

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL SARS-CoV-2

por ROCÍO BAUTISTA MORENO^(1,2), MACARENA ARROYO VARELA⁽³⁾ Y M. GONZALO CLAROS

(2,4)

⁽¹⁾PLATAFORMA ANDALUZA DE BIOINFORMÁTICA. CENTRO DE SUPERCOMPUTACIÓN Y BIOINNOVACIÓN. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

⁽²⁾INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE MÁLAGA (IBIMA).

⁽³⁾UGC DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS. HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA.

⁽⁴⁾DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA; CIBER DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER); INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA (IHSM-UMA-CSIC).

ROCIOBM@UMA.ES, MACARROYO@UMA.ES, CLAROS@UMA.ES

Enviado: 19/05/2020

Aceptado: 01/10/2020

Los biomarcadores son moléculas biológicas ampliamente utilizadas para determinar el estado de una enfermedad y están siendo la base de las pruebas de diagnóstico clínico, tanto directas como indirectas, de la infección por SARS-CoV-2. Los biomarcadores directos se basan en la identificación de secuencias del genoma del virus, como los diagnósticos por RT-qPCR, por CRISPR-Cas9, o por secuenciación directa del genoma del virus en nanoporos (LampPORE). Las determinaciones indirectas se basan en la identificación de biomarcadores en respuesta a la enfermedad, como las pruebas serológicas, donde se identifican las IgM e IgG. Un nuevo paradigma de detección aparece con el desarrollo de nuevas pruebas basadas en biosensores, en las diferencias en el estado metabólico del tejido, en el estudio de imágenes radiológicas asistido por ordenador, o incluso en tomar muestras de saliva. Tener pruebas de diagnóstico más rápidas permitirá dibujar un mapa de la evolución de la enfermedad en la población, por lo que su uso es esencial.

Biomarkers are biological molecules widely used to determine disease stages. Clinical diagnostic tests in the SARS-CoV-2 infection, both direct and indirect, rely on biomarkers. Direct biomarkers are based on the identification of viral genome sequences, such as RT-qPCR diagnostics, those based on CRISPR-Cas9 systems, or direct sequencing of the viral genome by nanopores (LampPORE). Indirect tests are based on the identification of biomarkers in response to the disease, such as serological tests, where IgM and IgG are identified. Ongoing, new test based on biosensors, differences in the metabolic status of the tissue, computer-assisted study of radiological images, or salivary sampling, become a new paradigm. Having faster diagnostic tests will enable to trace the evolution of the disease in the population, so its use is essential.

Biomarcadores diagnósticos:

Desde épocas muy antiguas, la humanidad ha tenido mucho interés por entender por qué enfermamos y qué medidas debemos tomar para determinar exactamente cuál es el mal que nos aqueja. En muchas ocasiones, ese mal se creía causado más por una mano divina que por un causante biológico o un cambio fisiológico. Por suerte, esos tiempos los dejamos atrás hace muchos lustros.

Antes del siglo XIX, el mecanismo para identificar una enfermedad se limitaba a la observación de los síntomas externos de los trastornos internos. El austríaco austriaco Joseph Leopold Auenbrugger introdujo el método de la percusión torácica en 1761, que el francés René Théophile Héophile Hacinthe Laennec convirtió en auscultación de tórax con un cilindro de madera con un conducto interno y una

pieza en forma de embudo que denominó estetoscopio. Otra innovación diagnóstica fueron los rayos X para ver los huesos en 1895. Pero además de la observación, se empezó a plantear que también era necesario medir parámetros físicos, y el primero que aportó números fue el artillero publicado por Wexleder en 1946^[1], capaz de determinar la longitud del cuello del útero (parámetro muy importante en ciertas afecciones ginecológicas). Estábamos en la antesala de una medicina más precisa. En pocos años se pasó de poder realizar mediciones físicas, a realizar mediciones biológicas que nos marcaban ciertos parámetros importantes para determinar el estado de salud. Como ejemplo, podemos nombrar el primer glucómetro, inventado por Anton Hubert Clemens en 1968, que era capaz de medir la concentración aproximada de glucosa en la sangre (glucemia) al detectar la luz emitida por una tira reactiva (Dextrostix) y así controlar la diabetes tipo 1.

El desarrollo de nuevas técnicas y la adquisición de conocimiento hizo que en pocos años fuéramos capaces de medir una gran cantidad de parámetros biológicos, los llamados «biomarcadores». Así, en el año 1999, un grupo de expertos de los Institutos Estadounidenses de la Salud (NIH) definió en 2001 los biomarcadores como *elementos con unas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien de identificar una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica*^[2]. Desde entonces, muchos han sido los elementos utilizados como biomarcadores con los que se pueden medir procesos biológicos (frecuencia cardíaca, tensión arterial, temperatura), procesos patológicos (presencia o ausencia de un patógeno o la fase de una enfermedad) o la respuesta de una persona a un tratamiento o medicamento (intolerancias o alergias). Pero hay que tener en cuenta que el riesgo de tener falsos positivos o falsos negativos en la detección de biomarcadores está presente en todas las pruebas de diagnóstico, puesto que ninguno llega al 100 % de acierto.

El SARS-CoV-2 y la COVID-19:

Como ya es sabido, a finales de diciembre, la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de la provincia de Hubei (China) informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) de que habían identificado una serie de pacientes con un cuadro de neumonía desconocida. Desde entonces, muchos han sido los estudios realizados que finalmente han derivado en la identificación de un nuevo virus perteneciente a la familia de los coronavirus. Ha sido bautizado como SARS-CoV-2 porque se parece al coronavirus SARS-CoV-1 que provocaba el síndrome agudo respiratorio y severo (SARS). Su material genético es un ARN monocatenario extremadamente largo (unas 29 900 bases) para ser un virus de ARN. El cuadro clínico asociado al SARS-CoV-2, en cambio, es muy diferente al SARS y la OMS lo ha denominado COVID-19 (la **coronavirosis de 2019**, o bien la enfermedad por coronavirus de 2019¹). En unos casos cursa con síntomas leves, pero en otros deriva en una neumonía atípica grave. Desde ese momento, el virus no ha parado de extenderse por todos los países del mundo, con lo que ha provocado una pandemia que está poniendo en jaque los sistemas sanitarios, con miles y miles de muertos en todos los países.

Durante el confinamiento se ha hablado mucho de los distintos métodos que existen para confirmar

la infección por SARS-CoV-2 en los pacientes, todos ellos basados en la identificación de ciertos biomarcadores que muestran el estado patológico en el que se encuentran los enfermos. Se les denomina **test (pruebas) de diagnóstico**, y vamos a intentar explicar cuáles son los fundamentos y las diferencias de cada uno de ellos. De paso, comentaremos cómo les afectan los falsos negativos (que nos hacen creer que el paciente está sano con consecuencias graves para el paciente y para la comunidad) y los falsos positivos (que nos dan una percepción erróneamente alta de la inmunidad colectiva).

Diagnóstico directo: la PCR:

Este método utiliza como biomarcador parte de la secuencia del ácido nucleico del genoma del virus sobre el que se aplica una prueba denominada **PCR** (*polymerase chain reaction* → «reacción en cadena de la polimerasa»), diseñada por Kary B. Mullis en 1983 y que revolucionó el mundo de la genética y la biología molecular. Mullis recibió por este descubrimiento el Nobel de Química en 1993. Esta técnica es capaz de realizar millones de copias de un ácido nucleico, por lo que su sensibilidad suele ser muy elevada. En el campo del diagnóstico se suelen emplear robots automatizados con kits estandarizados, dado que poner a punto la PCR para cada diagnóstico necesita que el personal tenga una formación específica.

La PCR se utiliza para amplificar el material genético del SARS-CoV-2, cuando esté presente. Por eso, el primer paso consiste en extraer el ARN de las muestras de los pacientes. Dichas muestras proceden de la parte posterior de la garganta. Entre los últimos avances está el que no sea necesario purificar el ARN, sino que baste con lisar las células y desnaturalizar las proteínas durante 5 a 10 min a 95 °C porque este virus no sintetiza en ningún momento un ADN intermedio como sí hacen los retrovirus. Como la PCR solo sabe amplificar ADN, el ARN vírico hay que transformarlo antes en ADN mediante una enzima denominada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Con este ADN complementario ya podemos realizar una RT-qPCR que se denomina así por ser «cuantitativa» (*quantitative*) en «tiempo real» (RT: *real time*, como si hubiera un tiempo 'irreal'). La ventaja es que la acumulación de los millones de copias del material genético del virus, si está presente en la muestra, se observa en directo (o sea, en lo que está de moda llamar «tiempo real»; **Figura 1A**). Para el diagnóstico del SARS-CoV-2 se suelen usar sondas TaqMan, lo

¹<http://mgclaros.blogspot.com/2020/03/covid-19-es-femenino-queridos-mios.html>

que permite detectar varias secuencias (dos del virus más un control de carga de una secuencia humana) en el mismo pocillo). La reacción de PCR no debería ocupar más de dos horas para garantizar la detección del ARN del virus aunque sea en baja cantidad (el umbral está situado en unas 5,2 copias del genoma en la reacción). Como puede colegirse, se trata de una prueba muy específica (> 96 %) y muy sensible (> 93 %), pero también reviste cierta complejidad técnica, pues depende mucho de la correcta toma, del transporte y del procesamiento de la muestra (desde la inactivación del virus en una sala P3 hasta la amplificación, pasando por la extracción del ARN). Por tanto, el proceso completo puede demorarse hasta doce horas (se tardaban varios días en los momentos más graves al comienzo de la pandemia). Los laboratorios de referencia bien automatizados no superaban las 700 PCR al día, pero la cesión de máquinas de 384 pocillos de los laboratorios veterinarios y de investigación, e incluso la donación de robots como el que acaban de prometer al Hospital Regional de Málaga, capaz de hacer 2,400 pruebas al día¹, ha servido para acelerar el proceso. Los falsos negativos suelen venir de que se tomó la muestra de un lugar donde no había virus. En cambio, los falsos positivos suelen deberse a que la persona que manipula la muestra está contagiada y ha contaminado involuntariamente el hisopo o torunda de muestreo, o a que el laboratorio la contamine en algún momento del proceso. Los casos de teórica reinfección realmente se deben a que la PCR detecta el ARN del genoma del virus, sea o no infectivo.

Hasta ahora, las muestras se han venido tomando de la laringe con un hisopo, un proceso bastante invasivo que tensa tanto en el paciente como en el personal sanitario, porque aunque dura unos segundos, puede parecer eterno cuando provoca náuseas e incluso dolor. Además se suele realizar también un hisopado orofaríngeo que es menos invasivo, pero igual de desagradable para el paciente. Todas estas molestias podrían desaparecer desde que sabemos que el coronavirus está en el 87-100 % de las muestras de saliva de los contagiados. Por tanto, escupir en un tubo estéril permite detectar el SARS-CoV-2 de forma simple (no hace falta conservar la muestra en frío ni extraer el ARN), no invasiva (no se usan hisopos), flexible (se ha validado con reactivos, material fungible y equipos de distintos proveedores), barata (menos de 5 \$ de fungibles por muestra) y segura, además de reducir el estrés y ahorrar equipos

de protección individual. El pasado 15 de agosto, la FDA ha aprobado el método **SalivaDirect**², cuyos resultados concuerdan en un 94 % con los obtenidos con el hisopado habitual, y un límite de detección de 6 a 12 copias del ARN del coronavirus por mililitro de muestra. La descripción se puede encontrar en una prepublicación y el protocolo ya es de dominio público en la plataforma protocols.io³, por lo que no hay que pagar para usarlo.

Detección por CRISPR-Cas y RT-LAMP:

Las bacterias tienen una especie de sistema inmunitario que les permite defenderse frente a patógenos víricos gracias a que almacenan en su genoma, a modo de memoria, parte de la secuencia de cada virus que la infecta. Este mecanismo de defensa actúa mediante un complejo denominado CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* → «grupos de repeticiones palindrómicas cortas a intervalos regulares»⁴), donde Cas es una endonucleasa imprescindible para su funcionamiento. Este complejo, ante una segunda infección de un virus, es capaz de reconocerle la secuencia y defenderse cortando el ADN invasor.

Los científicos han aprovechando esta funcionalidad para desarrollar una prueba de detección rápida denominada **DETECTR** (*SARS-CoV-2 DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*)^[3] capaz de reconocer, a través de un ARN guía con secuencias coronavíricas, partes del genoma del SARS-CoV-2, con lo que lo corta como si actuaran unas tijeras (Figura 1B). El sistema es tan sensible como la RT-qPCR, pero con la gran ventaja de que tarda mucho menos, tan solo unos 40 minutos. Es tan reciente que aún no ha sido homologado como test de diagnóstico en nuestro país.

En este sistema, el ARN del virus necesita una amplificación isotérmica previa acoplada a retrotranscripción: una RT-LAMP (*reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification*) basada en la «amplificación isotérmica mediada por bucles» (LAMP: *loop-mediated isothermal amplification*). La LAMP es una alternativa a la PCR, más simple y de bajo coste, que se realiza a una temperatura constante entre 60 y 65 °C con hasta cuatro cebadores para amplificar seis regiones diferentes del molde^[4]. No ha desplazado a la PCR para la clonación ni otras aplicaciones moleculares, pero sí para el diagnóstico y la detección de virus, bacterias, tumores, etc.

¹https://www.malagahoy.es/malaga/desescalada-Malaga-robot-Hospital-Regional-PCR_0_1467753428.html

²<https://covidtrackerct.com/about-salivadirect/>

³<https://www.protocols.io/view/salivadirect-rna-extraction-free-sars-cov-2-diagno-bjswkfn6>

⁴<https://mgclaros.blogspot.com/2015/12/que-significa-cripr-en-espanol.html>

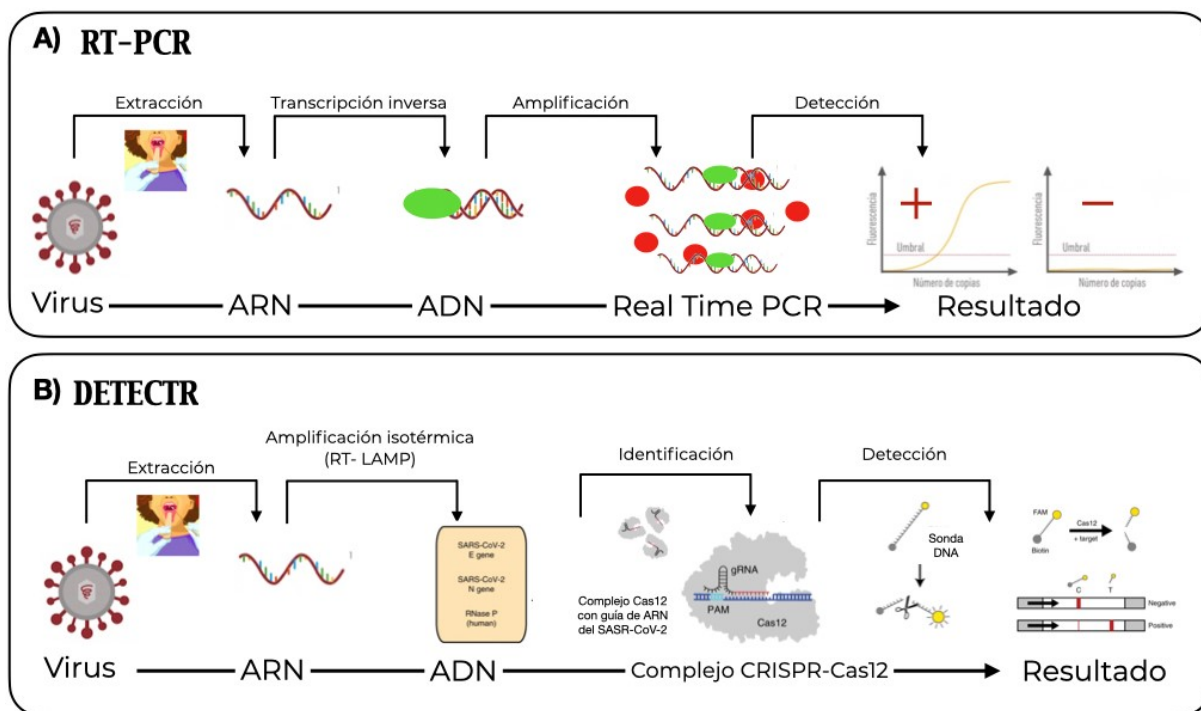


Figura 1: Identificación del virus SARS-CoV-2 a través de su ARN. A) Por PCR en tiempo real. B) Por CRISPR-Cas (modificada de [3]).

Como se puede combinar con la retrotranscripción (RT-LAMP), se han empezado a idear kits basados en esta técnica en los que la detección es colorimétrica. Parecen ser igual de sensibles, más baratos y más rápidos que los anteriores de CRISPR y RT-qPCR, como el que tiene en estudio la empresa New England Biolabs^[5].

Secuenciación rápida por nanoporos:

La secuenciación por nanoporos¹ es una reciente tecnología que se viene utilizando cada vez más en la investigación. Tiene la gran ventaja de que basta un instrumento portátil y poco costoso que cabe en la palma de la mano, al que no suele añadirse ningún reactivo, sino la muestra. De hecho, la mayor complicación reside en la preparación de dicha muestra para que la hebra de ARN consiga atravesar el poro de una proteína sintética cuyo un diámetro interior mide 1 nm (de ahí lo de «nanoporo»). Esta proteína está colocada sobre una membrana de polímero de baja conductividad, por lo que el paso del ácido nucleico crea una alteración característica en la corriente eléctrica que permite identificar cada nucleótido cuando pasa por el nanoporo. Como no hay límite de tamaño para los fragmentos secuenciados, se puede obtener todo el ARN del virus en un solo fragmento (lo que facilita el análisis bioin-

formático posterior con respecto a la tecnología de lecturas cortas de Illumina y SOLiD). Así pues, en tan solo 8 horas consigue secuenciar los casi 29 900 nt del genoma del SARS-CoV-2. Ya se había experimentado este ensayo en con los brotes del virus del Ébola y el del Zika. Para la pandemia de COVID-19, el pasado mes de mayo se ha propuesto **LampPORE**², una modificación que simplifica y abarata la prueba todavía más al realizarla en tan solo 4-5 horas, con lo se aumenta además la vida útil de cada cubeta de lectura (*flow cell*). A pesar del ahorro en reactivos, de ser portátil, de devolver el genoma como uno o muy pocos fragmentos, y de ser fácil de utilizar, es la más cara de todas las mencionadas, pero lo compensa con el aporte de la secuencia del virus y la detección de nuevas cuasiespecies. Por eso, debería plantearse su introducción en los hospitales para establecer un sistema de diagnóstico y seguimiento de la COVID-19 o cualquier otra infección que requiera seguimiento. Por desgracia, en España aún no está muy implantada esta tecnología, si bien muchos grupos que la usan están optimizando el protocolo con la mente puesta en su futura aplicación en el entorno clínico.

Diagnósticos serológicos:

En los diagnósticos serológicos, los biomarcadores que se utilizan se basan en la respuesta inmunitaria

¹<https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing>

²<https://nanoporetech.com/covid-19/lampore>

de nuestro organismo a la infección, por lo que no se detecta de forma directa la presencia del material genético del virus, sino otro tipo de moléculas: los antígenos (elementos extraños) y los anticuerpos (proteínas de tipo inmunoglobulina que reconocen los antígenos), dos moléculas que se reconocen de forma específica. En este caso, se dice que la prueba es una **inmuncromatografía** lateral. A diferencia de las anteriores, tiene la gran ventaja de que puede realizarse a domicilio y no necesita ninguna formación especial. Hay dos tipos principales: los que detectan antígenos del virus, y los que detectan anticuerpos contra el virus.

En los **test de antígenos**, lo que detectamos es la proteína S vírica, la proteína que se proyecta hacia el exterior del virus en forma las espículas (*spikes*) o peplómeros, y que le dan el aspecto de corona solar que les da su nombre. Estas proteínas se obtienen de muestras respiratorias de exudado nasofaríngeo. La prueba se realiza sobre un soporte sólido que lleva adheridos anticuerpos específicos que reconocen su antígeno específico (la proteína S). El resultado es muy rápido, en minutos, donde un valor positivo nos muestra que en ese momento estamos infectados porque tenemos partículas víricas. El problema principal

de estas pruebas es su baja sensibilidad y especificidad en comparación con la detección directa del genoma vírico por RT-qPCR.

Los **test de anticuerpos** utilizan un sistema de detección muy parecido al de los antígenos, pero se basan en la respuesta inmunitaria de nuestro organismo ante la presencia del coronavirus. El sistema inmunitario sintetiza inmunoglobulinas (anticuerpos) de distintos isotipos para defenderse, isotipos que van cambiando en función de la etapa de la enfermedad. En la primera respuesta, la rápida, se secretan más inmunoglobulinas M (IgM). En la segunda oleada de defensa se sintetizarán (y se guardarán como memoria) las inmunoglobulinas G (IgG). En el test de anticuerpos se fijan al soporte sólido las proteínas víricas, normalmente la proteína S. La muestra de partida ya no es nasofaríngea, sino de sangre. Según la Sociedad Española de Inmunología y el Instituto de Salud Carlos III^[6], las primeras IgM que aparecen no se acumulan en suficiente cantidad hasta los 5 o 7 días de la infección, unos 2-4 días después de la aparición de los síntomas, por lo que este tipo de diagnóstico no es tan eficaz en la etapa asintomática de la infección. La respuesta importante con IgG es más tardía: este isotipo de anticuerpos no se

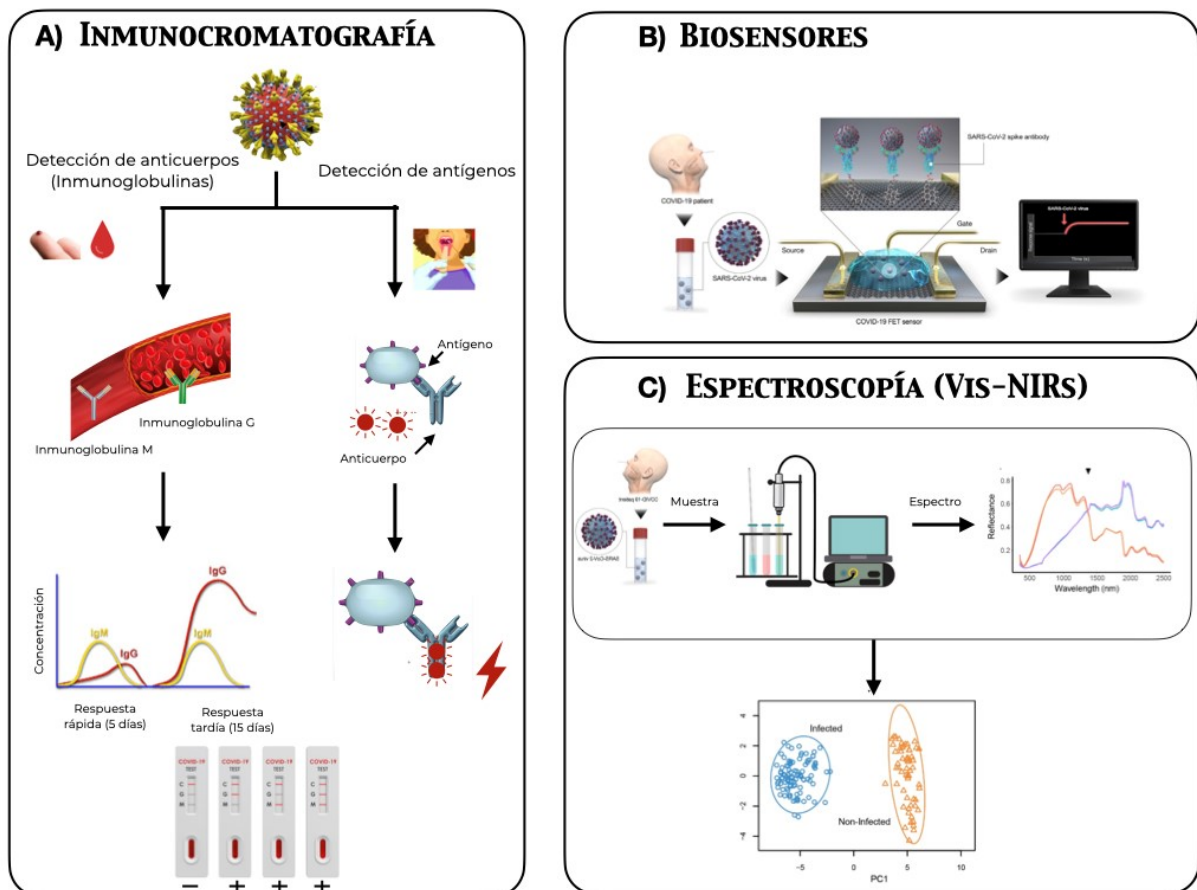


Figura 2: Otras formas de detección del SARS-CoV-2. A) Test serológicos. B) Biosensores (imagen tomada de^[7]). C) Espectroscopía (imagen tomada de <http://boscalia.org/covinirs>)

acumula en gran cantidad antes de los 15 días de la infección (Figura 2A), por lo que darán resultados muy fiables a partir de ese momento. La detección de ambas en el mismo test nos puede dar una idea de la fase de la enfermedad en la que nos encontramos: al principio (solo IgM), en plena infección (están las dos) o ya la hemos pasado (solo IgG). Sin embargo, aunque la detección solo tarde unos minutos y no se necesite personal especializado, vuelve a ser menos sensible y específica (se acerca al 80%) que la detección directa con el test de RT-qPCR. Si por algún motivo se quieren detectar las IgA, habría que acudir a técnicas más laboriosas basadas en inmunoensayos enzimáticos con cambio de color (ELISA) o emisión de luz (CLIA). Cualquier experto interpretará que un ELISA o un CLIA serán más precisos que los test rápidos, pero dado que estos análisis no son portátiles y necesitan más cantidad de muestra de sangre venosa central (sangre extraída con jeringuilla, que es donde los anticuerpos están más concentrados), no son los preferentes. Lo sorprendente ha sido la coincidencia entre los ELISA y las inmunocromatografía laterales, que oscila entre el 90% y el 97%, lo que respalda el uso de los test rápidos, que son más fáciles, baratos, rápidos y, sobre todo, menos cruentos para el paciente. No obstante, cualquiera de estas técnicas dará falsos negativos, que oscilan entre el 20 y el 30% debido a que el umbral de detección requiere una cantidad relativamente alta de anticuerpos.

Biosensores:

Por otro lado, se están desarrollando otros tipos de técnicas que no se basan en una reacción enzimática, sino que utilizan unos dispositivos integrados y autónomos constituidos por un chip sensor (de ahí que se denominen «biosensores») que, en contacto con los biomarcadores (antígenos, anticuerpos o fragmentos del genoma vírico) producen una reacción. El biosensor contiene un transductor que detecta las reacciones y las convierte inmediatamente en un valor numérico cuantificable. Su principal ventaja es que se pueden realizar sin grandes ni costosas infraestructuras de laboratorio. Además, según el tipo de biosensor, se pueden ofrecer medidas inmediatas, en directo (o como les gusta a otros, en ‘tiempo real’), sin que haya que amplificar señales ni usar marcajes (ya sean de fluorescencia o colorimétricos). Entre los biosensores que se están desarrollando hasta el momento cabe destacar el **COVID-19 FET**^[7], aunque como sus propios desarrolladores indican, es de dos a

cuatro veces menos sensible que la PCR (Figura 2B).

Nuevo paradigma de detección:

Hasta el momento, todas las técnicas descritas están basadas en la identificación, de una forma u otra, de algún biomarcador que determine la presencia del virus en el organismo a través de sus proteínas o su ácido nucleico, o en la percepción la huella dejada en el sistema inmunitario. Sin embargo, el nuevo paradigma lo conforman las técnicas que no se basan en la detección de un único biomarcador.

La técnica de **espectroscopía del infrarrojo cercano (Vis-NIRs)** se plantea el estudio del estado metabólico completo de una muestra para detectar el SARS-CoV-2 en una muestra de exudado nasofaríngeo sin necesidad de más modificaciones. Se basa en su capacidad para registrar las propiedades de la materia mediante pulsos de energía aplicados en el espectro de absorción, que se extiende desde el visible (780 nm) hasta los 2500 nm. Los pulsos de energía lumínica aplicados atraviesan su superficie y provocan la vibración de las moléculas, que luego se dispersan en todas las direcciones en función de la composición de la muestra. Las vibraciones se corresponden con los diferentes enlaces moleculares y grupos reactivos de las sustancias en el exudado, correlacionadas directamente con el metaboloma. Un espectro infectivo con el SARS-Cov-2 será significativamente diferente de un espectro no infectivo (Figura 2C). Se trata de una técnica precisa, rápida y económica que ofrece el resultados en menos de un minuto sin que se necesiten otros reactivos, por lo que es, además, sostenible¹.

Otra de las técnicas que se están poniendo en marcha sin necesidad de identificar moléculas es el **examen médico por imágenes**, mediante el estudio exhaustivo de las radiografías de rayos X tradicionales o de las tac². En este sentido, han surgido varias iniciativas en las que participan hospitales y centros de investigación de toda Europa, como por ejemplo la apoyada por la Sociedad Europea de Informática de Imágenes Médicas (EuSoMII) y coordinada por el Instituto del Cáncer de los Países Bajos, denominada Imaging COVID-19 AI³. El objetivo principal es el desarrollo de algoritmos que apliquen la **inteligencia artificial** al análisis de imágenes, de tal forma que se permita un diagnóstico preciso y rápido de la infección. El estudio se ha puesto en marcha a partir de miles de imágenes de pacientes de distinta gravedad y ha alcanzado una fiabilidad del 80%.

¹<http://boscalia.org/covinirs>

²<https://dle.rae.es/tac>

³<https://imagingcovid19ai.eu/>

Como veis, disponemos de pruebas diagnósticas lo que su uso, así como el aumento de la sensibilidad cada vez más rápidas que nos pueden dibujar un mapa de evolución de la enfermedad en la población, por y especificidad, se hacen completamente necesarios.

Para saber más:

- [1] D. J. Wexler. A simple uterine sound marker. *Am J Surg.* 1946. 72(5), 767. DOI: 10.1016/0002-9610(46)90361-3
 - [2] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2001. 69(3), 89-95. DOI: 10.1067/mcp.2001.113989
 - [3] James P. Broughton, Xianding Deng, Guixia Yu, Clare L. Fasching, Venice Servellita, Jasmeet Singh, Xin Miao, Jessica A. Streithorst, Andrea Granados, Alicia Sotomayor-Gonzalez, Kelsey Zorn, Allan Gopez, Elaine Hsu, Wei Gu, Steve Miller, Chao-Yang Pan, Hugo Guevara, Debra A. Wadford, Janice S. Chen, Charles Y. Chiu . CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0513-4.
 - [4] Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, Tetsu Hase, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research.* 2000. 28(12), e63, DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
 - [5] Yinhua Zhang, Nelson Odiwuor, Jin Xiong, Luo Sun, Raphael Ohuru Nyaruaba, Hongping Wei, Nathan A Tanner. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. *medRxiv* 2020.02.26.20028373.
 - [6] Instituto de Salud Carlos III. Interpretación de las pruebas diagnósticas frente a SARS-CoV-2. 2020. <https://www.mscbs.gob.es/> [consulta 20-5-20]
 - [7] Giwan Seo, Geonhee Lee, Mi Jeong Kim, Seung-Hwa Baek, Minsuk Choi, Keun Bon Ku, Chang-Seop Lee, Sangmi Jun, Daeui Park, Hong Gi Kim, Seong-Jun Kim, Jeong-O Lee, Bum Tae Kim, Edmond Changkyun Park, and Seung Il Kim. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano.* 2020. 14(4), 5135-5142. DOI: 10.1021/acsnano.0c02823.
-
-