

NUEVOS SISTEMAS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DEL SARS-COV-2





FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Departamento de Química Física

“NUEVOS SISTEMAS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DEL SARS-COV-2”

CURSO 2020/2021

Revisión bibliográfica

AUTOR: Adrián Muñoz Navarro

TUTOR: Elia María Grueso Molina

RESUMEN

El SARS-COV-2, perteneciente a la familia de los coronavirus, apareció por primera vez a finales del año 2019 en Wuhan, China. A partir de entonces empezó a transmitirse a lo largo de la población dando lugar a una pandemia a nivel mundial, ocasionando numerosas muertes. Para la detección del virus se han ido desarrollando una serie de métodos moleculares y serológicos, entre los que destaca la PCR, por ser la técnica más usada y la que proporciona resultados más fiables. Estos métodos de detección muestran una serie de diferencias que permiten que podamos elegir en función de las necesidades de sensibilidad, rapidez o eficacia, y que hacen necesario que se siga investigando para continuar mejorando y conseguir el método más eficaz en la detección del virus, buscando conseguir la mínima transmisión. A través de la búsqueda en distintas bases de datos científicas se ha ido combinando información para la redacción de esta revisión bibliográfica. Las pruebas rápidas de detección son pruebas de flujo lateral que determinan la presencia de antígenos o anticuerpos en distintos fluidos biológicos, pero que solo son de utilidad en ciertas ocasiones cuando el virus alcanza niveles elevados en el organismo o cuando se ha pasado la enfermedad. Muchas de estas pruebas se basan en el uso de nanopartículas, y en especial, nanopartículas metálicas, como las de oro coloidal, que por sus propiedades ópticas resultan de utilidad en los distintos métodos de detección gracias a los cambios colorimétricos que provocan y que facilitan la lectura de los resultados de estas pruebas. No obstante, aún resta mucho por investigar en este campo con el propósito de conseguir el mejor método de detección rápida, que ayude a erradicar y limitar el SARS-COV-2, ya que se ha comprobado que las pruebas masivas son esenciales para identificar los distintos focos de contagio.

Palabras clave: SARS-COV-2, pruebas, virus, detección, nanopartículas.

Índice de abreviaturas

- **+ssRNA:** ARN monocatenario de polaridad positiva
- **Ac:** anticuerpo
- **ADNc:** ADN complementario
- **Ag:** antígeno
- **Ag-RDT:** pruebas de detección de antígenos
- **ARNm:** ARN mensajero
- **ASOs:** oligonucleótidos antisentido
- **AuNP:** nanopartículas de oro
- **CLIA:** inmunoensayos de quimioluminiscencia
- **CNT:** nanotubo de carbono
- **CRISPR:** métodos basados en las repeticiones palindrómicas cortas
- **DETECTR:** Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter
- **DO:** densidad óptica
- **E:** envoltura
- **ELISA:** ensayos inmunoenzimáticos inmunoabsorbentes
- **FET:** transistores de efecto de campo
- **HE:** hemaglutinina-esterasa
- **ICG:** inmunocromatografía
- **LAMP:** amplificación isotérmica del ácido nucleico, y mediada por bucle de transcripción inversa
- **LFA:** ensayo de flujo lateral
- **LSPR:** resonancia plasmónica superficial
- **M:** membrana
- **MERS-CoV:** síndrome respiratorio de Oriente Medio
- **MET:** microscopio electrónico de transmisión
- **N:** nucleocápside
- **NAAT:** pruebas de detección de ácido nucleico
- **Nab:** anticuerpo neutralizante
- **NTS:** secuenciación de objetivos de nanoporos
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ORF:** marcos de lectura abierta
- **PAMP:** patrón molecular asociado a patógenos
- **Poli-A:** poliadenilada
- **RAT:** pruebas rápidas de antígenos
- **RBD:** proteína de dominio de unión al receptor
- **RDT:** pruebas de diagnóstico rápido
- **rRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real
- **S:** espiga
- **SARS-CoV:** síndrome respiratorio agudo severo
- **Se:** sensibilidad
- **Sp:** especificidad
- **SVNT:** una prueba de neutralización del virus SARS-CoV-2
- **VPH:** virus del papiloma humano

ÍNDICE

Contenido

1. Introducción	5
1.1. SARS-CoV-2.....	5
1.2. Métodos de detección del virus	7
1.2.1. Métodos moleculares	7
1.2.2. Métodos serológicos	10
1.3. Comparativa entre los métodos moleculares y serológicos para la detección del COVID-19.....	13
2. Objetivos de la revisión	14
3. Metodología.....	14
4. Resultados y discusión.....	15
▪ Pruebas rápidas de antígenos	18
▪ Pruebas rápidas de anticuerpos	21
▪ Nanopartículas en la detección del SARS-CoV-2.....	27
5. Conclusiones	37
6. Bibliografía	38

1. Introducción

Los coronavirus, pertenecientes a la familia *Coronaviridae*, son virus envueltos que causan resfriados comunes en los humanos y otras enfermedades serias en aves y mamíferos. Pueden afectar a diversos sistemas del organismo como son el respiratorio, gastrointestinal, hepático y nervioso central (Ahn et al., 2020).

A finales del año 2019 se notifica desde Wuhan, China, la aparición de un grupo de pacientes que presentan un cuadro de neumonía de etiología desconocida, con la misma sintomatología y relacionados todos ellos con el consumo de alimentos en un mercado mayorista de la ciudad en el que se comercializan diversas especies de murciélagos, serpientes, pangolines y tejones, convirtiéndose entonces dicha localidad en el punto álgido de la pandemia (Kakodkar et al., 2020). Se constató entonces que se trataba de un nuevo coronavirus, determinándose además su secuencia genómica. Poco después la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró esta neumonía viral como una pandemia que denominaron enfermedad por coronavirus 2019 o COVID-19, causado por el SARS-CoV-2, tratándose este de una especie de virus parecido a las variantes previamente identificadas. La primera de ellas en 2002, cuando se produjo el brote del SARS-CoV, y la segunda en 2012 o infección por MERS-CoV. Se sabe que el origen del SARS-CoV, el MERS-CoV y el SARS-CoV-2 son los murciélagos como huéspedes nativos. No obstante, mientras que se ha demostrado que el SARS-CoV y el MERS-CoV han tenido civetas y camellos como huéspedes intermediarios, el huésped intermedio empleado por el SARS-CoV-2 para infectar a los humanos es aún desconocido. Después de la infección animal, el SARS-CoV-2 se ha propagado rápidamente por todo el mundo hasta la fecha, principalmente a través de la transmisión continua de persona a persona (Yang, 2021).

1.1. SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un nuevo betaCoV que pertenece al mismo subgénero que el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), implicados anteriormente en epidemias de SARS-CoV y MERS-CoV con tasas de mortalidad de hasta el 10% y el 35%, respectivamente. Se encuentra dentro del grupo de los beta-coronavirus y está formado por una única cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) de aproximadamente 30.000 pares de bases. Esta cadena se asemeja estructuralmente al ARN mensajero (ARNm) de células eucariotas por el capuchón metilado y la cola poliadenilada (poli-A). Sin embargo, este genoma contiene marcos de lectura abierta (ORF), que son secuencias del ARN que codifican una serie de proteínas a través de los ribosomas, que son

procesadas por proteasas virales para producir 16 proteínas no estructurales que contienen la enzima ARN polimerasa dependiente del ARN (Ahn et al., 2020).

La partícula vírica presenta un aspecto de corona solar cuando se observa al microscopio electrónico de transmisión (MET), como puede verse en la figura 1. Dicha partícula tiene una forma redonda o elíptica y a menudo pleomórfica, y un diámetro de aproximadamente 60-140 nm. Estos tipos de virus son estructuralmente complejos y están formados por: proteínas estructurales, proteínas no estructurales y derivadas de la célula huésped. En general, los diferentes virus tienen proteínas estructurales de nucleocápside (N), espiga (S), envoltura (E) y membrana (M) y algunos también codifican una proteína hemaglutinina-esterasa (HE) (Alsaadi and Jones, 2019). Además, un conjunto variable de proteínas también está presente dentro de la membrana, dependiendo de la especie de CoV. La proteína S facilita la unión del virus al receptor de la célula huésped, la proteína M ayuda a mantener la curvatura de la membrana y la unión con la nucleocápside, la proteína E juega un papel importante en el ensamblaje y liberación del virus, y la proteína N forma parte de la nucleocápside al unirse al material genético viral. La proteína accesoria HE se halla solo en algunos Betacoronavirus y su actividad esterasa facilita la entrada del virus en la célula huésped, además de contribuir en su propagación. Las proteínas no estructurales de los coronavirus no suelen ser esenciales para la replicación del virus (Rabaan et al., 2012).

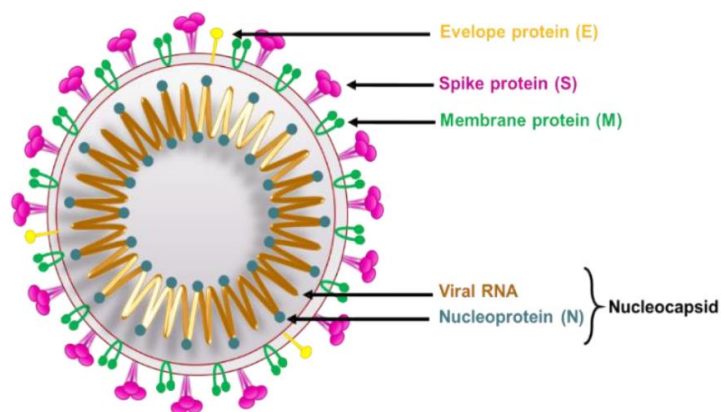


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del SARS-COV-2 (Belmehti et al., 2021).

Por otra parte, La entrada del SARS-CoV-2 en el neumocito tipo II produce un elevado estrés que conduce a la apoptosis de la célula, actuando además como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), que será reconocido por los receptores tipo Toll. Esto da lugar a un incremento de quimioquinas que conduce a la migración y activación de los neutrófilos,

derivando en la destrucción de las paredes de los capilares alveolares. A nivel microscópico, esto conduce a una pérdida en la interfaz entre el espacio intraalveolar y el estroma circundante. Por lo tanto, el líquido se filtra y llena los sacos alveolares (Kakodkar et al., 2020).

1.2. Métodos de detección del virus

Debido a la rápida transmisión y gravedad del virus entre la población, en un corto espacio de tiempo se han diseñado una serie de métodos analíticos para la identificación del coronavirus en el organismo humano. La precisión de las pruebas es importante para combatir la pandemia. En consecuencia, actualmente existen cientos de kits de diagnóstico basados en diferentes métodos, pero la selección del método adecuado requiere una mayor investigación. Actualmente estos métodos se basan en la detección molecular, inmunológica o serológica del virus. A diferencia de los métodos moleculares, los métodos serológicos carecen de la capacidad de detección precoz y son de baja precisión (Dhamad and Abdal Rhida, 2020).

1.2.1. Métodos moleculares

El avance de la tecnología en el campo de la biología molecular ha permitido el desarrollo de ensayos de detección basados en ácidos nucleicos que se han convertido en una tecnología importante y en el método más utilizado para la detección de virus. La detección de ácidos nucleicos ha desempeñado un papel importante en el diagnóstico precoz. Las técnicas moleculares utilizan el material genético del virus y se basan en el principio de la especificidad del emparejamiento de bases con hebras homólogas (Machado et al., 2020).

En función de cómo se procesa y detecta el ARN viral, existen tres métodos moleculares principales que se han propuesto a partir de la secuenciación genética del SARS-CoV-2. Estos son: (i) la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR), (ii) la amplificación isotérmica del ácido nucleico, y mediada por bucle de transcripción inversa, y (iii) los métodos basados en las repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR).

(I) Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

La rRT-PCR es la prueba de referencia para detectar el virus con una alta sensibilidad y especificidad, y ha sido desarrollado para detectar el COVID-19 por varios laboratorios.

NUEVOS SISTEMAS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

Las pruebas de RT-PCR proporcionan resultados en un intervalo de tiempo que puede oscilar entre la hora (algo menos) y un par de días, dependiendo de la versión de la PCR empleada. El ensayo puede llevarse a cabo en uno o dos pasos. El enfoque en un paso es más rápido. En dicho ensayo, tanto la RT como la ADN polimerasa se combinan para llevar a cabo su respectiva reacción en el mismo tubo de reacción, siendo este el método de referencia para la detección del SARS-CoV-2. El enfoque en dos pasos implica la RT del ARN en un tubo y la posterior polimerización del ADN en un tubo de reacción separado. Dependiendo del tipo de formato del ensayo, una sola máquina de RT-PCR puede analizar de una a cientos de muestras a la vez.

El resultado de la prueba depende de la toma de muestras, de los cebadores y las sondas utilizadas, el análisis de las curvas de fluorescencia, el uso de controles adecuados y la fiabilidad del control de la temperatura. Por tanto, tiene el inconveniente de requerir tanto de instrumental costoso como de personal altamente cualificado para su realización, lo cual supone un coste extra en el empleo de esta técnica. Además, se utiliza un control negativo para comprobar la contaminación cruzada de la muestra y otro positivo para evaluar la integridad química de los reactivos, cebadores y sondas (Giri et al., 2021).

Por su parte, las muestras respiratorias pueden contener diferentes géneros de coronavirus junto con otros patógenos virales importantes. Los resultados falsos positivos que se producen debido a la reactividad cruzada con estos virus, el genoma humano y la microflora, pueden ser borrados con la fidelidad de la secuencia. El análisis *in silico*, que se entiende como las simulaciones o reproducciones de experimentos *in vivo* o *in vitro*, que emplean modelos matemáticos y softwares de simulación, se realiza utilizando las numerosas secuencias disponibles en las bases de datos para discriminar el SARS-COV-2 de otros virus respiratorios, y es un sello distintivo ampliamente empleado para generar un cebador específico para la detección del COVID-19.

Este método es capaz de generar un ADN complementario (ADNc) a través del ARN extraído del virus con cebadores específicos. Los hisopos se utilizan para tomar la muestra del tracto respiratorio superior del paciente, que son las que se utilizan principalmente (Dhamad and Abdal Rhida, 2020). Un resultado positivo, que se produce cuando se detectan varios genes del virus en la muestra, indica que hay presencia de ARN viral en la muestra, pero no necesariamente la viabilidad del virus, por lo que hay que realizar una serie de controles para asegurar que el resultado que obtenemos es legítimo. Además de ser muy costoso y de requerir habilidades profesionales, requiere

mucho tiempo (requiere de 2 a 5 días desde la recogida de una muestra hasta la obtención del resultado) y debe realizarse en un laboratorio.

(II) Amplificación isotérmica del ácido nucleico, y mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP)

Actualmente, las técnicas isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos han surgido para superar las limitaciones de la PCR, proporcionando un diagnóstico molecular más rápido y de menor coste, que puede ser especialmente útil para los países en desarrollo o en la situación actual, en la que la falta de reactivos para la PCR se ha convertido en un problema importante. La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es una técnica de amplificación que no requiere ciclos de calentamiento y enfriamiento; por lo tanto, requiere una instrumentación más sencilla que la PCR. La LAMP se basa en la actividad de desplazamiento de la hebra, lo que elimina la necesidad de desnaturalizar el ADN de doble cadena. El uso de un conjunto de 4-6 cebadores específicos que son capaces de reconocer 6-8 lugares diferentes a lo largo de la secuencia objetivo proporciona a LAMP una mayor especificidad que la PCR, donde la diana se reconoce sólo en dos lugares (Oliveira et al., 2021).

Sin embargo, al ser una técnica de amplificación muy potente se produce un elevado número de amplicones. Por este motivo, la manipulación de LAMP requiere un cuidado extra para evitar falsos resultados positivos. Por ello, varios estudios han señalado la importancia de realizar el LAMP en un entorno cerrado, sin manipular las disoluciones una vez iniciada la reacción.

Por otra parte, es importante destacar que esta técnica supone otro enfoque molecular en el que un ácido nucleico se amplifica rápida y específicamente por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de hebra y diferentes conjuntos de cebadores a temperatura constante (60-65 °C), sin necesidad de ciclador térmico.

(III) Métodos basados en las repeticiones palindrómicas cortas

Los sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)-Cas (proteínas asociadas a CRISPR) son mecanismos inmunitarios adaptativos procariontes que se utilizan para escindir ácidos nucleicos invasores en la naturaleza.

Hasta la fecha, las herramientas basadas en CRISPR se han utilizado para muchas aplicaciones, como ingeniería del genoma y el transcriptoma, la edición del epigenoma y la terapia génica. Además, existen en la bibliografía un número creciente de estudios

sobre el uso de sistemas CRISPR-Cas para la detección de ácidos nucleicos y el diagnóstico de patógenos.

Estos métodos tienen la ventaja de ser rápidos, de bajo coste, portátiles, fáciles de usar, muy sensibles y específicos, y no requieren dispositivos complejos. Dado que algunos de estos métodos pueden detectar el SARS-CoV-2 con alta precisión y un tiempo de respuesta rápido, pueden ayudar a superar algunas de las limitaciones de las pruebas RT-qPCR de laboratorio y aumentar el número total de pruebas diarias realizadas. Además, como los métodos de diagnóstico basados en CRISPR pueden realizarse con equipos sencillos y sin necesidad de grandes conocimientos técnicos, pueden utilizarse fuera de los laboratorios centralizados, incluyendo aeropuertos, clínicas y entornos con recursos limitados. En consecuencia, estos métodos alternativos tienen el potencial de ser complementarios a la RT-qPCR en la lucha contra el COVID-19 (Palaz et al., 2021).

La mayoría de los métodos de detección del SARS-CoV-2 basados en CRISPR utilizan enzimas Cas12 para el reconocimiento específico de la secuencia viral, lo que resulta en el corte de ssDNAs fluorescentes o de flujo lateral. Broughton et al. adoptaron el DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter (DETECTR), una plataforma de diagnóstico rápido basada en Cas12a para la detección del SARS-CoV-2. El método DETECTR utiliza la transcripción inversa mediada por bucle para la preamplificación de regiones genéticas conservadas en los genes N y E de SARS-CoV-2, y los amplicones se detectan aprovechando la actividad de escisión colateral del ssDNA de Cas12a (Broughton et al., 2020).

Finalmente, En comparación con otras pruebas disponibles, estos métodos son mucho más sensibles y pueden detectar los virus mucho antes en las muestras clínicas. Son pruebas versátiles y pueden utilizarse para detectar el virus en una serie de muestras, como saliva, esputo, secreciones del tracto respiratorio inferior, sangre, orina o heces.

1.2.2. Métodos serológicos

A diferencia de los métodos moleculares, los métodos serológicos (también llamados pruebas de anticuerpos) pueden aplicarse para detectar la infección por el SARS-CoV-2 en el pasado y en el presente, y vigilar la evolución de la enfermedad y la respuesta inmunitaria. Este ensayo desempeña un papel notable en la epidemiología y el progreso de las vacunas ofreciendo una evaluación tanto de la respuesta de anticuerpos a corto plazo, como de la abundancia y la diversidad de los anticuerpos (Giri et al., 2021). De esta forma, pueden detectar la presencia de anticuerpos en el suero y el plasma de un paciente

con COVID-19. También pueden utilizarse otros fluidos biológicos como la saliva y el esputo, pero sin limitarse a ellos.

Los anticuerpos se producen como mecanismo de defensa del sistema inmunitario contra el SARS-CoV-2. Este método conocido como respuesta humoral, se utiliza para el desarrollo de métodos de diagnóstico inmunológico. En primer lugar, la IgM se produce después de unos días de la infección y dura aproximadamente dos semanas, seguido de la producción de IgG que dura más tiempo. Por lo tanto, la detección de IgM en la muestra de un paciente indica una infección en fase inicial, mientras que la detección de IgG indica una infección actual o anterior. La IgA, presente predominantemente en el tejido de la mucosa, también puede desempeñar un papel crítico en la respuesta inmunitaria y la progresión de la enfermedad por lo que puede considerarse entonces un objetivo de detección en estas pruebas (Machado et al., 2020).

Además de carecer de una detección temprana, la precisión es el principal reto de estos enfoques, ya que podría producirse un cruce con otros anticuerpos que se producen como resultado de la infección de otros miembros de la familia de los coronavirus, como el SARS-CoV. Una prueba serológica positiva puede ayudar a confirmar el diagnóstico y apoyar y guiar las decisiones de manejo clínico.

Los principales tipos de pruebas de diagnóstico serológico que existen son los siguientes: (i) ensayos inmunoenzimáticos inmunoabsorbentes (ELISA), (ii) inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA), (iii) pruebas de diagnóstico rápido (RDT) y (iv) pruebas de detección de antígenos (Ag-RDT).

(I) Ensayos inmunoenzimáticos inmunoabsorbentes

El ELISA es un método basado en placas que se ha utilizado para detectar y cuantificar sustancias solubles como las proteínas y los anticuerpos en los laboratorios clínicos y de investigación. Incluye formatos directos y formatos indirectos. En el ELISA indirecto, más popular y sensible que el ELISA directo, un antígeno (por ejemplo, una proteína recombinante (proteína N) del virus SARS-CoV-2) se recubre en la superficie interior de placas de poliestireno de 96 o 384 pocillos. Después, se añade a los pocillos un plasma diluido del paciente que puede tener anti-SARS-CoV-2 IgG/IgM (Dhamad and Abdal Rhida, 2020).

Estos ensayos inmunoenzimáticos anti-SARS-CoV-2 IgG e IgA proporcionan una determinación semicuantitativa in vitro de anticuerpos humanos IgG e IgA humanas contra el dominio S1 de la proteína de espiga del SARSCoV-2. Los resultados pueden

evaluarse de forma semicuantitativa calculando la relación de la muestra de control o del paciente sobre la extinción del calibrador (Chansaenroj et al., 2021).

(II) Inmunoensayos de quimioluminiscencia

El uso de CLIA en la detección del anticuerpo del SARS-CoV-2 es de especial interés, ya que este método tiene una excelente sensibilidad con una alta relación señal-ruido en la detección de otras infecciones virales. La CLIA utiliza perlas magnéticas recubiertas de antígenos recombinantes y un sustrato lumínico con análisis en plataformas automatizadas (Espejo et al., 2020).

Existen numerosos estudios en la bibliografía que emplean la técnica CLIA para abordar las diferencias en poblaciones de pacientes y el tiempo de inicio de los síntomas frente a los resultados serológicos. Estos trabajos estudian la sensibilidad de detección de IgG e IgM en las muestras obteniendo porcentajes diferentes.

(III) Pruebas de diagnóstico rápido

Estas pruebas rápidas, que suelen mezclar hisopos nasales o de garganta con líquido en una tira de papel para devolver los resultados en media hora, se consideran como pruebas de infecciosidad, no de infección. Sólo pueden detectar cargas virales altas, por lo que no detectarán a muchas personas infectadas con niveles más bajos del virus del SARS-CoV-2.

La esperanza es que ayuden a frenar la pandemia al identificar rápidamente a las personas más contagiosas, que, de otro modo, podrían transmitir el virus sin saberlo. Estas pruebas serán estudiadas más específicamente en este trabajo de revisión bibliográfica.

(IV) Pruebas de detección de antígenos

La mayoría de las Ag-RDT para COVID-19 utilizan un método de inmunodetección tipo sándwich que emplea un formato de prueba de flujo lateral comúnmente empleado para las pruebas del VIH, la malaria y la gripe. Las Ag-RDTs suelen estar en un estuche de plástico con pocillos para la muestra y el tampón, una tira de matriz de nitrocelulosa, con una línea de prueba con anticuerpos ligados específicos para los complejos antígeno-anticuerpo conjugados y una línea de control con anticuerpos ligados. En el caso de las RDT del SARS-CoV-2, el analito objetivo suele ser la proteína de la nucleocápside del virus, preferida por su relativa abundancia. La mayoría de estos test requieren tomar una

muestra con un hisopo de la nariz o de la faringe al igual que las RDT, aunque cada vez se estén incluyendo más otro tipo de muestras (Brief et al., 2020).

En general, la facilidad de uso y el rápido tiempo de respuesta de las Ag-RDT ofrece la posibilidad de ampliar el acceso a las pruebas y reducir los retrasos en el diagnóstico de los pacientes con síntomas tempranos.

1.3. Comparativa entre los métodos moleculares y serológicos para la detección del COVID-19

Tanto los métodos moleculares como los serológicos no son perfectos en cuanto a la detección del virus y cada método tiene sus propias limitaciones, como se detalla en la tabla 1, en la que se comparan los diferentes métodos de detección. Aunque los métodos moleculares son más fiables que los serológicos, ambos métodos pueden dar resultados falsos debido a varias razones.

Tabla 1. Comparativa entre los diferentes métodos de detección moleculares y serológicos del COVID-19.

	Métodos moleculares			Métodos serológicos		
Técnica	rRT-PCR	Amplificación isotérmica	CRISPR	LFA	ELISA	CLIA
Muestra	ARN	ARN	ARN	Ag o Ac	Ag o Ac	Ac
Precisión	Elevada	Elevada/Moderada	Elevada	Baja	Moderada	Moderada/Elevada
Tiempo necesario	Horas	Minutos	Minutos	Minutos	Horas	Horas
Habilidades profesionales requeridas	Sí	Sí	Sí/No	No	Sí	Si
Disponibilidad	Limitada	Limitada	Limitada	Amplia	Amplia	Amplia
Coste	Muy elevado	Elevado	Medio	Bajo	Medio	Elevado
Rendimiento elevado	Si	No	No	No	Si	Si

Por otra parte, los métodos moleculares sirven para detectar el virus en muestras a través del ARN de este, mientras que los serológicos detectan antígenos (Ag) o anticuerpos

(Ac). En general, en comparación con la prueba de referencia para la detección del SARS-CoV-2 (RT-qPCR), las pruebas serológicas se consideran menos costosas, ya que son más baratas y el tiempo de diagnóstico es más corto. Además, los pasos necesarios para realizar las pruebas son de menor complejidad, ya que no requieren pasos relacionados con el tratamiento de la muestra clínica (Dhamad and Abdal Rhida, 2020).

A la hora de elegir que método utilizar para la detección del COVID-19 hay que tener en cuenta una serie de criterios como el coste, el tiempo que se requiere para la obtención de los resultados, los equipos utilizados y la complejidad de los mismos, así como la sensibilidad y especificidad que nos proporcionan para al final hacer un balance de cuál es el que mayor fiabilidad va a proporcionar. De esta forma se evitan resultados anómalos que pueden conducir a una propagación del virus descontrolada.

2. Objetivos de la revisión

El SARS-CoV-2 llegó a España a finales de enero de 2020, cuando se confirmó el primer caso por el Centro Nacional de Microbiología, que se identificó en el hospital Virgen de Guadalupe de La Gomera. Fue en ese momento cuando la Dirección General de Salud Pública activó el protocolo para el estudio de posibles casos de afección de coronavirus y a partir del cual se empezó a aislar a aquellas personas que pudiesen estar infectadas y acudiesen a los hospitales.

Para identificar la infección por el virus y poder aislar a estos pacientes, diferenciándolos de aquellos con otras patologías, se han ido utilizando una serie de pruebas, entre las que destaca la PCR, que han ido evolucionando conforme se ha ido conociendo más sobre el coronavirus con el objetivo de ir obteniendo resultados más rápidos, más fiables y que faciliten a la población ir disminuyendo la tasa de infectados. En esta revisión bibliográfica se recoplian los distintos tipos de pruebas existentes poniendo el foco de atención sobre las pruebas rápidas de detección, y aquellas que utilizan la nanotecnología como herramienta de identificación del SARS-CoV-2, que muestran amplias ventajas respecto a otros métodos más convencionales. Así mismo, se comparará la sensibilidad en distintas técnicas, destacando las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas. Más específicamente, y en último término, se evaluará la naturaleza de los cambios colorimétricos que suceden en los nuevos sensores de COVID-19 basados en nanopartículas.

3. Metodología

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica sobre nuevos métodos de detección del SARS-CoV-2 se han utilizado diferentes fuentes de información entre las que se incluyen distintas

bases de datos, libros, artículos científicos, búsqueda en internet, etc. Se realizaron búsquedas en artículos de acceso libre y gratuito para la Universidad de Sevilla.

Para la redacción de la memoria, se realizó en primer lugar una búsqueda más amplia y general de diversos documentos sobre la temática para poder obtener una visión general del tema. Después, la búsqueda se centró en los distintos métodos de detección del virus, desarrollados hasta la fecha, de forma más concreta, incluyendo entre ellos específicamente los nuevos sensores basados en nanopartículas, y buscando resultados fiables para la revisión.

La búsqueda se realizó por términos clave, como se detalla a continuación, en varias bases de datos de carácter científico, utilizando mayoritariamente Web of Science, además de otras bases de datos como PubMed o Google Académico. Así en la búsqueda de las siguientes combinaciones de términos clave, se obtuvieron los siguientes resultados:

- La búsqueda con los términos "COVID" + "structure", discriminando por título del artículo nos dio 255 resultados.
- Al combinar "coronavirus" con "detection" se encontraron 549 resultados, por lo que se afinó la búsqueda añadiendo el término "methods" y la búsqueda proporcionó 18 resultados.
- Combinando los términos "rapid" + "test" + "coronavirus" se obtuvieron 20 resultados, parte de los cuales se utilizaron para la redacción de los resultados y la discusión.
- Por último, la búsqueda de los términos "nanoparticles" + "coronavirus" dio lugar a 74 resultados, que se redujeron a 10 resultados cuando afinamos la búsqueda al título exclusivamente.

Al ser un tema de bastante actualidad, la búsqueda se centra en los últimos 2 años, combinando la información recopilada con algunos artículos de más antigüedad y en relación a la temática de estudio, que han sido empleados fundamentalmente para la redacción de la introducción o para explicar los fundamentos de algunas técnicas.

En cuanto a las figuras y tablas, todas ellas han sido adaptadas de los distintos artículos científicos citados, y completando con información extraída de diversas fuentes de información.

En la bibliografía de esta revisión se recopilan todos los artículos, libros, revistas o páginas web utilizados para la redacción de la memoria.

4. Resultados y discusión

Nos encontramos actualmente en una fase crítica de la gestión de la respuesta al brote de COVID-19, que requiere acceso generalizado a pruebas rápidas y precisas. Mientras que las

pruebas de PCR han sido la columna vertebral para diagnóstico de COVID-19, ahora hay una necesidad urgente de vigilar a las poblaciones asintomáticas de riesgo. Así, las pruebas masivas son fundamentales para identificar y aislar los focos de contagio ("clusters"), que sirven para limitar y eventualmente erradicar el SARS-CoV-2.

En la actualidad existe un consenso generalizado de que la política más eficaz para prevenir o contener los brotes locales de SARS-CoV-2 pasa por una estrategia de diagnóstico precoz y aislamiento oportuno de los casos infectados y contagiosos. Sin embargo, el número primordial y sin precedentes de pruebas que se necesitan para alcanzar plenamente estos objetivos está desbordando en gran medida la oferta y la capacidad mundial de pruebas. Los resultados de las pruebas del SARS-CoV-2 influyen en la gestión eficaz de la actual crisis sanitaria (Mattiuzzi et al., 2021).

La prueba inmunológica, a diferencia de las técnicas moleculares, se centra en la presencia de proteínas inmunitarias específicas. Una persona infectada desencadena una respuesta inmunitaria produciendo anticuerpos contra la infestación del virus, que son las medidas en una prueba inmunológica, o también se pueden medir las proteínas del virus presentes en la muestra. Estas pruebas son muy útiles para conocer la situación actual de la persona infectada en el pasado o no. Sin embargo, estas pruebas no permiten identificar los casos activos. Además, los inmunoensayos como la prueba de anticuerpos, en la que una respuesta inmunitaria produce en el suero de un individuo inmunoglobulinas como IgA, IgG e IgM, también pueden medirse, como ya habíamos comentado anteriormente.

La capacidad de las pruebas serológicas para diagnosticar e identificar en poco tiempo una respuesta inmunitaria activa contra el virus ha atraído la atención recientemente. Sólo unas pocas han sido aprobadas de entre los cientos de pruebas serológicas disponibles actualmente en el mercado. Según la literatura, el antígeno más común utilizado para las pruebas serológicas es la espiga y las proteínas de la nucleocápside, que son las proteínas víricas contra las que se levantan los anticuerpos. Los resultados de las pruebas serológicas pueden ayudar a comprender la propagación real del virus en una población, aunque un individuo no haya sido tratado o sea asintomático.

Un número considerable de las nuevas pruebas comerciales de anticuerpos contra COVID-19 no están basadas en ELISA. Son ensayos de flujo lateral, que proporcionan un simple resultado positivo o negativo, sin información cuantitativa. Estos kits son baratos y fáciles de usar y, dependiendo de cómo se empleen, pueden ser útiles para la vigilancia de la enfermedad. Los ensayos de flujo lateral (LFA) se utilizan para la detección rápida e in situ de emergencia del virus. Estos ensayos funcionan detectando el antígeno del SARS-CoV-2 o los anticuerpos IgG e

IgM. Esta técnica ayudará a conocer la carga de la infección, a hacer un seguimiento de los pacientes asintomáticos, etc. Sin embargo, la variabilidad del muestreo y la baja carga viral en una persona infectada pueden ser responsables de un resultado falso negativo. La OMS ha recomendado estas pruebas de inmunodiagnóstico para los laboratorios de investigación, pero no para las decisiones clínicas hasta que las pruebas estén respaldadas. Aunque la limitación persiste, estas pruebas pueden desempeñar un papel fundamental en el rastreo de infecciones pasadas. También pueden proporcionar apoyo en la elección del plasma convaleciente que puede utilizarse en el tratamiento posterior de la persona infectada (Shetti et al., 2021). Los ácidos nucleicos del virus pueden encontrarse en muestras humanas como esputo, hisopos nasofaríngeos, secreciones del tracto respiratorio inferior, sangre y heces. Los LFA se encuentran entre las actuales plataformas de biosensores para pruebas caseras y potencialmente para el cribado masivo, pero la sensibilidad relativamente pobre inherente a esta tecnología hace urgente la búsqueda de un enfoque diferente. La mayoría de las pruebas de flujo lateral actuales tienen zonas de prueba separadas para la detección de IgM e IgG, que requieren dos conjuntos de reactivos de captura y detección.

Las pruebas de flujo lateral se realizan en una tira de nitrocelulosa de bajo coste que tiene reactivos de ensayo secados en la zona de prueba. El analito objetivo se difunde desde la almohadilla de depósito de la muestra hasta la zona de prueba por acción capilar, y la lectura de la zona de prueba se basa en la detección colorimétrica, lo que elimina la necesidad de instrumentos de laboratorio. Sin embargo, los ensayos de flujo lateral son propensos a la variabilidad debido a muchos factores, como la calidad de la nitrocelulosa y de las proteínas recombinantes, y su estabilidad tras el secado. Además, los diseños simples de flujo lateral no pueden realizar procesos secuenciales de varios pasos. Muchos ensayos de laboratorio se basan en pasos secuenciales de lavado y amplificación de la señal para mejorar la especificidad y la sensibilidad. Para mejorar los diseños de flujo lateral, se han desarrollado previamente dispositivos de papel bidimensionales que permiten la entrega oportuna de múltiples reactivos a la zona de ensayo. Estos dispositivos utilizan la acción capilar y los reactivos secos, pero su diseño incorpora compartimentos adicionales con reactivos de detección, de amplificación de la señal o de lavado, de forma que se suministran volúmenes fijos de reactivos a la zona de prueba de forma secuencial y controlada (Pavlova et al., 2020). Estos dispositivos bidimensionales de papel se han utilizado anteriormente con éxito para la detección de anticuerpos contra el virus del papiloma humano (VPH) y la malaria, pero no contra el SARS-CoV-2.

Es necesario poner más énfasis en el desarrollo de técnicas de pruebas rápidas que proporcionen resultados en un tiempo mucho menor, como las pruebas rápidas de antígenos,

que son plataformas de detección de bajo coste, aunque adolecen de escasa sensibilidad para los virus de la gripe. Hasta ahora, no es posible realizar un diagnóstico de acceso aleatorio del SARS-CoV-2 y la única opción es la realización de pruebas manuales por lotes, aunque es más tediosa y lleva más tiempo obtener los resultados de las muestras.

- **Pruebas rápidas de antígenos**

Estas "pruebas rápidas de antígenos" (RAT) no amplifican lo que hay en la muestra, por lo que sólo pueden detectar el virus cuando alcanza un nivel elevado en el cuerpo de una persona, con quizás cientos de miles o millones de copias virales por mililitro de muestra. El virus suele alcanzar estos niveles en torno al momento en que se inician los síntomas, cuando las personas son más contagiosas. Los datos de los fabricantes sobre la sensibilidad de las pruebas proceden en su mayoría de ensayos de laboratorio en personas con síntomas, que suelen tener cargas virales elevadas. En esos ensayos, muchas de las pruebas rápidas parecen ser muy sensibles. Además, son extremadamente específicos: es poco probable que den un falso positivo. Pero las evaluaciones en el mundo real han puesto de manifiesto un aparente rendimiento diferencial en personas con cargas virales más bajas. Los niveles virales de una muestra suelen cuantificarse en función del número de ciclos de amplificación de la PCR necesarios para detectar el virus. Por lo general, si se necesitan unos 25 o menos ciclos de amplificación por PCR (lo que se describe como un umbral de ciclo, o Ct, de 25 o menos), se considera que los niveles de virus viable son altos, lo que indica que las personas son probablemente infecciosas. No obstante, hasta la fecha no se conoce si existe un nivel clave en el que las personas son o no son contagiosas (Guglielmi, 2021).

La interpretación del resultado de una prueba no sólo depende de la precisión de la prueba, sino también de la posibilidad de que una persona ya tenga COVID-19. Eso depende de las tasas de infección en su zona y de si presenta síntomas. Si alguien procedente de una zona con altos niveles de COVID-19, presenta síntomas típicos de la enfermedad y obtiene un resultado negativo, probablemente se trate de un falso negativo que requiere una doble comprobación con PCR.

El uso generalizado de las pruebas rápidas de antígenos podría ser, por tanto, un recurso importante para superar la actual escasez de pruebas moleculares. Sin embargo, las pruebas rápidas de antígenos, a pesar de sus indudables ventajas, presentan algunas deficiencias notables, la primera de las cuales es, efectivamente, una menor sensibilidad en comparación con las pruebas de detección de ácido nucleico (NAAT). Como se ha puesto de relieve recientemente en una revisión bibliográfica sistemática publicada por el Grupo Cochrane de

Exactitud de las Pruebas de Diagnóstico COVID-19, la sensibilidad diagnóstica de muchas de estas pruebas de antígenos para el SARS-CoV-2 parece aceptable en muestras respiratorias con alta carga viral (por ejemplo, normalmente >80% con umbrales de ciclo umbrales de ciclo de 25 o inferiores), mientras que la tasa de positivos en muestras carga viral baja (por ejemplo, umbrales de ciclo >25/30) es siempre <80%, observándose entre el 8 y el 72% (Mattiuzzi et al., 2021). Estos datos fueron confirmados por otros estudios también recientes publicados por Liotti et al. que demostró que el porcentaje de concordancia de positividad con las NAAT de una prueba rápida de antígeno disponible en el mercado es superior al 95% en muestras del tracto respiratorio superior con una carga viral elevada (es decir, umbrales de ciclo <25), pero disminuye drásticamente hasta el 20-40% en muestras con umbrales de ciclo ≥ 25 .

Basándose en estas conclusiones, el uso de las pruebas rápidas de antígenos parece teóricamente injustificado, ya que el menor rendimiento diagnóstico (especialmente la mayor tasa de falsos negativos) puede dejar a muchos pacientes asintomáticos o ligeramente sintomáticos de COVID-19 sin diagnosticar y sin aislar de la comunidad. No obstante, es importante considerar que la infectividad real y la eficiencia de la transmisión viral en pacientes asintomáticos con baja carga viral de SARS-CoV-2, detectada por las NAAT, pero no con las pruebas rápidas de detección de antígenos (por ejemplo, umbrales de ciclo ≥ 30), sigue siendo un tema de debate abierto. Aunque no hay duda respecto al potencial de transmisión por parte de individuos infectados por el SARS-CoV-2 asintomáticos o presintomáticos, también se ha demostrado que la tasa de ataque de los sujetos asintomáticos es menor en comparación con los pacientes sintomáticos de COVID-19. De hecho, un meta-análisis publicado por Buitrago-García et al., supone un apoyo a esta afirmación. Dicho estudio concluyó que los sujetos asintomáticos y presintomáticos con infección por SARS-CoV-2 tienen un 65% y un 37% menos de riesgo, respectivamente, de transmitir el virus en comparación con los pacientes sintomáticos (Mattiuzzi et al., 2021). A pesar de que los sujetos asintomáticos parecen tener una duración similar o incluso mayor de la excreción vírica en comparación con los sintomáticos, otro metaanálisis ha llegado recientemente a la conclusión de que estos sujetos pueden ser poco infecciosos, especialmente durante la última fase de su infección. Aunque la mayoría de los estudios incluidos en el análisis combinado final eran de calidad baja a moderada, se podría concluir que la identificación del ARN del SARS-CoV-2 no siempre refleja la presencia de partículas virales viables y transmisibles. También cabe destacar que actualmente existen pruebas fiables de que la gravedad de la enfermedad por COVID-19 parece depender directamente

del volumen de partículas virales cargadas. Por lo tanto, incluso si los sujetos asintomáticos o presintomáticos con infección por el SARS-CoV-2 siguen siendo capaces de transmitir el virus, una menor inoculación viral se asociaría con una probabilidad mucho mayor de desarrollar sólo enfermedad ligeramente sintomática o incluso totalmente asintomática.

Otro aspecto que hay que destacar, es que la probabilidad de obtener un cultivo viral positivo para el SARS-CoV-2 alcanza su punto máximo entre 0 y 3 días desde el inicio de los síntomas, mientras que disminuye drásticamente después, de modo que el riesgo de ataque secundario 6 días después del inicio de los síntomas es muy cercano a cero (WHO, 2020).

Según las últimas orientaciones provisionales de la OMS para las pruebas de antígeno del SARS-CoV-2, estos métodos podrían utilizarse para la detección temprana de casos positivos, cuando no se disponga de pruebas moleculares/de referencia o los servicios de laboratorio se encuentran sobrecargados. Además, se utilizarán específicamente en entornos en los que las pruebas moleculares no estén disponibles de forma inmediata, para la investigación de brotes, para el seguimiento de las tendencias de la incidencia de la enfermedad dentro de la comunidad, así como durante la transmisión comunitaria generalizada, permitiendo así detectar y aislar oportunamente los casos positivos de SARS-CoV-2. El rendimiento diagnóstico mínimo de estas pruebas abarca al menos un 80% de sensibilidad y un 97% de especificidad diagnóstica, respectivamente, mientras que todas las muestras positivas deben confirmarse con pruebas moleculares de laboratorio. En particular, se desaconseja el uso de pruebas rápidas de antígenos de la enfermedad cuando la carga viral es baja o cuando las pruebas moleculares de confirmación son inviables.

En resumen, las pruebas rápidas basadas en antígenos pueden ser útiles para el cribado selectivo de la población, con un aislamiento oportuno de la comunidad cuando se identifiquen pacientes asintomáticos con cargas víricas elevadas, o para la realización de pruebas de emergencia en sujetos con posibles síntomas de COVID-19. Todo ello, permite detectar rápidamente a los pacientes con infección sintomática por el SARS-CoV-2 que presenten cargas víricas más elevadas, que incidentalmente son los más infecciosos, y que pueden necesitar un triaje y un tratamiento clínico tempranos. En el caso de los pacientes con resultados negativos, la probabilidad de una infección activa por el SRAS-CoV-2 con una carga vírica elevada es previsiblemente baja, por lo que la vigilancia clínica y/o la repetición de las pruebas si aparecen síntomas sugestivos de COVID-19 parece una estrategia globalmente viable. Independientemente de los resultados de las pruebas, la adopción reforzada de medidas como el enmascaramiento facial, el distanciamiento social y la higiene de las manos seguirá siendo inevitable para prevenir la transmisión del virus.

En un estudio realizado en Japón (Yamayoshi et al., 2020), en agosto de 2020, se comparan varios RATs para comprobar su sensibilidad dependiendo de varios parámetros. Estas RATs son inmunocromatográficas; por lo tanto, su sensibilidad depende de la cinética de unión de los anticuerpos monoclonales utilizados en cada RAT. La composición del tampón de lisis, la proporción de la muestra en el analito, y el método utilizado para visualizar el resultado también afectan a la sensibilidad. No obstante, no se puede deducir cómo afecta ya que los fabricantes de estas pruebas no indican la composición. La cantidad de tampón de lisis y de mezcla de muestra/tampón de lisis utilizada para las pruebas difería entre los RATs probados.

Cada una de las RATs difiere en el método de visualización de los resultados, ya que algunas utilizan partículas de color, fosfatasa alcalina y su sustrato, látex de color y coloides de platino-oro, para visualizar los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo. Los resultados visualizados se evalúan por el ojo humano a los 15 o 30 minutos después de añadir el analito en función de cada una. Para la realización de estas pruebas se toman distintas muestras de los pacientes después del inicio de la enfermedad: lavado de garganta, saliva, hisopo de garganta, hisopo del vestíbulo nasal, nasofaríngeo, esputo y aspirado traqueal. Dado que el tipo de muestra probablemente afecta a la sensibilidad de las RAT, se evalúan los resultados según el tipo de muestra. En particular, tanto el lavado de gárgaras, como los hisopos de garganta y los hisopos del vestíbulo nasal mostraron valores de Cq (indica cuántos ciclos son necesarios para detectar una señal en la muestra) más altos que los demás tipos de muestras, por lo que se deduce que estas son muestras adecuadas para la detección del virus.

Los resultados obtenidos indicaban que la sensibilidad de las cuatro RAT es menor que la de la RT-qPCR, pero similar a la del aislamiento del virus. Es importante destacar que varios especímenes de las que se aisló el virus fueron negativas con todas las RATs probadas, lo que indica que estas RATs podrían potencialmente fallar en el diagnóstico de pacientes con expulsión de SARS-CoV-2 infeccioso.

■ Pruebas rápidas de anticuerpos

Las pruebas de anticuerpos comprueban la respuesta de los anticuerpos a la infección por SARS-CoV-2 y se utilizan para determinar las tasas de infección y letalidad, o la posible inmunidad en pacientes recuperados y en estudios de vacunas. Se han desarrollado tecnologías eficaces de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en el laboratorio, y algunas han

sido validadas por la FDA con una sensibilidad (Se) y una especificidad (Sp) de hasta el 99-100% (Pavlova et al., 2020).

Actualmente, todas las pruebas rápidas de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 se basan en la capacidad de las proteínas recombinantes de la RBD, S1, S2 o el dominio N de la proteína de espiga del SARS-CoV-2 para capturar anticuerpos IgM o IgG en la sangre del paciente. Esta detección específica del isotipo (IgM o IgG) depende del tiempo. De acuerdo con la etapa de progreso de la enfermedad calculada desde el inicio de los síntomas, la enfermedad se puede dividir en etapa temprana (1-7 días desde el inicio), etapa intermedia (8-14 días) y etapa tardía (más de 15 días). Las tasas de positividad de IgM o IgG en la fase inicial son relativamente bajas, y aumentan gradualmente durante la progresión de la enfermedad. La tasa de positividad de IgM aumenta desde el 11,1% del estadio inicial hasta el 78,6 y el 74,2% en el estadio intermedio y tardío, respectivamente. La tasa de IgG positiva en los pacientes confirmados es del 3,6% en el estadio inicial, del 57,1% en el intermedio y del 96,8% en el tardío, respectivamente. Cabe destacar que la combinación del resultado de IgM e IgG, es decir, los pacientes con IgM o IgG positivos, aumentaría significativamente la sensibilidad, especialmente en la etapa intermedia. Mientras que las tasas de positividad de IgM e IgG en la fase intermedia son del 78,6% y el 57,1%, respectivamente, la combinación de ambos parámetros elevaría la tasa de positividad al 92,9%. En conjunto, en respuesta a la invasión del virus, la IgM se produjo en primer lugar contra el virus; con la progresión de la enfermedad, los anticuerpos IgG comienzan a producirse y se vuelven gradualmente detectables. La sensibilidad de los ensayos aumenta y alcanza su punto máximo en torno a los 15 días. La combinación de IgM e IgG sensibilizaría en gran medida el resultado del ensayo ICG (Pan et al., 2020). Además, estas pruebas rápidas validadas tienden a tener una Se más alta para los pacientes ingresados en la UCI en comparación con los pacientes con una enfermedad más leve. Estudios clínicos recientes sobre las respuestas de anticuerpos tras el inicio de los síntomas en pacientes con COVID-19 han asociado títulos más altos de IgG e IgM con un peor resultado de la enfermedad o con peores resultados clínicos y mayor edad. Estos resultados sugieren que los kits de pruebas rápidas pueden favorecer la detección de títulos más altos de IgG e IgM y, por lo tanto, tienen un mejor rendimiento en las enfermedades más graves.

Además, aunque un número creciente de estudios informa de que los anticuerpos SARS-CoV-2 son más detectables en las personas infectadas 3-4 semanas después del inicio de los síntomas, los niveles de anticuerpos son más bajos y pueden tener una cinética diferente en las personas con síntomas más leves y aún se desconocen en gran medida en las personas

asintomáticas (Pavlova et al., 2020). Esto sugiere que el momento y la elección de los ensayos pueden tener que optimizarse en función de las poblaciones que se vayan a analizar. Por otro lado, un estudio que caracteriza la respuesta de los anticuerpos neutralizantes (Nabs) en una cohorte de pacientes recuperados de COVID-19 con síntomas leves, encontró una respuesta persistente de Nabs en el 70% de los pacientes recuperados. La detección se produjo en un tiempo estimado 10-15 días después del inicio de la enfermedad con una cinética alineada con la de los anticuerpos de unión. Esto sugiere que la detección de Nabs podría realizarse en paralelo a la detección rápida de IgG e IgM, específicas de isotipo, para proporcionar información sobre la funcionalidad del reposo de anticuerpos y protección potencial.

Por otra parte, las pruebas rápidas de anticuerpos capturan anticuerpos IgG e IgM vinculantes, pero no necesariamente anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos de unión no tienen la misma capacidad de neutralización ni la misma afinidad por los antígenos proteicos de la espiga que los anticuerpos neutralizantes. Recientemente, se ha desarrollado una prueba de neutralización del virus SARS-CoV-2 (sVNT) que detecta los anticuerpos neutralizantes totales de forma independiente del isotipo. Esta prueba utiliza la interacción de alta afinidad entre la proteína del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína viral de la espiga (S) y el receptor de la célula huésped ACE2 (hACE2). Los anticuerpos neutralizantes inhiben esta interacción al unirse a la proteína RBD antes de la interacción virus-huésped. La prueba sVNT imita este proceso utilizando proteínas ACE2 y RBD recombinantes y detectando el % de inhibición mediada por anticuerpos (Pavlova et al., 2020).

También se sugiere que una prueba sVNT de flujo lateral tendrá una mayor sensibilidad, porque detecta anticuerpos neutralizantes con mayor afinidad al antígeno recombinante RBD que los anticuerpos de unión, optimizando la captura del analito objetivo en la tira de prueba. Estos test rápidos de anticuerpos son inmunoensayos cualitativos de flujo lateral para la determinación rápida de la presencia o ausencia de anti-SARS-CoV-2-IgM y anti-SARS-CoV-2-IgG en muestras humanas (sangre total, suero y plasma). Se trata de unos kit de prueba que en su mayoría contienen un cartucho de prueba, un tampón de dilución de muestras y un prospecto. El cartucho de prueba tiene tres bandas de detección como podemos observar en la figura 2, incluyendo una banda de control distal que aparece cuando la muestra ha fluido hasta el final de la tira de prueba. La presencia de anticuerpos SARS-CoV-2 IgG e IgM se indica mediante una línea roja/púrpura en la región específica indicada en el dispositivo. La tira de prueba rápida de anticuerpos combinados IgG-IgM del

SARS-CoV-2 tiene dos anticuerpos monoclonales antihumanos de ratón (anti-IgG y anti-IgM) despojados en dos líneas de prueba separadas. Un antígeno de superficie del SARS-CoV-2 que puede unirse específicamente a los anticuerpos del SARS-CoV-2 (incluyendo tanto IgM como IgG) se conjuga con nanopartículas de oro coloidal y se rocía en almohadillas de conjugación. Los conjugados AuNP- IgG de conejo también se impregnan en almohadillas de conjugación para que se unan al anticuerpo IgG de conejo que está inmovilizado en la línea de control (Li et al., 2020).

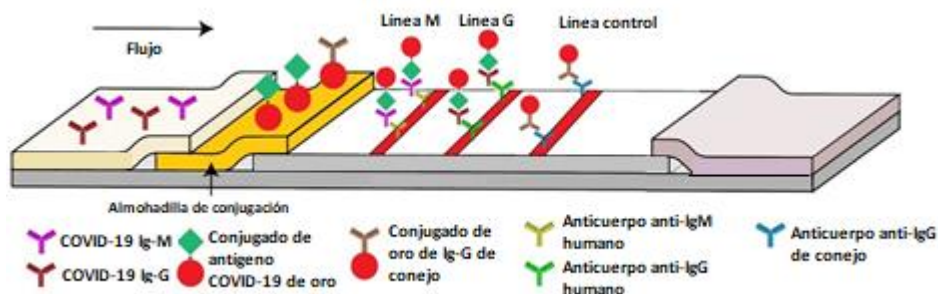


Figura 2. Ilustración esquemática de la prueba rápida de anticuerpos combinados IgM-IgG del SARS-CoV-2. Esquema del dispositivo de detección (Li et al., 2020).

Al realizar la prueba, se añaden de 10 a 15 μL de muestra en el puerto de carga de la muestra seguido de la adición del tampón de dilución de la muestra. El mecanismo del ensayo se basa en la hidratación y el transporte de reactivos al interactuar con la muestra a través de la tira mediante flujo lateral cromatográfico. A medida que la muestra fluye a través del dispositivo, si están presentes en la muestra los anticuerpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2, se unen al antígeno del SARS-CoV-2 marcado con oro y fijado en la almohadilla de conjugado. A medida que la muestra conjugada sigue subiendo por la tira, los anticuerpos anti-SARS-CoV-2 IgM se unen en la línea M (IgM), y los anticuerpos anti-COVID-19 IgG se unen a la línea G (IgG). Si la muestra no contiene anticuerpos SARS-CoV-2, no se unen complejos marcados a la zona de prueba y no se observan líneas. El oro coloidal restante asciende por la nitrocelulosa hasta la zona de la línea de control, que capta el exceso de conjugado, lo que demuestra que el fluido ha migrado adecuadamente a través del dispositivo. De esta forma, en la zona de la línea de control aparecerá una línea rojiza durante la realización de todas las pruebas válidas, tanto si la muestra es positiva como si es negativa para la infección por SARS-CoV-2. Durante la prueba, el exceso de reactivo que incluye los conjugados AuNPs-conejo IgG migran a través de la zona de la línea de control donde los conjugados AuNPs-IgG de conejo se unen a la IgG de conejo para formar una línea roja en la línea de control.

NUEVOS SISTEMAS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

El cuerpo principal de la tira reactiva consta de cinco partes, que incluyen el soporte de plástico, la almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, la almohadilla absorbente y la membrana NC. Cada componente de la tira debe recibir un tratamiento previo que se describe a continuación: en primer lugar, la membrana NC se adhiere a una capa de respaldo de plástico para su corte y manipulación. Después, tanto el anti-humano-IgM, como el anti-humano-IgG y el anti-conejo-IgG se inmovilizaron en la línea de prueba M, G y de control (línea C), respectivamente. Posteriormente, la almohadilla de conjugado se rocía con una mezcla de conjugado de antígeno recombinante AuNP-COVID-19 y AuNP-rabbit- IgG. Finalmente, la almohadilla de muestras se pretrata con BSA (3%, p/v) y Tween-20 (0,5%, p/v) antes de su uso. En la figura 3 se ilustran diferentes resultados posibles obtenidos como resultado de las pruebas: negativo, IgM positivo, IgG positivo e IgM/IgG ambos positivos (Li et al., 2020).



Figura 3. Posibles resultados obtenidos a partir de la realización de un test rápido de anticuerpos. Modificado de Li et al., 2020.

Cuando se utilizan muestras de sangre refrigeradas para la prueba, se calientan a temperatura ambiente (15°C-30°C). Durante la prueba, se pipetea 20 µL de muestra de sangre completa (o 10 µL de muestras de suero/plasma) en el puerto de muestras, seguido de la adición de dos o tres gotas (70-100 µL) de tampón de dilución (tampón PBS 10mM) para impulsar la acción capilar a lo largo de la tira. La prueba completa tarda unos 15 minutos en finalizar.

Hay un total de tres líneas de detección en la tira. La línea de control (C) aparece cuando la muestra ha fluido a través del cartucho. La presencia de IgM anti-SARS-CoV-2 y de IgG anti-SARS-CoV-2 se indicará mediante una línea de control roja/rosa en la región M y G. Si sólo la línea de control (C) se muestra en rojo, la muestra es negativa. Si cualquiera de las líneas M o G o ambas líneas se vuelven rojas, indica la presencia de anti-SARS-CoV-2-IgM o

anti SARS-CoV-2-IgG o ambos anticuerpos en la muestra. Si la línea de control no aparece en rojo, la prueba no es válida y debe repetirse con otro cartucho.

La especificidad y la sensibilidad de estos kits de pruebas rápidas se puede calcular de acuerdo con las fórmulas que aparecen en la figura 4, que aparece a continuación.

$$\text{Especificidad (\%)} = 100 \times \left[\frac{\text{verdadero positivo}}{\text{verdadero negativo} + \text{falso positivo}} \right]$$

$$\text{Sensibilidad (\%)} = 100 \times \left[\frac{\text{verdadero positivo}}{\text{verdadero positivo} + \text{falso negativo}} \right]$$

Figura 4. Cálculo de la especificidad y sensibilidad de las pruebas rápidas de anticuerpos. (Li et al., 2020)

Las ventajas de la detección de anticuerpos virales con la tira ICG son evidentes. En primer lugar, la sensibilidad de la tira de ICG es comparable, especialmente después de 7 días de la aparición; la capacidad de detección en los pacientes "clínicamente diagnósticos" con ácido nucleico negativo es impresionante. Por lo tanto, la tira de ICG se recomienda encarecidamente para ser utilizada como enfoque de diagnóstico complementario en aplicaciones clínicas. La tira de ICG también puede ser ampliamente adoptada en las áreas donde la capacidad de diagnóstico es limitada. En segundo lugar, el ensayo de la tira de ICG es operativo, ya que está listo para usar y ahorra tiempo. El ensayo puede terminarse en 15 minutos sin necesidad de equipo especializado. En tercer lugar, a diferencia de la toma de muestras con hisopos orales, que puede provocar arcadas y toses estimuladas, lo que aumenta el riesgo de exposición de los técnicos de laboratorio, la colecta de sangre podría evitar el riesgo innecesario y reducir los pasos de la operación que pueden causar aerosoles. En cuarto lugar, la detección de anticuerpos también puede indicar la recuperación de la enfermedad, ya que las inmunoglobulinas son uno de los soldados más importantes en la batalla contra los virus. Así, los pacientes que inicialmente se detectan como positivos al virus y que gradualmente se vuelven negativos, pero con IgG o IgM detectables durante el progreso de la enfermedad pueden considerarse recuperados de esta batalla. Cabe destacar que la tira de ICG sólo puede proporcionar resultados cualitativos, pero el ensayo serológico ELISA contra los anticuerpos virales ofrece el título de anticuerpos cuantitativo y se considera la alternativa superior en este punto. Por último, pero no menos importante, la tira ICG puede utilizarse para la vigilancia comunitaria. Algunas personas sanas en áreas epidémicas pueden estar infectadas, pero sin ningún síntoma, y el anticuerpo detectable en

su sangre es la evidencia de la infección (Pan et al., 2020). La detección de la vigilancia en las zonas epidémicas, tanto de los miembros sanos como de los pacientes, podría proporcionar información útil para trazar el cuadro completo de la transmisión viral, lo que nos ayudaría a comprender mejor la situación real y a establecer políticas óptimas contra la epidemia.

▪ Nanopartículas en la detección del SARS-CoV-2

En la actualidad, existen dos áreas de investigación que han ganado popularidad en la última década. Estas son la nanociencia y la nanotecnología. Podemos definir la nanociencia como una ciencia interdisciplinar que estudia los fenómenos, las propiedades y la manipulación de la materia a escala nanométrica; mientras que la nanotecnología es la ciencia aplicada, enfocada al diseño, caracterización y producción de estructuras nuevas a partir de materiales nanométricos. De esta forma, el objetivo que persiguen ambas disciplinas es el control y el conocimiento de los nanomateriales para su posterior uso en la tecnología. Hoy día se conocen muchos métodos diferentes para sintetizar nanomateriales, y existen distintas herramientas de caracterización y manipulación. La nanotecnología tiene aplicaciones en gran variedad de campos, como en tecnología informática, medicina y salud humana (Gogotsi, 2006).

La nanotecnología ha sido una herramienta prometedora para el diagnóstico y la detección del coronavirus debido a sus propiedades dependientes del tamaño y la superficie. La modificación de la superficie se realiza mediante la funcionalización del nanomaterial con una molécula o receptor, capaz de unirse selectivamente con el objetivo. La activación de la superficie puede realizarse manipulando la estructura electrónica del nanomaterial, ya sea mediante el dopaje o la carga con otras nanopartículas que tengan estructuras electrónicas diferentes (Daniel, M y Astruc, D, 2004).

Los puntos cuánticos de dimensión cero, las nanopartículas esféricas, los nanotubos de carbono (CNT) unidimensionales, metálicos, los nanotubos y varillas de óxido metálico, y los nanomateriales 2D como el grafeno también se han utilizado ampliamente para aplicaciones de detección (Layqah y Eissa, 2019). Además de los métodos de diagnóstico mencionados, el desarrollo de nanosensores para detectar el virus puede ser muy útil para identificar y aislar a los individuos infectados y ofrecer a los pacientes infectados el tratamiento necesario a tiempo.

Existen diferentes tipos de nanopartículas, que se clasifican según su origen, tamaño y composición química. El gran interés actual en este área de investigación reside en las

propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas, y catalíticas únicas, que las diferencia de sus componentes por separado en disolución (Daniel, M y Astruc, D, 2004). En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) tienen muchas propiedades diferentes. Algunas propiedades son magnéticas y ópticas como la resonancia plasmática de superficie localizada (LSPR), alta relación superficie / volumen, buena transmisión de conducción, bajo punto de fusión, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad. Estas propiedades hacen que las AuNPs sean una herramienta importante en bionanotecnología (Yeh et al., 2012). La LSPR es la oscilación resonante que sufren los electrones libres de las nanopartículas en presencia de luz. Eso sucede porque sus electrones forman una "nube" alrededor de los núcleos atómicos, que es móvil, lo que permite que las nanopartículas de oro transporten carga. Como puede deducirse de la mecánica cuántica, estos electrones podrían actuar como partículas o como ondas con un valor de energía definido y finalmente producir resonancia. Cuando un metal en su superficie absorbe luz de una longitud de onda resonante, la nube de electrones vibrará y disipará energía (véase Figura 5). Esas oscilaciones de la nube de electrones del metal se llaman "plasmones" (Meléndez Anzures y Chávez Guerrero, 2016). Es importante destacar como esta resonancia de plasmón superficial (SPR) ocurre en la región visible del espectro y algunas longitudes de onda visibles pueden ser absorbidas y otras pueden reflejarse proporcionando un cierto color al metal. En este sentido, las AuNPs exhiben una amplia gama de colores que van desde el marrón, naranja, rojo o púrpura, en disoluciones acuosas a medida que el tamaño del núcleo aumenta desde 1 a 100 nm, y generalmente muestran un pico de absorción relativo al tamaño que oscila de 500 a 550 nm (Yeh et al., 2012).

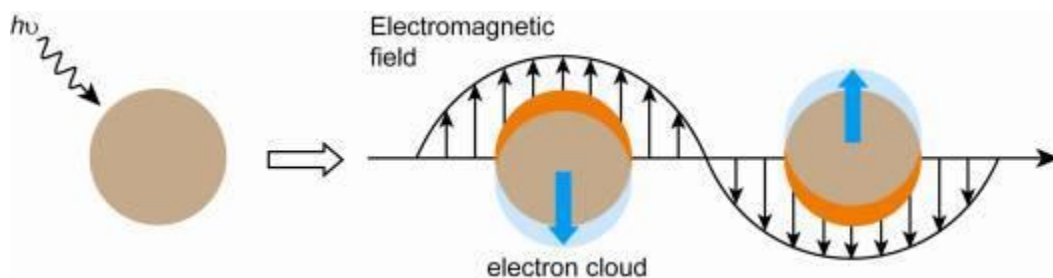


Figura 5. Efecto de Resonancia del Plasmón Superficial. Modificado de Yeh et al., 2012.

Se ha desarrollado recientemente un dispositivo de biosensores basado en transistores de efecto de campo (FET) para la detección clínica del virus 2019-nCoV (Shetti et al., 2021). El sensor se fabricó mediante la conjugación de láminas de grafeno FET con determinados

anticuerpos contra la proteína de espiga del 2019-nCoV, y se investigó su rendimiento utilizando la proteína del antígeno y el virus cultivado, muestras de hisopos nasofaríngeos de pacientes infectados. La conjugación de la proteína de espiga del virus en las láminas de grafeno se investigó mediante mediciones eléctricas utilizando la lámina de grafeno conjugada con anticuerpos, la gota de muestra como terminal de puerta y los dos terminales restantes como fuente y drenaje. De este modo, el sensor era bastante sensible como herramienta de diagnóstico para la detección del SARS-CoV-2 y no presentaba reactividad cruzada con el antígeno del MERS-CoV (Shetti et al., 2021).

Los métodos de diagnóstico basados en la nanotecnología que utilizan nanomateriales son sencillos y fáciles en comparación con las técnicas convencionales basadas en la PCR y los anticuerpos. Las técnicas basadas en la nanotecnología pueden ser más portátiles y precisas, aunque la detección rápida de antígenos basada en la tecnología convencional ofrece resultados rápidos, pero adolece inexactitudes de falsos positivos y falsos negativos. La nanotecnología puede conducir a nuevos avances en las pruebas y el diagnóstico del SARS-CoV-2. La relación entre la nanotecnología y los métodos de diagnóstico convencionales es que, con la ayuda de la nanotecnología, la PCR convencional y el diagnóstico de antígenos pueden mejorarse aún más y hacerse más precisos y rápidos para el diagnóstico viral. Sin embargo, las principales desventajas y limitaciones de las técnicas de detección basadas en la nanotecnología es que aún están en fase de desarrollo y el coste de fabricación de los dispositivos sensores debe reducirse aún más para que estén disponibles para el público en general. El desarrollo de nanomateriales flexibles y de bajo coste sigue siendo importante para la fabricación de sensores portátiles, precisos y rápidos que son muy importantes para el diagnóstico a tiempo del virus.

Por otra parte, la mayor ventaja y versatilidad de estos sistemas es la posibilidad de controlar el tamaño de las partículas a través de su síntesis o estado de agregación; permitiendo que circulen a través de las paredes de los vasos sanguíneos (nanopartículas de un tamaño inferior a 20nm), también pueden atravesar la barrera hematoencefálica y el epitelio estomacal. No obstante, el tamaño de la nanopartícula debe ser lo bastante pequeño para que el bazo no lo filtre y para poder atravesar el hígado. Gracias a su tamaño nanométrico, las nanopartículas pueden interactuar con biomoléculas, tanto en la superficie celular como dentro de ellas, sin modificar su comportamiento y propiedades bioquímicas. Como vemos en la Figura 6, las nanopartículas tienen un tamaño similar al de algunos elementos biológicos (McNeil, 2005).

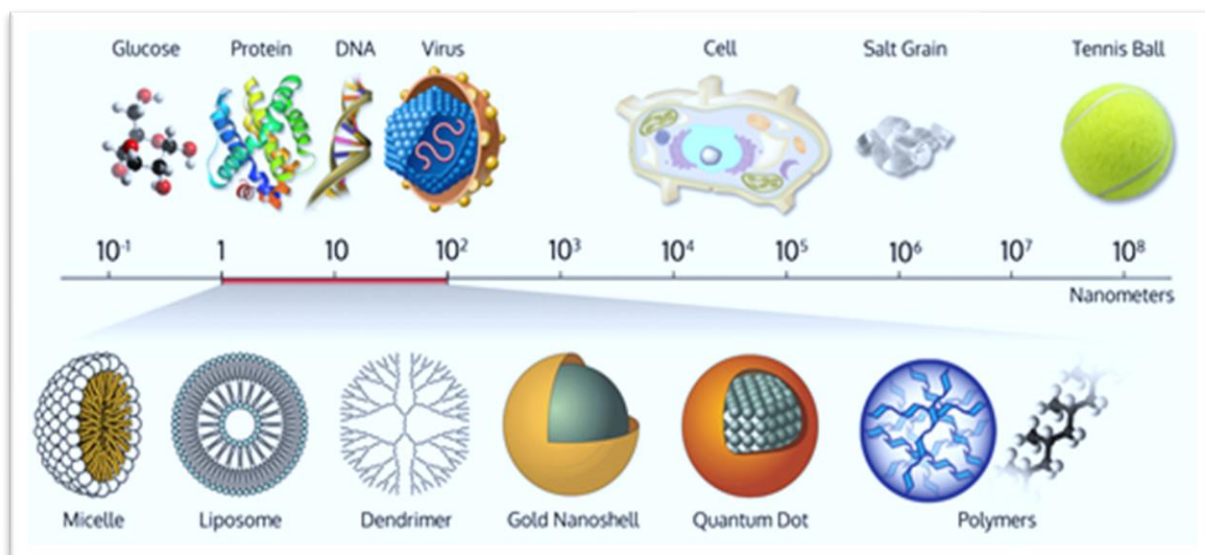


Figura 6. Tamaños de nanopartícula según el tipo. Se puede observar el tamaño de distintos elementos biológicos de forma comparativa. Modificado de McNeil, 2005.

Las propiedades que caracterizan a las nanopartículas varían de forma proporcional a su tamaño, por lo que gozan de propiedades ópticas exclusivas. Por un lado, los átomos que forman parte de la entidad de la nanopartícula poseen interacciones fuertes entre átomos y entre partículas, este fenómeno dota de uniformidad al sistema. Por otra parte, la superficie de las nanopartículas puede unirse a diversos ligandos y compuestos, lo que influye en sus propiedades, estabilidad, solubilidad y estructura de las nanopartículas. Finalmente, cuanto menor es el tamaño de la partícula, mayor es el espacio en los niveles de energía de los electrones. La variación del tamaño de las nanopartículas influye en el confinamiento cuántico, un fenómeno que modifica las propiedades ópticas, magnéticas y de conductividad (Strambeanu et al., 2014).

➤ *Nanopartículas metálicas*

Las nanopartículas metálicas, ofrecen propiedades físico-químicas únicas que hacen que incrementen su valor en diversas áreas de investigación. Según el material de su núcleo, podemos diferenciar gran variedad de nanopartículas metálicas, cada una tiene unas características, ligandos y aplicaciones, como puede verse en la Tabla 2 (Ando et al., 2013).

Tabla 2. Característica, ligandos y aplicaciones representativas para diversos metales y materiales semiconductores. Modificado de De, Ghosh y Rotello, 2008.

Material del núcleo	Características	Ligando(s)	Aplicaciones
Au	Absorción óptica, fluorescencia y enfriamiento de fluorescencia, estabilidad	Tiol, disulfuro, fosfina, amina	Reconocimiento biomolecular, vehículo de transporte, detección, biocompatibilidad
Ag	Fluorescencia de superficie mejorada	Tiol	Detección
Pt	Propiedad catalítica	Tiol, fosfina, amina, isocianuro	Biocatalizador, detección
CdSe	Luminiscencia, fotoestabilidad	Tiol, fosfina, piridina	Imagen, detección
Fe₂O₃	Propiedades magnéticas	Diol, derivado de dopamina, amina	RM y purificación de biomoléculas
SiO₂	Biocompatibilidad	Alcoxilano	Biocompatible por recubrimiento superficial

Las nanopartículas metálicas más utilizadas en Medicina y Biología son las nanopartículas de oro (AuNPs). Entre sus aplicaciones más importantes además de la electrónica y la fotodinámica se encuentra la interrelación con medicamentos o elementos biológicos como microRNAs, DNA, fármacos entre otros como la fabricación sensores y la catálisis (Yakoh et al., 2015; Giraldez-Pérez et al., 2020; Giraldez-Pérez et al., 2021). En este proyecto de investigación se han escogido las AuNPs porque tiene cualidades y propiedades muy valiosas, estas son: alta biocompatibilidad, baja toxicidad, gran relación superficie/volumen, alta estabilidad, excelentes propiedades ópticas, magnéticas,

catalíticas, electrónicas y estructurales, fácilmente modificables, y gozan de un soporte adecuado para la funcionalización con gran diversidad de ligandos (Giráldez-Pérez et al., 2020).

Gracias a todas estas características, las AuNPs son una herramienta muy útil para el desarrollo y fabricación de sensores químicos y biológicos (véase la Figura 6); con gran sensibilidad, estabilidad y selectividad. Los sensores deben tener dos componentes: un elemento de reconocimiento para la unión específica con diversos analitos y un componente transductor (Saha et al., 2012).

La detección colorimétrica con AuNPs se basa en los cambios que se experimentan en la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR), que es dependiente de la distancia entre los centros metálicos de las AuNPs. Dicha distancia es modificada frecuentemente por la existencia de determinados analitos en disolución, capaces de interactuar con las AuNPs, que inducen un cambio tanto en el color de la disolución coloidal como en el espectro de absorción del sistema. La resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR) es un fenómeno óptico generado por una onda de luz atrapada dentro de nanopartículas (NPs) conductoras más pequeñas que la longitud de onda de la luz (Petryayeva and Krull, 2011). Las AuNPs dispersas en disolución presentan una coloración roja y una absorción máxima alrededor de 520 nm, mientras que las AuNPs agregadas tienen un color azul o púrpura en disolución, desplazándose el máximo de absorción a longitudes de onda superiores, que puede ser variable en función del estado de agregación del sistema. Por lo tanto, es fundamental en la detección colorimétrica lograr una interacción selectiva entre el analito y las AuNPs para que se produzca la agregación adecuada (Zhang et al., 2016). En este sentido existen varios mecanismos que subyacen al cambio de color de las AuNPs. No obstante, entre las distintas estrategias colorimétricas basadas en el empleo de AuNPs existentes en la bibliografía destacan dos de ellas: aquellas basadas en la agregación y en la anti-agregación inducida por el analito (Chang et al., 2019).

La detección colorimétrica basada en la agregación de las nanopartículas de oro (AuNPs) se basa en el cambio de color que se produce en una suspensión coloidal de rojo a azul como resultado del acoplamiento LSPR entre las nanopartículas y en presencia de analito. Además, la agregación de las AuNPs puede regularse también mediante mecanismos biológicos como la interacción antígeno-anticuerpo (Ab), en cuyo caso se pueden utilizar diferentes estrategias para inmovilizar los Abs correctamente orientados en la superficie de las AuNPs, aunque la complejidad de los procedimientos estándar los hace inadecuados para aplicaciones industriales a gran escala.

Dentro del ámbito de detección de la COVID-19, recientemente se ha desarrollado un biosensor colorimétrico basado en nanopartículas de oro que puede utilizarse para cuantificar la cantidad de virus con una sensibilidad y especificidad superiores al 95%. El esquema de detección se muestra en la Figura 7 y consiste en una disolución coloidal de AuNPs funcionalizadas con PIT (f-AuNPs) contra tres proteínas de superficie del SARS-CoV-2: espiga, envoltura y membrana (S, E y M, respectivamente) (Ventura et al., 2020).

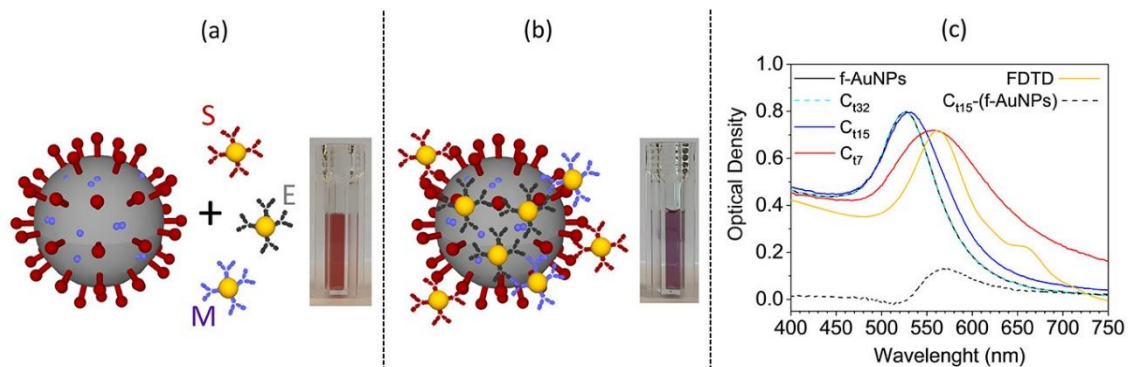


Figura 7. Esquema del SARS-CoV-2 y de las AuNPs funcionalizadas. (a) Las proteínas del SARS-CoV-2 (espiga, membrana y envoltura) y sus correspondientes (S, E y M) están resaltadas en rojo oscuro, violeta claro y gris, respectivamente. El recuadro muestra la disolución coloidal rosa que contiene las AuNPs funcionalizadas anti-SARS-CoV-2 (f-AuNPs). (b) Las f-AuNPs rodean al virión formando una capa de nanopartículas en su superficie. Su interacción conduce a un desplazamiento del pico de resonancia en el espectro de extinción y, por tanto, a un cambio de color visible en el recuadro. (c) Espectros de extinción que informan de la DO (densidad óptica) de la disolución coloidal de f-AuNPs mezclada con muestras de pacientes con diferente carga viral (Ventura et al., 2020).

El método se basa en la interacción de las partículas virales (viriones) con las nanopartículas de oro funcionalizadas que se sitúan sobre la superficie de la partícula del virus. Como consecuencia, se produce un desplazamiento de la densidad óptica (DO) en el espectro de extinción de la disolución hacia el rojo, que es más acusada conforme aumenta la concentración de partículas víricas en disolución (véase Figura 7c). Así, a una concentración muy baja de viriones el espectro de extinción no se distingue del espectro de la nanopartículas libres en disolución, f-AuNPs (línea continua negra). A una concentración intermedia, el espectro de extinción está ligeramente desplazado hacia el rojo y su diferencia con el "control" (f-AuNPs) produce la curva C₁₁₅-(f-AuNPs), que evidencia la

contribución que supone el virión. En cambio, a una concentración elevada del virión (C_{t7}), el espectro de extinción alcanza un máximo de 560 nm como para C_{t15} -(f-AuNPs). La concordancia entre la curva C_7 y el espectro simulado (línea continua dorada, escalada a la experimental) de una esfera dieléctrica (100 nm de diámetro) rodeada de AuNPs más pequeñas (20 nm de diámetro), confirma que los cambios registrados en los espectros de extinción en presencia del virus se deben a la agregación de las nanopartículas. Cuando la carga viral era relativamente alta, es decir, $C_t < 15$, el cambio de color rojo a púrpura es visible incluso a simple vista (Ventura et al., 2020).

Otra aproximación actual de ensayo tipo colorimétrico, se basa en el empleo de nanopartículas de oro recubiertas con oligonucleótidos antisentido (ASOs) específicos para el gen N del SARS-CoV-2 (Moitra et al., 2020). Este método de detección podría utilizarse para diagnosticar casos positivos de COVID-19 en 10 minutos a partir de las muestras de ARN aisladas. Así, las AuNPs recubiertas con ASO modificada por tiol se aglomeran selectivamente en presencia de ARN procedente del virus SARS-CoV-2, mostrando un cambio evidente en la banda de plasmón superficial. Además de la agregación de las nanopartículas, la adición de RNasaH escinde la hebra de ARN del híbrido de ARN-ADN, lo que da lugar a un precipitado visualmente detectable en disolución (Moitra et al., 2020).

Por otra parte, algunos métodos combinan las propiedades de flujo lateral inmunológico y las propiedades únicas de las AuNPs para obtener métodos rápidos de diagnóstico basados en la detección de IgM, obteniendo un método que es fácilmente operable y rentable en la detección a gran escala. Teniendo en cuenta todas las ventajas de este ensayo de AuNPs-LF, es posible que este se convierta en un método auxiliar de diagnóstico de COVID-19 y tiene un gran potencial para la contención de la pandemia mundial (Huang et al., 2020).

Además, se han reportado otros métodos de detección que se basan en el desarrollo de una secuencia de referencia del virus para su identificación. Estos son: el ensayo de neutralización del pseudovirus VSV, el ensayo inmunocromatográfico fluorescente, el uso de ácido nucleico sintético que tiene secuencias genéticas cercanas al 2019-nCoV y al SARS-CoV, la secuenciación de objetivos de nanoporos (NTS), el sistema de detección basado en CRISPR y la biodetección basada en FET (Shetti et al., 2021). En particular, la tecnología de nanoporos ya se emplea para la secuenciación y el análisis del ADN. También es muy prometedora para la secuenciación de proteínas y péptidos. Así, se ha comprobado que la combinación de la derivatización N-terminal de los aminoácidos con la tecnología de nanoporos puede dar lugar a su diferenciación efectiva. Esto puede ser muy útil en la determinación rápida y precisa de nuevos virus. De hecho, algunos de estos métodos de

diagnóstico pueden ofrecer resultados en menor tiempo y con mayor precisión y sensibilidad.

El desarrollo de una secuencia de referencia superaría las limitaciones de la baja sensibilidad de la técnica del ácido nucleico sintético. Además, dicho desarrollo puede ser muy importante para futuros estudios biológicos, seguimiento clínico, investigaciones sobre futuras infecciones de SARS-CoV-2 y análisis de las variaciones de la secuencia a lo largo del genoma. Queda mucho por investigar, ya que muchas de las pruebas de diagnóstico disponibles adolecen de baja sensibilidad, especificidad/selectividad, o ambas, y a veces ofrecen resultados falsos positivos o falsos negativos. Estos problemas deben ser superados para desarrollar métodos de diagnóstico/detección potencialmente exitosos que puedan ser específicos y sensibles y que no den resultados falsos positivos o falsos negativos.

Por otra parte, además del cuerpo humano, los virus también pueden encontrarse en los animales de compañía. Los tiempos de supervivencia de los virus en diferentes superficies, en el aire y en el agua también son motivo de preocupación, aunque el virus puede tener una vida menor en estos medios sin vida. Para estar seguros, es necesario detectar la presencia de virus en diferentes superficies, en el aire y en el agua, de manera que puedan ser tratados o desinfectados para eliminar la contaminación viral. Se necesitan muchos esfuerzos para desarrollar métodos para su diagnóstico eficaz, en particular aplicando herramientas nanotecnológicas, ya que los nanomateriales tienen una alta relación de aspecto.

En particular, el biosensor del SARS-CoV-2 que utiliza AuNPs con tapa de oligonucleótidos antisentido modificados con tiol puede diagnosticar casos positivos de COVID-19 a simple vista, y en un corto espacio de tiempo de alrededor 10 minutos, mediante el cambio de color a partir de ARN total aislado de muestras biológicas infectadas (Yang, 2021). Como otro método de aplicación de los AuNPs, se identificó el enlace glicano entre los GNs multivalentes estabilizados con polímeros que llevan un derivado del ácido siálico y la proteína S del SARS-CoV-2 utilizando una plataforma de gliconanopartículas. Este método basado en la construcción de una plataforma de detección y con un dispositivo de diagnóstico de flujo lateral presenta dos ventajas fundamentales: requiere un bajo coste para su producción y supone un tiempo de detección menor de 30 minutos.

No obstante, los sensores basados en la conjugación de las láminas de grafeno de los sensores FET con los anticuerpos que son específicos contra la proteína de la espiga del virus 2019-nCoV, desarrollados recientemente, son más eficaces. Por tanto, la investigación debe dirigirse a la fabricación de tales dispositivos, que pueden proporcionar resultados

específicos con mejor sensibilidad y pueden detectar pequeñas concentraciones virales para detectar incluso los casos asintomáticos. En un estudio reciente, se llevó a cabo la detección del SARS-CoV-2 en muestras clínicas con un sensor producido mediante el recubrimiento de la lámina de grafeno del transistor de efecto de campo con un anticuerpo específico contra la proteína de espiga del SARS-CoV-2 (Yang, 2021). Como resultado del estudio, fue posible detectar la proteína de espiga del SARS-CoV-2 en disolución salina tamponada con fosfato y 100 fg/mL en medio de transporte clínico.

A la luz de los recientes estudios realizados en el campo de los sensores colorimétricos basados en nanopartículas, así como de los resultados prometedores obtenidos, esperamos que en un futuro próximo estas técnicas puedan irse mejorando y perfeccionando, haciéndolas más sencillas, menos costosas y de mayor sensibilidad. Todo ello contribuyendo junto con el desarrollo de nuevas vacunas más eficaces a ganar la batalla contra el SARS-COV-2.

5. Conclusiones

El SARS-COV-2 ha cambiado la forma de vida del mundo entero, ocasionando la muerte de muchas personas y produciendo daños severos a muchas otras. A partir de los datos obtenidos en la presente revisión bibliográfica podemos concluir que:

- La mayor parte de los casos confirmados del virus se han detectado a través de los distintos métodos moleculares, destacando sobre todo la PCR como método de detección, al ser estos los que más fiabilidad y sensibilidad han demostrado hasta ahora, aunque se necesite más tiempo hasta saber los resultados de la prueba.
- Los métodos rápidos son en cambio los que ayudan a agilizar el proceso de detección de casos positivos del virus en la población, aunque tienen el inconveniente de poder ocasionar falsos negativos, siendo las pruebas de antígenos las más empleadas en caso de urgencia para poder diferenciar la enfermedad por COVID de otras patologías. Estas pruebas solo son de utilidad cuando una persona empieza a notar síntomas, ya que es cuándo los niveles del virus en el organismo son más elevados.
- Está comprobado que la mejor forma de contener el virus, hasta el momento en que se consiga la inmunidad de rebaño gracias a la vacuna, es la detección rápida de los infectados. No obstante, aún queda mucho que hacer en cuanto a la búsqueda de nuevos métodos de detección rápida de elevada sensibilidad, especificidad y bajo coste que ayuden a detectar casos positivos en la población para evitar la propagación del virus.
- Las nanopartículas, y en especial las metálicas de oro y plata, pueden ser una herramienta de detección del virus rápida, sensible, de bajo coste y fiable. Hasta la fecha, se han puesto a punto diferentes métodos, fundamentalmente de tipo colorimétrico, basados en estos sistemas que no requieren de instrumentación costosa, ni de personal cualificado para la detección del COVID-19. Actualmente, se sigue avanzando en este campo en aras de conseguir métodos de detección cada vez más fiables y competitivos, que permitan la detección rápida del virus.

6. Bibliografía

- Ahn D, Shin H, Kim M, Lee S, Kim H, Myoung J, et al. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J. Microbiol. Biotechnol.* 2020; 30 (3): 313–24.
- Alsaadi EAJ, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol.* 2019; 14(4): 275–86. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0144>.
- Ando, J., Yano, T., Fujita, K., Kawata, S. Metal nanoparticles for nano-imaging and nano-analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics.* 2013; 15: 13713.
- Astruc, D., Daniel, MC. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* 2004; 104(1): 293-346. <https://doi.org/10.1021/cr030698>
- Belmehdi O, Hakkour M, Omari N El, Balahbib A, Guaouguaou FE, Benali T, et al. Molecular structure, pathophysiology, and diagnosis of COVID-19. *Biointerface Res Appl Chem* 2021; 11(3): 10215–10237. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1021510237>.
- Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR – Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020; 38: 870-874.
- Chang CC, Chen CP, Wu TH, Yang CH, Lin CW, Chen CY. Gold nanoparticle-based colorimetric strategies for chemical and biological sensing applications. *Nanomaterials.* 2019; 9(6): 861.
- Chansaenroj J, Yorsaeng R, Posuwan N, Puenpa J, Sudhinaraset N, Chirathaworn C, et al. Detection of SARS-CoV-2-specific antibodies via rapid diagnostic immunoassays in COVID-19 patients. *Virology.* 2021; 18: 52. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01530-2>.
- De, M., Ghosh, P. S., Rotello, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials,* 2008; 20(22), 4225–4241. <https://doi.org/10.1002/adma.200703183>
- Dhamad AE, Abdal Rhida MA. COVID-19: Molecular and serological detection methods. *PeerJ* 2020; 8: 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>.
- Espejo AP, Akgun Y, Mana AF Al, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-fernandez C, et al. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol.* 2020; 154: 293–304.
- Giráldez-Pérez, R.M., Grueso E.M., Lhamyani, S., Pérez, M.P., Gentile, A.M., et. al. miR-21/Gemini surfactant-capped gold nanoparticles as potential therapeutic complexes: Synthesis, characterization and in vivo nanotoxicity probes. *Journal of Molecular Liquids.* 2020; 313: 113577. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113577>
- Giri B, Pandey S, Shrestha R, Pokharel K, Ligler FS, Neupane BB. Review of analytical performance of COVID-19 detection methods. *Anal Bioanal Chem* 2021; 413: 35–48.

- Gogotsi, Y. *Nanomaterials Handbook*. Florida: CRC Press. 2006. ISBN: 0-8493-2308-8.
- Guglielmi G. Rapid coronavirus tests: a guide for the perplexed. *Nature*. 2021; 590: 202–5.
- Huang C, Wen T, Shi FJ, Zeng XY, Jiao YJ. Rapid Detection of IgM Antibodies against the SARS-CoV-2 Virus via Colloidal Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Assay. *ACS Omega*. 2020; 5: 12550-12556.
- Kakodkar P, Kaka N, Baig M. A Comprehensive Literature Review on the Clinical Presentation, and Management of the Pandemic Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Cureus*. 2020; 12: e7560.
- Layqah LA, Eissa S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. *Microchim Acta*. 2019; 186: 224.
- Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM - IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. 2020; 92: 1518–1524. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>.
- Machado BAS, Hodel KVS, Barbosa-Júnior VG, Soares MBP, Badaró R. The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: An Overview Based on the Literature. *Viruses*. 2021; 13: 40. <https://doi.org/10.3390/v13010040>.
- Mattiuzzi C, Henry BM, Lippi G. Making sense of rapid antigen testing in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) diagnostics. *Diagnosis*. 2021; 8(1): 27–31.
- McNeil, S. E. Nanotechnology for the biologist. *Biol*. 2005; 78: 585-594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205074>
- Moitra P, Alafeef M, Dighe K, Frieman MB, Pan D. Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano*. 2020; 14(6): 7617–7627. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03822>.
- Oliveira KG de, Estrela PFN, Mendes G de M, Santos CA dos, Silveira-Lacerda E de P, Duarte GRM. Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with end-point visual detection. *Analyst*. 2021; 146: 1178-1187.
- Organización Mundial de la Salud. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. 2020. [Consultado en mayo 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
- Palaz F, Kalkan AK, Tozluyurt A, Ozsoz M. CRISPR-based tools: Alternative methods for the diagnosis of COVID-19. *Clin Biochem*. 2021; 89: 1–13.

- Pan Y, Li X, Yang G, Fan J, Tang Y, Zhao J. et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *Journal of Infection*. 2020; 81: e28–32.
- Pavlova IP, Nair SS, Kyprianou N, Tewari AK. The Rapid Coronavirus Antibody Test: Can We Improve Accuracy? 2020; 7: 569. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00569>.
- Petryayeva E, Krull UJ. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review. *Analytica Chimica Acta*. 2011; 706: 8–24.
- Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. A Comparative Overview*. *Explor Law Succession Studies Natl Hist Comp* 2012: 1–26.
- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*, 2012; 112(5), 2739–2779. https://doi.org/10.1021/cr2001178*****
- Shetti NP, Mishra A, Bukkitgar SD, Basu S, Narang J, Raghava Reddy K, et al. Conventional and Nanotechnology-Based Sensing Methods for SARS Coronavirus (2019-nCoV). *ACS Appl. Bio Mater*. 2021; 4: 1178–1190. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01545>.
- Strambeanu N., Demetrovici L., Dragos D., Lungu M. Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties. En: Lungu M., Neculae A., Bunoiu M., Biris C. (eds) *Nanoparticles' Promises and Risks*. Springer, Cham. 2015. p. 3-8.
- Ventura BD, Cennamo M, Minopoli A, Campanile R, Censi SB, Terracciano D, et al. Colorimetric test for fast detection of SARS-COV-2 in nasal and throat swabs. *ACS Sensors*. 2020; 5: 3043–3048. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01742>.
- WHO. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays Interim guidance, 11 September 2020. *World Heal Organ* 2020: 1–9.
- Yakoh A, Pinyorosphatum C, Siangproh W, Chailapakul O. *Biomedical Probes Based on Inorganic Nanoparticles for Electrochemical and Optical Spectroscopy Applications*. 2015; 15: 21427-21477.
- Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Koga M, Akasaka O, Nakachi I, Koh H, et al. Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19. *Viruses*. 2020; 12: 1420. <https://doi.org/10.3390/v12121420>.
- Yang D. Application of Nanotechnology in the COVID-19 Pandemic. *International Journal of Nanomedicine*. 2021; 16: 623–649.
- Zhang Y, McKelvie ID, Cattrall RW, Kolev SD. Colorimetric detection based on localised surface plasmon resonance of gold nanoparticles: Merits, inherent shortcomings and future prospects. *Talanta*. 2016; 152: 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.015>.
- Yeh, YC., Creran, B, Rotello, VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012; 4: 1871–1880.