígeno del virus. Empleando un transistor de campo efecto (FET) de manera que se genera un campo eléctrico y un chip de CRISPR que permite el análisis de los resultados y detección de muestras de hasta 1 fg/mL en muestras salinas (40).
- Sensores con electrodos de oro de nanopartículas: es un sensor semejante al previo, que utiliza nanopartículas de oro para fijar los anticuerpos a un electrodo FTO (*Fluorine Doped Tin Oxide*). El límite capacidad de detección de este sensor es de muestras de entre 1 fM a 1 μ M, resultado que obtiene en segundos (40).
- Bio-nanogate (método enzimático): es un método que difiere significativamente de los previos. En lugar de emplear anticuerpos para la detección, utiliza una sustancia llamada aptámero. Un aptámero es un oligonucleótido de DNA o RNA que tiene afinidad por una o varias moléculas que es capaz de detectar mediante un plegamiento de su estructura tridimensional. Los aptámeros se obtienen mediante química combinatoria

(básicamente prueba y error partiendo de un pool que contiene un gran número de ellos) y su producción menos costosa así como su elevada afinidad los convierten en una buena alternativa frente al uso de anticuerpos. El método de bio-nanogate emplea estos aptámeros para reconocer la proteína S del virus y luego es analizado mediante diversos procesos electro-químicos (40).

5.8. Otras técnicas

En este apartado me gustaría comentar técnicas más inusuales, pero siempre con base científica, de detección del coronavirus.

- Detección de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs):

Los VOCs son compuestos orgánicos volátiles que se producen como resultado de reacciones metabólicas que tienen lugar en una célula. Al conjunto de todos los VOCs producidos por un organismo se le conoce como volatiloма, característico de cada individuo (41). Estos VOCs se asocian con determinadas enfermedades como cáncer, malaria, enfermedades neurológicas y enfermedades infecciosas e incluso con hábitos de la persona (41, 42). Es posible la detección de estos VOCs empleando perros y dispositivos.

Respecto a los perros, en un estudio en el que se empleó un perro para intentar distinguir tanto muestras de laboratorio como pacientes infectados de *C.*

difficile obtuvo sensibilidades de 100% y 83%, así como especificidades de 94% y 98% (muestras y pacientes respectivamente) (42). Con respecto a la detección del coronavirus, los perros pueden detectar los VOCs que se desencadenan como consecuencia de expresión de HLA y por la tormenta de citokinas (41). Existen actualmente varios estudios que valoran la posibilidad su uso para un cribado rápido de pacientes, sin embargo ello plantea algunos posibles problemas (41). En primer lugar, la manera que tiene el perro de comunicar la positividad de una muestra/paciente es bastante influenciado por otros aspectos. También es importante considerar que muchos de estos estudios se hacen en condiciones óptimas irreales, lo que penaliza considerablemente su validez externa.

El otro método de detección de VOCs es mediante biosensores, aunque este tipo de biosensores están mucho menos desarrollados que los comentados en su correspondiente apartado y son necesarios más estudios al respecto.

6. Nuevas variantes y pruebas diagnósticas

En primer lugar es importante diferenciar los términos cepa, linaje, mutación y variante, ya que con frecuencia se utilizan indistintamente a pesar de hacer referencia a conceptos distintos:

Def: Mutación. Cambio en el material genético del virus. Ej: las mutaciones N501Y, A570D, D614G de la variante británica.

Def: Variante. Conjunto de mutaciones sobre el material genético de un virus. Ej: la variante británica del SARS-CoV-2 se denomina VUI 202012/01 según nomenclatura de Nexstrain.

Def: Linaje. Posición en la que se ubica el nuevo genoma en un árbol filogenético. Ej: el linaje de la variante británica se denomina B.1.1.7. según la nomenclatura de PANGO.

Def: Cepa. Aquel conjunto de mutaciones que resultan en una variación de las capacidades del virus, afectando las características biológicas del mismo. Ej: el SARS-CoV-2 es una cepa de coronavirus.

A pesar de que al inicio de la pandemia solo nos enfrentábamos a una única variante, con el avance y dada la capacidad de mutación de los coronavirus hoy en día nos enfrentamos a varias: siendo las más relevantes las variantes británica (20I/501Y.V1), la californiana (20C/S:452R), la japonesa/brasileña (20J/501Y.V3) y la sudafricana (20H/501.V2) y en los

últimas semanas, la india (aunque está por ahora no ha sido catalogada como variante preocupante por la CDC) (43). Debido a la identificación de nuevas variantes se ha creado una red de vigilancia genómica a nivel nacional cuya función es detección y seguimiento de nuevas variantes, siendo uno de los centros integrantes el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, aunque entraremos en un poco más de detalle sobre su papel más adelante (44).

Respecto a sus características es importante destacar que estas variantes presentan distintas variaciones en la proteína S y N, así como otros cambios que les confieren incrementos en la infectividad de entre 20-50%, disminución de la susceptibilidad a terapias monoclonales y disminución de la neutralización por anticuerpos en los sueros post-vacunación (43). No todas estas características están presentes en todas las variantes pero de manera general estos son algunos de los motivos que hacen que estas variantes generen tanta preocupación.

Respecto al diagnóstico de las nuevas variantes, por ahora no es posible diferenciar variantes mediante test antigénicos aunque sí es posible mediante PCR (usando como objetivo un gen o incluso SNPs) u otras técnicas como el RT-LAMP (44). Un ejemplo de como estas variantes modifican el diagnóstico es la variante británica (B.1.1.7/501Y.V1), que presenta un fenómeno llamado *drop out* del gen S. Esta variante tiene una mutación en dicho gen que hace que las PCRs que únicamente detectan ese gen no sean capaces de detectar esta variante o lo hagan con menor intensidad (44). Esto no ocurre para otros genes del virus.

De hecho las nuevas PCRs no se están realizando para detectar un único gen, ya que podría dar lugar a falsos negativos, ya que estas variantes se están convirtiendo en predominantes en

nuestro medio, como así ocurre con la británica. En un estudio se analizaron las diferentes secuencias identificadas para el SARS-CoV-2 obtenidas de bases de datos genéticas y se estudió su grado de apareamiento con los cebadores de kits de PCR disponibles en el mercado (45). Las conclusiones fueron que aproximadamente un 34,38% de estas secuencias afectaban a este apareamiento, de las cuales un 25,94% se consideraron de alto riesgo por tratarse de secuencias muy diferentes (45). Todo esto nos apunta a la necesidad de que los kits de PCRs usen como objetivo varios genes en lugar de emplear uno aislado. Los nuevos kits de casas como Vircell o Seegene incluyen varios genes (E, N, RdRP, S) e incluso permiten identificar mutaciones concretas, son las llamadas PCRs multiplex.

Para finalizar, me gustaría destacar un trabajo que está resultando fundamental a la hora de controlar y vigilar la evolución y aparición de nuevas variantes: la secuenciación del genoma del SARS-CoV-2. Esto se fundamenta en establecer una red de vigilancia de laboratorios que secuencien el genoma (que en nuestra comunidad autónoma la forman los hospitales CHUAC, CHUS y CHUVI), lo que permite vigilar la aparición e incidencia de nuevas variantes, su interacción con las vacunas, tratamientos y pruebas diagnósticas y también identificar posibles grupos de riesgo afectados por estas nuevas variantes (44). Estos laboratorios, designados por cada Comunidad Autónoma colaboran con el Ministerio de Sanidad y el ISCII y aportan datos a la OMS y ECDC. Las nuevas secuencias identificadas se almacenan en una base de datos a nivel internacional llamada GISAID (44). Esta labor es fundamental para combatir el virus y sus variantes de una manera actualizada y poder tomar decisiones de una manera coordinada y efectiva.

7. Referencias

1. Salian VS, Wright JA, Vedell PT, Nair S, Li C, Kandimalla M, et al. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol Pharmaceutics* 2021;18(3):754-771.
2. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology* 2020 Dec;41(12):1100-1115.
3. Tang S, Mao Y, Jones RM, Tan Q, Ji JS, Li N, et al. Aerosol transmission of SARS-CoV-2? Evidence, prevention and control. *Environment international* 2020 Nov;144:106039.
4. Yao M, Zhang L, Ma J, Zhou L. On airborne transmission and control of SARS-Cov-2. *The Science of the total environment* 2020 Aug 20;731:139178.
5. Santarpia JL, Rivera DN, Herrera V, Morwitzer MJ, Creager H, Santarpia GW, et al. Transmission Potential of SARS-CoV-2 in Viral Shedding Observed at the University of Nebraska Medical Center. 2020 Mar 26.
6. van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *Journal of clinical virology* 2020 Jul;128:104412.
7. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Annals of internal medicine* 2020 Aug 18;173(4):262-267.

8. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clinical Infectious Diseases* 2020 -05-22;71(10):2663.
9. Cento V, Colagrossi L, Nava A, Lamberti A, Senatore S, Travi G, et al. Persistent positivity and fluctuations of SARS-CoV-2 RNA in clinically-recovered COVID-19 patients. *The Journal of infection* 2020 Sep;81(3):e90-e92.
10. Gao Z, Xu Y, Sun C, Wang X, Guo Y, Qiu S, et al. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect* 2021 Feb;54(1):12-16.
11. Oran DP, Topol EJ. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic : A Systematic Review. *Annals of internal medicine* 2021 Jan 22,.
12. Syangtan G, Bista S, Dawadi P, Rayamajhee B, Shrestha LB, Tuladhar R, et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 Carriers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Public Health* 2021 Jan 20;8:587374.
13. Bates TA, Weinstein JB, Farley S, Leier HC, Messer WB, Tafesse FG. Cross-reactivity of SARS-CoV structural protein antibodies against SARS-CoV-2. *Cell reports (Cambridge)* 2021 Feb 16,;34(7):108737.
14. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, et al. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *International journal of infectious diseases* 2020 Oct;99:397-402.

15. Kyosei Y, Namba M, Yamura S, Takeuchi R, Aoki N, Nakaishi K, et al. Proposal of De Novo Antigen Test for COVID-19: Ultrasensitive Detection of Spike Proteins of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)* 2020 Aug 14;10(8):594.
16. DJ, Jj D, BS, TM, AA, DC, et al. Cochrane Library Cochrane Database of Systematic Reviews Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection (Review) Van den Bruel A, Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection (Review).
17. Kissler SM, Fauver JR, Mack C, Olesen SW, Tai C, Shiue KY, et al. SARS-CoV-2 viral dynamics in acute infections. 2020 -10-23.
18. Post N, Eddy D, Huntley C, Van Schalkwyk, May C I, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE* 2020 -12-31;15(12).
19. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, et al. Evolution of Antibody Immunity to SARS-CoV-2. *BioRxiv* 2021:2020.11.03.367391.
20. Chen M, Qin R, Jiang M, Yang Z, Wen W, Li J. Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for the diagnosis of COVID-19: A meta-analysis and systematic review. *International journal of infectious diseases* 2021 Mar;104:415-422.
21. Chen M, Qin R, Jiang M, Yang Z, Wen W, Li J. Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for the diagnosis of COVID-19: A meta-analysis and systematic review. *International journal of infectious diseases* 2021 Mar;104:415-422.
22. Mathur S, Mathur G. Antibody Testing for COVID-19 Can It Be Used as a Screening Tool in Areas With Low Prevalence? *American journal of clinical pathology* 2020 Jul 01;154(1):1-3.

23. Kang H, Wang Y, Tong Z, Liu X. Retest positive for SARS-CoV-2 RNA of “recovered” patients with COVID-19: Persistence, sampling issues, or re-infection? *Journal of medical virology* 2020 Nov;92(11):2263-2265.
24. CDC. Antibody Testing Interim Guidelines. 2021; Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>.
25. Lynne S. Garcia editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Third edition ed.: LSG & Associates; 2010.
26. Dr Bahman Rasuli and Dr Daniel J Bell et al. COVID-19. 2021; Available at: <https://radiopaedia.org/articles/covid-19-4>. Accessed 19/04/2021.
27. Ye Z, Zhang Y, Wang Y, Huang Z, Song B. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. *European radiology* 2020 Aug;30(8):4381-4389
28. Sarah B. Heili, Germán Peces-Barba. *Ecografía pulmonar. El nuevo estetoscopio del Neumólogo del siglo XXI*. *Medicina respiratoria* 2014;7(3):55-67.
29. De AM, Sustacha B, JA, Lázaro D, J, Oniceag D, et al. ECOCLIP Fecha del boletín Marzo de 2020 ECOGRAFÍA PULMONAR (III): IMÁGENES PATOLÓGICAS.
30. Clevert D, Schroeder I. Curved Transducer B-mode B-mode and M-mode Healthy Lung Lung Ultrasound in COVID-19 Disease Severe Infection.
31. Bosso G, Allegorico E, Pagano A, Porta G, Serra C, Minerva V, et al. Lung ultrasound as diagnostic tool for SARS-CoV-2 infection. *Internal and emergency medicine* 2021 Mar;16(2):471-476.

32. Li B, Di DYW, Saingam P, Jeon MK, Yan T. Fine-Scale Temporal Dynamics of SARS-CoV-2 RNA Abundance in Wastewater during A COVID-19 Lockdown. *Water research (Oxford)* 2021 Jun 01,;197:117093.
33. Bhattacharya P, Kumar M, Islam MT, Haque R, Chakraborty S, Ahmad A, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Communities Through Wastewater Surveillance—a Potential Approach for Estimation of Disease Burden. *Curr Pollution Rep* 2021 -04-06.
34. Rimoldi SG, Stefani F, Gigantiello A, Polesello S, Comandatore F, Mileto D, et al. Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. 2020 May 05,.
35. Larsen DA, Wigginton KR. Tracking COVID-19 with wastewater Wastewater testing captures the rise and fall of novel coronavirus cases in a mid-sized metropolitan region.
36. Cesewski E, Johnson BN. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors & bioelectronics* 2020 Jul 01,;159:112214.
37. Lin Yu, Shanshan Wu, Xiaowen Hao, Xue Dong. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical Chemistry* 2020 July;66(7):975–977.
38. Ricardo Lozano-Reyes, César Daniel García-Sandoval, Cynthia Michelle Avilez-Bahena, Violeta Trejo-Reveles, Rodrigo Balam Muñoz-Soto, César López-Camacho. La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en discapacidad* 2016 mayo-agosto;5(2):116-128.
39. Santiago I. Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 2020 Oct 15,;21(20):2880-2889.

40. Samson R, Navale GR, Dharne MS. Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. 3 Biotech 2020 Sep;10(9):385.
41. Sakr R, Ghsoub C, Rbeiz C, Lattouf V, Riachy R, Haddad C, et al. COVID-19 detection by dogs: from physiology to field application—a review article. Postgrad Med J 2021;0.
42. Thomas Rowley. 'Pet scans': training dogs to sniff out disease. Nature America 2013 febrero;42(2).
43. CDC. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. 2021; Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html#Concern>.
44. De Coordinación De Alertas, Centro, Sanitarias E. Secuenciación de SARS-CoV-2 Secretaría del Estado de Sanidad. Dirección General de Salud Pública. Vigilancia del SARS-CoV-2 22 de enero de 2021.
45. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, Rao SN, Juanola-Falgarona M, Manissero D, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. International journal of infectious diseases 2020 Aug;97:225-229.