



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Descripción general de las metodologías de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en muestras clínicas

Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Wendy Abigail Sailema Ronquillo

Tutor: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato - Ecuador

Septiembre 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este trabajo de Titulación bajo la Modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 01 de agosto del 2022

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714348859

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Wendy Abigail Sailema Ronquillo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Wendy Abigail Sailema Ronquillo

C. I. 1804985388

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía
C.I. 1804148086
Presidente del tribunal

Dr. Mario Daniel García Solís
C.I. 1103605471

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas
C. I. 1802726628

Ambato, 31 de agosto del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de este un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública. Además, apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Wendy Abigail Sailema Ronquillo

C. I. 1804985388

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fuerza y mi guía.

En especial dedico este logro a mis padres Francisco Sailema y Fanny Ronquillo, quienes han sido el motor principal de mis estudios brindándome todo su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanas María y Nicol, por estar siempre presente en los momentos difíciles, cuando parecía que todo iba mal.

A mi esposo Stalin Paul, tu ayuda, tu apoyo y tu amor incondicional han sido uno de los complementos fundamentales durante toda mi carrera universitaria.

Principalmente todo mi esfuerzo y dedicación, al regalo más grande que Dios me supo dar, mi amado hijo Alan Alejandro, Te Amo.

Por y para ustedes, todo mi cariño.

Wendy Abigail

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida, por brindarme salud y fuerzas para seguir adelante. Un infinito agradecimiento a mis padres Francisco Sailema y Fanny Ronquillo, quienes con su amor y paciencia supieron guiarme por el camino del bien para poder convertirme en profesional, gracias por tanto esfuerzo, todas sus noches de esfuerzo y desvelo serán recompensadas, gracias por seguir siempre adelante y por su apoyo incondicional, los amo papas. A mis hermanas, por estar siempre conmigo, compartiendo en todas las etapas de mi vida, las quiero mucho brujas.

A mi amor Stalin Paul, gracias por siempre estar ahí en los buenos y malos momentos, incluso cuando sentía que todo estaba mal, tu estabas presente con tus palabras de aliento y motivación para seguir adelante y especialmente para hacerme reír, tu apoyo ha sido fundamental para poder culminar mi carrera universitaria, Te Amo.

A la personita que me otorgo mi primer título, el título de madre. A mi hijo amado, Alan Alejandro, hijo mío eres el regalo más hermoso que Dio me pudo dar, Te Amo infinitamente, gracias por llegar a mi vida y llenarme de todo tu amor, tus ocurrencias, tus travesuras, este logro es gracias a ti y por ti, porque somos la prueba de que siempre se puede salir adelante a pesar de todas las adversidades.

A Sonia Tisalema, más que mi suegra mi amiga, gracias por su ayuda y sus palabras de aliento para poder seguir adelante. A mis familiares más cercanos, que siempre estuvieron pendientes de mi en todo lo que hacía sin juzgarme y queriendo verme siempre salir a delante.

A mi tutor el PhD. William Calero por estar dispuesto a brindarme su ayuda, por su paciencia, su tiempo, colaboración, guía académica y profesional en el desarrollo de este trabajo de titulación. Eternamente agradecida.

A la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me abrió sus puertas para poder adquirir conocimientos y experiencias que quedarán guardadas en mi corazón por siempre.

¡Infinitas gracias a todos, esto es por y para ustedes...!

Wendy Abigail

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Taxonomía	2
1.1.2. Epidemiología	3
1.1.3. Estructura y características del SARS-CoV-2	6
1.1.4. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2.....	7
1.2. Objetivos.....	9
1.2.1. Objetivo General.....	9
1.2.2. Objetivos Específicos	9
CAPITULO II.....	10
METODOLOGÍA.....	10
2.1. Definición del problema	10
2.2. Búsqueda de la información	10
2.3. Organización de la información.....	10
2.4. Análisis de la información	11
2.5. Materiales	11
CAPITULO III.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
3.1. Técnicas de detección y cuantificación	12

3.1.1. Diagnóstico de COVID-19 basado en la amplificación de ácidos nucleicos	13
3.1.1.1. RT-PCR.....	13
□ Características de las técnicas comerciales RT-PCR.....	16
3.1.1.2. LAMP	19
3.1.1.3. CRISPR.....	20
3.1.2. Diagnóstico de COVID-19 por detección de antígenos del SARS-CoV-2	22
3.1.3. Detección de COVID-19 basada en ensayos inmunológicos	23
3.2. Dianas analíticas del SARS-CoV-2	24
3.3. Muestreo y tipos de muestras	29
3.3.1. Muestras respiratorias	29
3.3.1.1. Muestras respiratorias del tracto superior	29
3.3.1.2. Muestras respiratorias del tracto inferior	31
3.3.2. Muestras de sangre	32
3.3.3. Muestras de heces.....	33
3.4. Ventajas y limitaciones de los métodos utilizados para la detección de SARS-CoV-2.....	33
3.5. Técnicas de secuenciación del SARS-CoV-2.....	39
3.6. Variantes del SARS-CoV-2	41
3.6.1. Variantes de interés (VOI).....	41
3.6.2. Variantes preocupantes (VOC).....	42
CAPITULO IV	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
4.1. Conclusiones.....	47
4.2. Recomendaciones.....	49
BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción y características de los ensayos de RT-PCR	17
Tabla 2. Secuencias de primers para la detección de SARS-CoV-2.....	26
Tabla 3. Características de las muestras clínicas y sus aplicaciones analíticas	34
Tabla 4. Ventajas y limitaciones de las técnicas de detección para SARS-CoV-2....	36
Tabla 5. Características de los ensayos Illumina, Ion Torrent y Oxford Nanopore...	40
Tabla 6. Variantes de interés (VOI) del SARS-CoV-2	41
Tabla 7. Variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2.....	43
Tabla 8. Técnicas para la detección de VOC del SARS-CoV-2	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de HCoV	3
Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2.....	6
Figura 3. Organización genómica del SARS-CoV-2	7
Figura 4. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2	8
Figura 5. Organización de la información en MENDELEY	11
Ilustración 1. Métodos para la detección de SARS-CoV-2	12
Figura 6. Métodos principales para la detección de SARS-CoV-2	13
Figura 7: Diagnóstico de COVID-19 mediante el ensayo RT-PCR.....	14
Figura 8: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)	15
Figura 9. Diagnóstico de COVID 19 mediante RT-LAMP	20
Figura 10. Diagnóstico de COVID-19 mediante CRISPR/Cas12a	21
Figura 11: Ensayo DETECTR para la detección de SARS-CoV-2.....	21
Figura 12: Prueba rápida para la detección de antígenos del SARS-CoV-2	22
Figura 13. Inmunoensayos para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2...	24
Figura 14. Estructura genómica de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2	25
Figura 15. Secuenciación de Sanger	39
Figura 16. Diversidad genética del SARS-CoV-2 en Sudamérica	44

RESUMEN

A finales del año 2019, apareció un nuevo tipo de coronavirus, conocido como SARS-CoV-2 que ocasiona la enfermedad de COVID-19, este virus resultó de rápida expansión y en marzo del 2020 fue declarado como pandemia por COVID-19, los síntomas más comunes de la enfermedad son fiebre, dolor muscular, dificultad para respirar, tos, pérdida del olfato y el gusto, dolor de cabeza y diarrea en el 10 por ciento de los pacientes infectados. Por otro lado, existen pacientes que no presentan ningún tipo de síntoma, conocidos como pacientes asintomáticos. Dentro de los factores críticos para una adecuada respuesta frente a una pandemia vírica se consideran en primer lugar una detección oportuna, y el aislamiento de los individuos potencialmente infectados. Así pues, el apareamiento de nuevas variantes (alfa, delta, ómicron) y el estudio de la secuenciación del genoma completo del SARS-CoV-2 permitió el desarrollo de nuevas tecnologías de análisis molecular.

La presente investigación tuvo como objetivo principal indagar sobre las metodologías de detección y cuantificación de SARS-CoV-2, para el desarrollo del estudio se plantearon criterios de inclusión y exclusión como: libros, artículos, documentos y reportes de bases científicas e investigaciones realizadas a partir del año 2019. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 150 documentos que se analizaron para la presente investigación. De forma específica, se estudió las diferentes tecnologías disponibles, los tipos de muestras y su procesamiento, técnicas de secuenciación del genoma completo del SARS-CoV-2, así como las ventajas y limitaciones de los métodos vigentes.

Palabras clave: Investigación bibliográfica, coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, dianas analíticas, diagnóstico COVID-19, variantes SARS-CoV-2.

ABSTRACT

At the end of 2019, a new type of coronavirus appeared, known as SARS-CoV-2, which causes the disease COVID-19. This virus spread rapidly and in March 2020 it was declared a pandemic by COVID-19. The most common symptoms of the disease are fever, muscle pain, shortness of breath, cough, loss of smell and taste, headache and diarrhea in 10 percent of infected patients. On the other hand, there are patients who do not present any symptoms, known as asymptomatic patients. Among the critical factors for an adequate response to a viral pandemic, timely detection and isolation of potentially infected individuals are considered first. Thus, the appearance of new variants (alpha, delta, omicron) and the study of the complete genome sequencing of SARS-CoV-2 allowed the development of new molecular analysis technologies.

The main objective of this research was to investigate the methodologies for the detection and quantification of SARS-CoV-2. For the development of the study, inclusion and exclusion criteria were proposed, such as: books, articles, documents and reports of scientific bases and research carried out at from the year 2019. As a result, approximately 150 documents were obtained that were analyzed for the present investigation. Specifically, the different technologies available, the types of samples and their processing, SARS-CoV-2 whole genome sequencing techniques, as well as the advantages and limitations of current methods were studied.

Keywords: Bibliographic research, coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, analytical targets, COVID-19 diagnosis, SARS-CoV-2 variants.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

Al final del año 2019, las autoridades chinas detectaron numerosos casos de neumonía humana grave de origen desconocido, dichos casos estaban vinculados a un mercado mayorista de animales marinos en Wuhan, provincia de Hubei (**Alygizakis et al., 2021**), esta enfermedad fue identificada como brote de 2019-nCoV y actualmente se distingue como agente causal al SARS-CoV-2 que produce la enfermedad de COVID-19 (**Rabaan et al., 2020**).

El nuevo coronavirus se extendió rápidamente por el mundo, y el 12 de marzo de 2020 la OMS la declaró como pandemia por COVID-19 (**Organización Mundial de la Salud, 2020**) Los pacientes contagiados por el SARS-CoV-2 desarrollan neumonía, la cual es acompañada con el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) e insuficiencia renal. Una vez que el humano se ha expuesto al virus, el período de incubación de COVID-19 es de 5 a 25 días; los síntomas más comunes son fiebre, dolor muscular, dificultad para respirar o disnea, tos, pérdida del olfato y el gusto, además de dolor de cabeza y diarrea en el 10% de los pacientes infectados (**Chellasamy et al., 2020**). Por otro lado, existen pacientes que no presentan ningún tipo de síntoma, conocidos como pacientes asintomáticos (**Martínez & Rodríguez, 2021**).

Hasta julio de 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha registrado un aproximado de 535 millones de casos totales del nuevo SARS-CoV-2, y han sido notificados más de 6,35 millones de muertes a nivel mundial (**OMS, 2022a**). Dentro de los factores críticos para una adecuada respuesta frente a una pandemia vírica se consideran en primer lugar una detección oportuna, y el aislamiento de los individuos potencialmente infectados (**Rosenthal, 2020**). En este contexto, la respuesta adecuada del sector de investigación y desarrollo a nivel mundial permitió la estandarización de protocolos analíticos de diversa índole, aplicados en diferentes ámbitos, en un tiempo récord.

La obtención de la secuencia de SARS-CoV-2, en enero de 2020, permitió el rápido desarrollo de metodologías de análisis molecular (**Zhu et al., 2020**). La Organización Mundial de la Salud, desde el 17 de enero de 2020, publicó una guía provisional para el diagnóstico del entonces conocido 2019-nCoV en humanos, basados en una tecnología de real time RT-qPCR (**Corman et al., 2020**). Posteriormente, se desarrollaron nuevas técnicas diagnósticas basadas en la detección de antígenos, anticuerpos, y otros test basados en diversas metodologías de amplificación de ácidos nucleicos.

En el presente proyecto de investigación bibliográfica se analizará la evolución de las técnicas de diagnóstico de SARS-CoV-2 en muestras clínicas. De forma específica, se abarcarán las diferentes tecnologías disponibles, tipos de muestras y su procesamiento, metodologías de extracción y purificación de ácidos nucleicos, así como las ventajas y limitaciones de los métodos vigentes.

1.1.1. Taxonomía

La nueva enfermedad conocida como COVID-19 es causada por un patógeno viral llamado coronavirus (CoV) el cual pertenece a la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales* y la subfamilia de *Orthocoronavirinae*; esta subfamilia posee cuatro géneros de coronavirus: el alfa-coronavirus (α -CoV), beta-coronavirus (β -CoV), delta-coronavirus (δ -CoV) y el gamma-coronavirus (γ -CoV). Entre estos géneros, los mamíferos son infectados principalmente por α - y β -CoVs, mientras que los géneros δ - y γ -CoVs infectan aves (**Chellasamy et al., 2020**).

El género β -CoV se puede dividir en cuatro especies: A, B, C y D (Figura 1). El género coronavirus ocasionalmente logra mutar para infectar humanos ya que posee una amplia diversidad y alta recombinación genética (**Zhu et al., 2020**). Considerando los hospedadores, existen seis especies que infectan a huéspedes humanos, los cuales son más conocidos como HCoV (coronavirus que infectan humanos). De forma frecuente, la infección en humanos por HCoV causa síntomas respiratorios leves a graves, según el género del coronavirus, así como por la naturaleza inmunodeprimida de los pacientes (**Ying Yan et al., 2020**).

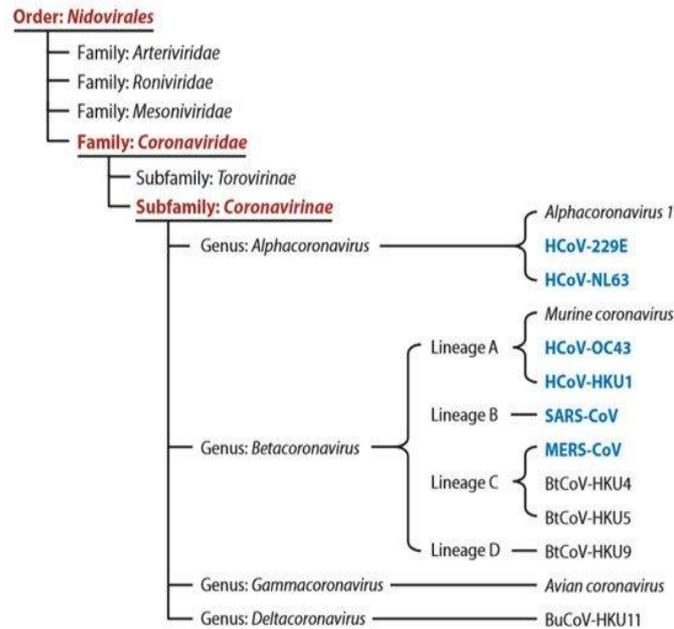


Figura 1. Taxonomía de HCoV

Fuente: (Fung & Liu, 2019)

El género β -CoV incluye el SARS-CoV, que provoca la enfermedad del síndrome respiratorio agudo grave, de igual manera se incluye el virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el nuevo SARS-CoV-2. En todo el mundo, el SARS- y MERS-CoVs han infectado a más de 8.000 y 2.500 personas respectivamente (Tesini, 2021).

1.1.2. Epidemiología

1.1.2.1. SARS-CoV

El SARS-CoV no fue el primer coronavirus que logró infectar a los humanos, pero si logró tener una gran importancia en la historia de enfermedades infecciosas. El SARS-CoV apareció como un brote de neumonía por primera vez en la provincia de Guangdong en China en el año 2002, la neumonía recibió el nombre de síndrome respiratorio agudo severo (SARS) pues se desconocía los patógenos que ocasionaban la enfermedad y sobre todo estos nunca habían sido identificados previamente (Azevedo, 2021). El SARS-CoV tenía un período de incubación de 4 a 6 días previos

a que el paciente presentara síntomas comunes de gripe y neumonía (**Rabaan et al., 2020**). La epidemia finalizó en junio del año 2003 con un aproximado de 8.000 casos positivos de SARS-CoV en todo el mundo y presentó una mortalidad no mayor al 10% (**Yuxin Yan et al., 2020**).

Como medida preventiva, se trató de identificar el origen del SARS-CoV, para ello se realizó estudios en animales vivos de un mercado de Guangdong y se descubrió que la civeta enmascarada de las palmeras (*Paguma larvata*) junto con otras especies similares había adquirido el virus anteriormente (**Fung & Liu, 2019**). Por otro lado, se realizaron estudios en civetas silvestres y no se encontró evidencia de que estas hayan presentado síntomas del SARS-CoV, mientras que las civetas que se vendían en los mercados chinos si presentaban síntomas del virus (**L. Wang, 2021**), lo cual muestra que hay baja probabilidad de que las civetas hayan sido el huésped natural del virus.

La investigación realizada por **Li et al., (2017)** centró su mirada en los murciélagos y su capacidad para hospedar virus zoonóticos, sumado a ello se dio un aumento en el consumo de murciélagos y sus derivados en el sur de China lo cual incentivó a creer que los murciélagos hospedaban el SARS-CoV, esto se comprobó mediante el análisis y recolección de muestras de 400 murciélagos pertenecientes a tres familias, seis géneros y nueve especies diferentes, donde el SARS-CoV obtuvo resultados positivos en especies diferentes de murciélagos herradura en el género *Rhinolophus* (**Li et al., 2017**). De esta forma se determinó que los murciélagos herradura fueron el anfitrión principal que albergaba el virus del SARS-CoV, el cual más adelante fue transmitido a las civetas como hospedero intermediario para finalmente llegar a infectar humanos (**Fung & Liu, 2019**).

1.1.2.2.MERS-CoV

El MERS-CoV surgió a principios del verano de 2012, en Jeddah de Arabia Saudita. El descubrimiento se dio cuando se aisló un nuevo coronavirus de origen desconocido a la fecha la muestra se obtuvo del esputo de un paciente que presentaba neumonía severa e insuficiencia renal crónica(**Ying Yan et al., 2020**). De igual manera, en abril del mismo año, empleados de un hospital en Zarqa al norte de

Jordania presentaron los mismos síntomas, dichos datos resultaban alarmantes puesto que los síntomas presentados eran similares al SARS-CoV (Tesini, 2021).

Varios países fueron afectados por el brote de MERS-CoV; los brotes más graves sucedieron el 2012 en Arabia Saudita, y el 2015 en Corea del Sur, con más de 2.000 casos registrados alrededor del mundo, y con una tasa de mortalidad superior a la del SARS-CoV (>30%) en niños, ancianos y personas con enfermedades crónicas (Yuxin Yan et al., 2020). Así como el SARS-CoV es zoonótico, el MERS-CoV también lo es y se sospecha que fue transmitido a los humanos por el contacto con el camello arábigo o dromedario, y éste a su vez fue infectado por murciélagos (Al-Tawfiq, 2020).

1.1.2.3.SARS-CoV-2

En la actualidad, existe un debate científico acerca del origen del SARS-CoV-2. Los antecedentes e información actual no son lo suficientemente concluyentes para aseverar que la pandemia se produjo a causa de una emergencia zoonótica, o por un accidente de laboratorio (Sallard et al., 2021). Durante los primeros meses de estudio de este virus, se postularon varios huéspedes naturales de β -CoV, como los murciélagos y pangolines como los potenciales reservorios del SARS-CoV-2, el cual posee la capacidad de diseminación relativamente generalista, y que permite una eficiente diseminación de tipo humano-humano (MacLean et al., 2021).

Es posible que los murciélagos sean los principales reservorios para la formación de nuevos coronavirus, debido a que el SARS-CoV-2 posee características similares a un CoV de una especie de murciélago salvaje (*Rhinolophus affinis*), pero no son los transmisores directos ya que no comparten un hábitat conjunto con los humanos (Zhou et al., 2020), también se identificó una especie de pangolines (*Manis javanica*) contrabandeados de manera ilegal de Malasia a China con CoV semejante al SARS-CoV-2 (Zhang & Holmes, 2020), con estos datos se estima que el virus se originó en un murciélago que posteriormente habría infectado a una especie animal viva que se vende en los mercados de China (Mayta, 2020).

1.1.3. Estructura y características del SARS-CoV-2

El nombre de los coronavirus se debe al aspecto singular que posee en forma de corona. La evaluación de su estructura se realiza mediante microscopía electrónica (Oliva, 2020). El material genético del SARS-CoV-2 está conformado por una cadena única de ARN en sentido positivo y posee una envoltura lipoproteica (Cortés, 2020). El ARN del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aproximadamente 29.899 pares de bases que codifica 9.861 aminoácidos (Ezpeleta & García, 2020).

El SARS-CoV-2 codifica cuatro proteínas estructurales esenciales para el proceso de infección. La glicoproteína espiga (S) o *spike* emerge de la envoltura lipoproteica externa del virus, las espigas miden aproximadamente de 8 a 12 nm de longitud (Figura 2). La función principal que realiza la glicoproteína S es facilitar la unión del virus con la célula huésped, esta actúa como ligando de adsorción del virus al sistema respiratorio para favorecer el tropismo del virus (Pastrian, 2020). La glicoproteína transmembrana (M) se encarga de dar forma al virus manteniendo la curvatura de la membrana, además, permite la unión con la nucleocápside (N). La proteína (E) es importante para la liberación y ensamblaje del virus, por último, la proteína (N) posee dominios que forman parte de la nucleocápside al unirse al ARN viral (Dabanch, 2021). El SARS-CoV-2 también contiene proteínas accesorias y estructurales como la hemaglutinina-esterasa (HE), la proteína 3a/b y 4a/b (Chen et al., 2020). La proteína HE hace factible la entrada del virus a la célula huésped y contribuye con su propagación (Ezpeleta & García, 2020).

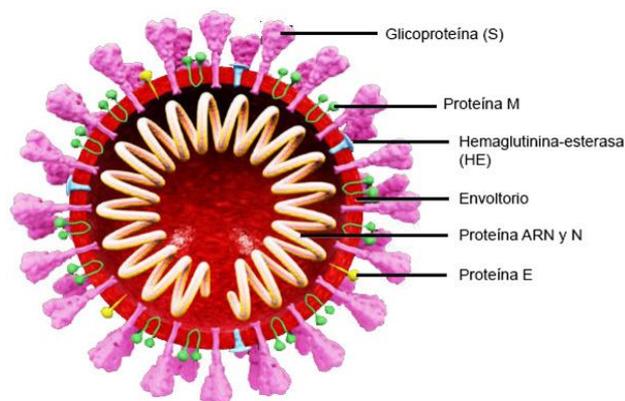


Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2

Fuente: (Dabanch, 2021)

El genoma del SARS-CoV-2 tiene aproximadamente de 6 a 11 marcos abiertos de lectura o ORFs según sus siglas en inglés “open reading frame”. El ARN viral del SARS-CoV-2 conforma tres tercios (Figura 3), el primer tercio del genoma es el ORF 1a/b el cual es de mayor tamaño ubicado en el extremo 5' (**Marston, 2021**). Al inicio de la infección viral los genes ORF1a y ORF1b codificarán directamente dos poliproteínas conocidas como pp1a y pp1ab, más adelante estas poliproteínas se degradarán proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps) que intervendrán en la replicación viral y transcripción del genoma viral (**Pastrian, 2020**).

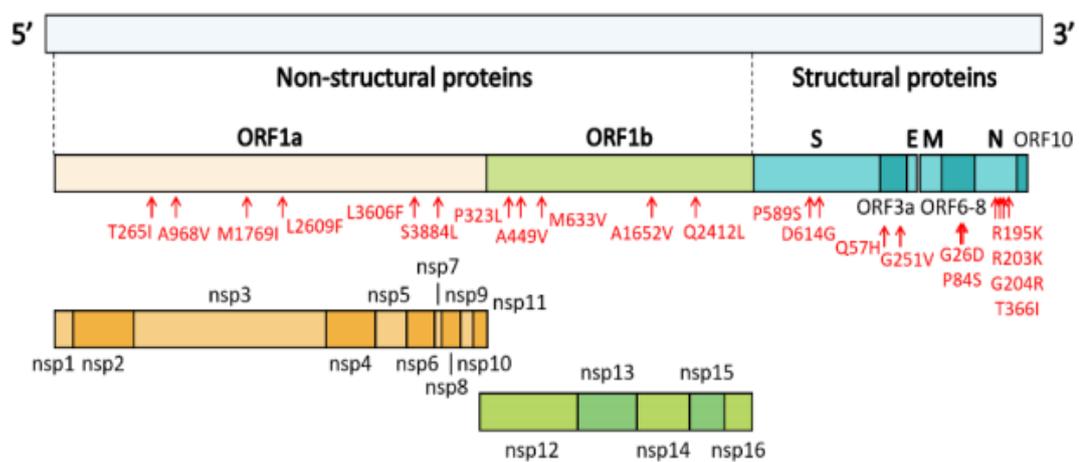


Figura 3. Organización genómica del SARS-CoV-2

Fuente: (Ju et al., 2020)

Por otro lado, el remanente de ORFs como ORFS, ORFM, ORFN, ORFE, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8, ORF9 y ORF10 se encargan de codificar proteínas estructurales y accesorias (**Alanagreh et al., 2020**). Hacia el extremo 3', el resto del genoma codifica las cuatro proteínas estructurales, la glicoproteína espiga o anclaje S, proteína de membrana M, proteína de envoltura E y la proteína N que se une a la nucleocápside (**Tsoleridis, 2021**).

1.1.4. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2

Inicialmente se conoce que el SARS-CoV-2 es un virus zoonótico transmitido de un animal a los humanos. El mecanismo de infección de humanos a humanos se da mediante la infección de células epiteliales bronquiales y neumocitos tipo II, el virus

se une mediante la glicoproteína S al receptor de superficie que es la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2) (Ezpeleta & García, 2020).

El ciclo de vida del SARS-CoV-2 inicia cuando la proteína S se une al receptor ACE2, en este punto la proteína S sufre un cambio de conformación S1 y S2 (Figura 4). La subunidad S1 establece rango de hospedadores, facilita la unión viral y el tropismo celular (Hoffmann et al., 2020), la subunidad S2 interviene en la fusión de las membranas celular y viral para fortalecer la infección mediante endocitosis (Alanagreh et al., 2020). De esta forma en SARS-CoV-2 libera su genoma a la célula huésped. Los ORF1a y ORF1b se traducen y producen poliproteínas pp1a y pp1b, estas a su vez son divididas por las proteasas del complejo replicación-transcripción (RTC) (Letko et al., 2020).

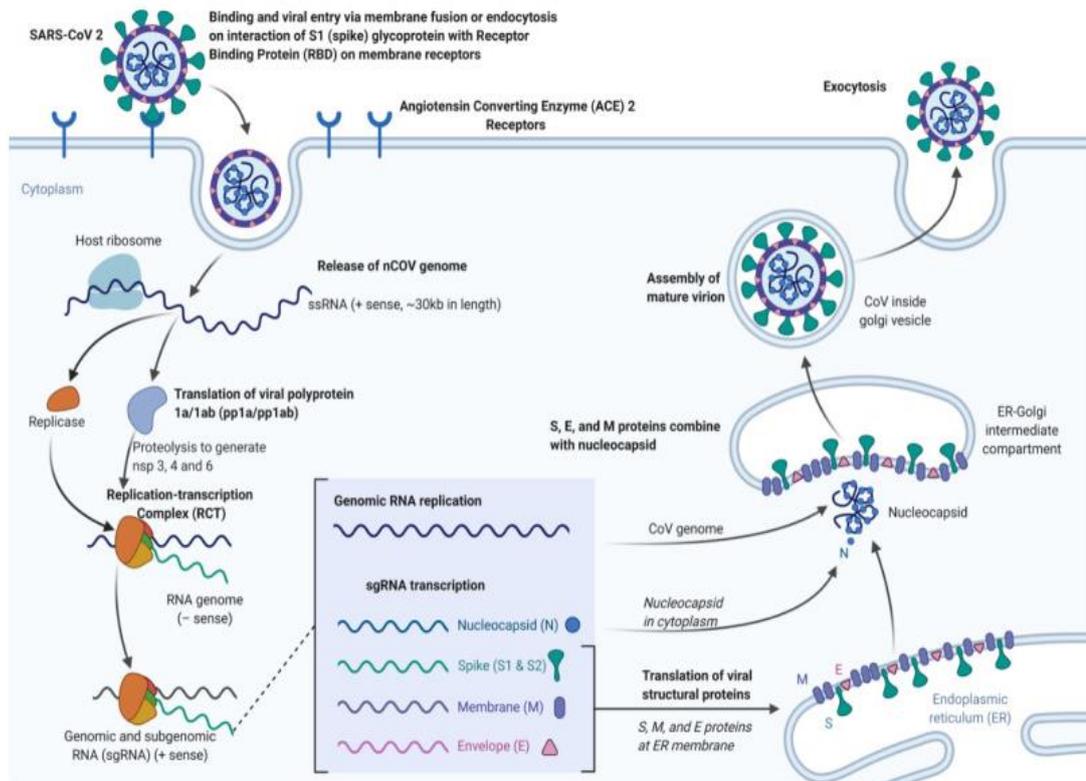


Figura 4. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2

Fuente: (Cascella et al., 2020)

En la replicación el complejo RTC promueve la producción de copias del ARN viral, en la transcripción las polimerasas sintetizan ARN mensajero subgenómico (ARNsg)

mediante la transcripción discontinua o fragmentada (Oliva, 2020). Aun cuando los ARNsg poseen varios ORFs, solo se traducirá el ORF próximo al extremo 5' para producir las proteínas estructurales del virus (Dabanch, 2021). Finalmente, las proteínas estructurales y el ARN genómico se ensamblan en el citoplasma y se convierten en viriones que brotan al retículo endoplasmático y aparato de Golgi. La liberación de los viriones se realiza mediante exocitosis (Pastrian, 2020).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Describir las metodologías de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en muestras clínicas, a partir de fuentes bibliográficas.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Realizar una investigación bibliográfica sobre las diferentes tecnologías de detección y cuantificación de SARS-CoV-2, desarrolladas con fines de diagnóstico médico.
- Analizar los criterios para la toma de muestras, transporte y almacenamiento de material biológico para SARS-CoV-2, con fines de diagnóstico médico.
- Efectuar un análisis comparativo de las ventajas y limitaciones de los métodos utilizados para la detección de SARS-CoV-2 con fines de diagnóstico médico.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Definición del problema

El presente proyecto constituye un análisis descriptivo de las metodologías de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en muestras clínicas, para ello se empleó una investigación bibliográfica que permitirá el análisis de la información.

2.2. Búsqueda de la información

La investigación se ejecutará a través de la revisión de reportes oficiales de organismos nacionales e internacionales de Salud (Organización Mundial de la Salud, CDC, ECDC, Ministerio de Salud Pública de Ecuador), y la revisión de artículos científicos disponibles en los siguientes buscadores online:

- Pubmed.
- Sciencedirect.
- Scopus.
- Springer
- Scientific Electronic Library Online (SCIELO).
- Scholar Google.
- ELSEVIER

Las estrategias de búsqueda se realizarán mediante la descripción de ciencias de la salud como: COVID-19, SARS-CoV-2, nuevo coronavirus, infección respiratoria, análisis de muestras clínicas, técnicas de detección y su semejante en inglés. De igual modo se analizará la fiabilidad y validez técnica de los artículos científicos dentro de los últimos 5 años.

2.3. Organización de la información

La información será organizada mediante el gestor de referencias bibliográficas MENDELEY, el cual permitirá generar citas bibliográficas automáticas con su

respectiva bibliografía. En la figura 5 se puede dar un vistazo sobre organización de la información del programa. Resulta una herramienta sencilla pues permite organizar la información por carpetas, una vez cargado el documento, el programa genera automáticamente el título, el autor, el año de publicación, revista científica y el identificador objeto digital (DOI-Digital Object Identifier) de los artículos científicos electrónicos.

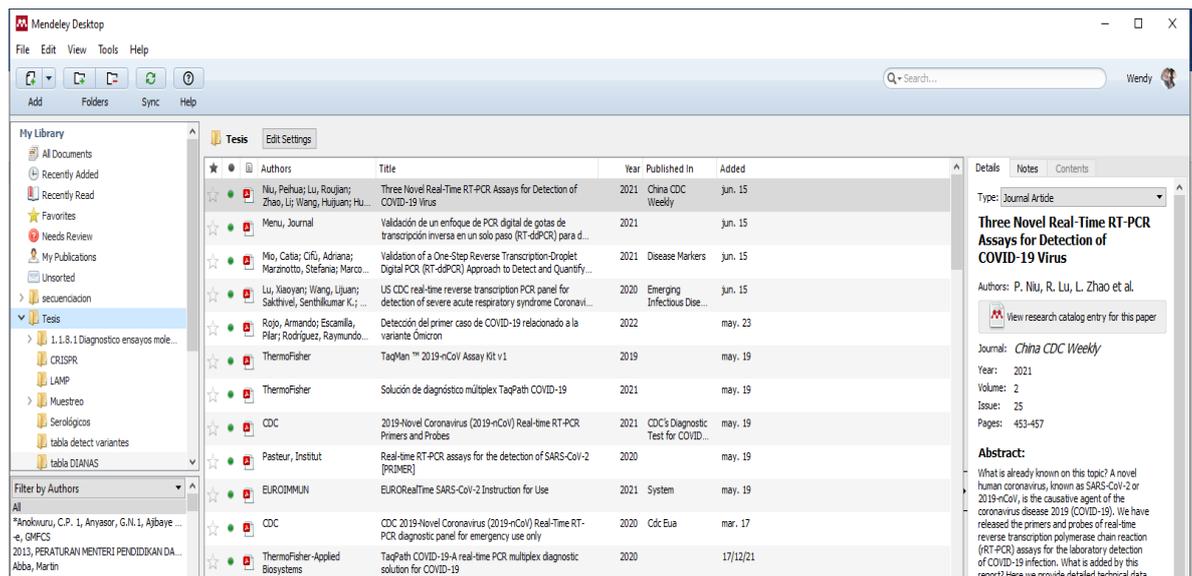


Figura 5. Organización de la información en MENDELEY

2.4. Análisis de la información

La información se analizó mediante aproximadamente 150 documentos (libros, artículos científicos, reportes) publicados a partir del año 2018, la mayoría de ellos analizados en idioma inglés, con palabras clave de búsqueda como: *samples*, *techniques*, *detection SARS-CoV-2*, *sequencing of SARS-CoV-2*, *variants* y *analytical targets*. Para la recopilación de la información se tomó en cuenta los artículos científicos relevantes al tema de investigación, es decir, muestras clínicas, variantes del SARS-CoV-2, dianas analíticas, técnicas de detección y cuantificación.

2.5. Materiales

- Laptop
- Internet
- Buscadores académicos-científicos

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Técnicas de detección y cuantificación

Los laboratorios clínicos y de investigación utilizan diversas pruebas para la detección del SARS-CoV-2, las cuales son fundamentales para identificar si una persona ha sido infectada por el virus ya sea que la persona presenta o no síntomas de la enfermedad (Cheng et al., 2020). Generalmente existen pruebas directas que identifican el ARN viral y pruebas indirectas que determinan los anticuerpos generados por un paciente expuesto al virus (Giri et al., 2021).

En términos generales los métodos de diagnóstico se basan en la detección de ácidos nucleicos, anticuerpos y antígenos (Haagmans, 2021). Entre los métodos y técnicas utilizados podemos encontrar pruebas moleculares basadas en oligonucleótidos, detección focalizada en inmunoensayos, detección con muestras particulares como se muestra en la ilustración 1 y la figura 6. En cada proceso se analiza y discuten elementos que distinguen el principio de la técnica, así como el proceso, la precisión y el período de respuesta (CDC, 2021b).

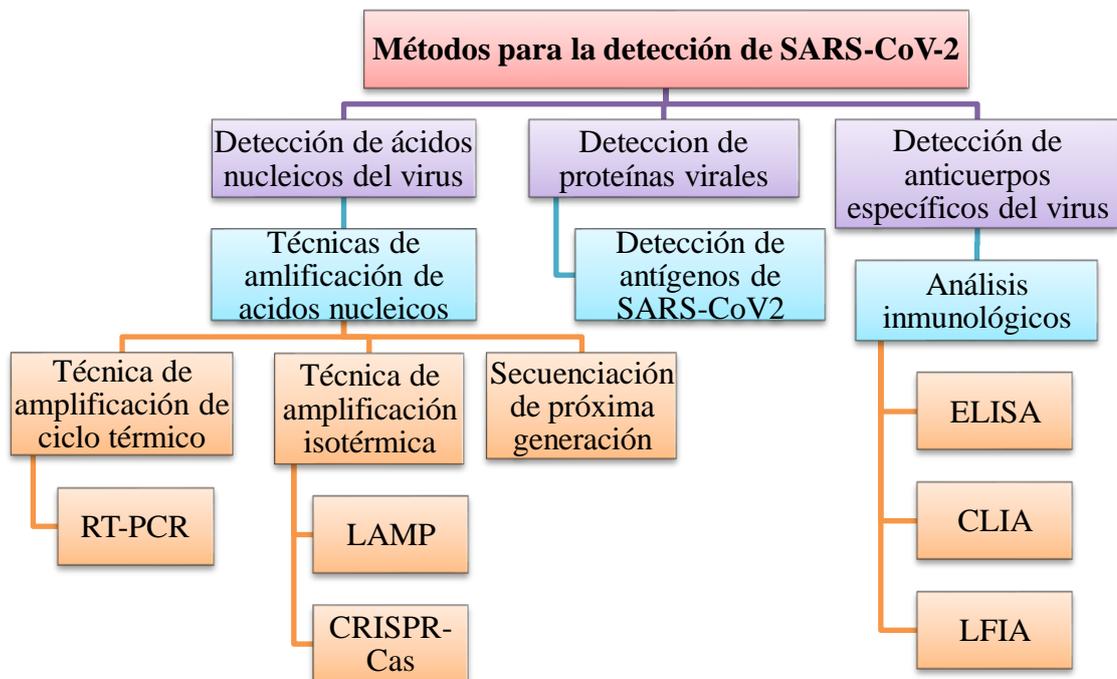


Ilustración 1. Métodos para la detección de SARS-CoV-2

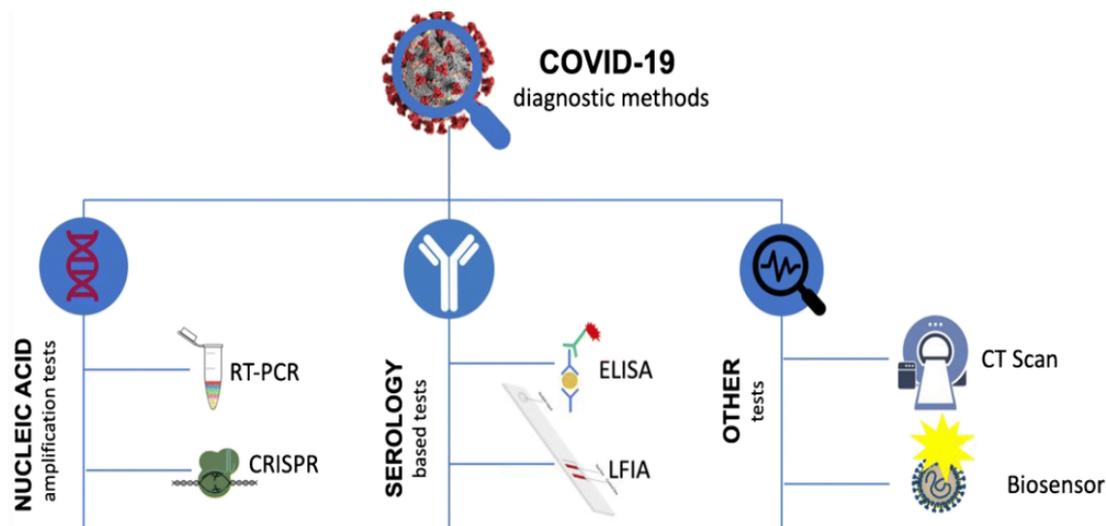


Figura 6. Métodos principales para la detección de SARS-CoV-2

Fuente: (Giri et al., 2021)

Es importante señalar que el potencial de las técnicas de diagnóstico depende del tipo de prueba realizada, la precisión, el tiempo de respuesta, los recursos y materiales, con ello se logra identificar rápidamente a personas contagiadas y reducir la transmisión del virus (Onoda & Martínez, 2021).

3.1.1. Diagnóstico de COVID-19 basado en la amplificación de ácidos nucleicos

El diagnóstico de COVID-19 mediante ensayos moleculares comprende el análisis de ácidos nucleicos en muestras clínicas. Debido a la existencia de varios síntomas similares a los de la gripe común, el diagnóstico exacto para COVID-19 es complicado, por esta razón la detección del SARS-CoV-2 a nivel molecular resulta ser el método preciso para el diagnóstico de COVID-19. En la actualidad el ensayo RT-PCR, LAMP y CRISPR son las técnicas diseñadas y aplicadas para la detección de SARS-CoV-2 (Habibzadeh et al., 2021; Panpradist et al., 2021).

3.1.1.1. RT-PCR

La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o qPCR es considerada como el estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19, con el uso de RT-PCR el ARN viral del SARS-CoV-2 se transcribe a la inversa en ADN complementario (ADNc) el cual posteriormente es amplificado con

cebadores específicos que flanquean la secuencia de ADN, después se realiza la PCR en tiempo real y el resultado de analiza por fluorescencia (Figura 7) (Giri et al., 2021; Carter et al., 2020). En tal sentido la RT-PCR es capaz de amplificar hasta la más pequeña cantidad de ARN viral (Ishige et al., 2021). Para la aplicación de la RT-PCR se utilizan principalmente muestras respiratorias NPS y OPS (hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos), pero también se ha realizado pruebas con saliva, sangre y heces (Kujawski et al., 2020).

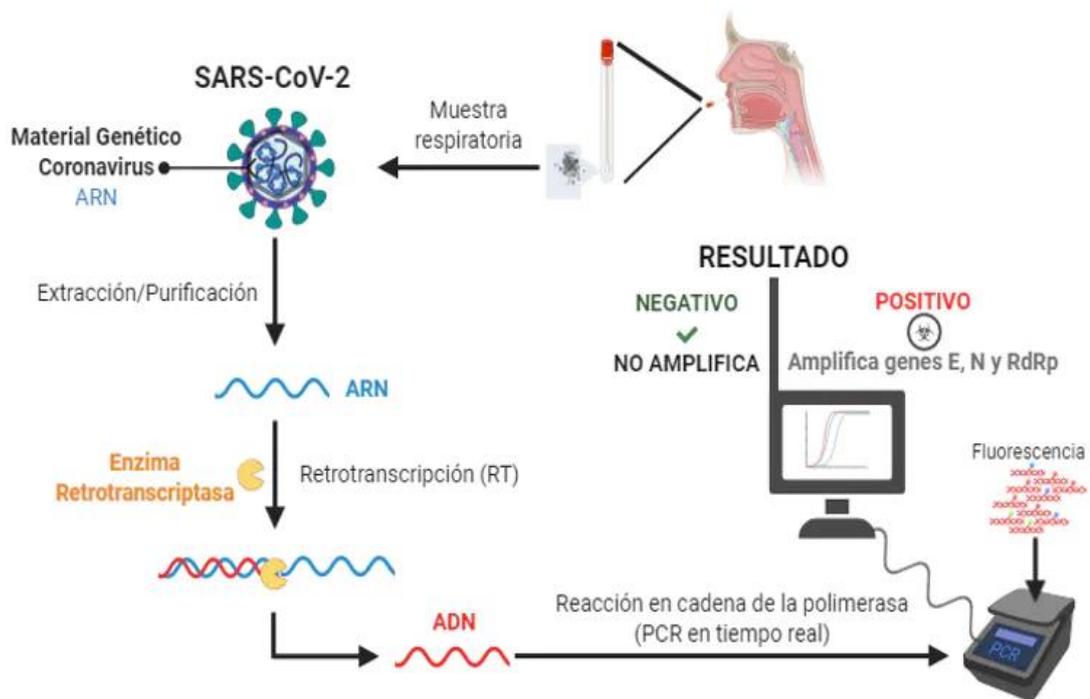


Figura 7: Diagnóstico de COVID-19 mediante el ensayo RT-PCR

Fuente: (Villalobo, 2020)

La prueba RT-PCR se puede efectuar en uno o dos pasos, el enfoque de un paso es el ideal para detectar SARS-CoV-2 ya que la retrotranscriptasa y la ADN polimerasa se combinan en un solo tubo de reacción para realizar sus respectivas reacciones (Giri et al., 2021), mientras que el enfoque en dos pasos aísla cada reacción, la retrotranscripción del ARN se realiza en un tubo y la síntesis de ADN en otro tubo separado.

El diagnóstico de COVID-19 mediante la RT-PCR inicia con la recolección de la muestra, después la muestra clínica es tratada para aislar el ARN, el aislamiento del ARN requiere tiempo y cuidado para evitar la contaminación de la muestra que

podría dar resultados falsos negativos (Touma, 2021). Posteriormente se realiza la conversión de ARN viral a ADNc gracias a la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (Villalobo, 2020). El principio de esta reacción consiste en el reconocimiento específico de secuencias genómicas complementarias al ARN viral mediante el uso de primer o cebadores diseñados para este fin, entonces la transcriptasa inversa genera una pequeña copia de ADNc (Figura 8) (Carter et al., 2020). A continuación, se realiza la amplificación de ADNc por medio de RT-PCR en tiempo real, el ADNc es cuantificado mientras la reacción avanza, esto se controla usando una molécula fluorescente, la presencia del virus se confirma cuando la fluorescencia supera cierto nivel (Herrera, 2022). Por otro lado, también se analiza el tiempo y la cantidad de ciclos que dura en alcanzar dicha fluorescencia, la enfermedad COVID-19 será más grave cuando el número de ciclos es menor al rango normal (Jawerth, 2020).

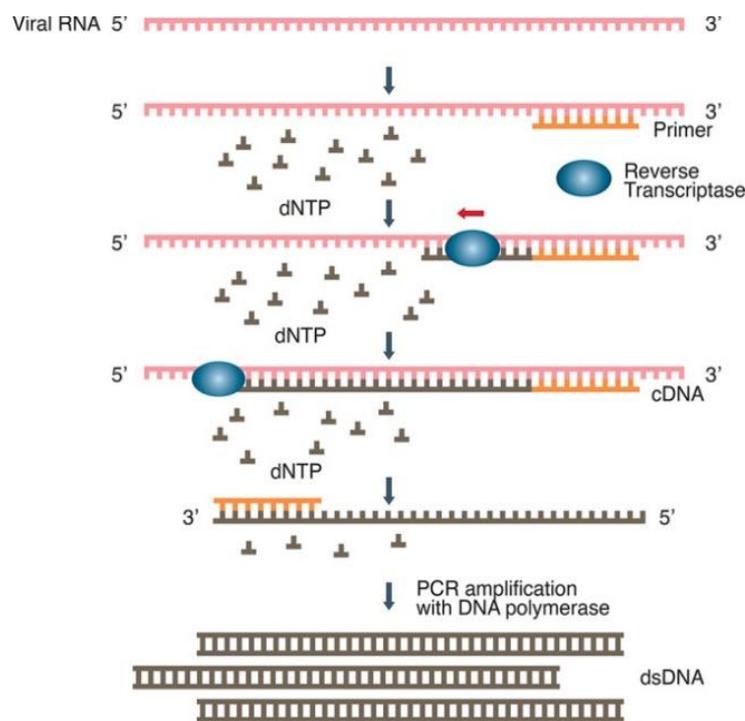


Figura 8: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Fuente: (Carter et al., 2020)

En la RT-PCR el gen E y el gen RdRp presentan sensibilidad analítica de detección de 3,7 copias en reacción, mientras tanto el gen N presenta una sensibilidad más baja, de 8,3 copias en reacción (Ayesa et al., 2020).

- **Características de las técnicas comerciales RT-PCR**

En la actualidad existen diferentes técnicas comerciales para el diagnóstico de COVID-19 por medio de RT-PCR, entre las primeras pruebas que aparecieron se puede encontrar:

- La RT-PCR de COVID-19 realizada por LabCorp que utiliza la metodología de amplificación de ácidos nucleicos (NAA) (LabCorp, 2019).
- La prueba de diagnóstico del nuevo (2019-nCoV) con transcriptasa inversa en tiempo real lanzado con la colaboración del CDC (Redfield, 2020).
- El Kit de RT-PCR TaqPath COVID-19 elaborado por Thermo Fisher Scientific (ThermoFisher-Applied Biosystems, 2020).
- El ensayo Multiplex 2019-nCoV elaborado por la empresa SeeGene (SeeGene, 2019).
- La prueba cualitativa de cobas SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics, 2020).

Todas las anteriores se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción y características de los ensayos de RT-PCR

Protocolo RT-PCR	Primers y sondas	Master Mix utilizada	* LOD	Controles positivos	Referencias
CDC 2019-nCoV Nuevo Coronavirus, RT-PCR en tiempo real (diagnóstico <i>in vitro</i>)	2019-nCoV EUA-01, catálogo: 10006606	TaqMan, virus rápido en un paso, catálogo 4444436, 10 ml	2,1 copias/ μ L	2019-nCoV_N_Positivo Control (nCoVPC) dirigido a los genes RP, N1 y N2.	(CDC, 2020a)
TF-SinglePlex	TaqMan 2019-nCoV Kit v1, catálogo: A47532	TaqMan en un paso, catálogo 4444436, 10 ml	0,8 copias/ μ L	Dirigido al gen de la RNasa P humana.	(ThermoFisher, 2019)
TF-MultiPlex	TaqMan 2019-nCoV Kit combo, catálogo: A47813/A47814	TaqPath1-paso Multiplex Master Mix, catálogo: A28523	0,1 copias/ μ L	Dirigido al gen S para la detección temprana de la variante ómicron (B.1.1.529)	(ThermoFisher, 2021)

EURO Real Time SARS-CoV-2 (Euroimmune)	Catálogo: MP 2606-0425	Chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96	0,8 copias/ μ L	Gen ORF1ab y gen N	(EUROIMMUN, 2021)
Protocolo del Instituto Pasteur de París (OMS)	Gen RdRp/nCoV_IP2, gen RdRp/nCoV_IP4 y gen E/Sarbeco	Mezcla múltiplex cuantitativa en un paso, catálogo:11732-088	1 copia/reacción	Gen RdRp y gen E	(Pasteur, 2020)
Oncobit	2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Panel Primer and Probes	TaqPath1-paso Multiplex Master Mix, catálogo: A28521	0,2 copias/ μ L	Dirigido a los genes N, E, ORF1 ab, S y RdRp	(CDC, 2021a)

* LOD: Límite de detección

3.1.1.2. LAMP

La amplificación de ácidos nucleicos isotérmica mediada por bucle (LAMP) representa una tecnología rápida en la amplificación del ADN utilizada para la detección de virus y bacterias (**Notomi et al., 2012**). En términos generales la reacción LAMP se lleva a cabo a una temperatura constante (alrededor de 65°C) y la amplificación del ADN target en 30 minutos. La técnica LAMP posee una alta especificidad pues emplea de 4 a 6 cebadores para la unión de seis regiones de un ADN diana (**Tomita et al., 2008**).

Una alternativa a la RT-PCR es la técnica isotérmica LAMP con transcripción inversa (RT-LAMP), debido a que el genoma del SARS-CoV-2 posee aproximadamente 30kb, se puede acortar significativamente el tiempo de reacción mediante la transcripción inversa (RT) y LAMP omitiendo la purificación de ADN en la transcripción inversa, con ello se puede alcanzar una detección rápida y eficaz del genoma viral (**D. Wang et al., 2020 ; W. E. Huang et al., 2020**). Además de la transcriptasa inversa, la RT-LAMP debe tener un ADN polimerasa que tolere altas temperaturas y tenga una fuerte capacidad de desplazamiento (**Tanner et al., 2015**). La RT-LAMP tiene un alto índice de detección del genoma viral, así como una fuerte especificidad y sensibilidad, ya que puede utilizar diferentes cebadores para amplificar varias secuencias diana en la misma reacción de forma exponencial (**Dao Thi et al., 2020**).

El diagnóstico de COVID-19 mediante la RT-LAMP inicia con la transcripción del ARN en ADNc con la transcriptasa inversa, consecutivamente se da la amplificación molecular isotérmica a una temperatura constante de 65°C, todo ello se realiza en un solo paso. El resultado se manifiesta con el cambio de color rosa/rojo a amarillo con un indicador de pH (Figura 9) (**Jiang et al., 2020**). Esta técnica permite una detección visual clara de la amplificación, mediante la producción de protones y la consecuente disminución del pH. Es por ello que la técnica RT-LAMP es una de las más utilizadas en la detección de SARS-CoV-2, pues no necesita un equipo costoso como el termociclador con fluorescencia(**Tanner et al., 2015**).



Figura 9. Diagnóstico de COVID 19 mediante RT-LAMP

Fuente: Adaptado de Odiwuor et al., (2022) elaborado en BioRender.

3.1.1.3. CRISPR

La técnica CRISPR es conocida por varias aplicaciones, la más destacada es la modificación del genoma, la cual permite la edición y modificación de genes de un organismo en un punto específico, mediante el reconocimiento de secuencias específicas en muestras clínicas; de forma adicional, puede ser utilizada como una herramienta de diagnóstico molecular (**Wright et al., 2016**). En el contexto de la pandemia de COVID-19, CRISPR se ha enfocado en la detección de SARS-CoV-2 y el desarrollo de procesos para destruir el virus. En la actualidad se ha identificado que la técnica CRISPR resulta útil para identificar carga viral baja del SARS-CoV-2 en muestras clínicas (**Broughton et al., 2020**).

La técnica básica de CRISPR consta de la proteína Cas, que muestra actividad ADNasa o ARNasa, lo cual permitirá que la proteína corte el ADN o ARN diana, proporcionando un resultado visual inmediato. CRISPR/Cas12a de simple lectura o también conocida como CRISPR/Cas12a-NER, permite detectar SARS-CoV-2 con mayor sensibilidad (80%) y rapidez. Este sistema incluye la proteína Cas12a, el ARN CRISPR específico de SARS-CoV-2 (crARN) y un ADN monocatenario (ssADN). Para el diagnóstico de COVID-19 se puede utilizar un indicador ssADN que este marcado con una molécula

fluorescente verde (FAM-biotina), la cual será dividida por Cas12a cuando exista la presencia del virus, el resultado será positivo cuando se pueda observar visualmente la coloración verde (Z. Huang et al., 2020), como se muestra en la figura 10.

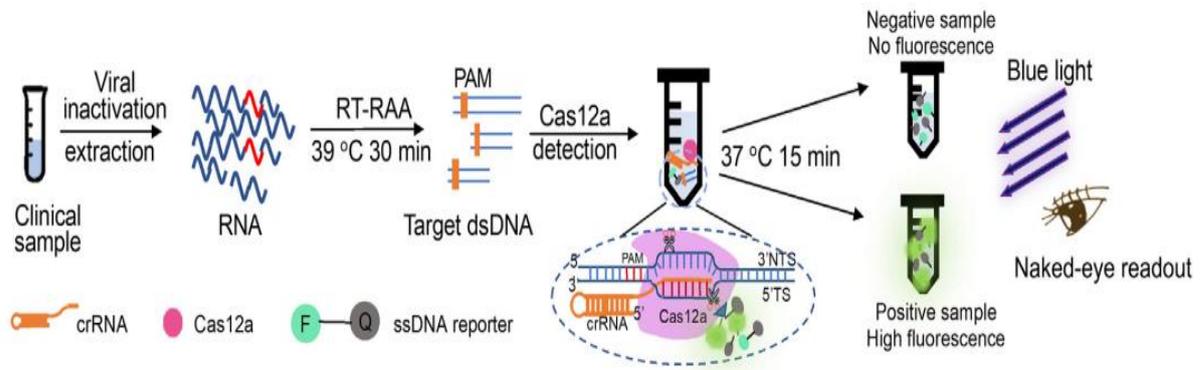


Figura 10. Diagnóstico de COVID-19 mediante CRISPR/Cas12a

Fuente: (X. Wang et al., 2020)

Actualmente se ha desarrollado un ensayo basado en CRISPR/Cas12a conocido como DETECTR por sus siglas en inglés Endonucleasa-Targeted CRISPR Trans Reporter. El sistema DETECTR se enfoca en la técnica RT-LAMP, seguido de la detección por Cas12 de secuencias predefinidas de SARS-CoV-2. El proceso de este ensayo se muestra en la figura 11. Se inicia con la extracción de ARN, seguido de una preamplificación con RT-LAMP y detección con Cas12 con el diseño de cebadores para el gen E , gen N y RNasa P, finalmente el resultado se analiza por tiras de flujo lateral o un lector fluorescente (Broughton et al., 2020).

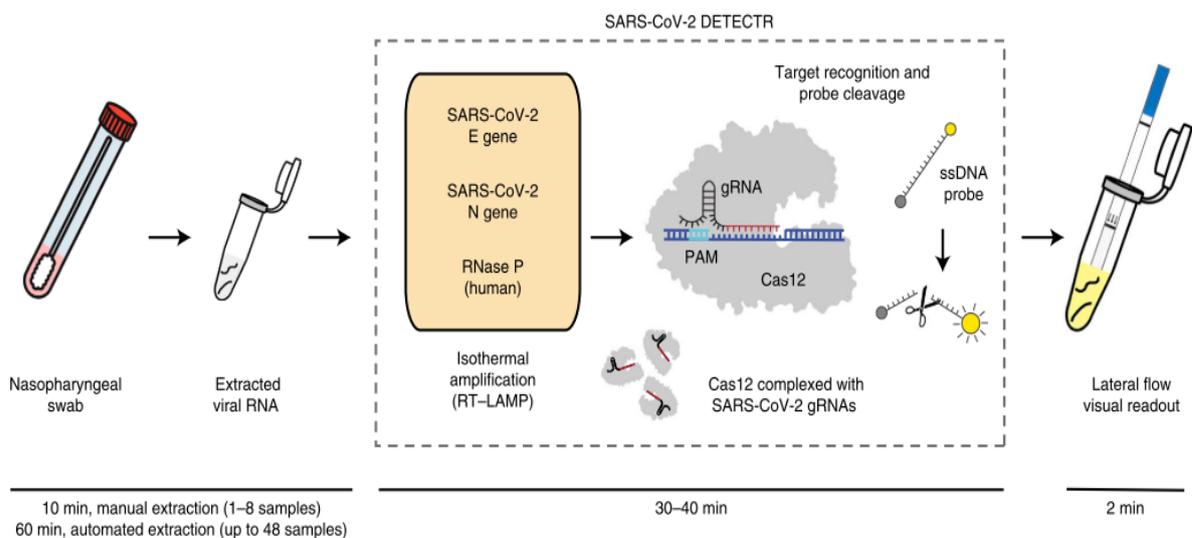


Figura 11: Ensayo DETECTR para la detección de SARS-CoV-2

Fuente: (Broughton et al., 2020)

3.1.2. Diagnóstico de COVID-19 por detección de antígenos del SARS-CoV-2

Los ensayos para la detección de antígenos, detectan la infección por SARS-CoV-2 en etapas tempranas cuando la replicación activa es vigente. La proteína S y N del SARS-CoV-2 son los principales objetivos en la detección de antígenos (X. Zhang et al., 2022). Actualmente, existen pruebas cualitativas para la detección rápida de antígenos (RAD) del SARS-CoV-2, estas ofrecen resultados rápidos en menos de 30 min y no necesitan de un equipo especializado (Mak et al., 2020).

En las pruebas para la detección de antígenos se encontró varias, entre las más utilizadas esta: la prueba rápida ROCHE, la prueba BIOCREREDIT (RapiGEN) y el ensayo Panbio™ (Abbott), todas estas pruebas se realizan de forma similar como se muestra en la figura 12. Estas son pruebas de flujo lateral que ocupan inmunocromatografía, la presencia de antígenos se evidencia por la coloración de una línea en la prueba. Además, estos ensayos ocupan únicamente muestras respiratorias, especialmente muestras nasofaríngeas (Schildgen et al., 2021).

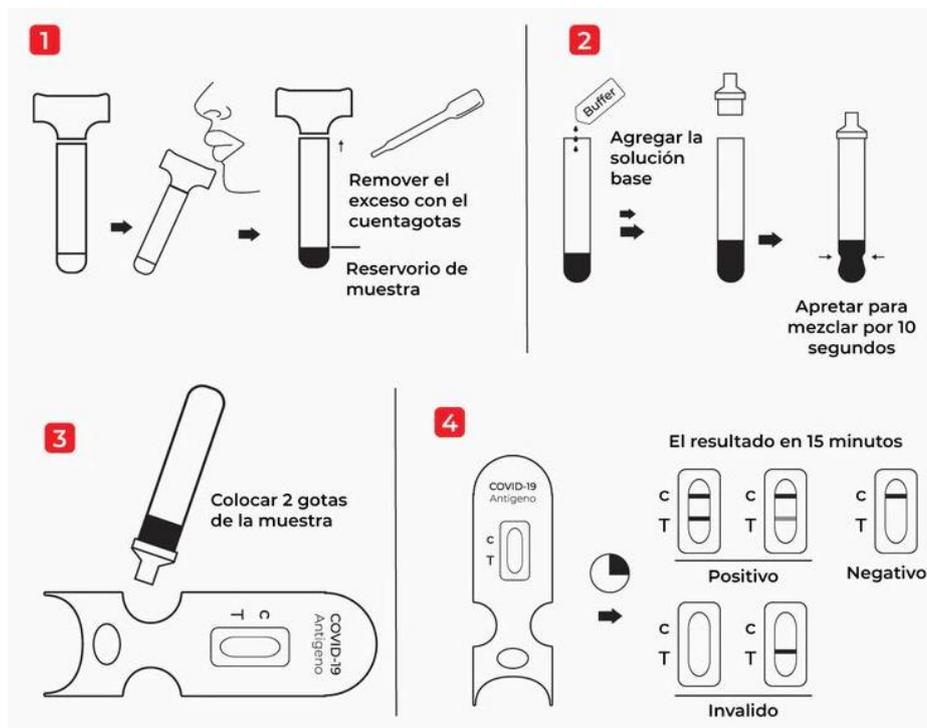


Figura 12: Prueba rápida para la detección de antígenos del SARS-CoV-2

Fuente: (Díaz, 2021)

3.1.3. Detección de COVID-19 basada en ensayos inmunológicos

La enfermedad causada por el SARS-CoV-2 estimula a que el sistema inmunológico produzca anticuerpos específicos contra el virus (respuesta humoral). El primer anticuerpo que el cuerpo fabrica para combatir una infección es la inmunoglobulina M (IgM), este dura aproximadamente 2 semanas en el cuerpo. Inmediatamente el cuerpo produce la inmunoglobulina G (IgG) que perdura por más tiempo en el cuerpo. Así pues, la identificación de IgM en la sangre muestra que el paciente se encuentra en la fase inicial de la infección (1 a 7 días), mientras que la identificación de IgG indica que el paciente anteriormente presentó la infección (más de 15 días) o se encuentra actualmente con la enfermedad (8 a 14 días) (**Z. Li et al., 2020**).

La detección con ensayos inmunológicos consiste en identificar ciertas proteínas inmunes específicas como: S1, S2 y N del SARS-CoV-2, con el fin de capturar los anticuerpos IgM o IgG en muestras de sangre (**Krammer & Simon, 2020**). Los métodos serológicos más utilizados para la detección de SARS-CoV-2 son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA, el inmunoensayo enzimático con quimioluminiscencia o CLIA y el inmunoensayo de flujo lateral o LFIA, el objetivo principal de estos inmunoensayos es identificar la interacción del antígeno con el anticuerpo. Por otro lado, estos inmunoensayos son útiles para identificar la enfermedad en grandes poblaciones (**Filchakova et al., 2022**).

El ensayo ELISA es por mucho el más utilizado y consiste en la reacción antígeno-anticuerpo que muestra un resultado cuantitativo mediante la reacción enzimática. El ensayo CLIA acopla la radiación electromagnética producida por la reacción química que produce luz o quimioluminiscencia con el complejo antígeno-anticuerpo, el resultado se confirma mediante la producción de luz en un dispositivo de quimioluminiscencia, mientras que el resultado positivo de ELISA se confirma por el cambio de color a simple vista con un lector de microplacas. LFIA también ocupa la reacción antígeno-anticuerpo en materiales biológicos con la ayuda de la cromatografía en capa fina, este proceso se realiza mediante el uso de tiras reactivas o casetes de pruebas. El mecanismo de LFIA inicia cuando la tira reactiva es sumergida en la muestra líquida y esta empieza a migrar a lo largo de la tira por la cromatografía de capa fina

(Park et al., 2021). En la figura 13 se muestra el mecanismo de acción para la detección de anticuerpos producidos contra el SARS-CoV-2.

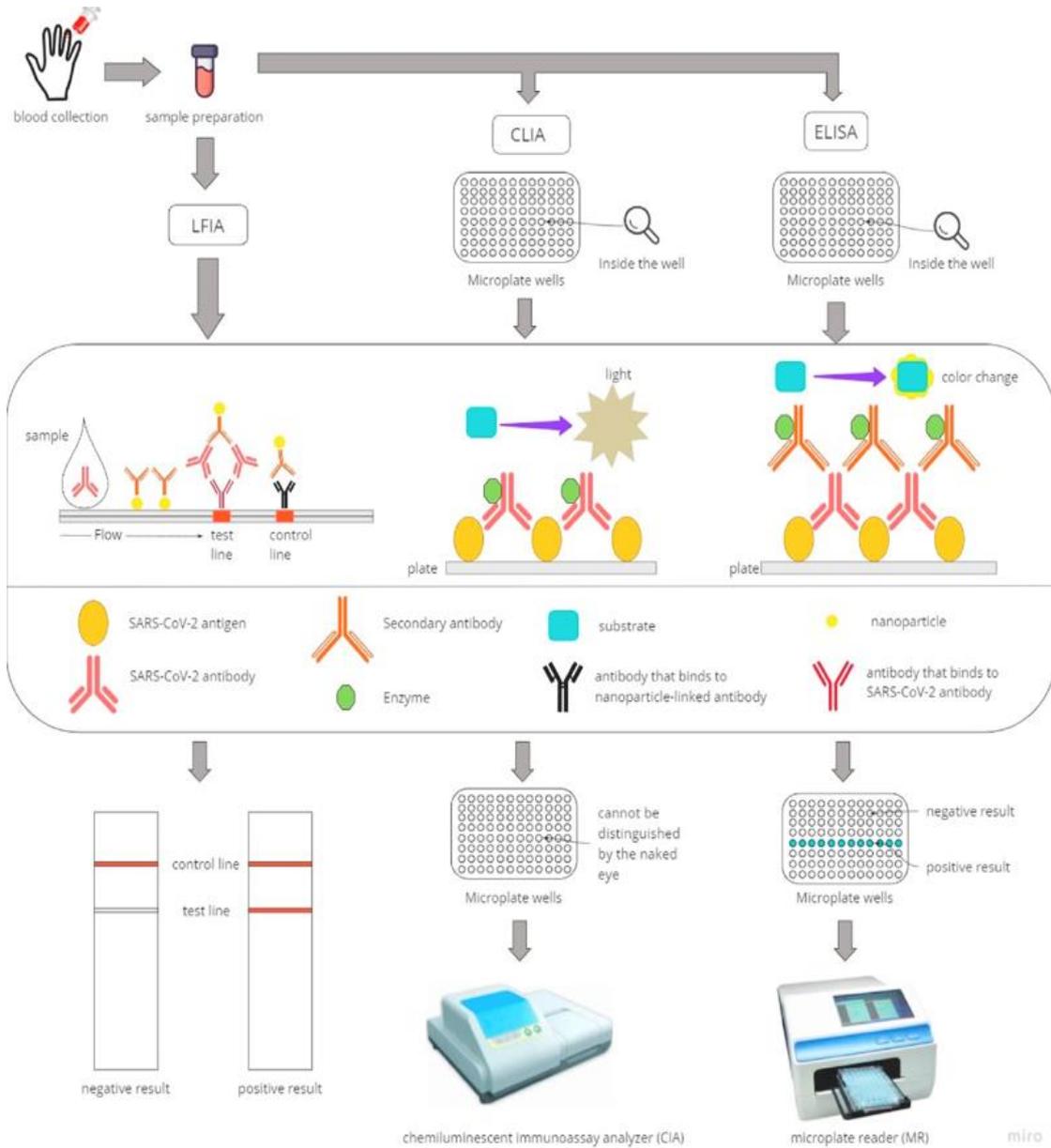


Figura 13. Inmunoensayos para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2

Fuente: (Filchakova et al., 2022)

3.2. Dianas analíticas del SARS-CoV-2

La confirmación habitual de la infección respiratoria por SARS-CoV-2 está basada en la detección de secuencias virales específicas, las cuales se identifican por pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (AAN), la más utilizada actualmente es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) (Goldschmidt,

2020). El genoma de los coronavirus comúnmente incluye marcos de lectura abiertos (ORF1a/b), proteínas estructurales (E, M, N, S) y ARN polimerasa dependiente de ARN o RdRP debido a sus siglas en inglés (RNA-dependent RNA polymerase). En las pruebas de amplificación las dianas son determinadas regiones de genes E, RdRP, N y S (Kasibhatla et al., 2020). Por otro lado, existen genes específicos del SARS-CoV-2 como el ORF3b y ORF8, los cuales no tienen relación con los genes de SARS-CoV (Touma, 2021).

La estructura del material genético del SARS-CoV-2 se analiza mediante la secuencia publicada en la base de datos de secuencias de nucleótidos GenBank, número de acceso MN975262. El análisis de las secuencias genómicas de coronavirus indica que el SARS-CoV-2 comparte aproximadamente un 80% del genoma de SARS-CoV (Figura 14), de igual manera comparte una homología de 50% con el genoma del MERS-CoV (Maroto, 2020).

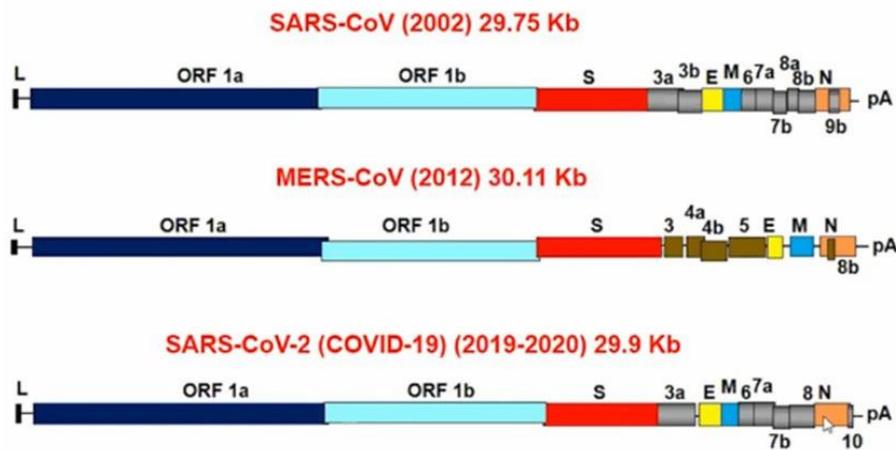


Figura 14. Estructura genómica de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2

Fuente: (Maroto, 2020)

Generalmente, los blancos analíticos son seleccionados en base a porciones específicas del genoma de SARS-CoV-2. En la Tabla 2 se describen los primers utilizados para la detección y cuantificación de SARS-CoV-2 de algunos centros de investigación alrededor del mundo. De forma específica, las dianas analíticas utilizadas para la detección de material genético del SARS-CoV-2 son el gen ORF1a, el gen ORF8, el gen RdRp y los genes estructurales E y N (Lu et al., 2020). El gen E es el principal componente para el cribado de la enfermedad, mientras que los genes ORF1a y RdRp son utilizados para verificar la presencia del virus (Soldevila et al., 2021).

Tabla 2. Secuencias de primers para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR

Nación-Entidad	Diana	Secuencia de primers	Tamaño del amplicón	Referencias
Universidad de Hong Kong, Hong Kong	ORF1b	F: 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACCT-3' (Y = C/T, R = A/G) R: 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-3' (R = A/G) P: 5'- FAM/ZEN-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-IBFQ-3' (W = A/T)	132 pb	(Vásquez et al., 2020)
	N	F: 5'-TAATCAGACAAGGAACTGATTA-3' R: 5'-CGAAGGTGTGACTTCCATG-3' P: 5'- FAM/ZEN-GCAAATTGTGCAATTTGCGG-IBFQ-3'	110 pb	(Vásquez et al., 2020)
China-CDC	ORF1ab	F: 5'-CCCTGTGGGTTTTACTTAA-3' R: 5'-ACGATTGTGCATCAGCTGA-3' P: 5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3'	119 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020; Niu et al., 2021; Etievant et al., 2020)
	N	F: 5'-GGGGAAGTTCTCCTGCTAGAAT-3' R: 5'-CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG-3' P: 5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-BHQ1-3'	99 pb	(Niu et al., 2021; Etievant et al., 2020)

Nación-Entidad	Diana	Secuencia de primers	Tamaño del amplicón	Referencias
EE. UU-CDC	N1	F: 5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3' R: 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3' P: 5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3'	71 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020)
	N2	F: 5'-TTACAAACATTGGCCGCAAA-3' R: 5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3' P: 5'-FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1-3'	67 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020)
	RP	F: 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3' R: 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3' P: 5'-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1-3'	87 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020)
Alemania	RdRP	F: 5'-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3'(R=G/A) R: 5'-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3' (R=G/A, S=G/C) P1: 5'-FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ-3' (W=A/T, M=A/C, R=G/A) P2: 5'-FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ-3'	100 pb	(Ceron et al., 2021; Uhlenhaut et al., 2021)

Nación-Entidad	Diana	Secuencia de primers	Tamaño del amplicón	Referencias
	E	F: 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' R: 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' P: 5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ-3'	113 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020)
	N	F: 5'-CACATTGGCACCCGCAATC-3' R: 5'-GAGGAACGAGAAGAGGCTTG-3' P: 5'-FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ-3'	128 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020)
Japón	N	F: 5'- AAATTTTGGGGACCAGGAAC-3' R: 5'-TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC-3' P: 5'- FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ-3'	155 pb	(John Hopkins Center for Health Security, 2020)
Tailandia	N	F: 5'-CGTTTGGTGGACCCTCAGAT-3' R:5'-CCCCACTGCGTTCTCCATT -3' P: 5'- FAM-CAACTGGCAGTAACCA-BQH1-3'	57 pb	(Etievant et al., 2020)

3.3. Muestreo y tipos de muestras

El diagnóstico y la detección de SARS-CoV-2 juegan un papel fundamental para disminuir la propagación del coronavirus (**Xu et al., 2020**). Por ello, se debe utilizar un adecuado muestreo clínico, así como una prueba de diagnóstico eficaz y precisa (Zhou et al., 2020).

La enfermedad de COVID-19 provocada por el virus de SARS-CoV-2 posee un extenso tropismo, por lo tanto, la detección del virus incluye el análisis de distintos tipos de muestras como secreciones respiratorias, sangre, heces, orina y en ciertas ocasiones líquido cefalorraquídeo (**D. Wang et al., 2020**). Es de suma importancia señalar que la toma de muestras clínicas se debe realizar en un área ventilada con personal capacitado, además, se debe tomar en cuenta todas las normas de bioseguridad como el uso de trajes protectores o batas, mascarilla o respirador N95 o FFP2, gafas o protectores faciales y guantes (**OMS, 2020**).

3.3.1. Muestras respiratorias

Las muestras obtenidas del tracto respiratorio son superior e inferior y son utilizadas tanto para la ejecución de técnicas bioquímicas y moleculares, las cuales serán descritas en los siguientes apartados (**Organización Panamericana de la Salud, 2020**).

3.3.1.1. Muestras respiratorias del tracto superior

Hisopados nasofaríngeos-orofaríngeos

La muestra superior se refiere al aspirado nasofaríngeo (NP) que posee mayor carga viral, también se puede encontrar el aspirado orofaríngeo (OP) en pacientes ambulatorios, para la recolección de estas muestras se usa hisopos nasofaríngeos (NPS) e hisopos orofaríngeos (OPS) (**Martínez, 2020**). En tal sentido, también se puede utilizar hisopados de las conchas nasales o cornete medio (MTS) e hisopados de la ventana nasal o narinas anteriores (ANS) (**CDC, 2020b**).

Aunque resulta sencillo extraer muestras NPS, en ciertos pacientes es difícil obtener dicha muestra ya que la deficiente obtención de NPS resulta en un falso negativo, por ello, se toma en cuenta el muestreo de MTS puesto que es un proceso menos doloroso para el paciente **(Piras et al., 2020)**.

El muestreo NPS u OPS consiste en introducir el hisopo de algodón o poliéster en cada cavidad nasal, el hisopo se inserta en la fosa nasal y se introduce cruzando las coanas hasta alcanzar la pared nasofaríngea donde se frota el hisopo y se retira mediante movimientos rotatorios, con el mismo hisopo se realiza el mismo procedimiento en la otra cavidad nasal. Posteriormente la muestra se deposita en un vial que contiene de 2 a 3ml de solución de transporte, las muestras son almacenadas bajo refrigeración a una temperatura entre 4-8°C y finalmente serán analizadas en las siguientes 24 a 72 horas después de la toma de la muestra **(Ministerio de Sanidad-Gobierno de España., 2021)**.

Saliva

La muestra de saliva forma parte del OPS y se ha propuesto como muestra alternativa debido a la fácil recolección, es decir no es un procedimiento incómodo, además de ser un procedimiento de baja exposición para el personal de salud, sin embargo, no existen muchas publicaciones que apoyen el uso de estas muestras en la detección de SARS-CoV-2 puesto que se requiere un análisis de resultados cauteloso debido a que la sensibilidad de NPS y OPS es mayor a la saliva **(Pasomsub et al., 2020)**.

Por otro lado, la muestra de saliva es recomendable para niños puesto que no genera malestares y resulta menos desagradable para los niños y sus padres, en comparación con la NPS u OPS que resulta un proceso invasivo para niños. Un estudio realizado a 388 niños menores de 16 años verificó la fiabilidad del muestreo con saliva para la detección de COVID-19 mediante RT-PCR y test por antígenos **(Gallardo, 2021)**.

En tal sentido también se demostró la permanencia de ARN viral en muestras de saliva tiempo después de la infección. Un estudio realizado a 23 personas infectadas de COVID-19 demostró que durante los primeros días de la infección cuando los síntomas aparecen la carga viral en la saliva es muy alta. A pesar que la carga viral en la saliva disminuye con el tiempo de la infección, se detectó ARN vírico en un paciente 25 días

después de la aparición de los síntomas (**Ramanathan et al., 2020**). Según **Huang et al., (2019)** en pacientes con alto índice de mortalidad con enfermedad crónica el ARN viral es prolongado y es detectable incluso 6 semanas después de la manifestación de síntomas. Generalmente el muestreo se realiza mediante un enjuague bucal con solución salina o se puede recoger la muestra directamente de los conductos salivales, luego se deposita la muestra en un recipiente estéril y se analiza dentro de las siguientes 4 horas (**Rivas et al., 2020**).

3.3.1.2. Muestras respiratorias del tracto inferior

Lavado broncoalveolar

El propósito del lavado broncoalveolar (BAL) o lavado bronquial es recolectar una muestra de tejido pulmonar que se realiza mediante broncoscopía (**Dezube, 2021; Wahidi et al., 2020**). Este procedimiento consiste en introducir un tubo (broncoscopio) en el tracto inferior del paciente, una vez ahí, el personal de salud infiltra solución salina por el tubo y posteriormente aspira el líquido, el cual envuelve células respiratorias incluyendo virus y bacterias (**Wahidi, Lamb, et al., 2020**).

En ciertos casos los pacientes que presentan varios síntomas de COVID-19 obtienen un resultado negativo en muestras realizadas con aspirado nasofaríngeo, en estos casos la broncoscopía no es recomendable debido a que resulta un procedimiento invasivo y peligroso para el personal médico, pero es necesaria para confirmar el diagnóstico de la enfermedad (**Jalilie E. et al., 2020**).

Un estudio realizado por **Patrucco et al., (2021)** ratificó la detección de SARS-CoV-2 en 14 de 15 pacientes graves a los que se realizó BAL mediante broncoscopía, el estudio mencionó que los pacientes con sospecha de SARS-CoV-2 y que contaban con resultados negativos para hisopados nasofaríngeos, eran pacientes cuya infección afectó mayormente el tracto respiratorio inferior, además, mencionó que uno de los factores que influyó en el resultado de hisopados nasofaríngeos negativos fue el tiempo de infección y la aparición de los síntomas, puesto que la carga viral y la detección de la

enfermedad mediante muestras de BAL disminuyen paulatinamente desde el primer día de la aparición de los síntomas (**Kucirka et al., 2020**).

Espuito

Anteriormente se mencionó que las muestras nasofaríngeas y orofaríngeas resultan apropiadas para la detección del virus, en el mismo contexto las muestras de BAL presentaron una detección positiva más alta, por otro lado, la muestra de esputo logró obtener un porcentaje positivo mayor que las anteriores muestras para detectar SARS-CoV-2 (**Wahidi et al., 2020; Lou et al., 2020**).

El esputo resulta una muestra ideal para la detección de SARS-CoV-2, es un método no invasivo, desafortunadamente no todos los pacientes producen esputo (**Argenzian et al., 2020**). Para la obtención de la muestra, el paciente debe inhalar solución salina hipertónica usada para examinar a pacientes con enfermedades pulmonares crónicas, lo cual facilitará la obtención de esputo (**Lai et al., 2021**).

En un estudio realizado por **Mohammadi et al., (2020)** en pacientes diagnosticados con SARS-CoV-2 evidenció la efectividad de la muestra de esputo para la detección del virus, la tasa de detección obtenida fue de 50% a 90%, mientras que el hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo no superó el 70%.

3.3.2. Muestras de sangre

La muestra de sangre es utilizada para el test rápido de anticuerpos, el proceso para la toma de muestra consiste en pinchar el dedo del paciente con una lanceta y depositar las gotas de sangre en el test, el cual dará el resultado después de 10 o 15 min (**Martínez, 2020**). Es conveniente usar la muestra de sangre para realizar pruebas serológicas debido a que estas pueden identificar la respuesta inmunológica del sistema frente a un agente infeccioso, de esta forma se puede medir si el sistema inmunológico ha producido anticuerpos para combatir el SARS-CoV-2 (**Higuera, 2021**).

De manera general se puede decir que la prueba serológica es útil para saber si la paciente esta o estuvo infectado con el virus (**Martínez, 2020**). Sin embargo, la prueba de anticuerpos no siempre es confiable y puede revelar falsos positivos debido a que los anticuerpos de ciertas personas pueden desaparecer con el tiempo (**Baraniuk, 2020**).

3.3.3. Muestras de heces

Se ha comprobado que el nivel de SARS-CoV-2 en las heces es mayor que en muestras respiratorias y muestras de sangre. Un estudio realizado por **Wu et al., (2020)** evidenció que las muestras de heces en adultos dieron resultados positivos mayores en comparación con hisopados orofaríngeos. De igual manera, se realizó un estudio en pacientes pediátricos para identificar la permanencia del virus después de que las pruebas realizadas con hisopados orofaríngeos dieran negativo, las muestras de heces resultaron ser efectivas para detectar SARS-CoV-2 en niños con síntomas gastrointestinales puesto que los infantes presentan una mayor carga viral en sus heces, la cual puede permanecer hasta por 21 días (**T. Zhang et al., 2020; Rubin & Crowe, 2020; Lázaro, 2021**).

Por otro lado, un estudio demostró que la presencia de SARS-CoV-2 en heces no se relaciona directamente con síntomas gastrointestinales, de los 36 casos confirmados con COVID-19, tan solo 8 pacientes presentaban síntomas gastrointestinales, mientras tanto 28 pacientes no presentaban síntomas gastrointestinales y se obtuvo muestras de heces positivas para SARS-CoV-2 que permanecieron por un rango de 6 a 10 días después del inicio de los síntomas (**Cheung et al., 2020**). En la tabla 3 se analiza las características de las muestras clínicas, así como sus aplicaciones analíticas y la evaluación de riesgos (NOS) al manipular la muestra.

3.4. Ventajas y limitaciones de los métodos utilizados para la detección de SARS-CoV-2

La tabla 4 describe algunas de las ventajas, limitaciones y varias características de las técnicas de detección del virus SARS-CoV-2.

Tabla 3. Características de las muestras clínicas y sus aplicaciones analíticas

Tipo de muestra	Procesamiento	Diana analítica	Límites de detección	Aplicación (Prueba)	NOS*	Referencias
NPS	Extracción de ARN	ORF1a, ORF1b, Gen E, Gen N, Gen RdRp	85-98% +	RT-qPCR, LAMP, CRISPR	6	(García et al., 2021)
OPS	Extracción de ARN	ORF1a, ORF1b, Gen E, Gen N, Gen RdRp	85% +	RT-qPCR, LAMP	6	(García et al., 2021)
Saliva	Extracción de ARN	ORF1a, ORF1b, Gen E, Gen N	Variable 5-91%+	RT-qPCR, CRISPR	7	(Collings, 2021)
BAL	Extracción de ARN	ORF1ab, proteína de nucleocápside NP	90%+	RT-qPCR	6	(Liu et al., 2020)
Espuito	Extracción de ARN	Proteína N, Proteína espiga S1 y S2	60%+ 4.8 copias/ml	RT-qPCR, Inmunocromatografía (antígeno)	6	(Madrid et al., 2021)

Tipo de muestra	Procesamiento	Diana analítica	Límites de detección	Aplicación (Prueba)	NOS*	Referencias
Sangre, suero o plasma	Extracción de ARN	Anticuerpos IgM e IgG	88%+	ELISA, CLIA, Inmunocromatografía (anticuerpo)	6	(Onoda & Martínez, 2021)
Heces	Extracción de ARN	ORF1a, ORF1b, ACE2	10 ⁶ copias/litro	RT-qPCR	6	(Barreto, 2020)

*Evaluación de riesgos (NOS): 0=bajo riesgo, 10=alto riesgo.

Tabla 4. Ventajas y limitaciones de las técnicas de detección para SARS-CoV-2

Técnica de detección	Ventajas	Limitaciones	Sensibilidad	Especificidad	Tipo de muestra	Tiempo de prueba	Objetivo	Resultado
RT-PCR	Tecnología con alta sensibilidad y precisión (menor contaminación), presenta un menor índice de falsos negativos.	Necesita equipo sofisticado (costoso) y personal capacitado para el análisis de las muestras.	85%– 99%	99,5%-100%	Respiratorias (NPS), aguas residuales	120 min	Gen N (N1, N2, N3)	Cuantitativo
RT-LAMP	Amplificación isotérmica del ARN en un solo paso, no requiere equipo especial y sofisticado (termociclador).	Diseño de 4 a 6 primers específicos para el reconocimiento del gen diana.	94,4%-100%	90%-98,7%	Respiratorias (NPS)	30 a 40 min	Gen E y gen N	Cualitativo

CRISPR/Cas	Útil para identificar carga viral baja del SARS-CoV-2 en muestras clínicas.	Deficiente sensibilidad y fiabilidad, estudio realizado con pocos pacientes.	96%-98%	99%-100%	Respiratorias (NPS)	40 a 45 min	Gen E y gen N	Cualitativo
Antígenos	Las pruebas RAD no necesitan equipos sofisticados para la detección, tiempo de respuesta corto.	Presenta una baja sensibilidad debido a varios resultados falsos negativos.	* Pacientes sintomáticos: 95% * Pacientes asintomáticos: sin evidencia	95%-99%	Respiratorias (NPS)	15 a 30 min	Antígenos virales (proteínas S y N)	Cualitativo
ELISA	Se puede detectar la infección en la fase inicial y pacientes asintomáticos.	Necesita de equipos sofisticados como un lector de microplacas.	IgM: 77,3% IgG: 83,6%	IgM: 98,6%-100% IgG: 100%	Sangre, saliva	2 a 8 horas	IgM, IgG (proteína N y S)	Cuantitativo

CLIA	Ensayo de alto rendimiento, precisión y especificidad.	No indica si el paciente superó o está presentando la infección.	IgM: 48,2% IgG: 88,9%	IgM: 100% IgG: 90,9%	Sangre	0,5 a 2 horas	IgM, IgG (proteína N y S)	Cualitativo
LFIA	Prueba simple de bajo costo, rápida y portátil.	Alto índice de resultados falsos negativos y falsos positivos.	IgM: 82,6% IgG: 82,6%	IgM: 92,9%-100% IgG: 92,9%-99,2%	Sangre, saliva	3 a 30 min	IgM, IgG (proteína S)	Cualitativo

Fuente: (Pérez & Mir, 2021; S. Wang et al., 2022; Jarrom et al., 2020)

3.5. Técnicas de secuenciación del SARS-CoV-2

La secuenciación genética del SARS-CoV-2 desempeña un papel importante en la evolución del virus, pues permite la reconstrucción de genomas virales completos y a su vez identificar los cambios que puede tener el genoma como variantes o marcadores de transmisibilidad (Chiu & Miller, 2019). Además, la secuenciación del genoma permite estudiar el origen del virus, el diseño de vacunas y fármacos antivirales (Díaz, 2020). En enero de 2020, se publicaron las primeras secuencias genómicas del SARS-CoV-2; el genoma se usó para formar sistemas de detección de ARN viral, con la ayuda de nuevas tecnologías como la secuenciación de próxima generación o NGS (*Next Generation Sequencing*) (Chiara et al., 2021). La secuenciación de próxima generación permite secuenciar millones de fragmentos de ácido nucleico a la vez, reduciendo así el costo y el tiempo de secuenciación (Goldin et al., 2021). La tabla 5 muestra los métodos de NGS empleados para lectura corta como: Illumina, Ion Torrent y para lectura larga como: Oxford Nanopore que se emplean en la secuenciación de SARS-CoV-2.

Por otro lado, la secuenciación de próxima generación resulta ser una técnica costosa que requiere de un equipo bioinformático sofisticado, además de un extenso tiempo de procesamiento. Por lo anterior mencionado, se ha optado por otras tecnologías rápidas y convenientes para la secuenciación del genoma de SARS-CoV-2 como es la secuenciación de Sanger (Figura 15) (Murillo et al., 2020).

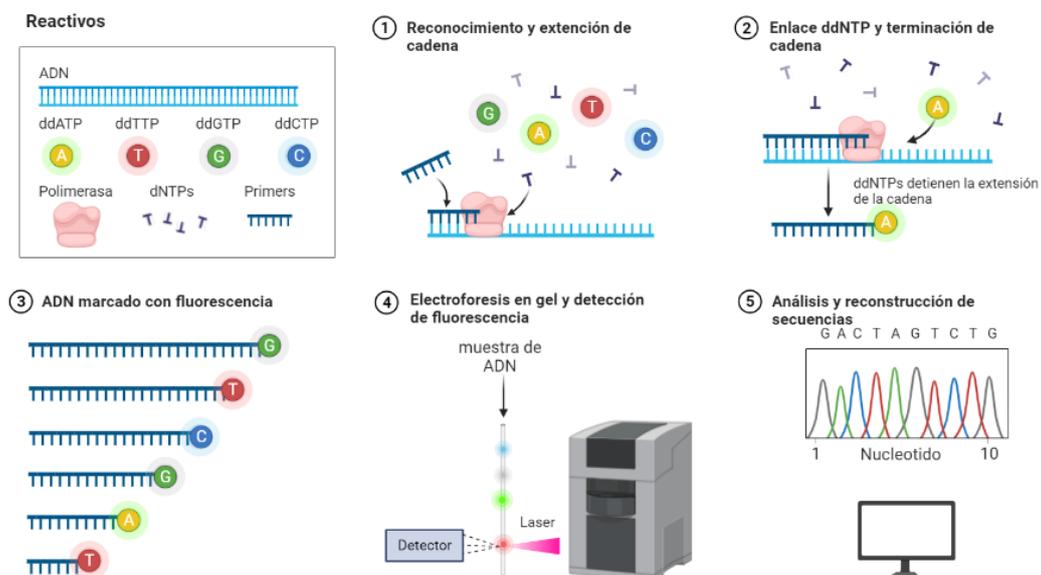


Figura 15. Secuenciación de Sanger

Tabla 5. Características de los ensayos Illumina, Ion Torrent y Oxford Nanopore

Variable	Illumina COVIDseq (short)	Ion AmpliSeq™ SARS-CoV-2 (short)	Oxford Nanopore MinION (long)
Características	NGS basado en amplicones con tiempo de respuesta corto.	Secuenciación dirigida con enfoque único mediante un panel inteligente que permite el análisis de mutaciones o variantes.	Permite el análisis directo y en tiempo real de largas secuencias de ARN.
Tipo de muestra	Hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo, BAL	Saliva, hisopado nasofaríngeo, BAL	Saliva, hisopado nasofaríngeo, esputo
Tamaño del amplicón	400 pb	125 – 275 pb	-
Límites de detección	menor a 500 copias/ml	20 copias/ reacción	10 copias/ reacción
Sistemas	NovaSeq 6000, NextSeq 2000 o NextSeq 500/550/550Dx	3 muestras (Ion 510™ Chip), 130 muestras (Ion 550™ Chip)	12 a 2.304 muestras empleando MinION
Descripción gráfica	<p>Nucleótidos marcados con fluorescencia ciclos de secuenciación recopilación de datos secuencia ensamblada</p>	<p>A. Primer B. Protón liberado C. Cambios en la detección de pH</p>	<p>Muestra Secuenciador MinION poros activos Nanopore</p>

Fuente: (Goldin et al., 2021; ECDC, 2021)

3.6. Variantes del SARS-CoV-2

La principal característica biológica de los virus es la evolución, con el paso del tiempo el SARS-CoV-2 ha sufrido varias mutaciones genéticas con carencia o nulo efecto (Marshall & Iacoviello, 2021). Las mutaciones genéticas de un virus comúnmente se conocen como variantes, en el caso del SARS-CoV-2 las variantes influyen sobre la capacidad de propagación del virus, el índice de gravedad de la enfermedad, la eficacia de las vacunas y las distintas formas de diagnóstico (OMS, 2021b).

Desde el inicio de la pandemia en enero del 2020 la OMS ha observado y ha valorado la evolución del SARS-CoV-2 (Casella et al., 2020). La OMS clasifica las variantes del virus en base a sus cambios genéticos y atributos funcionales, así aparecen las variantes de interés o VOI (*Variant of interest*) y las variantes preocupantes o VOC (*Variant of concern*) (Álvarez, 2021).

3.6.1. Variantes de interés (VOI)

Las variantes de interés presentan marcadores genéticos que estimulan pequeños cambios en la proteína S (Marshall & Iacoviello, 2021), lo cual afecta las propiedades del virus como la transmisibilidad, la letalidad de la enfermedad, la capacidad del sistema inmunitario para responder ante la enfermedad y la disminución de la eficiencia de vacunas (Marston, 2021). En la tabla 6 se resume las principales variantes de interés según la OMS.

Tabla 6. Variantes de interés (VOI) del SARS-CoV-2

Nombre OMS	Linaje	Origen	Fecha de aparición	Mutaciones relevantes	Observaciones
Zeta	P.2	Brasil	Abril 2020	L18F; T20N; P26S; F157L; E484K; D614G; S929I y V1176F	Potencial reducción en inmunidad y vacunas.
Eta	B.1.525	EEUU-New York	Noviembre 2020	A67V, Δ69 / 70, Δ144, E484K, D614G, Q677H, F888L	Reducción de neutralización por anticuerpos.

Nombre OMS	Linaje	Origen	Fecha de aparición	Mutaciones relevantes	Observaciones
Iota	B.1.526	EEUU- New York	Noviembre 2020	(L5F*), T95I, D253G, (S477N*), (E484K*), D614G, (A701V *	Reducción de neutralización por anticuerpos.
Epsilon	B.1.429 y B.1.427	EEUU	Junio 2020	S13I, W152C, L452R, D614G (B.1.429); L452R, D614G (B.1.427)	Alta virulencia y disminución en la capacidad inmunitaria.
Theta	P.3	Filipinas y Japón	Febrero 2021	141-143 E484K; N501Y; y P681H	Reducción de neutralización por anticuerpos.
Kappa	B.1.617.1	India	Octubre 2020	(T95I), G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R y Q1071H	Reducción de neutralización por anticuerpos.
Lambda	C.37	Perú	Diciembre 2020	L425R	Reducción de neutralización por anticuerpos.

Fuente: (Marston, 2021)

3.6.2. Variantes preocupantes (VOC)

Las variantes preocupantes poseen un alto impacto en la transmisibilidad, lo cual puede ocasionar que los casos confirmados de COVID-19 y las muertes aumenten considerablemente (Álvarez, 2021). Las VOC reducen significativamente la eficacia de una vacuna o de anticuerpos generados en una previa infección del virus, de igual manera las VOC reducen la capacidad de diagnóstico de la enfermedad (Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Según la OMS, (2022b), hasta la fecha existen 5 variantes de preocupación alfa, beta, gamma y delta las cuales se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2

Nombre OMS	Linaje	Origen	Fecha de aparición	Mutaciones relevantes	Observaciones
Alfa	B.1.1.7	Reino Unido	Diciembre 2020	N501Y, del 69-70, P681H, Y144 del, A540D	Aumento en la transmisibilidad en un 50%
Beta	B.1.351	Sudáfrica	Diciembre 2020	E484K, N501Y, K417N, L18F, A701V, del ORF1b	Incrementa la transmisión del virus en un 95% y la mortalidad hospitalaria en un 20%
Gamma	P.1	Brasil y Japón	Enero 2021	S: N501Y, E484K, K417T, del ORF1b	Mayor transmisibilidad de 38%
Delta	B.1.617	India	Octubre 2020	(V70F *), (A222V *), (W258L *), (K417N *)	Mayor transmisibilidad en un 97%
Ómicron	BA.1 (B.1.1.5.29)	Sudáfrica	Diciembre 2021	A67V 69-70del T95I GVYY142-145D NL211-212I	Mayor transmisibilidad en un 97%

Fuente: (Centers for Disease Control and Prevention, 2021; Cascella et al., 2020; Rojo et al., 2022)

Es importante señalar la evolución de la epidemiología genómica del SARS-CoV-2, ya que esto permite el estudio del genoma viral, el origen, el comportamiento del agente viral dentro del huésped, y en el caso de las variantes permite el estudio de mutaciones, linajes y cepas (OMS, 2021a). A continuación, la figura 16 muestra la diversidad genética del SARS-CoV-2 en Sudamérica durante los últimos 6 meses.

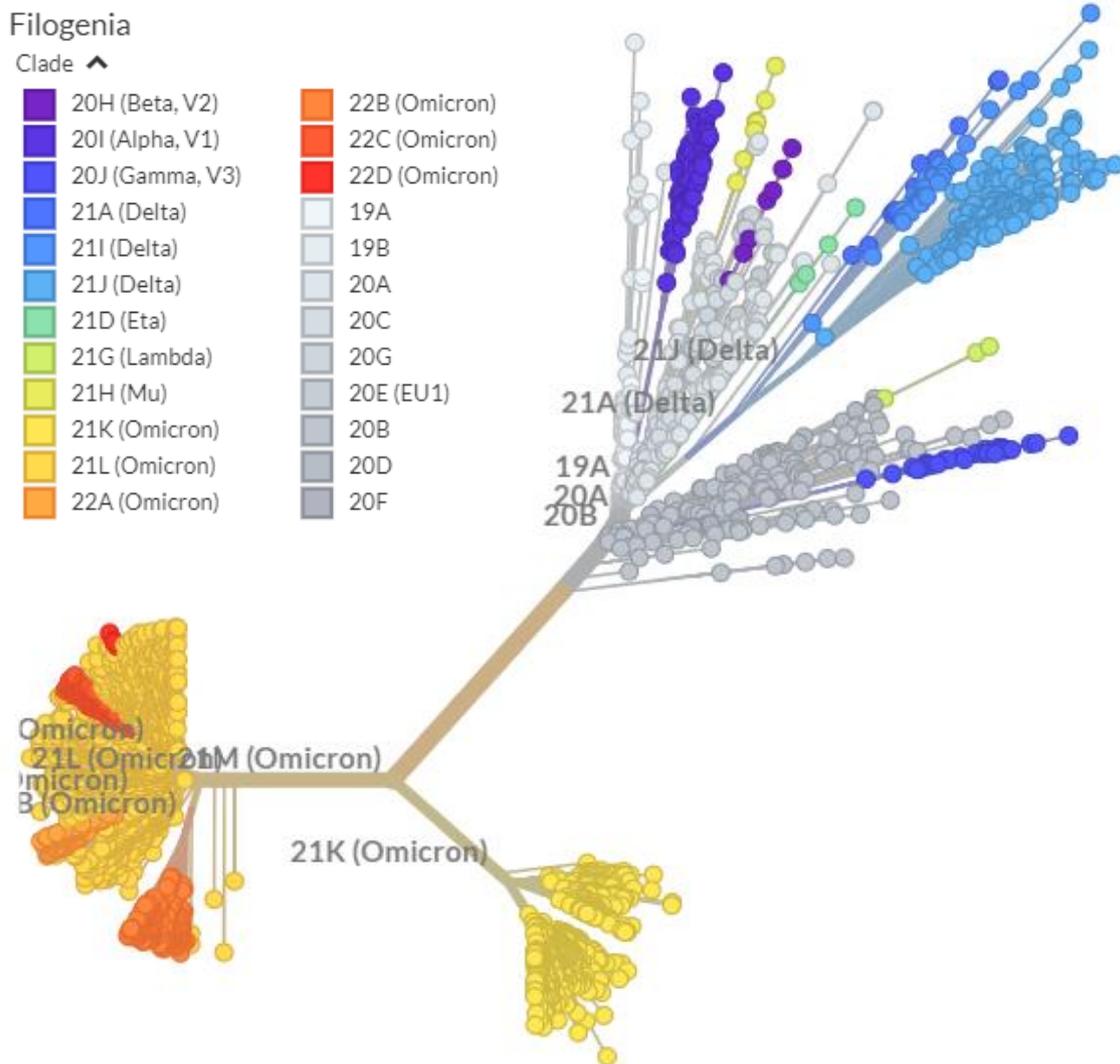


Figura 16. Diversidad genética del SARS-CoV-2 en Sudamérica

Fuente: (Nextstrain, 2022)

Tabla 8. Técnicas para la detección de VOC del SARS-CoV-2

Variante de interés	Tipo de muestra	Target	Secuencia de primers	Tamaño del amplicon	Fundamento	Referencias
Alfa	*Hisopado nasofaríngeo *Saliva	Orf8	F: 5'- GAAGACTTTTTAGAGTATCATGAC-3' R: 5'- TTTTGGGGTCCATTATCAGAC-3' P: 5'- HEX- CGTGTTGTTGTAATCTAAACGAACAAAC- BHQ1-3'	150 pb	PCR cuantitativa en un solo paso	(Erster et al., 2022)
Beta	*Aguas residuales	Proteína S	F: 5'CTGAAATCTATCAGGCCGGT-3' R: 5'GTTGGTAACCAACACCATAAG-3' P:5'- FAM o HEX/ZEN- CACACCTTGTAATGGTGTAAAGGTT- IBFQ-3'	150 pb	PCR cuantitativa	(Wolfe et al., 2022; Umair et al., 2022)
Gamma	*Hisopado nasofaríngeo *Saliva	Proteína S	F: 5' -CCAGATGATTTTACAGGCTGCG-3' R: 5' -GTTGCTGGTGCATGTAGAAGTTC-3'	293 pb	PCR en un solo paso, seguido de la secuenciación de un fragmento menor	(Jaspe et al., 2020)

Variante de interés	Tipo de muestra	Target	Secuencia de primers	Tamaño del amplicon	Fundamento	Referencias
Delta	*Hisopado nasofaríngeo	Proteína S2	F: 5'- CCACAAAAACAACAAAAGTTGG-3' R:5'- TGAGAGACATATTCAAAGTGCAA-3' P: 5'- FAM-ATAAACTCCACTTTCCA-MGB-3'	78 pb	PCR en tiempo real, genotipificación y secuenciación de Sanger	(Hamill et al., 2022)
Ómicron	*Hisopado nasofaríngeo *Esputo	Proteína S	F: 5'-TTGGAACAGGAAGAGAATCAGC-3' R: 5'- TGACACCACCAAAGAACATGG -3'	733 pb	RT-PCR en un solo paso, de forma complementaria se realizaría una secuenciación de tipo Sanger	(Bloemen et al., 2020)

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- De todo lo anterior mencionado en la investigación bibliográfica, se deduce que existen diferentes metodologías para la detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en muestras clínicas como; la detección basada en la amplificación de ácidos nucleicos, la detección de proteínas virales de antígenos del SARS-CoV-2 y la detección de anticuerpos específicos del virus, siendo las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos las más utilizadas actualmente para el diagnóstico de COVID-19. De igual manera se describió las técnicas de secuenciación del SARS-CoV-2 puesto que permite el análisis de genomas virales completos para identificar variantes de interés y a su vez estudiar la evolución del genoma viral.
- Se revisó las técnicas de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 basada en la amplificación de ácidos nucleicos como la RT-PCR que tiene como fundamento la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, además, es considerada como el estándar de oro para la detección del virus y es la técnica más utilizada para diagnosticar el COVID-19 debido a su alta sensibilidad, además, cuenta con un límite de detección promedio de 0,8 copias de ARN/ reacción lo cual indica una alta concentración del virus. También se describieron las técnicas de amplificación isotérmicas como RT-LAMP y CRISPR/Cas12 que presentan una sensibilidad menor a la de RT-PCR. De igual forma se investigó la detección de antígenos que localizan la infección por el virus en la etapa inicial de la enfermedad y ensayos inmunológicos ELISA, CLIA Y LFIA útiles para identificar la enfermedad en grandes poblaciones.
- Para el análisis de SARS-CoV-2 se utilizan distintos tipos de muestras clínicas como son muestras respiratorias, que incluyen el hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo, la saliva, el lavado bronco alveolar y el esputo usadas para el análisis

de amplificación de ácidos nucleicos, de igual se analizó las muestras de sangre utilizadas en los ensayos inmunológicos y muestras de heces. La toma de la muestra clínica se debe realizar en un área con ventilación, también se debe contar con un equipo de bioseguridad como bata o mandil, protector facial, mascarilla y guantes. Se deben tener en cuenta las recomendaciones específicas con respecto a la toma de muestra, manipulación del material biológico, conservación y transporte de las muestras.

- Se analizó las ventajas y limitaciones de las técnicas de detección de SARS-CoV-2, donde la RT-PCR es un ensayo cuantitativo que posee alta sensibilidad del 85% al 99%, esta técnica cuenta con un menor índice de resultados falsos negativos y con una especificidad del 100%, sin embargo es una técnica que requiere un equipo costoso y su tiempo de prueba es muy largo; en comparación con la RT-LAMP, esta es una técnica que no requiere equipos sofisticados como un termociclador y su tiempo de prueba es relativamente bajo menor a 40 min, cuenta con una sensibilidad del 94,4% al 100%, la cual la ubica como una alternativa económica para detectar SARS-CoV-2 frente a la RT-PCR. De igual forma la técnica CRISPR/Cas 12 posee una alta sensibilidad del 98% lo cual permite identificar el virus cuando se presenta en pequeñas cantidades debido a su alta especificidad del 100%. También se analizó las ventajas que presentan las pruebas de antígenos, estas son de rápida aplicación, menor a 30 min, pero presentan una sensibilidad del 95% en pacientes sintomáticos debido a resultados falsos negativos. Por último, los inmunoensayos se basan en la detección de anticuerpos IgM e IgG, no necesitan de equipos sofisticados, pero no son útiles para identificar la carga viral, tampoco indican si el paciente está pasando por la enfermedad o si ya supero la misma, en comparación a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos el inmunoensayo ELISA presentó una sensibilidad muy baja de 77,3%, CLIA de 48,2% y LFIA de 82,6% debido a que son ensayos cualitativos y presentan un alto índice de resultados falsos negativos y falsos positivos.

4.2. Recomendaciones

- ✓ Se debe realizar un estudio amplio y extenso que exponga todas las técnicas de detección del SARS-CoV-2, puesto que la tecnología está avanzando de manera rápida para descubrir una técnica efectiva para el diagnóstico y tratamiento del COVID-19.

- ✓ Analizar la importancia y la efectividad de los kits comerciales RT-PCR y RT-LAMP de manera más extensa para la detección y cuantificación de SARS-CoV-2, de esta manera se podría deducir el kit esencial para el diagnóstico de COVID-19.

- ✓ Elaborar un protocolo de muestreo, transporte y almacenamiento para la toma de muestras clínicas.

- ✓ Gestionar un estudio detallado sobre las ventajas que poseen las distintas técnicas de detección del SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Tawfiq, J. (2020). *Asymptomatic coronavirus infection: MERS-CoV and SARS-CoV-2 (COVID-19)*. January. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101608>
- Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The human coronavirus disease covid-19: Its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. *Pathogens*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens9050331>
- Álvarez, F. (2021). *Impacto de las variantes del SARS-CoV-2 en la efectividad vacunal*. 1–11. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01329-9>
- Alygizakis, N., Markou, A. N., Rousis, N. I., Galani, A., Avgeris, M., Adamopoulos, P. G., Scorilas, A., Lianidou, E. S., Paraskevis, D., Tsiodras, S., Tsakris, A., Dimopoulos, M. A., & Thomaidis, N. S. (2021). Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 134, 116125. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116125>
- Argenzian, M. G., Bruc, S. L., Slate, C. L., Tia, J. R., Baldwi, M. R., Barr, R. G., Chan, B. P., Cha, K. H., Cho, J. J., Gavin, N., Goyal, P., Mill, A. M., Pate, A. A., Romney, M. L. S., Saffor, M. M., Schluge, N. W., Sengupta, S., Sobieszczy, M. E., Zucke, J. E., ... Chen, R. (2020). Characterization and clinical course of 1000 patients with coronavirus disease 2019 in New York: Retrospective case series. *The BMJ*, 369(March). <https://doi.org/10.1136/bmj.m1996>
- Ayasa, M., Gómez, N., & Varas, S. (2020). *Pruebas moleculares diagnósticas de SARS-COV-2 : fundamentos*. 8–23. <http://revistabioanálisis.com/images/pdf/rev105.pdf>
- Azevedo, F. (2021). *Coronavirus como posible causa de síndrome respiratorio agudo severo*. 6736(03), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13077-2)
- Baraniuk, C. (2020). Covid-19 antibody tests: A briefing. *The BMJ*, 369, 1–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2284>
- Barreto, S. (2020). COVID-19 y aguas residuales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(3), 1–15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Bloemen, M., Rector, A., Swinnen, J., Ranst, M. Van, Maes, P., Vanmechelen, B., & Wollants, E. (2020). *Fast detection of SARS-CoV-2 variants including Omicron using one-step RT-PCR and Sanger sequencing*. January. <https://europepmc.org/article/pmc/pmc8896866>

- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, *38*(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., Beskid, T. R., Jervey, S. R., & Liu, C. (2020). Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science*, *6*(5), 591–605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>
- Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150360>
- CDC. (2020a). CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR diagnostic panel for emergency use only. *Cdc Eua*, *3*, 1–42. <https://www.fda.gov/media/134922/download>
- CDC. (2020b). Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. *May 22, 2019*, 1–5. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
- CDC. (2021a). 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes. *CDC’s Diagnostic Test for COVID-19 Only and Supplies*, 2019–2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>
- CDC. (2021b). *Pruebas de detección del COVID-19: visión general*. 2019–2021. <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. *Cdc*, 1–12. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html><https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html#print>
- Ceron, J. J., Lamy, E., Martinez-Subiela, S., Lopez-Jornet, P., Silva, F. C. E., Eckersall, P. D., & Tvarijonaviciute, A. (2021). Use of saliva for diagnosis and monitoring the SARS-CoV-2: A general perspective. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/jcm9051491>
- Chellasamy, G., Arumugasamy, S. K., Govindaraju, S., & Yun, K. (2020). Analytical

- insights of COVID-19 pandemic. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116072. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116072>
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Cheng, M. P., Papenburg, J., Desjardins, M., Kanjilal, S., Quach, C., Libman, M., Dittrich, S., & Yansouni, C. P. (2020). Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Annals of Internal Medicine*, 172(11), 726–734. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
- Cheung, K. S., Hung, I. F. N., Chan, P. P. Y., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., Ng, Y. Y., Chu, M. Y., Chung, T. W. H., Tam, A. R., Yip, C. C. Y., Leung, K. H., Fung, A. Y. F., Zhang, R. R., Lin, Y., Cheng, H. M., Zhang, A. J. X., To, K. K. W., Chan, K. H., ... Leung, W. K. (2020). Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, 159(1), 81–95. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.065>
- Chiara, M., D'Erchia, A. M., Gissi, C., Manzari, C., Parisi, A., Resta, N., Zambelli, F., Picardi, E., Pavesi, G., Horner, D. S., & Pesole, G. (2021). Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: Challenges, applications and opportunities. *Briefings in Bioinformatics*, 22(2), 616–630. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa297>
- Chiu, C. Y., & Miller, S. A. (2019). Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), 341–355. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>
- Collings, P. (2021). *Desarrollan un test basado en CRISPR que detecta el virus de la COVID-19 en saliva*. <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Desarrollan-un-test-basado-en-CRISPR-que-detecta-el-virus-de-la-COVID-19-en-saliva>
- Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., Drosten, C., Landt, O., Koopmans, M., & Zambon Public Health England, M. (2020). Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR incl. workflow protocoll on the last 3 pages. *Carité Berlin*, 13. https://www.microsynth.ch/files/Inhalte/PDFs/Oligosynthesis/1_Corona_Virus_protocol-v2-1.pdf
- Cortés, M. E. (2020). Conociendo al coronavirus SARS-CoV-2, protagonista de una pandemia. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 54(3), 333-335. <https://www.redalyc.org/journal/535/53564518008/html/>
- Dabanch, J. (2021). Emergencia De Sars-Cov-2. Aspectos Básicos Sobre Su Origen,

- Epidemiología, Estructura Y Patogenia Para Clínicos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.12.003>
- Dao Thi, V. L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P. M., Kirrmaier, D., Freistaedter, A., Papagiannidis, D., Galmozzi, C., Stanifer, M. L., Boulant, S., Klein, S., Chlanda, P., Khalid, D., Miranda, I. B., Schnitzler, P., Kräusslich, H. G., Knop, M., & Anders, S. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science Translational Medicine*, 12(556). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABC7075>
- Dezube, R. (2021). *Broncoscopia en pacientes con COVID-19*. 1–3. <https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/trastornos-pulmonares/procedimientos-diagnosticos-y-terapeuticos-pulmonares/broncoscopia>
- Díaz, F. (2020). *¿Qué es la secuenciación genética? Una herramienta mas para combatir el nuevo coronavirus*. 1–7. <https://www.isciii.es/InformacionCiudadanos/DivulgacionCulturaCientifica/DivulgacionISCIII/Paginas/Divulgacion/InformeCoronavirusSecuenciacion.aspx>
- Díaz Pinzón, J. E. (2021). Afinidad entre las pruebas PCR y Antígeno, y su positividad para COVID-19 en Colombia. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 16–20. <https://doi.org/10.31260/repertmedcir.01217372.1192>
- ECDC. (2021). *Sequencing of SARS-CoV-2: first update. January*, 13. <https://cov-lineages.org>
- Erster, O., Mendelson, E., Kabat, A., Levy, V., Mannasse, B., Assraf, H., Azar, R., Ali, Y., Bucris, E., Bar-Ilan, D., Mor, O., Elul, M., Mandelboim, M., Sofer, D., Fleishon, S., Zuckerman, N. S., & Bar-Or, I. (2022). Specific Detection of SARS-CoV-2 Variants B.1.1.7 (Alpha) and B.1.617.2 (Delta) Using a One-Step Quantitative PCR Assay. *Microbiology Spectrum*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02176-21>
- Etievant, S., Bal, A., Escuret, V., Brengel-Pesce, K., Bouscambert, M., Cheynet, V., Generenaz, L., Oriol, G., Destras, G., Billaud, G., Josset, L., Frobert, E., Morfin, F., & Gaymard, A. (2020). Performance assessment of SARS-CoV-2 PCR assays developed by who referral laboratories. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/jcm9061871>
- EUROIMMUN. (2021). EURORealTime SARS-CoV-2 Instruction for Use. *System*, 10(5), 1–9. https://www.coronavirus-diagnostics.com/documents/Indications/Infections/Coronavirus/MP_2606_D_UK_

A.pdf

- Ezpeleta, D., & García, D. (2020). Manual COVID-19 para el neurólogo general. In *Sociedad Española de Neurología*. https://neuroalmeria.com/wp-content/uploads/2020/04/Manual_neuroCOVID-19_SEN_.pdf#page=12
- Filchakova, O., Dossym, D., Ilyas, A., Kuanysheva, T., Abdizhamil, A., & Bukasov, R. (2022). Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*, *244*(March), 123409. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123409>
- Fung, T. S., & Liu, D. X. (2019). *Human Coronavirus : Host-Pathogen Interaction*. 529–560. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
- Gallardo, I. (2021). *Test de saliva para coronavirus : ¿ En qué consisten ?* 1–7. <https://cuidateplus.marca.com/bienestar/2020/12/10/test-saliva-coronavirus--consisten-175972.html> 5/7
- García, F., Melón, S., Navarro, D., Paño, J. R., & Galán, J. C. (2021). Organización del diagnóstico de SARS-CoV-2 y estrategias de optimización. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *1*(6–9), 1–16. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2020-COVID19-OrganizacionDiagnostico.pdf>
- Giri, B., Pandey, S., Shrestha, R., Pokharel, K., Ligler, F. S., & Neupane, B. B. (2021). Review of analytical performance of COVID-19 detection methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *413*(1), 35–48. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02889-x>
- Goldin, J., Sahajpal, N. S., Mondal, A. K., Ananth, S., Williams, C., Chaubey, A., Rojiani, A. M., & Kolhe, R. (2021). Next-generation sequencing (Ngs) in covid-19: A tool for sars-cov-2 diagnosis, monitoring new strains and phylodynamic modeling in molecular epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, *43*(2), 845–867. <https://doi.org/10.3390/cimb43020061>
- Goldschmidt, P. (2020). Dificultades en la detección de genomas del Nuevo Coronavirus 2 (SARS COV-2). *Rev. Argent. Salud Publica*, *12*, 17–17. http://rasp.msal.gov.ar/rasp/articulos/vol12supl/REV_Goldschmidte17.pdf
- Haagmans, B. (2021). Métodos diagnósticos para COVID-19. *Fundación MF*, *5676*, 21–23. https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/pruebas_diagnosticas_de_laboratorio_de_covid_vfinal.pdf
- Habibzadeh, P., Mofatteh, M., Silawi, M., Ghavami, S., & Faghihi, M. A. (2021). Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. *Critical Reviews in*

- Clinical Laboratory Sciences*, 58(6), 385–398.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1884640>
- Hamill, V., Noll, L., Lu, N., Tsui, W. N. T., Porter, E. P., Gray, M., Sebhatu, T., Goerl, K., Brown, S., Palinski, R., Thomason, S., Almes, K., Retallick, J., & Bai, J. (2022). Molecular detection of SARS-CoV-2 strains and differentiation of Delta variant strains. *Transboundary and Emerging Diseases*, December 2021, 1–11.
<https://doi.org/10.1111/tbed.14443>
- Herrera, J. (2022). PCR en tiempo real. *Ibt-Unam*, 40.
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Higuera, M. (2021). *Coronavirus: ¿Qué son las pruebas serológicas y para qué sirven?* 1–5. <https://uniandes.edu.co/es/tags/COVID19>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Huang, J.-T., Ran, R.-X., Li, Y., Hart, B., Cangelosi, G. A., Wood, R. C., Wehber, K., Verma, P., Vojta, D., Berke, E. M., Palarach, C., Sujirarat, D., Sangprasert, S., Romera-Liebana, L., Orfila, F., Segura, J. M., Real, J., Fabra, M. L., Möller, M., ... Marti, N. (2019). Chronological Changes of Viral Shedding in Adult Inpatients with COVID19 in Wuhan, China. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 0813(April), 1–11.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa631>
- Huang, W. E., Lim, B., Hsu, C. C., Xiong, D., Wu, W., Yu, Y., Jia, H., Wang, Y., Zeng, Y., Ji, M., Chang, H., Zhang, X., Wang, H., & Cui, Z. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 950–961.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>
- Huang, Z., Tian, D., Liu, Y., Lin, Z., Lyon, C. J., Lai, W., Fusco, D., Drouin, A., Yin, X., Hu, T., & Ning, B. (2020). Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 164(May), 112316.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112316>
- Ishige, T., Murata, S., Taniguchi, T., Miyabe, A., Kitamura, K., Kawasakia, K., Nishimuraa, M., Igarib, H., & Matsushita, K. (2021). *Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by*

clinical

laboratories.

January.

<https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC7179514&blobtype=pdf>

- Jalilie E., A., Barcos M., P., Morales S., A., Rodriguez V., M., & Lazo P., D. (2020). Recomendaciones de la Comisión de Broncoscopía y Neumología Intervencionista de la Sociedad Chilena de Enfermedades Respiratorias en el uso de la Broncoscopía y toma de muestras en pacientes con sospecha o diagnóstico de infección por COVID-19. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 36(2), 135–137. <https://doi.org/10.4067/s0717-73482020000200135>
- Jarrom, D., Elston, L., Washington, J., Prettyjohns, M., Cann, K., Myles, S., & Groves, P. (2020). *The effectiveness of tests to detect the presence of SARS-CoV-2 virus, and antibodies to SARS-CoV-2, to inform COVID-19 diagnosis: a rapid systematic review.* <https://doi.org/10.1101/2020.08.10.20171777>
- Jaspe, R. C., Loureiro, C. L., Sulbaran, Y., & Moros, Z. C. (2020). *Introduction and rapid dissemination of SARS-CoV-2 Gamma Variant of Concern in Venezuela.* *January.* <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105147>
- Jawerth, N. (2020). Detección del virus de la COVID-19 mediante la RT-PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas*, 1(1), 4. <https://www.iaea.org/sites/default/files/6120811es.pdf>
- Jiang, M., Pan, W., Arasthfer, A., Fang, W., Ling, L., Fang, H., Daneshnia, F., Yu, J., Liao, W., Pei, H., Li, X., & Lass-Flörl, C. (2020). Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(June), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>
- John Hopkins Center for Health Security. (2020). Comparison of National RT-PCR Primers , Probes , and Protocols for SARS-CoV-2 Diagnostics. *Centerforhealthsecurity.Org*, 5. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2%0Ahttps://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200410-RT-PCR.pdf
- Ju, J., Wei, S. J., Savira, F., Suharsono, Y., Aragão, R., Linsi, L., Editor, B., Reeger, U., Sievers, W., Michalopoulou, C., Mimis, A., Editor, B., Ersbøll, E., Groenendijk, K., Waldrauch, H., Waldrauch, H., Bader, E., Lebhart, G., Neustädter, C., ... Saillard,

- Y. (2020). Genomic and phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 strains isolated in the city of Gwangju, South Korea. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 43(1), 7728. https://online210.psych.wisc.edu/wp-content/uploads/PSY-210_Unit_Materials/PSY-210_Unit01_Materials/Frost_Blog_2020.pdf%0Ahttps://www.economist.com/special-report/2020/02/06/china-is-making-substantial-investment-in-ports-and-pipelines-worldwide%0Ahttp://
- Kasibhatla, S. M., Kinikar, M., Limaye, S., Kale, M. M., & Kulkarni-Kale, U. (2020). Understanding evolution of SARS-CoV-2: A perspective from analysis of genetic diversity of RdRp gene. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 1932–1937. <https://doi.org/10.1002/jmv.25909>
- Krammer, F., & Simon, V. (2020). Serology assays to manage COVID-19. *Science*, 368(6495), 1060–1061. <https://doi.org/10.1126/science.abc1227>
- Kucirka, L. M., Lauer, S. A., Laeyendecker, O., Boon, D., & Lessler, J. (2020). Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Annals of Internal Medicine*, 173(4), 262–267. <https://doi.org/10.7326/M20-1495>
- Kujawski, S. A., Wong, K. K., Collins, J. P., Epstein, L., Killerby, M. E., Midgley, C. M., Abedi, G. R., Ahmed, N. S., Almendares, O., Alvarez, F. N., Anderson, K. N., Balter, S., Barry, V., Bartlett, K., Beer, K., Ben-Aderet, M. A., Benowitz, I., Biggs, H. M., Binder, A. M., ... Zhang, J. (2020). Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nature Medicine*, 26(6), 861–868. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0877-5>
- LabCorp. (2019). 2019 nuevo coronavirus (COVID-19), NAA. *Laboratory Corporation of America*. <https://www.labcorp.com/tests/139900/2019-novel-coronavirus-covid-19-naa>
- Lai, T., Xiang, F., Zeng, J., Huang, Y., Jia, L., Chen, H., Wu, J., Xie, J., Liu, S., Deng, W., Zheng, W., Huang, Y., Zhang, Q., Luo, Q., Mo, F., Long, L., Zhang, W., Chen, W., & Han, H. (2021). Reliability of induced sputum test is greater than that of throat swab test for detecting SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A multi-center cross-sectional study. *Virulence*, 11(1), 1394–1401. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1831342>
- Lázaro, A. (2021). *Coronavirus : diagnóstico más fiable con muestra de heces que con PCR*. 1–4. <https://www.redaccionmedica.com/secciones/sanidad-hoy/coronavirus->

diagnostico-mas-fiabile-con-muestra-de-heces-que-con-pcr--4858

- Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Jonathan H. Epstein, H. W., & Crameri, G. (2017). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science*, 310(5748), 676–679. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=1323722>
- Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., Sun, R., Wang, Y., Hu, B., Chen, W., Zhang, Y., Wang, J., Huang, B., Lin, Y., Yang, J., Cai, W., Wang, X., Cheng, J., Chen, Z., ... Ye, F. (2020). Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, 92(9), 1518–1524. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>
- Liu, R., Han, H., Liu, F., Lv, Z., Wu, K., Liu, Y., Feng, Y., & Zhu, C. (2020). Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Journal of Infection and Public Health*, 13(January), 1224–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>
- Lou, J., Bai, Y., & Wang, M. (2020). COVID-19 disease with positive fecal and negative pharyngeal and sputum viral tests. *American Journal of Gastroenterology*, 115(5), 790. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000610>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- MacLean, O. A., Lytras, S., Weaver, S., Singer, J. B., Boni, M. F., Lemey, P., Kosakovsky Pond, S. L., & Robertson, D. L. (2021). Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen. *PLoS Biology*, 19(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001115>
- Madrid, C., González, T., Iscar, M., Nava, E., Ortiz, A., Herrero, J., & García, M. (2021). PCR in Sputum for the Diagnosis of COVID-19 in a Case with Infrequent Radiological Pattern. *Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Asociación Latinoamericana Del Tórax (ALAT). Asociación Sudamericana de Cirugía Torácica (ASCT)*, 57, 70–71. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.22954.7>

- Mak, G. C., Cheng, P. K., Lau, S. S., Wong, K. K., Lau, C. S., Lam, E. T., Chan, R. C., & Tsang, D. N. (2020). Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of Clinical Virology*, 129(June), 104500. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104500>
- Maroto Vela, M. del C. (2020). SARS-CoV-2: Problems and uncertainties. *Anales Rnm*, 137(137(02)), 98–103. <https://doi.org/10.32440/ar.2020.137.02.rev01>
- Marshall, H. D., & Iacoviello, V. (2021). *Nuevas variantes del SARS-CoV-2 (VOC), nombres y actualización*. 2, 1–5. <https://www.ebsco.com/e/latam/blog/nuevas-variantes-del-sars-cov-2-voc-nuevos-nombres-y-nueva-actualizacion>
- Marston, P. (2021). *Información microbiológica acerca de SARS-CoV-2*. 1–19. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Documento_MICROBIOLOGIA.pdf
- Martínez, A., & Rodríguez, J. (2021). Asymptomatic COVID-19 excluded from protocol. *Atencion Primaria*, 53(1), 118–119. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2020.06.005>
- Martinez, R. M. (2020). Clinical Samples for SARS-CoV-2 Detection: Review of the Early Literature. *Clinical Microbiology Newsletter*, 42(15), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2020.07.001>
- Mayta, M. (2020). Una aproximación al nuevo coronavirus SARS-CoV2: aspectos generales e hipótesis sobre su origen. *ResearchGate*, 2(June), 1–5. https://www.researchgate.net/profile/Martin-Mayta/publication/341915383_Una_aproximacion_al_nuevo_coronavirus_SARS-CoV2_aspectos_generales_e_hipotesis_sobre_su_origen/links/5ed9886d92851c9c5e8160d9/Una-aproximacion-al-nuevo-coronavirus-SARS-CoV2-aspectos-generales-e-hipotesis-sobre-su-origen.pdf
- Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. (2021). *Toma y transporte de muestras para diagnóstico por PCR de SARS-Cov-2. Documento Técnico. Versión de 18 de Mayo de 2021*. https://www.sanidad.gob.es/eu/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/202005018_Toma_muestras.pdf
- Mohammadi, A., Esmailzadeh, E., Li, Y., Bosch, R. J., & Li, J. Z. (2020). SARS-CoV-2 detection in different respiratory sites: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*, 59, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102903>
- Murillo, E., Palacios, K., Ayala, C., García, J., & Zulagua, A. (2020). Validación de una nueva estrategia para la identificación de variantes de SARS-CoV-2 mediante

- secuenciación del gen espiga por Sanger. *EBioMedicine*, January, 2–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9108067/pdf/main.pdf>
- Nextstrain. (2022). Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused on South America over the past 6 months. *Nextstrain*, 49. <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global>
- Niu, P., Lu, R., Zhao, L., Wang, H., Huang, B., Ye, F., Wang, W., & Tan, W. (2021). Three Novel Real-Time RT-PCR Assays for Detection of COVID-19 Virus. *China CDC Weekly*, 2(25), 453–457. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.116>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2012). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Medicina Del Lavoro*, 103(3), 187–197. <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC102748&blobtype=pdf>
- Odiwuor, N., Xiong, J., Ogolla, F., Hong, W., Li, X., Khan, F. M., Wang, N., Yu, J., & Wei, H. (2022). A point-of-care SARS-CoV-2 test based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification without RNA extraction with diagnostic performance same as RT-PCR. *Analytica Chimica Acta*, 1200(44), 339590. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339590>
- Oliva, J. (2020). SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta*, 3(2), 79–86. <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- OMS. (2020). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2. Orientaciones provisionales. 11 de septiembre de 2020. *World Health Organization*, 26. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/335830/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- OMS. (2021a). COVID-19 Weekly Epidemiological Update (11 July 2021). *World Health Organization*, July, 1–3. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/weekly_epidemiological_update_22.pdf
- OMS. (2021b). *Orientaciones para la vigilancia de las variantes del SARS-CoV-2. 1*, 1–22. https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO_2019-nCoV_surveillance_variants
- OMS. (2022a). *Muertes y casos a nivel mundial por COVID-19*. 27–29. <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/coronavirus-disease-answers?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7D&gclid=Cj0KCQJwxIOXBhCrA>

- RI5AL1QFCbQwr4hFidKHKbGWS4UiYrOjrwBYZdIxJz-
mvz4DwefLTCmviZOZy0aAj-jEALw_wcB&query=muertes+a+nivel+mundi
- OMS. (2022b). Seguimiento de las Variantes del SARS-CoV-2. 2022, 6. <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- Onoda, M., & Martínez, M. J. (2021). PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO DE COVID-19. *Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria*, 49(1), 40–44. <https://doi.org/10.11392/jsao.49.40>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. *World Health Organization (WHO)*, March, 20. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334254>
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID-19. *Organización Panamericana de La Salud*, 1–11. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID-19200038_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Panpradist, N., Wang, Q., Ruth, P. S., Kotnik, J. H., Oreskovic, A. K., Miller, A., Stewart, S. W. A., Vrana, J., Han, P. D., Beck, I. A., Starita, L. M., Frenkel, L. M., & Lutz, B. R. (2021). Simpler and faster Covid-19 testing: Strategies to streamline SARS-CoV-2 molecular assays. *EBioMedicine*, 64, 103236. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103236>
- Park, J. G., Oladunni, F. S., Chiem, K., Ye, C., Pipenbrink, M., Moran, T., Walter, M. R., Kobie, J., & Martinez-Sobrido, L. (2021). Rapid in vitro assays for screening neutralizing antibodies and antivirals against SARS-CoV-2. *Journal of Virological Methods*, 287(October 2020), 113995. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113995>
- Pasomsub, E., Watcharananan, S. P., Boonyawat, K., Janchompoo, P., Wongtabtim, G., Nalumansi, A., Lutalo, T., Kayiwa, J., Watera, C., Balinandi, S., Kiconco, J., Nakaseegu, J., Olara, D., Odwilo, E., Serwanga, J., Kikaire, B., Ssemwanga, D., Nabadda, S., Ssewanyana, I., ... Kaleebu, P. (2020). *Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. January.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>
- Pasteur, I. (2020). *Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 [PRIMER]*. 1–3.
- Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2).

- Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune Genetic and Molecular Basis of COVID-19 (SARS-CoV-2) Mechanisms of Pathogenesis and Immune. *Int. J. Odontostomat*, 14(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Patrucco, F., Albera, C., Bellocchia, M., Foci, V., Gavelli, F., Castello, L. M., Bellan, M., Sainaghi, P. P., Airoidi, C., Balbo, P. E., & Solidoro, P. (2021). SARS-CoV-2 Detection on Bronchoalveolar Lavage: An Italian Multicenter experience. *Respiration*, 99(11), 970–978. <https://doi.org/10.1159/000511964>
- Pérez, B., & Mir, M. (2021). Commercialized diagnostic technologies to combat SARS-CoV2 : Advantages and disadvantages. *Centro de Investigación Biomédica En Red En Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)*, 225(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121898>
- Piras, A., Rizzo, D., Longoni, E., Turra, N., Urru, S., Paolo, P., Musumano, L., & Bussu, F. (2020). *Nasopharyngeal swab collection in the suspicion of Covid-19. January*. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102551>
- Rabaan, A. A., Al-ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., & Tiwari, R. (2020). *SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. April*. https://infzmed.it/media/journal/Vol_28_2_2020_7.pdf
- Ramanathan, K., Antognini, D., Combes, A., Paden, M., Zakhary, B., Ogino, M., Maclaren, G., & Brodie, D. (2020). *Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. January*, 19–21. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1) See
- Redfield, R. (2020). *CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time Reverse Transcriptase (RT) -PCR Diagnostic Panel. 1988*, 1–12. <https://www.fda.gov/media/134919/download>
- Rivas, A. M., Calcumil Herrera, P., Boin Bakit, C., Soto, R. C., & Melián, R. A. ; (2020). Detección de COVID-19 (SARS-CoV-2) Mediante la Saliva: Una Alternativa Diagnóstica poco Invasiva Detection of COVID-19 (SARS-CoV-2) by Saliva: A Low-invasive Diagnostic 1. Rivas AM, Calcumil Herrera P, Boin Bakit C, Soto RC, Melián RA; Detección de COVID-. *Int. J. Odontostomat*, 14(3), 316–320. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijodontos/v14n3/0718-381X-ijodontos-14-03-316.pdf>
- Roche Diagnostics. (2020). *Prueba cobas SARS-CoV-2 (para el coronavirus COVID-19)*. 2, 1–10. <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/params/cobas-sars-cov-2->

test.html

- Rojo, A., Escamilla, P., Rodríguez, R., Medina, L., García, M., Ramírez De La O, L., Martínez, I. L., Arámbula, C. W., Maldonado, A. R., Arredondo, V. R., Benítez, A. M., Mercado, J. Q., Villa, M. G., Ortiz, N. C., Rivas, L. H., & González, E. R. (2022). *Detección del primer caso de COVID-19 relacionado a la variante Ómicron*. 20(1), 62–66. <https://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2022/am221k.pdf>
- Rosenthal, P. J. (2020). The importance of diagnostic testing during a viral pandemic: Early lessons from novel coronavirus disease (CoVID-19). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(5), 915–916. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.20-0216>
- Rubin, J. E., & Crowe, S. E. (2020). SARS-CoV-2–Positive Sputum and Feces After Conversion of Pharyngeal Samples in Patients With COVID-19. *Annals of Internal Medicine*, 172(1), ITC1–ITC14. <https://doi.org/10.7326/AWED202001070>
- Sallard, E., Halloy, J., Casane, D., Decroly, E., & van Helden, J. (2021). Tracing the origins of SARS-COV-2 in coronavirus phylogenies: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(2), 769–785. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01151-1>
- Schildgen, V., Demuth, S., Lüsebrink, J., & Schildgen, O. (2021). Limits and opportunities of sars-cov-2 antigen rapid tests: An experienced-based perspective. *Pathogens*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010038>
- SeeGene. (2019). *Ensayo Allplex™ Ensayo Allplex™*. 1–5. https://www.seegene.com/assays/allplex_2019_ncov_assay
- Soldevila, L., Valerio, L., & Díez, R. (2021). Uso adecuado de exploraciones complementarias-Interpretación de las pruebas diagnósticas de la COVID-19. *Formación Médica Continuada En Atención Primaria*, 28(3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2021.01.005>
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
- Tesini, B. (2021). Coronavirus y síndromes respiratorios agudos (COVID-19, MERS y SARS). *Manual MSD*, 1. <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/virus-respiratorios/coronavirus-y-sindromes-respiratorios-agudos-covid-19-mers-y-sars>
- ThermoFisher-Applied Biosystems. (2020). *TaqPath COVID-19-A real-time PCR multiplex diagnostic solution for COVID-19*.

- <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/clinical/clinical-genomics/pathogen-detection-solutions/covid-19-sars-cov-2/multiplex.html>
- ThermoFisher. (2019). *TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v1*. 1–5. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A47532>
- ThermoFisher. (2021). *Solución de diagnóstico múltiple TaqPath COVID-19*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/clinical/clinical-genomics/pathogen-detection-solutions/covid-19-sars-cov-2/multiplex.html>
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Touma, M. (2021). COVID-19: molecular diagnostics overview. *Journal of Molecular Medicine*, 98(7), 947–954. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01931-w>
- Tsoleridis, A. (2021). *Proteínas de coronavirus (CoV) | Introducción | Guía BPS / IUPHAR de FARMACOLOGÍA*. 7–9. <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F80/2020.5%0A>.
- Uhlenhaut, C., Cohen, J. I., Pavletic, S., Illei, G., Gea-Banacloche, J. C., Abu-Asab, M., Krogmann, T., Gubareva, L., Mcclenahan, S., & Krause, P. R. (2021). Use of a novel virus detection assay to identify coronavirus HKU1 in the lungs of a hematopoietic stem cell transplant recipient with fatal pneumonia. *Transplant Infectious Disease*, 14(1), 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2011.00657.x>
- Umair, M., Ikram, A., Salman, M., Haider, S. A., Badar, N., Rehman, Z., Ammar, M., Rana, M. S., & Ali, Q. (2022). Genomic surveillance reveals the detection of SARS-CoV-2 delta, beta, and gamma VOCs during the third wave in Pakistan. *Journal of Medical Virology*, 94(3), 1115–1129. <https://doi.org/10.1002/jmv.27429>
- Vásquez, E., Guadrón, A., Cruz, R., & Cuadra, T. (2020). *Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 , virus causante del*. 31–39. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
- Villalobo, E. (2020). ¿Cómo se detecta si un paciente está infectado por coronavirus? 24 Marzo, 21–40. <https://theconversation.com/como-se-detecta-si-un-paciente-esta-infectado-por-coronavirus-134003>
- Wahidi, M. M., Lamb, C., Murgu, S., Musani, A., Shojaee, S., Sachdeva, A., Maldonado, F., Mahmood, K., Kinsey, M., Sethi, S., Mahajan, A., Majid, A., Keyes, C., Alraiyes, A. H., Sung, A., Hsia, D., & Eapen, G. (2020). American Association for Bronchology and Interventional Pulmonology (AABIP) Statement on the Use of

- Bronchoscopy and Respiratory Specimen Collection in Patients with Suspected or Confirmed COVID-19 Infection. *Journal of Bronchology and Interventional Pulmonology*, 27(4), e52–e54. <https://doi.org/10.1097/LBR.0000000000000681>
- Wahidi, M. M., Shojaee, S., Lamb, C. R., Ost, D., Maldonado, F., Eapen, G., Caroff, D. A., Stevens, M. P., Ouellette, D. R., Lilly, C., Gardner, D. D., Glisinski, K., Pennington, K., & Alalawi, R. (2020). The Use of Bronchoscopy During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic: CHEST/AABIP Guideline and Expert Panel Report. *Chest*, 158(3), 1268–1281. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.036>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(11), 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, L. (2021). *Revisión de murciélagos y SARS*. 12(12), 1–9. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/12/06-0401_article
- Wang, S., Hu, J., Sui, C., He, G., Qu, Z., Chen, X., Wang, Y., Guo, D., & Liu, X. (2022). Microbial Pathogenesis Accuracy of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) to diagnose COVID-19 , a meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 165(December 2021), 105498. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105498>
- Wang, X., Zhong, M., Liu, Y., Ma, P., Dang, L., Meng, Q., Wan, W., Ma, X., Liu, J., Yang, G., Yang, Z., Huang, X., & Liu, M. (2020). Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER. *Science Bulletin*, 65(17), 1436–1439. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.04.041>
- Wolfe, M., Hughes, B., Duong, D., & Chan-herur, V. (2022). *Detection of SARS-CoV-2 Variants Mu, Beta, Gamma, Lambda, Delta, Alpha, and Omicron in Wastewater Settled Solids Using Mutation-Specific Assays Is Associated with Regional Detection of Variants in Clinical Samples*. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.00045-22>
- Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1–2), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>
- Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., Yin, H., Xiao, Q., Tang, Y., Qu,

- X., Kuang, L., Fang, X., Mishra, N., Lu, J., Shan, H., Jiang, G., & Huang, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 5(5), 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
- Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(18), 1843–1844. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
- Yan, Ying, Chang, L., & Wang, L. (2020). Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology*, 30(3), 1–14. <https://doi.org/10.1002/rmv.2106>
- Yan, Yuxin, Shin, W. I., Pang, Y. X., Meng, Y., Lai, J., You, C., Zhao, H., Lester, E., Wu, T., & Pang, C. H. (2020). The first 75 days of novel coronavirus (SARS-CoV-2) outbreak: Recent advances, prevention, and treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph17072323>
- Zhang, T., Cui, X., Zhao, X., Wang, J., Zheng, J., Zheng, G., Guo, W., Cai, C., He, S., & Xu, Y. (2020). Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia. *Journal of Medical Virology*, 92(7), 909–914. <https://doi.org/10.1002/jmv.25795>
- Zhang, X., Meng, H., Liu, H., & Ye, Q. (2022). Advances in laboratory detection methods and technology application of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 94(4), 1357–1365. <https://doi.org/10.1002/jmv.27494>
- Zhang, Y., & Holmes, E. (2020). A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, 181(2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G., & Tan, W. (2020). Un nuevo coronavirus de pacientes con neumonía en China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733.

[/pmc/articles/PMC7092803/%0A/pmc/articles/PMC7092803/?report=abstract%0A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7092803/?report=abstract)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7092803/>