



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULARES DEL CORONAVIRUS SARS-COV-2

Directoras

Lorena García Hevia
Laura Miralles López

Tesis Doctoral presentada por **Alexis Dorta Gorrín**

Santander, 2024

Dña. Lorena García Hevia, investigadora Juan de la Cierva incorporación del departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y Dña Laura Miralles López, profesora Ayudante Doctora del Área de Genética de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN: Que D. Alexis Dorta Gorrín ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Evaluación de métodos de detección moleculares del coronavirus SARS-CoV-2”

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria. Por tanto, se emite la conformidad para que esta memoria sea presentada y tenga lugar, posteriormente, la correspondiente Lectura y Defensa. Y para que conste y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Santander, a 06 de febrero de 2024.

Fdo.

Dra Lorena García Hevia

Dra Laura Miralles López

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a:

- “Desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos del coronavirus SARS-CoV-2 mediante técnicas de amplificación isotérmica” del Instituto de Investigación Sanitaria (IDIVAL). Proyecto de Innovación y Transferencia Regional (INNVAL 20/22, IDIVAL).

- Ecohydros S.L. Empresa especializada en procesos de ecología avanzada del agua.

- “Formulación de bacteriófagos como liposomas y nanopartículas con aplicación potencial al tratamiento de infecciones de pacientes de fibrosis quística” de la Fundación Mutua Madrileña. Proyecto de Investigación.

.

AGRADECIMIENTOS

Aquí estamos después de todo. Resulta complicado honrar y agradecer a todos los que formaron parte de este proceso como merece. Un proceso de aprendizaje que, como todo, tuvo sus altos y sus bajos y pone a prueba la fortaleza, la resistencia y esa palabra que es tan poco comprendida y se dice tanto como es la resiliencia.

Primero he de agradecer a mis directoras de tesis, a Lorena por “rescatarme”, que más que rescatarme, me enseñó el camino que tenía que seguir y me dio los medios para conseguirlo y sin ella no habría sido posible. Gracias por tu infinita paciencia, tu dedicación y tu esfuerzo y en la nueva etapa te deseo mucho bienestar y éxito. También a ti Laura, que has estado desde prácticamente el principio y me has dado aliento y apoyo cada vez que lo necesitaba. Gracias también por tu paciencia, por estar hasta el final y ayudarme en lo necesario para concluir esta etapa. No sé cómo expresar mi profundo agradecimiento a ambas.

Gracias a los profesionales y magníficas personas que conforman el Servicio de Microbiología del hospital como Mónica Gozalo y Jorge Calvo, a los que he recurrido de forma constante a lo largo de estos años y he discutido distintos aspectos de la investigación referente a este y otros proyectos. Gracias por su profesionalidad y estar siempre dispuestos a ayudarme. Gracias también a Agustín Monteoliva, de la empresa Ecohydros S.L. por apostar en su momento en este proyecto y sentar las bases de lo que hoy he conseguido. La colaboración de ellos ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto.

Gracias a aquellas personas han sido mis compañeros de laboratorio de forma eventual y aquellos compañeros actuales del grupo de nanomedicina como Danilo, Baruc, Diego, Elena, Débora, Lourdes, Ana, Carlos. De todos he aprendido algo y gracias por su compañía y ánimo en las distintas etapas.

Gracias también a Marisa y Jorge por atender a mis constantes preguntas y peticiones, que más de una vez me han servido de guía a lo largo del doctorado.

Gracias a mi círculo de amistades tanto aquí como allá, a Eva, Estefi, Lidia, Lisbel, Senia, Ayoze... por aguantar innumerables horas de debate y chapa. Sois la resistencia. De verdad que gracias por estar ahí y de ser una fuente de risas y de desconexión tan grande.

También he de agradecerle a Diego por ayudarme en aquellos momentos de mayor oscuridad y a Fer, que fue una fuente de inspiración, admiración y apoyo. Se que el éxito de esta etapa lo hará genuinamente feliz, al igual que me hace feliz a mí su buena estrella.

No puedo terminar estas palabras sin agradecer la familia que tengo. Son mi pilar fundamental. Esa familia que se esfuerza cada día por comprender qué hago y me apoyan. Siempre cuentan los días para verme, me preguntan cuando vuelvo y no pueden hacerme sentir más orgulloso. Mis hermanos, que los adoro y que están empezando a abrir su propio camino. Mis logros se cimentan en ustedes y gracias a ustedes las cosas son más llevaderas.

Si no lo pongo, no va a haber quien les aguante;
mamá, papá, los quiero.

INDICE

ABREVIATURAS	17
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE TABLAS	22
1. INTRODUCCIÓN.....	29
1.1. Origen del coronavirus SARS-CoV-2	29
1.2. Diversidad biológica de los coronavirus	35
1.3. Taxonomía, estructura y genoma	38
1.4. Ciclo viral del SARS-CoV-2	39
1.5. Variantes del coronavirus.....	41
1.6. Transmisión del coronavirus SARS-CoV-2	44
1.7. Parámetros estadísticos del uso de las pruebas diagnósticas	46
1.8. Herramientas diagnósticas de la infección por el coronavirus	49
1.8.1. Técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos (NAATs): RT-qPCR	51
1.8.2. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs): Técnicas isotérmicas	53
1.8.3. Técnicas de detección de proteínas virales: Test de antígenos	56
1.9. Pruebas en el punto de atención (<i>Point-Of-Care Testing</i>)	58
2. OBJETIVOS	63
Objetivo principal e hipótesis	63
Objetivos específicos	63
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
3.1. Muestras de SARS-CoV-2	69
3.1.1. Descripción de las muestras de SARS-CoV-2 atendiendo al valor de Ct	69

3.1.2. Descripción de las muestras de SARS-CoV-2 atendiendo a las variantes	71
3.2. Extracción del ARN viral.....	71
3.3. Diseño de cebadores.....	73
3.4. RT-PCR convencional del SARS-CoV-2	75
3.5. RT-qPCR mediante el termociclador portátil de muestras clínicas.....	76
3.5.1. Sensibilidad y límite de detección del termociclador portátil.....	77
3.5.2. <i>Pooling</i> y detección mediante termociclador portátil	78
3.5.3. Monitorización de las enfermedades infecciosas usando el termociclador portátil.....	78
3.6. Test de antígenos.....	79
3.7. Técnicas de amplificación isotérmica (RPA)	80
3.7.1. Protocolo básico de RPA.....	80
3.7.2. Optimización de RPA en función de distintos parámetros.....	81
3.7.2.1. Retrotranscripción seguida de amplificación por recombina- polimerasa (RT-RPA).....	81
3.7.2.2. En función de la temperatura y de los cebadores.....	81
3.7.2.3. En función del tiempo.....	82
3.7.2.4. En función de la concentración de acetato de magnesio.....	82
3.7.2.5. En función del volumen.....	82
3.7.2.6. Diseño y <i>screening</i> de cebadores adecuados para RPA.....	82
3.7.2.7. Adición de aditivos.....	83
3.7.2.8. Pretratamientos	83
3.7.2.9. Multiplexado de RPA	84
3.8. Análisis de muestras clínicas mediante RPA	84
3.9. Reactividad cruzada	84
3.10. Análisis estadístico	85
3.11. Secuenciación	85

4. RESULTADOS	89
4.0. Revisión de los métodos de diagnóstico basados la amplificación de ácidos nucleicos	89
4. Parte I. Desarrollo inicial.....	89
4.I.1. Diseño de cebadores específicos para la detección de SARS-CoV-2	89
4.I.2. RT-PCR convencional de SARS-CoV-2	92
4. Parte II. Validación de la RT-qPCR portátil.....	93
4.II.1. Análisis preliminar por RT-qPCR mediante el termociclador portátil.....	93
4.II.2. Sensibilidad y límite de detección	97
4.II.3. <i>Pooling</i> usando el termociclador portátil.....	100
4.II.4. Monitorización de las enfermedades infecciosas usando el termociclador portátil.....	101
4. Parte III. Rendimiento analítico de métodos de diagnóstico molecular	102
4.III.1. RT-qPCR mediante el termociclador portátil de muestras clínicas	102
4.III.1.1. Reactividad cruzada usando el termociclador portátil y especificidad	109
4.III.1.2. Estimación de los parámetros estadísticos de la RT-qPCR portátil	109
4.III.2. Test de antígenos	111
4.III.2.1 Especificidad y reactividad cruzada en test de antígenos	114
4.III.2.2. Estimación de parámetros estadísticos de los test de antígenos.....	114
4.III.3. Técnicas de amplificación isotérmica (RPA).....	117
4.III.3.1. Optimización de RPA.....	117
4.III.3.1.1 Temperatura.....	118
4.III.3.1.2. Cebadores de PCR	119
4.III.3.1.3. Tiempo de reacción.....	120
4.III.3.1.4. Concentración de acetato de magnesio.....	121
4.III.3.1.5. Cebadores específicos.....	121

4.III.3.1.6. Empleo de aditivos	122
4.III.3.1.7. Pretratamientos	123
4.III.3.2. Multiplexado de RPA.....	123
4.III.3.3. Secuenciación del fragmento de RPA.....	125
4.III.3.4. RPA en muestras clínicas	126
4.III.3.4.1. Reactividad cruzada y especificidad de RPA	128
4.III.3.4.2. Estimación de los parámetros estadísticos de RPA	128
4. Parte IV. Evaluación comparativa de los métodos de diagnóstico.....	130
4.IV.1. Comparación de curvas ROC de RT-qPCR y test de antígenos	130
4.IV.2. Comparación de curvas ROC entre todos los métodos.....	131
5. DISCUSIÓN.....	135
6. CONCLUSIONES.....	147
7. ANEXOS	153
Anexo I. Análisis preliminar por RT-qPCR mediante el termociclador portátil...	153
Anexo II. Experimento de <i>pooling</i>	156
Anexo III. RT-qPCR mediante el termociclador portátil de muestras clínicas.....	157
Anexo IV. Reactividad cruzada y especificidad del termociclador portátil	164
Anexo V. Test de antígenos.....	166
Anexo VI. Reactividad cruzada y especificidad test de antígenos	168
Anexo VII. RPA en muestras clínicas.....	169
Anexo VIII. Secuenciación de fragmento de RPA.....	173
Anexo IX. Reactividad cruzada y especificidad de RPA	174
8. BIBLIOGRAFÍA.....	179
9. PUBLICACIONES.....	199

ABREVIATURAS**3CL^{pro}**

proteasa viral como la quimotripsina

ACE2

enzima convertidora de angiotensina II

ADN

ácido desoxirribonucleico

ARN

ácido ribonucleico

AUC

área bajo la curva

BAL

lavado broncoalveolar

CatB/L

catepsina B/L

CDC

Centro de Control y Prevención de Enfermedades (del inglés *Center for Disease Control and Prevention*)

cDNA

ácido desoxirribonucleico

complementario

CFR

tasa de letalidad (del inglés *Case Fatality Rate*)

CoV

coronavirus

COVID-19

enfermedad causada por SARS-CoV-2

CRISPR

repeticiones palindrómicas cortas
agrupadas y regularmente Inter
espaciadas

Ct

umbral de ciclo (del inglés *Cycle threshold*)

CT

tomografía computarizada

DTT

ditiotreitól

E

Envoltura

(E)

especificidad

ECDC

Centro de Control y prevención de enfermedades europeo

EUAs

autorizaciones de emergencia

FDA

Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (del inglés *U.S. Food & Drug Administration*)

FN

falso negativo

FP

falso positivo

GD/GX pangolín-CoV

coronavirus aislados del pangolín de los mercados de Guangdong y Guangxi (China)

GISAID

Iniciativa internacional para compartir de datos genómicos de la gripe y el SARS-CoV-2 (del inglés *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*)

HCoV-HKU1

coronavirus humano HKU1

IFR

tasa de mortalidad específica (del inglés *Infection Fatality Rate*)

IgG

Inmunoglobulina G

IgM

Inmunoglobulina M

(J)

índice de Youden

κ

coeficiente kappa de Cohen

LAMP

amplificación isotérmica mediada por bucle (del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*)

LoD

Límite de detección (por sus siglas en inglés *Limit of Detection*)

MERS-CoV

coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio

NAATs

técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (en inglés *Nucleic Acid Amplification Tests*)

NIH

Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (del inglés *National Institute of Health*)

nsps

proteínas no estructurales

ODS

razón de probabilidades diagnóstica (del inglés *odds-ratio diagnostic* denominada también como DOR)

OMS (WHO)

Organización Mundial de la Salud

ORF

marco abierto de lectura

pb

pares de bases

PDCoV

deltacoronavirus porcino

PHEIC

emergencia de salud pública de preocupación internacional

PHEV

virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina

PLpro

proteasa como la papaína

pp1a/pp1b

poliproteínas derivadas de la traducción directa del ARN viral

RATG13

betacoronavirus que infecta al murciélago *Rhinolophus affinis*

RBD

dominio de unión al receptor (por sus siglas en inglés *Receptor Binding Domain*)

rCoV

coronavirus relacionados a

RdRp

RNA polimerasa dependiente de RNA

REASSURED

conectividad real, asequible, específico, sensible, fácil de usar, robusto, rápido, libre de equipamiento y disponible para el usuario final

RhSTT182/200

coronavirus de murciélagos provenientes de Camboya

RhV

rinovirus

RmY0N2

coronavirus proveniente de murciélagos malayos

ROC

Característica operativa del receptor (del inglés *Receiver-Operating-Characteristic*)

RPA

amplificación mediada por una recombinasa polimerasa (del inglés *Recombinase Polymerase Amplification*)

RTC

complejo replicasa transcriptasa

RT-qPCR

retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa

(S)

Sensibilidad

S

Spike

SADS-CoV

coronavirus causante de la diarrea aguda del cerdo

SARS-CoV

coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo tipo I

SARS-CoV-2

coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (COVID-19)

sgRNA

ARN subgenómico

ssRNA+

ARN monocatenario de polaridad positiva

Pe

concordancia esperada por el azar

Po

concordancia observada

POCT

técnica diagnóstica en el sitio de la toma de muestra (del inglés *point-of-care testing*)

TAG-VE

grupo consultivo técnico sobre la evolución del SARS-CoV-2 (*Technical Advisory Group of SARS-CoV-2 Viral Evolution*)

TC

tomografía computarizada

TMPRS22

serín-proteasa transmembrana de tipo II

TRS

región reguladora transcripción

VN

verdadero negativo

VOCs

variantes de preocupación (del inglés *Variants-of-concern*)

VOIs

variantes de interés (del inglés *Variants of interest*)

VP

verdadero positivo

VPN

valor predictivo negativo

VPP

valor predictivo positivo

VRS

Virus respiratorio sincitial

VUMs

variantes bajo monitorización (del inglés *Variants-under-monitoring*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético del SARS-CoV-2 con respecto a otros coronavirus	33
Figura 2. Estructura genómica y molecular del SARS-CoV-2	39
Figura 3. Esquema del ciclo viral de SARS-CoV-2	40
Figura 4. Ejemplo de curvas ROC	48
Figura 5. Evolución temporal de la infección por COVID-19 y positividad de la prueba	51
Figura 6. Esquema de la amplificación isotérmica LAMP y RPA	55
Figura 7. Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral o test de antígenos	57
Figura 8. Cartucho de extracción <i>M1 Prep Cartridge</i> para la extracción de ARN	72
Figura 9. Termociclador portátil Franklin™	77
Figura 10. Test de antígenos para saliva de autodiagnóstico	79
Figura 11. Reactivos de RPA	80
Figura 12. Gráfico de la fluorescencia	99
Figura 14. Curva ROC de la RT-qPCR mediante el termociclador portátil	111
Figura 15. Curva ROC para los test de antígenos	116
Figura 16. Optimización de la temperatura de reacción	118
Figura 17. Amplificaciones realizadas con distintos cebadores de PCR en RPA	119
Figura 18. RPA a distintos tiempos de reacción	120
Figura 19. Concentración de acetato de magnesio en RPA	121
Figura 20. Contraste del cebador inverso ER4	122
Figura 21. RT-RPA multiplex de los cebadores para los genes E, N, Orfab1 y S	124
Figura 22. RT-RPA de las muestras clínicas de SARS-CoV-2	126
Figura 23. Curva ROC para RPA	129
Figura 24. Comparación de curvas ROC entre la RT-qPCR portátil y el test de antígenos	130
Figura 25. Gráfico de comparación de curvas ROC entre RT-qPCR portátil, antígenos y RPA	131

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de distintas VOIs y VUMs	43
Tabla 2. Clasificación del valor Ct según el tipo de muestra positiva.....	70
Tabla 3. Descripción de los cebadores utilizados.....	74
Tabla 4. Composición de cada mezcla de <i>pooling</i>	78
Tabla 5. Contraste de cebadores diseñados para RPA	83
Tabla 6. Datos de los cebadores diseñados para PCR.	90
Tabla 7. Datos relativos a los cebadores específicos de RPA	91
Tabla 8. Tabla comparativa preliminar de las muestras de saliva	93
Tabla 9. Tabla comparativa preliminar de exudado nasofaríngeo.....	94
Tabla 10. Resultados de los valores de Ct obtenidos para las muestras de exudado proporcionadas al CSIC en el periodo comprendido de enero a febrero de 2.022.	96
Tabla 11. Resultado del experimento de sensibilidad de la RT-qPCR portátil.	98
Tabla 12. Resultados del experimento del límite de detección de RT-qPCR portátil.	99
Tabla 13. Resultados de los experimentos de <i>pooling</i>	101
Tabla 14. Resultados prueba in situ en el HUMV.....	102
Tabla 15. Resultados del termociclador portátil a partir de muestras de exudado	103
Tabla 16. Resultados del termociclador portátil a partir de muestras de saliva	106
Tabla 17. Cuadro de contingencia de los resultados obtenido por RT-qPCR portátil...	110
Tabla 18. Parámetros estadísticos de la RT-qPCR mediante el termociclador portátil.	110
Tabla 19. Resultados obtenidos en los test de antígenos.....	112
Tabla 20. Relación de Cts entre los antígenos, los resultados proporcionados por el HUMV y el termociclador portátil.	114
Tabla 21. Cuadro de contingencia de los resultados obtenido por test de antígenos.....	115
Tabla 22. Parámetros estadísticos obtenidos por test de antígenos.	115
Tabla 23. Resultados de las primeras pruebas de RPA	117
Tabla 24. Resultados de las reacciones de RPA en muestras clínicas.....	127
Tabla 25. Tabla de contingencia de las muestras clínicas para RPA.	128
Tabla 26. Parámetros estadísticos de RPA en este estudio.	129

RESUMEN

La posibilidad de que un coronavirus podría producir un salto inter-especies se conocía, debido a su inestabilidad genómica unida a su probabilidad de recombinación. Este hecho se apoyaba en epidemias precedentes de virus capaces de producir síndromes de distrés respiratorio como SARS-CoV y MERS-CoV. El nuevo coronavirus saltó de los reservorios e intermediarios naturales e infectó al ser humano como una nueva enfermedad emergente. Con una letalidad inusitada, una transmisibilidad alta y una población susceptible avanzó rápidamente a través de un planeta globalizado y obliga a gobiernos, instituciones sanitarias y a la población general a tomar medidas sanitarias en aras de contener la propagación y mitigar sus consecuencias. Los avances científicos y el esfuerzo de sanitarios e investigadores permiten una rápida secuenciación del agente viral, el desarrollo de métodos de diagnóstico y el desarrollo de una vacuna que revierte la situación y permite el final de las medidas de restricción sanitarias bajo una nueva “normalidad”, junto con la adaptación del virus a la población humana. Los hechos acontecidos durante la pandemia y la urgencia de la infección pusieron de relevancia la necesidad de contar con métodos de diagnóstico útiles en el punto de atención del paciente (*point-of-care*), ya que permiten abaratamiento de los costes y rapidez en los resultados. En este trabajo analizamos la evolución de los métodos de diagnóstico del SARS-CoV-2 y como se integran de manera multidisciplinar con otras ciencias y tecnologías. Por otro lado, validamos el posible uso de un termociclador portátil y un kit de detección rápida basado en PCR en el entorno sanitario y su efectividad con respecto a otros métodos de detección rápida como los test de antígenos comerciales. La siguiente etapa fue el desarrollo de un método de detección propio basado en amplificación isotérmica, optimizando las distintas condiciones que pueden afectar al rendimiento de la reacción y probamos su efectividad en muestras clínicas. Con el fin de compararlos entre sí, evaluamos los tres métodos de diagnóstico molecular con utilidad *point-of-care* del SARS-CoV-2 en nuestro entorno y a su vez con la técnica de referencia. Los resultados obtenidos confirman una mayor eficacia general del kit basado en PCR por sus parámetros de rendimiento analítico con respecto a los test de antígenos y el método desarrollado de RPA. No se obtuvieron diferencias significativas de rendimiento entre los test de antígenos y RPA. Avances en este sentido permiten una mayor contención de agentes infecciosos presentes y adaptación a los fenómenos infecciosos posibles futuros.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen del coronavirus SARS-CoV-2

En diciembre de 2019, el gobierno de China reportó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) varios casos de neumonía de etiología desconocida en Wuhan, una ciudad con una población de 11 millones de habitantes en la provincia de Hubei. De los 41 casos iniciales hospitalizados debido a esta neumonía habían tenido exposición directa el 66% en el mercado Huanan, un mercado mayorista de pescado donde se comercializaba también con animales salvajes como zorros rojos (*Vulpes vulpes*), perros mapache (*Nyctereutes procyonoides*), tejones (*Arctonyx albogularis*), etc. Dos años después, con los datos proporcionados por la genómica de los linajes iniciales del SARS-CoV-2 (A y B), la reconstrucción de los casos iniciales y la positividad de muestras ambientales asociadas a carros, jaulas y congeladores donde se concentraba la actividad comercial de vida salvaje en el sudeste del mercado apoyan la evidencia de este comercio como epicentro de la pandemia^{1,2}.

En enero de 2020 el centro de control y prevención de enfermedades (CDC) de China compartió la secuencia genómica del agente etiológico desconocido causante de la neumonía observada. Esta secuencia genómica demostró que estaba próximo al clado SARS-CoV e inicialmente se denominó temporalmente “2019 nuevo coronavirus” (2019-nCoV). El 11 de febrero de 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) renombró al nuevo coronavirus descubierto como coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) en base a su estructura genética y la OMS denominó COVID-19 a la enfermedad causada por este virus³.

La llegada del Año Nuevo Lunar facilitó la diseminación del coronavirus dentro de China, debido a la alta tasa de viajes dentro del país de una provincia a otra por las festividades. El crucero *Diamond Princess* que partió hacia Japón con 3.711 personas a bordo el 1 de Febrero de 2020 reveló información epidemiológica valiosa al constituir un entorno cerrado donde poder medir a todos los integrantes y monitorearlos, describiendo así como de rápido se transmitía el virus, el porcentaje de casos asintomáticos y estimaciones de la gravedad de la enfermedad como la frecuencia de los casos fatales (CFR, por sus siglas en

inglés) y la frecuencia de infectividad fatal (IFR, por sus siglas en inglés). La importancia de estimar tanto el CFR como la IFR radica en estimar la transmisibilidad potencial y virulencia de una enfermedad y permite inferir la intensidad de la respuesta de la Salud Pública. Estos parámetros, contrastados con los que había estimado la OMS permitían a las autoridades de Salud Pública y gubernamentales un mejor manejo del brote infeccioso. El crucero se confinó en aguas japonesas durante dos semanas siendo, en ese momento, el lugar con más casos fuera de China⁴⁻⁶.

En un mes, el coronavirus se diseminó a las 34 provincias chinas de forma masiva, por lo que las autoridades chinas instauraron medidas estrictas de contención sanitaria sin precedentes. La ciudad de Wuhan fue confinada el 23 de enero de 2020 y se bloqueó el acceso mediante transporte a la ciudad, así como la movilidad y las actividades exteriores fueron restringidas durante el transcurso de las próximas semanas⁷.

Ante este escenario, fue declarada por la OMS la epidemia por el nuevo coronavirus el 30 enero de 2020 como emergencia de salud pública y de preocupación internacional (PHEIC, por sus siglas en inglés) como una medida para controlar la situación y desarrollar estrategias para la intervención.

En febrero de 2020, China alcanzó su pico epidémico, pero ya se habían detectado los primeros casos importados en países como Francia, Alemania, Finlandia, Estados Unidos y España. Los países comenzaron a tomar medidas de salud pública como la restricción de vuelos procedentes de China y la entrada a personas inmigrantes o quienes podían tener riesgo de transmitir el coronavirus. Como medida de control y detección de posibles casos de neumonía por el nuevo coronavirus, se autorizó de emergencia por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) el diagnóstico basado en retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa de forma cuantitativa (RT-qPCR). El protocolo de RT-qPCR fue publicado por el CDC, poniéndose en práctica guía para el manejo clínico de estos casos y aislamiento de personas que tengan síntomas compatibles como fiebre, dificultad respiratoria, tos y que hayan estado en contacto con pacientes positivos^{8,9}.

Ante la rápida difusión del número de casos y la gravedad de la enfermedad, la OMS declara el 11 de marzo de 2020 la pandemia por SARS-CoV-2, con una diseminación de casos confirmados en ese momento de 118.629 a nivel mundial y 4.292 muertes, destacando

China en número de casos y fallecidos y con alta tasa de propagación en el continente europeo. El 2 de abril de 2.020, el número de casos de COVID-19 confirmados se aproximaba al millón, dejando tras de sí 46.891 fallecidos, demostrando la rápida propagación y letalidad del virus¹⁰.

La pandemia debida al coronavirus SARS-CoV-2 ha provocado 580 millones de casos en el mundo y 5,8 millones de muertes según la Organización Mundial de la Salud. Reunida la Asamblea General de las Naciones Unidas a fecha de 22 de septiembre de 2.022, han concluido que la pandemia aún no ha terminado, si bien estamos en una mejor posición desde su punto álgido en enero de 2.021 seguían ocurriendo unas 10.000 muertes semanales atribuidas al coronavirus a pesar de la inmunidad de grupo adquirida por dos tercios de la población mediante la vacunación en el año 2022.

En la Comunidad de Cantabria, según datos proporcionados por el Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecilla, se han realizado 17.201 pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2 entre noviembre de 2.022 y enero de 2.023 hallándose 3.578 pruebas positivas. De este total de casos positivos, se ha realizado un *screening* de variantes del coronavirus a aquellos resultados de RT-qPCR con un Ct (umbral de ciclo del inglés *Cycle threshold*) menor a 30, encontrándose el predominio de la variante Ómicron BA.5 con mutación en R346T, hecho que se comentará más adelante en el apartado de variantes del SARS-CoV-2.

El origen del coronavirus SARS-CoV-2 es polémico. Como dos teorías principales está el origen natural y artificial, que deben ser evaluadas de forma equitativa a pesar de haber generado controversia. Existen múltiples pruebas de distinto origen que apoyan su transmisión zoonótica. Se entiende como transmisión zoonótica, según la OMS, cualquier enfermedad transmitida de animales vertebrados a personas por contacto directo o de forma indirecta a través del agua, alimentos o el medio ambiente.

Entre las pruebas que apuntan hacia su origen zoonótico, el coronavirus SARS-CoV-2 comparte el 96,2% de homología genómica con el coronavirus BatCoV RaTG13 del murciélago *Rhinolophus affinis*¹¹. La probabilidad de que haya surgido desde los murciélagos es muy alta, pero la evidencia descarta que haya sido un fenómeno recombinante reciente, la distancia del genoma del SARS-CoV-2 con respecto a RaTG13 es de un 4% (~1.150 mutaciones) reflejando décadas de divergencia evolutiva¹². Aunque

comparten más de un 95% de homología genómica, el SARS-CoV-2 difiere de RaTG13 en sitios genómicos claves, entre los cuales destaca el sitio polibásico de corte (furina) entre las subunidades S1 y S2 de la proteína Spike, lo cual aumenta su infectividad. Aunque este sitio polibásico no esté presente en otros betacoronavirus, si lo está en coronavirus humanos como HCoV-HKU1 y aislados altamente patogénicos de virus de la gripe aviar^{13,14}. Otros coronavirus encontrados en murciélagos con alta homología con el SARS-CoV-2 son RmY0N2 con un 93,3% de homología genómica general y demostrando inserciones naturales entre S1 y S2, aunque con una menor homología en el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés)¹⁵; RshSTT182 y RshSTT200, virus provenientes de murciélagos de Camboya, también del género *Rhinolophus* pero de distinta especie, teniendo interesantemente más similitud en RBD que RaTG13 pero careciendo de este sitio polibásico, que es clave para la infección en seres humanos¹⁶.

Además, la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) es el mismo receptor de unión a los tejidos humanos que utilizan tanto el SARS-CoV-2 como el SARS-CoV (coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo tipo I) en su ciclo infectivo¹⁷. Los coronavirus infectan a una gran variedad de especies de animales: un amplio espectro de mamíferos como murciélagos, roedores, ocas, ganado, caballos, gatos, pangolines y también se han encontrado en especies de reptiles y aves como pollos, pavos y faisanes. La plétora de coronavirus que existen en la vida salvaje unido a los hábitos del ser humano, que reducen los hábitats de las especies como la urbanización y las prácticas de la agricultura moderna, hacen que las probabilidades de mutación y salto inter-especies de estos virus puedan ocurrir con mayor frecuencia¹⁸.

De hecho, expertos en coronavirus de la tristemente famosa ciudad de Wuhan ya alertaban en 2018, después de los anteriores brotes epidémicos de SARS-CoV y MERS-CoV (coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio), de la existencia de recombinación de coronavirus de murciélagos, de la diversidad de coronavirus de murciélagos y la plasticidad de unión a receptor y de la presencia de anticuerpos en los seres humanos frente a estos, sinónimo de contacto frecuente e infección, alertando de que podría volver a producirse otro salto zoonótico como las anteriores epidemias si no se respetaban las barreras entre los reservorios naturales de la vida salvaje y la sociedad humana¹⁹.

El hospedador intermediario se define como un organismo que se infecta del virus sin ser el hospedador primario u origen y que es capaz de transmitirlo a otros seres vivos como el ser humano²⁰. En el caso del SARS-CoV-2 permanece sin esclarecer. La evidencia científica apunta al pangolín malayo (*Manis javanica*) como posible candidato, al encontrarse dos sublinajes de virus del pangolín con secuencias genéticas en el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés) parecidas al SARS-CoV-2 pero sin ser idénticas. Estos sublinajes se denominaron pangolín-CoV-1 (GD-pangolín-CoV, clado Guandong) y pangolín-CoV-2 (GX-pangolín-CoV, clado Guangxi), haciendo referencia a la provincia de origen de las muestras. El sublinaje pangolín-CoV-1 es más similar al SARS-CoV-2 en residuos clave de RBD que RaTG13, el coronavirus de murciélago. El clado de Guandong (GD-pangolín-CoV) es genéticamente más similar (91,2%) que el clado de Guangxi (GX-pangolín-CoV) (85%)^{21,22}. Las relaciones filogenéticas del SARS-CoV-2 con los distintos virus de murciélagos y pangolines están representados en la *Figura 1*.

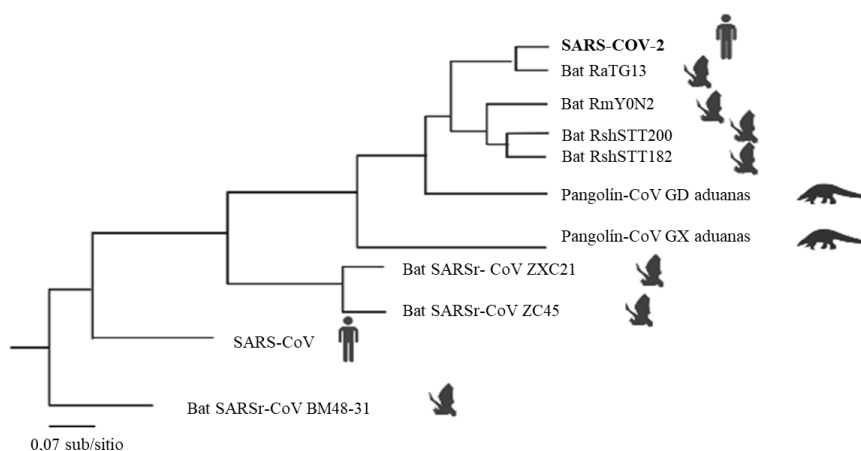


Figura 1. Árbol filogenético del SARS-CoV-2 con respecto a otros coronavirus de murciélagos y pangolines. Adaptado de [Organización Mundial de la Salud (OMS)]²³.

La homología de esta región es muy alta entre el virus del pangolín y el SARS-CoV-2 pero difiere el resto del genoma, por lo que los autores apuntan a que se pudo deber a una evolución selectiva convergente en esta región genómica más que a un escenario de recombinación, pero es difícil establecer y sustentar estas hipótesis en base a estos datos^{24,25}.

Otros investigadores apuntan a que la identidad aminoacídica de pangolín-CoV y SARS-CoV-2 es de 100%, 98,6%, 97,8% y 90,7% en las proteínas E, M, N y S respectivamente, siendo el dominio S1 de RBD idéntico entre ambos virus. Por lo que el pangolín podría actuar como hospedador intermediario y apuntan a un fenómeno recombinante del pangolín-CoV con un virus RaTG13 como origen del SARS-CoV-2²⁶.

La identificación de un posible hospedador intermediario desde el cual el virus produce el salto al ser humano es fundamental para el control de la transmisión de la enfermedad y la emergencia. Así, fueron identificadas infecciones naturales por el SARS-CoV-2 en animales domésticos como gatos, perros y en otros como civetas (mustélidos), tigres, leones, vacas, cerdos. Ciertos países como Dinamarca y Holanda tomaron medidas radicales de sacrificio de granjas de animales donde se dieron casos positivos al coronavirus. Esta actuación se justificó como medida preventiva de la transmisión por hacinamiento, para eliminación de reservorios virales y de fómites contaminados, aunque con mucha probabilidad los visones fuesen infectados a través de la exposición a trabajadores de la granja con la infección y no a la inversa²⁷.

Antes de la detección de casos en el mercado de la provincia de Hubei, unos estudios epidemiológicos apuntan a que el virus pudo haber estado anteriormente en circulación al encontrarse en aguas residuales en Barcelona, en marzo de 2.019, aunque no puede descartarse que pudo tratarse de falsos positivos, ya que una serie de muestras de enero de 2.018 a diciembre de 2.019 fueron negativas²⁸. El análisis de aguas residuales en otros países como Brasil o el estudio serológico de donantes de sangre en Estados Unidos evidenció la detección de muestras positivas en noviembre de 2.019, mucho antes de la primera identificación del primer caso en cada respectivo país^{29,30}.

El origen sintético del coronavirus es dudoso por la comunidad científica debido a la alta similaridad de RBD del SARS-CoV-2 con otros coronavirus. Mediante RBD, que está situado en la proteína Spike (S) del virus, se determina el tropismo viral, es decir, la especificidad del virus para infectar un tipo particular de célula o tejido. La proteína Spike es la responsable de la fusión del virus con las células, liberando su genoma al interior. El último estudio global de la OMS sobre el origen del coronavirus señala la altamente improbabilidad de un origen sintético del coronavirus, por liberación accidental en un traslado del Instituto de Virología de Wuhan cercano al mercado de origen el 2 de diciembre

de 2.019. Las hipótesis de ingeniería genética o liberación deliberada no fueron consideradas, basándose en artículos previos como el de Andersen et al. (2.020)²⁵. Argumentos a favor de este origen es la diferencia evolutiva entre los SARSr-CoV de los murciélagos y los pangolín-CoVs comparados con SARS-CoV-2 y se especuló con el sitio de corte de furina, del cual hay elementos en coronavirus como RmY0N2 y coronavirus encontrados en murciélagos en Tailandia como RacCS203 relacionados estrechamente con el SARS-CoV-2³¹. No hay reportes de virus parecidos al SARS-CoV-2 en ningún laboratorio antes de diciembre de 2.019, ni evidencia de alguna incidencia en el traslado del Instituto de Virología de Wuhan, ni actividad de almacenamiento o traslado de coronavirus de murciélago o en la serología con anticuerpos en sangre entre sus trabajadores que evidenciase la infección por SARS-CoV-2 previa.

Otra hipótesis que se barajó fue la introducción del SARS-CoV-2 a través de la cadena de frío de alimentos como una infección alimentaria al mercado de Wuhan, dado que el virus a bajas temperaturas y condiciones óptimas de humedad mantiene su infectividad. La OMS considera esta hipótesis como improbable, distinguiendo fuente de infección primaria de infección por entrada de productos al mercado (origen) de contaminación de productos de cadena de frío que dio lugar a brotes secundarios en 2.020, como por ejemplo en Qingdao, encontrándose el virus en un lote de bacalao importado³². Aunque la transmisión por fómites, es decir, la infección adquirida por el contacto con superficies contaminadas es posible, aunque baja, se cree que los alimentos actuaron como fómites de estos brotes, al haber evidencia de contaminación después del brote de SARS-CoV-2 y no previa a 2.019, cuando el virus no estaba ampliamente circulando.

1.2. Diversidad biológica de los coronavirus

Los coronavirus fueron descubiertos en 1.967 por la investigadora June Almeida y Tyrell al observar al microscopio electrónico epitelio nasal embrionario cultivado e infectándolo con muestras de pacientes con resfriado. Se observaron tres partículas virales que no habían sido descritas anteriormente, morfológicamente parecidas a las partículas encontradas en la bronquitis aviar infecciosa³³. Posteriormente, al reunir las evidencias

suficientes de que podría tratarse de otra familia de virus a las descritas, se denominaron coronavirus debido a las proteínas con forma de espícula que rodeaban la envoltura viral³⁴.

Los coronavirus causan infecciones respiratorias e intestinales en el ser humano. Los síntomas respiratorios van desde el resfriado común hasta los síndromes de distrés respiratorio conocidos como SARS. Se conocen siete tipos de coronavirus que infectan al ser humano: los comunes con síntomas leves o moderados de resfriado, como HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, y los que son capaces de causar enfermedad grave con distrés respiratorio, como SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2. La primera vez que se observó un coronavirus altamente patogénico para el ser humano y con letalidad fue la epidemia de SARS-CoV en 2003. Se identificó al virus o a anticuerpos frente a él en civetas (*Paguma larvata*) y en cuidadores que las manipulaban en mercados de la provincia de Guangdong³⁵. Hasta este momento se aceptaba que la infección de coronavirus por el ser humano (principalmente cepas 229E y OC43) eran infecciones de las vías respiratorias altas y resfriado común, en muy pocos casos derivaba a neumonía³⁶. La tasa de letalidad del brote de SARS-CoV fue del 9%, con un total de 8.096 casos reportados después de julio de 2003, unas 774 muertes en 27 países, de los cuales los más afectados fueron el sureste asiático y Canadá³⁷.

Después se estableció que el hospedador intermediario eran las civetas, que habían sido infectadas por el SARS-CoV a partir de animales salvajes. El reservorio natural de coronavirus tipo SARS (SL-CoV) son los murciélagos, sobre todo el género *Rhinolophus*, encontrándose altos grados de seroprevalencia al SARS-CoV y seropositividad, lo cual es indicativo de que son su reservorio natural³⁸. Aunque no se ha encontrado el progenitor directo del SARS-CoV, el estudio de estos virus en poblaciones de murciélagos en 15 años demuestra que la recombinación del ARN viral es frecuente y que el progenitor directo del SARS-CoV emergió antes de 2.002^{39–41}. Debido a que la transmisión del SARS-CoV era relativamente ineficiente mediante contacto directo con el individuo infectado después del inicio de la enfermedad, se controló el brote en su mayoría con medidas de cuarentena como el confinamiento en hogares y entorno sanitario, aunque se observaron fenómenos de superdiseminación, es decir un individuo infectado es capaz de infectar a múltiples individuos por una alta carga viral o una mejor capacidad de aerosolizar al virus⁴². Desde el descubrimiento del SARS-CoV se aislaron dos nuevos coronavirus NL63 y HKU-1 de

pacientes con infecciones no fatales^{43,44}. Diez años después, emergió otro coronavirus altamente patogénico tipo SARS, el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) que fue aislado de un paciente con neumonía en Arabia Saudí⁴⁵. El brote de MERS-CoV tenía una letalidad de aproximada de 50% al inicio y suponía una amenaza seria. Sin embargo, no se aceleró el brote en 2.013 sino que continuó dándose en casos esporádicos durante todo el año. En abril de 2.014 hubo un brote de 200 casos con 40 fallecidos indicando que el virus había mutado y era más transmisible entre humanos, también los métodos de detección habían mejorado y coincidía con la estación en la que había un mayor nacimiento de dromedarios⁴⁶. El MERS-CoV tiene como hospedador intermediario a dromedarios^{47,48} y se identificó infección por este virus en sueros de dromedarios en 1.983, 30 años antes del brote epidémico, y eran altamente prevalentes en dromedarios de Oriente medio, África y Asia⁴⁹⁻⁵¹. Aunque tampoco se encontró el progenitor directo de MERS-CoV, virus relacionados con MERS-CoV, fueron encontrados en 14 especies de murciélagos de las familias Vespertilionidae y Nycteridae y los fenómenos de recombinación también eran frecuentes entre estos⁵².

El MERS-CoV utiliza el receptor DPP4 (Dipeptidil peptidasa 4, también conocido como CD26), para infectar células humanas, de murciélago, dromedario, conejos y caballos y establecer la infección⁵³. Esta diferencia implica la infección de neumocitos de tipo II y células bronquiales no ciliadas, con preferencia de las vías respiratorias bajas, mientras que SARS-CoV infecta neumocitos de tipo II.

Otros coronavirus que infectan a animales y deben de ser vigilados son el coronavirus causante de la diarrea aguda del cerdo (SADS-CoV) observado en granjas de cerdos de Guandong en 2.017 y tiene capacidad de replicarse en células humanas⁵⁴, el deltacoronavirus porcino (PDCoV) detectado en E.E.U.U. en 2.014⁵⁵, el virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina (PHEV) causantes de graves pérdidas económicas en granjas de cerdos⁵⁶ y otros coronavirus de cánidos y félidos de importancia veterinaria que circulan de forma enzoótica, es decir, entre poblaciones animales de forma estable en el tiempo y que pueden mutar y cruzar las barreras inter-especies.

1.3. Taxonomía, estructura y genoma

El coronavirus SARS-CoV-2 pertenece taxonómicamente al subgénero *Sarbecovirus*, del género *Betacoronavirus*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, de la familia *Coronaviridae*, del suborden *Cornidovirineae*, del orden de los *Nidovirales*, de la clase *Pisoniviricetes*, del filo *Pisuviricota* del reino de los *Orthornavirae* del dominio *Riboviria* según el ICTV (Comité Internacional de Taxonomía Viral)⁵⁷. El virión del SARS-CoV-2 mide aproximadamente 60-140 nanómetros de diámetro y consiste en una envuelta lipídica que rodea una nucleocápside que contiene el genoma viral y varias proteínas estructurales como E (envoltura), N (nucleocápside), M (matriz) y S (Spike). Las proteínas Spike que sobresalen de la membrana del virión son las encargadas del reconocimiento al receptor y del tropismo viral a los tejidos^{17,58}.

Su material genético consta de una cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva (ssRNA+) de longitud de 26-32 kb (29.903 nucleótidos) de manera similar al ARN mensajero celular, con el extremo 5'-cap y poliadenilado en su extremo 3' y que codifica para dos proteínas no estructurales (nsps) denominadas pp1a y pp1ab que son escindidas ambas en varias proteínas no estructurales (11 y 15 nsps, respectivamente) por proteasas virales [nsp3 (PL-pro) y nsp5 (Mpro)]. El genoma viral es usado como molde para la replicación y la transcripción, formándose una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) que reconoce distintas regiones de lectura de los distintos genes no estructurales y se transcriben ARN subgenómicos (sgRNAs). Los diferentes sgRNAs codifican para las distintas proteínas estructurales que van a formar parte del virión conocidas como proteína M (matriz), E (envoltura), S (Spike) y N (nucleocápside) y varias proteínas accesorias, que son al menos seis, pero no está aún clara su expresión. Existen regiones reguladoras de la transcripción conocidas como TRSs que secuencias cortas a 5' de los ORF, que actúan como sitio de reconocimiento de la transcripción por el complejo de la replicasa, iniciando la síntesis de cada sgRNA que servirán luego como molde para la traducción de las distintas proteínas virales por lo que actúan de reguladores de la expresión de las proteínas virales a lo largo del ciclo viral. Cada sgRNA posee su región TRS en 5' y es añadida por el complejo RdRP (probablemente por nsp12) en la cadena de sentido positivo durante la replicación viral. En la transcripción discontinua, que es un fenómeno típico de los coronavirus, RdRP pausa al llegar a cada región TSR de cada sgRNA y cambia de molde

para producir otro sgRNA de diferente ORF. Los sgRNA resultantes, por tanto, están anidados conteniendo TRS previos, y es una manera de coordinar la producción de las distintas proteínas virales y son conocidos como ARNs no canónicos, al seguir una ruta distinta a la típica transcripción. Como ARNs canónicos entendemos aquellos ARNs que siguen una ruta típica de transcripción como el ARN genómico y sgRNAs que codifican para proteínas específicas⁵⁹⁻⁶³. La *Figura 2* representa la estructura genómica y molecular del virión.

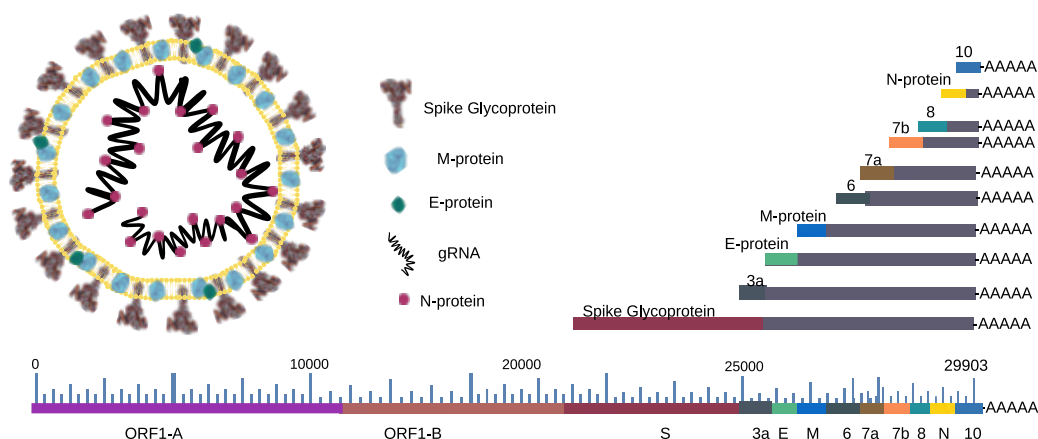


Figura 2. Estructura genómica y molecular del SARS-CoV-2. Representado el genoma completo de 29.903 nucleótidos en la línea basal y el conjunto de ARN subgenómicos en gris. A la izquierda está esquematizada la estructura molecular del virión del SARS-CoV-2⁶⁴.

1.4. Ciclo viral del SARS-CoV-2

El ciclo viral de infección del SARS-CoV-2 comienza con el reconocimiento del receptor ACE2 de la superficie del endotelio respiratorio por parte de la subunidad S1 de la proteína Spike viral y la serina proteasa transmembrana de tipo II, TMPRS22, una proteasa celular que junto con la furina median el corte de la proteína Spike al unirse a ACE2. En ausencia de TMPRS22, SARS-CoV-2 puede usar otras cisteín-proteasas como CatB/L de manera no esencial⁶⁵. Otros receptores propuestos para la mediación de la entrada del SARS-CoV-2 son la neuropilina-1 (NRP-1) que explicaría casos atípicos independientes de la entrada de ACE2⁶⁶. De las tres vías propuestas ACE2/ TMPRS22, ACE2/ furina y CatB/L, la más importante es la ACE2/ TMPRS22 debido a su expresión pulmonar, las otras vías

parecen ser más importantes en otras vías como el epitelio renal o intestinal⁶⁷⁻⁶⁹. Después de la unión del virus al receptor, es endocitado. En el interior de la célula, el virus es rodeado por una vesícula y la fusión de la membrana viral con la membrana citoplasmática por la subunidad S2 de la proteína Spike en los dominios ricos en heptadecapéptido 1 y 2 (HR1 y HR2, respectivamente) permite la liberación del genoma viral en el citoplasma⁷⁰. Una vez liberado el genoma viral de sentido positivo es traducido en las dos poliproteínas pp1a y pp1ab del extremo 5' que son escindidas por proteasa viral como la quimotripsina (3CLpro), proteasa principal (Mpro) y una o dos proteasas similares a la papaína (PLpro)⁷¹. Esta escisión proteolítica da lugar a 16 proteínas no estructurales denominadas nsp1 a nsp16. Estas proteínas son necesarias para formar el complejo replicasa transcriptasa (RTC) en vesículas de doble membrana, complejos de membrana y esférulas pequeñas se replica y sintetiza el conjunto de sgRNAs y el ARN genómico en un microambiente que lo protege. Los ARN subgenómicos se traducen en las proteínas estructurales y las proteínas accesorias y son translocadas al lumen del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, necesario para la glicosilación proteica. Aquí los nuevos viriones son ensamblados y el transporte vesicular permite su liberación al exterior celular por exocitosis^{72,73} (Figura 3).

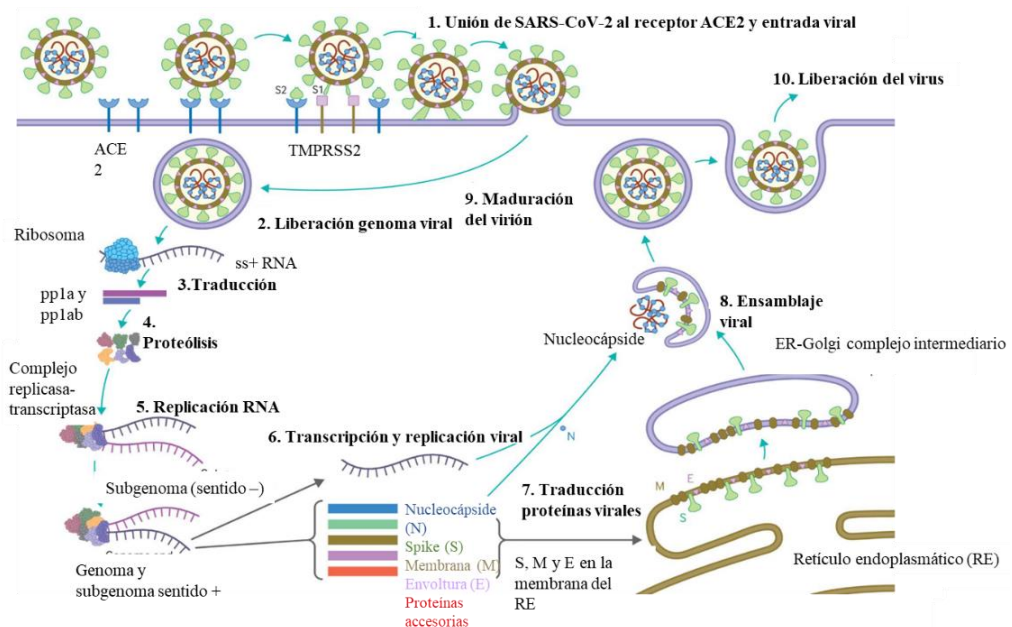


Figura 3. Esquema del ciclo viral de SARS-CoV-2. Adaptado de Cevik et al. 2.020⁷⁴.

1.5. Variantes del coronavirus

Se debe de considerar a las poblaciones virales en términos de cuasiespecies. Se define como cuasiespecie a una estructura poblacional en la que genomas no idénticos, pero estrechamente relacionados están sujetos a continua variación genética, competición y selección⁷⁵. En virus ARN como el SARS-CoV-2 o con intermediarios de ARN, la variabilidad es mayor debido a la propensión de la ARN polimerasa dependiente de ARN a introducir mutaciones, del rango de 10^{-3} a 10^{-6} errores de copia por nucleótido incorporado en la cadena de ARN naciente^{76,77}. La baja fidelidad de la ARN polimerasa, unido a la rápida replicación viral, las grandes poblaciones y los fenómenos de recombinación, y el reordenamiento que exhiben los coronavirus debido a la transcripción discontinua explican su alta diversidad (aunque menor que otros ARN virus debido a la actividad exonucleasa de RdRP, que es correctora de pruebas). Al estar sujetos a la presión selectiva evolutiva surgen la aparición de variantes⁷⁸. La mayoría de las variantes producidas tienen poco o ningún efecto en las propiedades del virus. Sin embargo, algunas mutaciones sí que cambian las propiedades del virus como: su facilidad de transmitirse, la severidad de la enfermedad asociada, el escape inmunológico o la disminución de la eficacia de la vacunación, las herramientas diagnósticas, terapéuticas, preventivas o las medidas sociales. Por ello, en junio de 2020, se establece un grupo de trabajo de la OMS, enfocado en la monitorización y vigilancia de las distintas variantes, el fenotipo y el impacto en las medidas de contención. Este equipo se convirtió luego en el Grupo Consultivo Técnico sobre la Evolución del SARS-CoV-2 (TAG-VE, por sus siglas en inglés). Las distintas variantes se clasificaron en variantes de preocupación (VOCs, por sus siglas en inglés), variantes de interés (VOIs, por sus siglas en inglés) y variantes bajo monitorización (VUMs, por sus siglas en inglés) según el impacto de las mutaciones en el comportamiento viral. Se definen como VOCs, según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades Europeo (ECDC), aquellas variantes con evidencia clara de un mayor impacto en la transmisibilidad, severidad o escape inmunológico y puedan representar un cambio en la situación epidemiológica en Europa; se definen como VOIs aquellas variables en las que hay evidencia genómica, epidemiológica o *in vitro* de que podría haber un impacto en la transmisibilidad severidad o escape inmunológico pero la evidencia es preliminar o hay mayor incertidumbre. Se definen como VUMs aquellas variantes adicionales que, podrían tener características similares a VOCs,

pero la evidencia es débil o no ha sido debidamente evaluada (Fuente ECDC). Las primeras variantes se denominaron según el país de origen, pero luego la OMS determinó que su aparición se denominaría siguiendo el alfabeto griego.

Gracias a bases de datos globales de secuenciación genómica como *Global Initiative of All Influenza Data* (GISAID), Nexstrain y PANGO en los que se depositaron las secuencias, se pudo analizar a tiempo real la aparición de las distintas variantes y su relación filogenética. La variante Ómicron y los distintos sublinajes de Ómicron han sustituido las anteriores variantes (Alpha, Beta, Gamma, Delta). Originalmente descrita en noviembre de 2021, la alta tasa de mutaciones de la proteína Spike incrementó su transmisibilidad, su evasión a la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes⁷⁹. De los distintos sublinajes de Ómicron denominados BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5; BA.2 sustituyó rápidamente al original BA.1 siendo dominante en marzo de 2022 y siendo sustituida en junio de 2022 por BA.4 y BA.5⁸⁰. A fecha del 03 de marzo de 2023 se determinaron los sublinajes de Ómicron BA.2, BA.4 y BA.5 como sublinajes fuera de circulación según la ECDC, a pesar de que, entre noviembre de 2022 a enero de 2023 eran las variantes mayoritarias en nuestro entorno según el Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecilla. En particular el sublinaje Ómicron BA.5 con mutación R346T, una sustitución de arginina por treonina en la región RBD de especial interés científico que señalan como causa de disminución de anticuerpos neutralizantes y aumento de la transmisibilidad⁸¹, lo que demuestra la constante evolución de las variantes del SARS-CoV-2. La *Tabla 1* relaciona los actuales linajes de Ómicron circulantes que se consideran VOIs y VUMs con sus respectivas mutaciones de interés, aunque hay que tener en cuenta que están siendo evaluadas de forma constante conforme evoluciona el SARS-CoV-2.

Tabla 1. Relación de distintas VOIs y VUMs en circulación según la OMS a 21 de abril de 2023 según su denominación con la base de datos Pango, el clado Nexstrain, las mutaciones en Spike (S) de interés y la fecha de evaluación del riesgo. En XBB no se incluyen los sublinajes catalogados como VOIs y VUMs. Las sustituciones de interés en Spike se corresponden con el aminoácido sustituido en primer lugar, seguido de la posición en la cadena de aminoácidos donde ocurre la sustitución y el aminoácido sustituyente, así Alanina (A), Arginina (R), Asparagina (N), Ácido aspártico (D), Cisteína (C), Glutamina (Q), Ácido glutámico (E), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Leucina (L), Lisina (K), Metionina (M), Fenilalanina (F), Prolina (P), Serina (S), Treonina (T), Triptófano (W), Tirosina (Y) y Valina (V). Fuente: Organización Mundial de la Salud⁸².

VOIs			
Linaje Pango	Clado Nexstrain	Características genéticas	Fecha de designación y evaluación del riesgo
XBB.1.5	23A	Recombinante del sublinaje BA.2.10.1 y BA.2.75 resultando en BJ1 y BM.1.1.1, con delección en S1. XBB.1 + S: F486P (con perfil genético de Spike similar a XBB.1.9.1)	24/02/2023
XBB.1.16	23B	Recombinante de los sublinajes BA.2.10.1 y BA.2.75, resultando en BJ1 y BM.1.1.1 XBB.1 + S: E180V, S: K478R y S: 486P	17/04/2023
VUMs			
BA.2.75	22D	BA.2 + S: K147E, S: W152R, S: F157L, S: I210V, S: G257S, S: D339H, S: G446S, S: N460K, S: Q493R reversión	06/07/2022
CH.1.1	22D	BA.2.75 + S: L452R, S: F486S	08/02/2023
BQ.1	22E	BA.5 + S: R346T, S: K444T, S: N460K	21/09/2022
XBB	22F	BA.2+ S: V83A, S: Y144-, S: H146Q, S: Q183E, S: V213E, S: G252V, S: 339H,	12/10/2022

		S: R346T, S: L368I, S: V445P, S: G446S, S: N460K, S: F486S, S: F490S	
XBB.1.9.1	No asignada	Recombinante de BA.2.10.1 y BA.2.75 resultando en BJ1 and BM.1.1.1 XBB.1 + S: F486P (perfil genético de Spike similar a XBB.1.5)	30/03/2023
XBB.1.9.2	No asignada	Recombinante de BA.2.10.1 y BA.2.75, resultando en BJ1 y BM.1.1.1 XBB.1 + S: F486P, S: Q613H	26/04/2023
XBF	No asignada	Recombinante de BA.5.2.3 y CJ.1 (BA.2.75.3 sublinaje) BA.5 + S: K147E, S: W152R, S: F157L, S: I210V, S: G257S, S: G339H, S: 346T, S: G446S, S: 460K, S: F486P, S: 490S	08/02/2023

1.6. Transmisión del coronavirus SARS-CoV-2

La rápida dispersión del SARS-CoV-2 por el planeta y la evolución constante del virus en diferentes variantes está íntimamente relacionado con su modo de transmisión. De manera enzoótica, los coronavirus se transmiten entre poblaciones de animales, los alfa y betacoronaviruses (a los cuales pertenece el SARS-CoV-2) tienen como reservorio natural los murciélagos mientras que los gamma y delta coronavirus tienen como fuente ancestral los pájaros⁸³. Al producirse la zoonosis, es decir, la transmisión de animales a personas, fenómeno que también se determina en inglés como *spillover*, el virus infecta a otro hospedador al cual al principio no tiene una adaptación y provoca una mortalidad elevada. Esto se ha observado en virus zoonóticos de fiebres hemorrágicas como el Ébola, Marburg^{84,85}. El establecimiento de una cadena de transmisión efectiva es un fenómeno complejo que involucra no solo la virulencia viral, sino también la replicación del virus, la inmunidad del huésped y el modo de transmisión. Así, coronavirus previos como el SARS-CoV y el MERS-CoV no se convirtieron en pandemia por varias características diferenciales: ambos necesitaban de contacto estrecho con individuos infectados, mientras

que SARS-CoV-2 tiene una alta transmisibilidad a través de secreciones respiratorias y aerosoles^{86,87}. Aunque SARS-CoV y MERS-CoV tenían una alta mortalidad (10 y 35% respectivamente), eran menos virulentos que el SARS-CoV-2, teniendo esta menor frecuencia de casos fatales, tiene una mayor frecuencia de transmisión. Las medidas de control sanitario funcionaron para el control de los brotes epidémicos de SARS-CoV y MERS-CoV como la pronta identificación y aislamiento de los casos, el rastreo de contactos y las medidas de cuarentena^{88,89}. En el caso del SARS-CoV-2, la distribución global fue facilitada por la alta transmisibilidad del virus, el gran porcentaje de casos asintomáticos y la globalización de la sociedad interconectada.

La principal vía de transmisión del SARS-CoV-2 son secreciones de gotitas respiratorias de las personas infectadas que producen al toser, hablar o estornudar^{90,91}. Las gotas producidas al hablar o toser se pueden dividir en distintos tamaños desde nanómetros a micras, influyendo su tamaño en su comportamiento. Así las gotas de tamaño mayor de 100 micras impactan en el suelo a unos 2 metros del emisor, las de menor tamaño se consideran aerosoles y permanecen en el aire unos segundos y alcanzan distancias mayores, incluso ser inhaladas en ausencia del emisor. De estas gotas menores a 100 micras, el tamaño de 15 a 100 micras alcanzaría las vías respiratorias altas, de 5 a 15 micras las vías respiratorias bajas y menores a 5 micras llegarían hasta los alveolos pulmonares. Estas secreciones contendrían al virus y pueden ser inhaladas por personas cercanas o depositarse en superficies actuando como fómites, donde el virus permanece con capacidad infectiva durante un tiempo⁹²⁻⁹⁴. El contacto estrecho con una persona que presenta la infección o el contacto de superficies contaminadas y posterior contacto con mucosas como ojos, nariz o boca puede resultar infectivo. En ciertas condiciones, el virus puede transmitirse por el aire como espacios cerrados, con pobre ventilación y gran cantidad de gente⁹⁵.

La transmisión fecal-oral es dudosa, aunque se ha documentado la presencia del virus en aguas residuales debido al aclaramiento y se ha usado como forma de monitorizar la infección, debido a que su concentración es proporcional al aumento de casos (denominadas “olas”)^{96,97}, la infección *in vitro* con virus procedentes de estas aguas en algunos casos es posible y en otros no ocurre^{98,99}.

Con respecto a la transmisión vertical, referida a la transmisión de una enfermedad de la madre al hijo durante el embarazo o el momento del parto, se han encontrado evidencias de

recién nacidos con síntomas de COVID-19, con PCR positiva y gran expresión de proteínas virales en la placenta, probablemente producida por células mononucleares fetales infectadas¹⁰⁰. Si bien esta vía es posible, no se ha podido descartar que la infección se debiese al contacto estrecho con la madre, y esto no ocurre de forma mayoritaria¹⁰¹.

Estudios a gran escala descartan la lactancia, la vía parenteral y la vía sexual como vías de transmisión para la COVID-19. Aunque se haya encontrado al virus en fluidos biológicos, la posible infección puede deberse al contacto estrecho¹⁰²⁻¹⁰⁵.

1.7. Parámetros estadísticos del uso de las pruebas diagnósticas

Antes de definir las herramientas diagnósticas para la detección del coronavirus, es necesario establecer los parámetros estadísticos en los que se apoya el uso de una prueba diagnóstica y que sirven para decidir en qué momento usar la prueba, dentro del contexto clínico del paciente¹⁰⁶.

Uno de los parámetros más importantes usados es la **sensibilidad (S)**, que es la probabilidad de que una prueba determine que un individuo tenga una determinada enfermedad o condición, teniendo el individuo dicha enfermedad o condición. Si la prueba no detecta la enfermedad en un individuo que realmente la tiene, esta persona se considera un **falso negativo (FN)**. Se calcula dividiendo los verdaderos positivos (VP) entre VP+FN.

$$(S) = VP / VP + FN$$

Otro parámetro muy utilizado es la **especificidad (E)**. La especificidad se define como la capacidad de una prueba de excluir una enfermedad o condición cuando el individuo no tiene esa enfermedad o condición. Si la prueba da positivo y el individuo no posee la enfermedad o condición estamos ante un **falso positivo (FP)**. Se calcula como verdaderos negativos (VN) entre el total de negativos (VN+FP).

$$(E) = VN / VN + FP$$

Teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad, es decir, la totalidad de casos de una afección/condición en un momento determinado, la precisión de las pruebas se establece con los valores predictivos. Así, se determina el **valor predictivo positivo (VPP)** como el porcentaje de personas con una prueba positivo que realmente poseen la enfermedad o condición y se calcula como:

$$VPP = VP / VP + FP$$

Como **valor predictivo negativo (VPN)**, al contrario, es aquel porcentaje de personas que, teniendo una prueba negativa, no poseen la enfermedad o condición. Se calcula como:

$$PN = VN / (VN + FN)$$

Asumiendo que el resto de los factores que influyen en la realización de una prueba permanecen constantes, el VPP aumenta conforme lo hace la prevalencia¹⁰⁷. La definición de **exactitud** de una prueba diagnóstica es la probabilidad de que el resultado de una prueba prediga correctamente la presencia o ausencia de la condición o enfermedad para el que está diseñado. Se calcula como:

$$\text{Exactitud: } (VP + VN) / \text{Total de casos}$$

Otros parámetros estadísticos que tienen en cuenta la probabilidad preprueba y post-prueba es la **razón de máxima verosimilitud** o *likelihood ratio*; que existe en sentido positivo (**LH+**) es la probabilidad de dividir la fracción de los verdaderos positivos entre la fracción de falsos positivos (1-especificidad). Se calcula como:

$$LH+ = (S) / (1 - (E))$$

La razón de máxima verosimilitud en sentido negativo (**LH-**) es el cociente de los falsos negativos (1-S) entre la fracción de verdaderos negativos. Se calcula como:

$$LH- = 1 - (S) / (E)$$

El cálculo de la **odds-ratio diagnóstica (ODS)** es la probabilidad de que un individuo enfermo dé positivo frente a la probabilidad de que un individuo sano dé negativo. Expresado matemáticamente es:

$$ODS = (VP / FN) / (VN / FP)$$

El valor 1 en la ODS significa que la prueba no tiene capacidad discriminatoria. $ODS > 1$ indica que la prueba si discrimina entre sanos y enfermos y es mejor cuanto mayor es su valor. Valores entre 0 y 1 no solo indican que la prueba no discrimina bien, sino que clasifica erróneamente, dando más valores negativos entre enfermos que entre los sanos.

Es de relevancia igualmente para las técnicas diagnósticas el **índice de Youden (J)**. El índice de Youden es un parámetro estadístico que se basa en la sensibilidad y especificidad de la prueba, dando una medida única de la capacidad discriminativa de la prueba. El índice de Youden se calcula como:

$$J = (\text{Sensibilidad} + \text{especificidad}) - 1$$

El coeficiente **Kappa de Cohen (κ)** explica la concordancia observada coincide con la que ocurriría por puro azar. Valores positivos señalan mayor concordancia que la que se esperaría por azar. Si el resultado fuera 1, se trataría de una concordancia perfecta. Si κ toma un valor negativo, significa existencia de discordancia, que solamente en una tabla de 2x2, podría llegar hasta -1, lo que señalaría una discordancia total entre las dos clasificaciones o evaluaciones¹⁰⁸.

Se calcula como $\kappa = (Po - Pc) / (1 - Pc)$

Po= concordancia observada

Pc= concordancia esperada al azar

A menudo junto con el índice de Youden se construyen **curvas ROC** (Característica Operativa del Receptor, por sus siglas en inglés) y enfrenta en el eje x la fracción de falsos negativos (1-especificidad) con la sensibilidad en el eje y en todos los posibles puntos de corte de la prueba, generándose un gráfico en diagonal y curva con un área específica bajo la curva (AUC). Se puede definir AUC como la probabilidad de clasificar correctamente a dos individuos siendo uno sano y el otro enfermo. Si la prueba fuese perfecta, AUC sería igual a 1, es decir, habría una separación perfecta entre casos positivos y negativos, oscilando AUC entre 0,5 y 1, siendo más discriminativa la prueba cuanto más próximo esté su valor a 1 e igual a 0,5 no tendría valor diagnóstico. (Figura 4)^{106,109,110}.

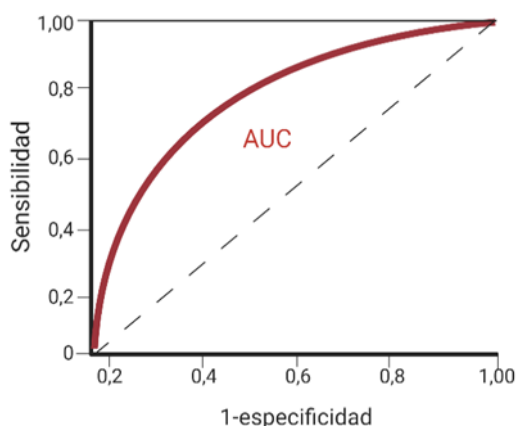


Figura 4. Ejemplo de curvas ROC. El área entre el gráfico y la diagonal se conoce como región AUC, siendo la línea diagonal la de no-discriminación de la prueba diagnóstica (AUC= 0,5). Adaptado de Cerda y Cifuentes (2.012)¹¹¹.

1.8. Herramientas diagnósticas de la infección por el coronavirus

Como cualquier enfermedad emergente, al inicio de la neumonía de etiología desconocida, el diagnóstico se basaba en la sintomatología y en hallazgos radiológicos en la tomografía computarizada (CT). La forma frecuente de presentación eran opacidades en el pulmón en forma de consolidaciones y opacidades de vidrio deslustrado, de forma bilateral y periférica y que, junto con la clínica, podían ser indicadores de gravedad y evolución de la enfermedad^{112,113}. Las pruebas moleculares de PCR eran dirigidas a los CoV de forma genérica de muestras respiratorias, la serología de muestras de suero, unidos a la clínica e historial del paciente, mientras se alentaba a la compartición de datos de secuenciación y al desarrollo de las herramientas diagnósticas^{114,115}. Las primeras secuencias genómicas del SARS-CoV-2 se depositaron en la plataforma GISAID el 10 de enero de 2020, a los pocos días del brote epidémico de Wuhan por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) chino en colaboración con otras instituciones como el Instituto de Salud Pública y el Hospital de Wuhan, junto con las Universidades de Fudan, Shanghai y Sydney y en el foro online especialista Virological. El depósito de las secuencias fue publicado de forma abierta y accesible a toda la comunidad científica, lo que permitió un rápido desarrollo de herramientas diagnósticas, el estudio de la transmisión, patogénesis y el desarrollo de tratamientos y vacunas. Se depositó también en el banco genómico (GenBank) del Instituto Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) bajo el número de acceso MN908947.3^{116–118}. Así, el 23 de enero de 2020, se publicó el primer test de RT-qPCR específico para la detección de ARN de SARS-CoV-2 por investigadores de la Universidad de Charité, (Berlín) en muestras de exudado nasofaríngeo, para detectar el gen E y el gen RdRP¹¹⁹. El protocolo Charité (Berlín) fue adoptado como estándar y utilizado por muchos laboratorios. La importancia de un diagnóstico preciso de una enfermedad con tal alta transmisión y diseminación comunitaria como es la COVID-19, radica en la estrategia seguida por la OMS y establecida en las distintas entidades de Salud Pública de los diferentes países: en detectar, aislar y trazar para un control efectivo de la pandemia y una disminución del riesgo de transmisión^{120–123}.

La interpretación de un método diagnóstico nunca debe ser aislada, siempre debe estar apoyado en la sintomatología para un correcto manejo clínico. El método de elección de detección de SARS-CoV-2 depende de la decisión del clínico y nos da información del

transcurso de la infección. Toda prueba diagnóstica consta de un periodo ventana desde la exposición al agente infeccioso hasta la detección efectiva de dicho agente infeccioso. La longitud del periodo ventana depende del tipo de prueba que está siendo usado y de la respuesta inmune que desarrolla el individuo frente a la enfermedad. Así, el periodo ventana de la RT-qPCR es menor que la serología, detectándose el ARN viral dentro de la primera semana antes del inicio de síntomas y siendo preferible el exudado nasofaríngeo que la PCR en heces. Por otro lado, el aislamiento del virus en el tracto respiratorio es posible al inicio de los síntomas, pero decae rápidamente, el aclaramiento es mayor, sobre todo en personas asintomáticas o con síntomas leves, probablemente por la producción en las mucosas del tracto respiratorio de enzimas y proteínas que puedan degradar al virus junto con la respuesta inmune, la producción de anticuerpos o la activación de células T. La carga viral está relacionada con la evolución de la enfermedad, siendo mayor en aquellos casos más graves y produciéndose antes la detección del inicio de síntomas. La duración de la liberación de partículas virales varía ampliamente entre individuos, dependiendo de varios factores como la severidad de la enfermedad. Por ello, algunos individuos pueden liberar virus durante semanas. La detección por métodos serológicos empieza con la producción de inmunoglobulinas M (IgMs) e inmunoglobulinas G (IgGs), denominada seroconversión, a las dos semanas del inicio de los síntomas, siendo como es natural primero la producción de IgMs de la respuesta inmune humoral y posterior las IgGs de la respuesta inmune celular, dándonos información de la evolución y respuesta del paciente a la enfermedad¹²⁴⁻¹²⁷ (Figura 5).

Los métodos diagnósticos de detección del SARS-CoV-2 podemos dividirlos en detección de ácidos nucleicos (NAATs, por sus siglas en inglés), detección de antígenos, serología y técnicas radiológicas (CT y rayos X). En esta tesis nos centraremos en las pruebas de diagnóstico basadas en la biología molecular como NAATs y detección de antígenos. En los inicios de la enfermedad, cuando las pruebas moleculares aún permanecen negativas, la tomografía computarizada (CT) ha demostrado una alta sensibilidad al diagnóstico de COVID-19. Sin embargo, la especificidad de la CT decae, debido a que las anomalías encontradas en los pulmones pueden deberse a otras enfermedades respiratorias y también requieren de personal experto para su valoración^{128,129}. La serología ha demostrado su utilidad en detectar infecciones pasadas, en estudios de prevalencia en la población y de

vigilancia epidemiológica. La serología es la base para la determinación de la producción o no del individuo de anticuerpos neutralizantes, lo cual es un indicador de la respuesta inmunitaria¹³⁰.

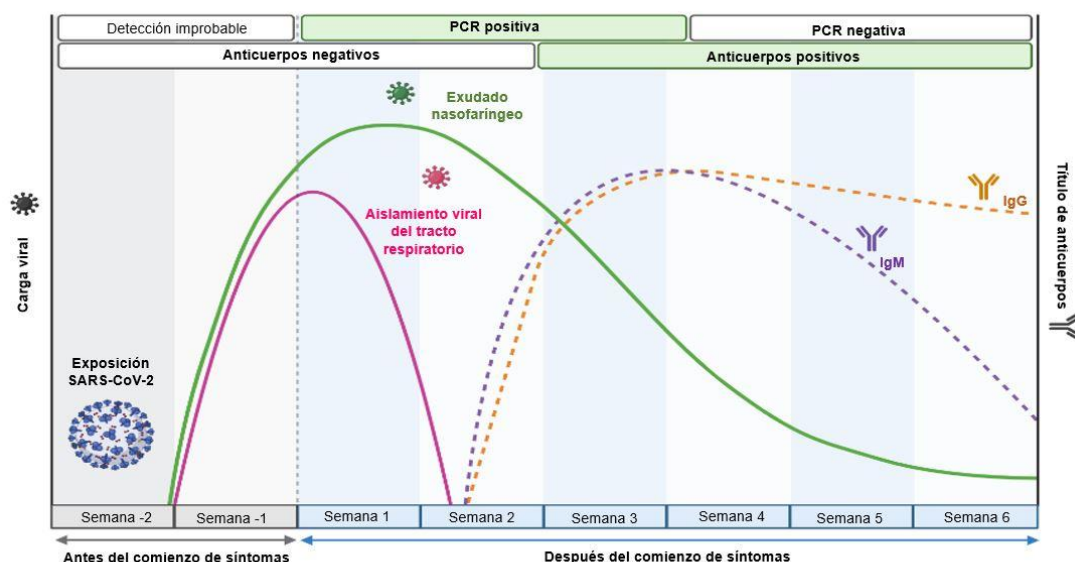


Figura 5. Evolución temporal de la infección por COVID-19 y positividad de la prueba. Adaptado de Sethurman, Jeremiah y Ryo (2.020)¹²⁷.

1.8.1. Técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos (NAATs): RT-qPCR

Se definen como técnicas de amplificación de ácidos nucleicos aquellas que tienen como objetivo la detección de ARN viral. La técnica por excelencia definida por la OMS como *gold standard* para la detección del SARS-CoV-2 es la RT-qPCR, definida en enero de 2.020 poco después de declarar el brote de coronavirus como PHEIC y ya ampliamente usada en clínica. La RT-qPCR es capaz de detectar pequeñas cantidades de ARN viral de muestras de distinta procedencia como exudado nasofaríngeo, lavado broncoalveolar (BAL), saliva con gran sensibilidad y especificidad, al dirigirse específicamente a genes concretos como el gen E, N, ORF1b, S o RdRp, y detectando su amplificación mediante sondas específicas fluorescentes a tiempo real¹³¹. El primer paso de la RT-qPCR es la retrotranscripción (RT) que es la conversión del ARN viral en ADN complementario denominado ADNc (cDNA). A este ADNc se le unirán los primers o cebadores específicos

de la secuencia de interés que se vaya a detectar. Esta unión es reconocida por la polimerasa, que amplificará las secuencias en sentido 5' a 3'. Esta amplificación provocará la hidrólisis de sondas *TaqMan*. Las sondas *TaqMan* son secuencias de oligonucleótidos específicos de los genes de interés que tienen en su extremo 5' un fluoróforo y en su extremo 3' un bloqueador o *quencher* que le impide emitir fluorescencia por sí misma. Al producirse la unión entre la sonda y el ADN diana y la posterior hidrólisis, el fluoróforo se separa del *quencher* y se acumula la fluorescencia, que es medida por un detector. La cantidad de fluorescencia detectada es proporcional al ARN de partida. La progresión de la reacción de PCR nos da un valor denominado Ct o *cycle threshold* que es el número de ciclo a la cual la fluorescencia emitida por la unión de la sonda es superior a la fluorescencia umbral y es medible, lo cual confirma la presencia del ARN específico y es un valor que se relaciona de forma inversamente proporcional a la carga viral, es decir, a mayor carga viral el valor de Ct es menor y se detectará antes en la prueba y a valores de Ct más altos, la carga viral será menor¹³²⁻¹³⁴.

Sin embargo, el valor de Ct debe manejarse dentro del contexto clínico del paciente. Una prueba de RT-qPCR positiva no significa necesariamente que el paciente sea infeccioso, pudiendo detectarse ARN viral hasta después de 5 semanas del inicio de síntomas. Por lo que existe variabilidad intraespecífica, es decir, la misma prueba da resultados diferentes en distintos individuos e interespecífica entre las distintas pruebas de RT-qPCR desarrollados por las distintas casas comerciales. Es por ello por lo que cada laboratorio debe evaluar los puntos de corte de los Cts en relación con la carga viral, lo cual es una importante limitación^{135,136}. En la práctica clínica, se ha estratificado los valores de Ct de la siguiente manera: un Ct menor a 30 se considera altamente contagioso, de 30 a 34 moderadamente contagioso, de 34 a 37 es una zona de indeterminación y mayor a 37 no contagioso como un intento de aclarar anteriores criterios adoptados como que un Ct entre 30 a 35 no tendría capacidad infectiva, aunque deben tenerse en cuenta la variabilidad individual ya mencionada^{133,137,138}. Otras limitaciones de la PCR es la heterogeneidad de la muestra que puede incidir en la carga viral y necesita de personal entrenado tanto para la toma de la muestra como para su realización, necesidad de laboratorios centrales bien preparados para los procesos necesarios de extracción de ARN viral como la PCR que necesitan de equipos aparatosos y costosos, además del automatizado debido al gran número de muestras diarias.

La alta demanda en plena pandemia llevó a que hubiese escasez de reactivos de PCR, aparte de las restricciones en el transporte y almacenaje de las muestras para ser procesadas en los laboratorios y hospitales centrales, tardando días en recibirse los resultados¹³⁹. A pesar de las limitaciones, la RT-qPCR permanece como la técnica de diagnóstico por excelencia por su alta sensibilidad y especificidad y fue crítica en el control de la pandemia de COVID-19.

1.8.2. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs): Técnicas isotérmicas

Se definen las técnicas de amplificación isotérmica aquellas que ocurren a temperatura constante, por lo que evitan la necesidad de un termociclador. Surgen como alternativa a la PCR, con el fin de aprovechar sus fortalezas y solventar sus debilidades y llevan desarrollándose desde 1.990 en combinación con estrategias derivadas de otras disciplinas como la nanomedicina y la microfluídica para mejorar aspectos como la sensibilidad, el coste y la automatización, pudiendo encontrar nichos de aplicación de las técnicas en diagnóstico, bioanálisis, ciencia de los materiales, etc.¹⁴⁰.

La técnica de amplificación isotérmica más conocida es *loop-mediated-isothermal-amplification* comúnmente conocida como LAMP. LAMP se describió en el 2000 por Notomi T.¹⁴¹, el cual señaló diferentes aspectos de la técnica que ofrecían una ventaja considerable con respecto a la PCR como una sensibilidad equiparable con un límite de detección bajo, la posibilidad de detectar también ARN, un menor coste al poder realizarse con un termobloque, estufa o baño maría y mayor simplicidad¹⁴¹. En resumen, RT-LAMP requiere de cuatro a seis pares de cebadores que presentan una complementariedad media entre ellos al amplificar, formando bucles o loops. Estos bucles producen una cascada de amplificación al crear más sitios complementarios. Los resultados se pueden observar con técnicas muy diversas, como electroforesis al terminar la reacción, turbidimetría, colorimetría, colorantes de agentes intercalantes y fluorescencia en tiempo real. Es una técnica muy versátil y es posible adaptarla a entornos de bajos recursos por su equipamiento mínimo. Se han desarrollado varios métodos de detección colorimétrica de SARS-CoV-2 mediante RT-LAMP, por poner ejemplos, realizan la reacción en 30 minutos a 65 °C

independientemente del reactivo de laboratorio¹⁴², o turbidimetría¹⁴³. Desde entonces se han evaluado numerosos estudios, con respecto al SARS-CoV-2 se ha encontrado que RT-LAMP es más sensible que el resto de las técnicas de diagnóstico analizadas (PCR, serología) pero menos específico¹⁴⁴.

De toda la variedad de técnicas de amplificación isotérmica, el interés de esta tesis se centra en la técnica de la recombinasa-polimerasa (RPA, por sus siglas en inglés). Descrita en 2.006 por Piepenburg et al.¹⁴⁵, el proceso inicia cuando la recombinasa *uvrX* se une a los cebadores y al ATP formando un complejo. Este complejo escanea el ADN de la muestra. Al reconocer la secuencia complementaria, se produce un desplazamiento de cadena, que es estabilizado por las proteínas SSB. Por lo tanto, el complejo se desarma y la ADN polimerasa polimeriza las hebras en el extremo 3'. Este proceso ocurre en ciclo en una amplificación exponencial hasta que se consume todo el ATP. El tiempo de la reacción suele ser de 20 minutos¹⁴⁵. En la *Figura 6* se esquematiza tanto LAMP como RPA. RPA ha sido usada ampliamente para la detección de diversos microorganismos bacterianos^{146,147}, virus como el VIH en zonas de bajos recursos¹⁴⁸, parásitos¹⁴⁹, análisis de organismos genéticamente modificados¹⁵⁰, etc., lo cual demuestra su enorme potencial de detección unido a su rapidez y simplicidad. A pesar de las inherentes ventajas que tiene RPA, tiene varias limitaciones que deben ser tenidas en cuenta. Se requiere totalmente una optimización de la reacción debido a la cinética de la misma. La cinética de la reacción se ve afectada, por ejemplo, con el paso de mezcla manual intermedio que es necesario debido a la viscosidad de la mezcla de la reacción, por lo que se recomienda automatizarlo y controlarlo cuidadosamente.

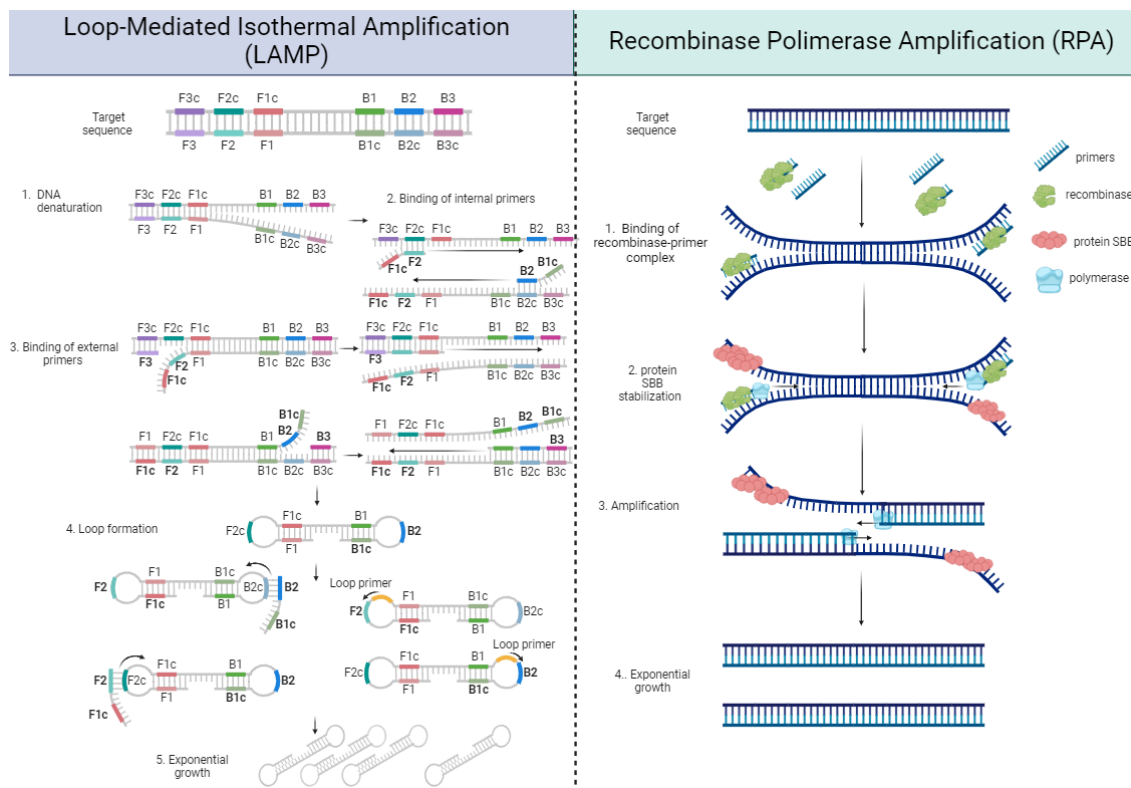


Figura 6. Esquema de la amplificación isotérmica LAMP y RPA. Mientras que LAMP (izquierda) requiere de un mayor número de primers, RPA (derecha) requiere de sólo un par, pero con un mayor número de enzimas implicadas en la mezcla de reacción⁶⁴.

No proporciona un valor de Ct como RT-qPCR sino un umbral de tiempo en el caso de que se mida a tiempo real. La tasa de amplificación de falsos positivos es más alta que otras técnicas isotérmicas. Los colorantes que normalmente se utilizan en qPCR, como las sondas *SYBR Green* o *TaqMan*, no funcionan en las reacciones de RPA, las polimerasas *TaqMan* digieren la hebra desplazada por su actividad de exonucleasa 5'-3'^{151,152}.

La fortaleza de RPA es que podría combinarse con otros sistemas para mejorar la sensibilidad, reducir la tasa de falsos positivos y automatizar las reacciones. Podría acoplarse a una tira de flujo lateral y brindar lecturas visuales como un método cualitativo algo que se ha desarrollado para el SARS-CoV-2¹⁵³ se ha integrado con sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente inter espaciadas conocidas como CRISPR, por sus siglas en inglés¹⁵⁴; en nanosensores¹⁵⁵ como una manera de mejorar

aún más la sensibilidad de RPA, aumentar su especificidad, abaratar los costes y reducir el tiempo de respuesta.

1.8.3. Técnicas de detección de proteínas virales: Test de antígenos

Se conoce como antígeno a cualquier sustancia que es capaz de producir una respuesta inmunitaria al ser reconocida como extraña. Por ello, las proteínas virales como las de cualquier agente infeccioso, actúan como antígeno al ser diferentes y reconocidas por el sistema inmune. Las pruebas de antígenos consisten en un inmunoensayo de flujo lateral, en el que la muestra líquida que contiene el analito de interés se mueve a través del papel por capilaridad a través de varias zonas de tiras poliméricas en las que se unen moléculas que pueden interactuar con el analito. Una tira de flujo lateral típica consta de dos membranas superpuestas que encajan en una base para mejor estabilidad y manejo. En un extremo se añade la muestra (sitio adsorbente) donde se une a sales que actúan de tampón y agentes tensioactivos que garantizan que el analito sea capaz de unirse (conjugarse) con el anticuerpo específico que tiene alguna partícula para su reconocimiento, un fluoróforo u oro coloidal. La muestra junto con el anticuerpo conjugado migra hacia la zona de detección, que suele ser una membrana porosa donde hay en filas de anticuerpos que reconocen esta unión analito anticuerpo y emite una respuesta si el analito está presente en la muestra. Detrás de la zona de detección, respuesta en la línea de control indica el flujo de líquido adecuado a través de la tira. La lectura, representada por las líneas que aparecen con diferentes intensidades, se puede evaluar a simple vista o con un lector¹⁵⁶ (Figura 7).

Típicamente fueron dirigidos hacia la proteína N del coronavirus, ya que es menos variable que Spike. El tiempo de obtención de resultados suele ser de 15 minutos. Aunque han sido desarrollados de manera extensa por diferentes casas comerciales con distinto rendimiento clínico, ofrecen varias ventajas como un costo limitado, capaces de ser implementados rápidamente sin una infraestructura extensa, un tiempo de respuesta corto y alta especificidad en poblaciones con una alta prevalencia de enfermedad. Después de la implementación en una variedad de entornos clínicos, varias publicaciones recientes han descrito las características de rendimiento de las pruebas rápidas de antígenos en relación con las pruebas de ácido nucleico realizadas simultáneamente como método de referencia¹⁵⁷.

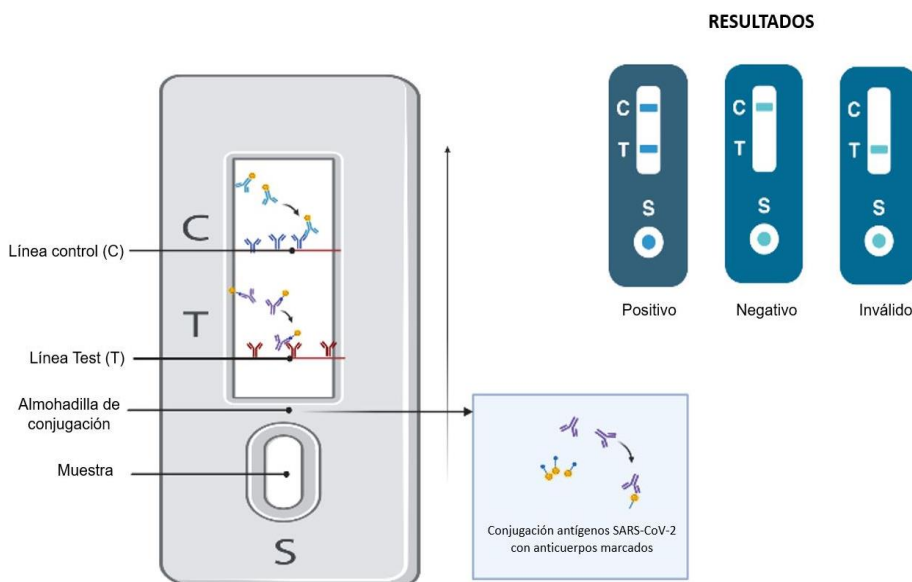


Figura 7. Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral o test de antígenos. La muestra se añade a la almohadilla indicada (*sample pad*) y migra por capilaridad. En la almohadilla de conjugación se une a los anticuerpos específicos marcados. Esta unión será reconocida por otros anticuerpos en la línea de la prueba (T) y otros anticuerpos reconocerán a los anticuerpos sin el antígeno (C), actuando como control de que ha ocurrido el proceso. A la derecha los posibles resultados: positivo: aparición de dos bandas, negativo aparición solo de la banda control. Si no aparece la banda control se considera un resultado inválido y hay que repetir la prueba. Adaptado de Koczula et al. 2016¹⁵⁶.

Se observa que la sensibilidad y especificidad varía entre las diferentes pruebas de antígenos¹⁵⁸, teniendo una mayor especificidad que sensibilidad¹⁵⁹ con un mayor riesgo de falsos positivos en zonas de baja prevalencia, puesto en conocimiento por la FDA (*Food & Drug Administration*) al personal clínico y de laboratorio (FDA 2022). Al ser la sensibilidad menor que la RT-qPCR sobre todo en personas con baja carga viral, una de las estrategias para mejorar esta limitación es repetir la prueba de forma seriada como una forma de compensar esta limitación^{161,162}.

1.9. Pruebas en el punto de atención (*Point-Of-Care Testing*)

Las pruebas en el punto de atención (POCT) son aquellas que se realizan en el lugar de toma de la muestra, al lado del paciente. La OMS ha definido como criterios REASSURED aquellos que serían cumplidos por una técnica POCT ideal. REASSURED es el acrónimo en inglés de conectividad real, asequible, específico, sensible, fácil de usar, robusto, rápido, libre de equipamiento y disponible para el usuario final¹⁶³. Las técnicas POCT más conocidas en el caso del SARS-CoV-2 son las pruebas de antígenos, pero una prueba de embarazo o una tira reactiva de orina también se consideran POCT. Las POCT tienen un objetivo claro de screening de casos, lo cual permite la descentralización de los hospitales centrales. En el contexto de la pandemia, el rol del diagnóstico, rápido, preciso y eficaz ha puesto en relevancia la utilidad en la toma de decisiones clínicas, el control de los casos, aislamiento y establecimiento de medidas de cuarentena, trazabilidad y control de la diseminación de la enfermedad¹⁶³. Las pruebas en el punto de atención (POCT) que utilizan dispositivos de diagnóstico miniaturizados que se pueden usar fuera de los laboratorios en lugares de prueba no tradicionales (farmacias, escuelas, aeropuertos, residencias, empresas, consultorios médicos y para uso doméstico) y se venden como dispositivos de venta libre en tiendas o a través de comercio electrónico¹⁶⁴. La pandemia debida al coronavirus puso de manifiesto la necesidad de diagnóstico rápido para implementar las medidas de prueba, trazar y aislar para controlar la propagación de la enfermedad. Ante este escenario la FDA implementó varias medidas para flexibilizar el diagnóstico el 04 de enero de 2020 para el desarrollo y comercialización de pruebas diagnósticas, como autorizaciones de emergencia (EUA, por sus siglas en inglés). Estas medidas tenían como objetivo ampliar la capacidad de prueba y facilitar la disponibilidad de pruebas de diagnóstico, lo cual permitió a los fabricantes distribuir y usar sus pruebas antes de obtener la aprobación total de la FDA, siempre que cumplieran con ciertos criterios de seguridad, precisión y eficacia. También continuaron monitoreando y evaluando el desempeño de estas pruebas, de hecho, aquellas pruebas de antígenos que no cumplían los estándares de calidad como prueba diagnóstica fueron retirados del mercado. La FDA recomendó que no se usasen las pruebas de antígenos como única herramienta diagnóstica, al ser menos precisas que las pruebas moleculares. Es posible que las pruebas de antígeno de COVID-19 no detecten el virus SARS-CoV-2 en las primeras etapas de una infección, lo que significa que las pruebas poco después de haber

estado expuesto a alguien con COVID-19 podrían generar un resultado falso negativo, especialmente si es asintomático, por lo que recomienda repetir la prueba¹⁶⁵.

El control de la transmisión y aislamiento en la pandemia de COVID-19 supuso un reto científico y de gestión de los sistemas sanitarios. Esta situación favoreció un amplio desarrollo en el ámbito del diagnóstico en términos de sensibilidad, precisión diagnóstica, rapidez y monitorización¹⁶⁶. A los métodos “clásicos” de detección de ácidos nucleicos como la RT-qPCR, serología y test de antígenos, se les unieron métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos como reacciones isotérmicas, CRISPR y enfoques que integran la nanomedicina y la microfluídica como biosensores¹⁶⁷, nanopartículas de oro y partículas nanoplasmonicas^{168,169}, combinaciones de técnicas en chips que utilizan fuerzas centrífugas¹⁷⁰, biosensores capacitivos que detectan la unión eléctrica antígeno-anticuerpo¹⁷¹ e incluso dispositivos basados en papel (μ PADs) capaces de integrarse en mascarillas y detectar antígenos del coronavirus a través de la respiración¹⁷². Estos avances son sorprendentes y permiten una mejor integración con *smartphones* y dispositivos *Bluetooth* en la era de la medicina digital. Sin embargo, no podemos olvidar de que el manejo clínico del paciente no se debe solo a un resultado de una prueba, sino que debemos tener en cuenta la sintomatología y el resto de las evidencias clínicas¹⁷³. La mayoría de esta innovación y de avance diagnóstico difícilmente llega a la “madurez” como para comercializarse en laboratorios y hospitales de referencia, quedando en “pruebas de concepto” porque al reto que supone la técnica en sí misma, se le añaden otros parámetros como el coste, la adaptabilidad, la rapidez, la implementación y producción a gran escala en el mercado entre otras dificultades encontradas por varios autores^{174,175}.

Por ello, es necesario pruebas POCT que cumplan los estándares de las pruebas en el laboratorio en términos objetivos de rendimiento analítico, lo cual es el objetivo general de esta tesis doctoral, la evaluación de técnicas moleculares mediante amplificación isotérmica con técnicas moleculares ya preexistentes como la RT-qPCR usando un termociclador portátil que puede determinar su uso como POCT y test de antígenos ya comerciales para demostrar sus parámetros estadísticos importantes respecto al diagnóstico y contextualizar su utilidad clínica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo principal e hipótesis

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de métodos de diagnóstico del SARS-COV-2 basados en amplificación isotérmica que se puedan ofrecer como servicios o bienes a terceros y que funcionen como pruebas POCT. Como hipótesis de partida planteamos que las pruebas del diagnóstico del SARS-CoV-2 basadas en amplificación isotérmica ofrecían la misma validez que otras pruebas ya existentes en el mercado. Adicionalmente, se planteó que las pruebas evaluadas en esta tesis doctoral podrían usarse como POCT.

Objetivos específicos

Este objetivo principal está dividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Revisión de los métodos actuales de diagnóstico del SARS-CoV- basados en la amplificación de ácidos nucleicos.

2. Validación RT-qPCR mediante termociclador Franklin™. Análisis de ARN viral mediante el kit de RT-qPCR de Biomeme, ensayo de sensibilidad del kit, monitorización de enfermedades crónicas y ensayos de *pooling*.

3. RT-qPCR de muestras clínicas mediante termociclador Franklin™. Analizar un conjunto de muestras clínicas de exudado nasofaríngeo y de saliva de pacientes positivos y negativos de SARS-CoV-2 mediante el kit de Biomeme y compararlo con la RT-qPCR estándar de referencia del Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecilla.

4. Análisis de prueba de antígenos. Este mismo conjunto de muestras se les realizó test de antígenos comercial de autodiagnóstico.

5. Optimización RPA. Análisis de las condiciones de la reacción de RPA de temperatura, concentración de ADN inicial, acetato de magnesio, tiempo, diseño de distintos primers para distintos genes a distintas concentraciones, multiplexado.

6. **Amplificación isotérmica (RPA) de muestras clínicas.** Análisis mediante RPA de un subconjunto de muestras de exudado nasofaríngeo.

7. **Análisis de resultados.** Análisis de datos de las diferentes técnicas para la obtención de los parámetros de rendimiento analítico importantes en el diagnóstico y comparativa de ellos entre sí y con la PCR estándar de referencia para la evaluación de su uso como POCT.

Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de SARS-CoV-2

Las muestras de coronavirus SARS-CoV-2 proceden de exudados nasofaríngeos y saliva de pacientes positivos y negativos proporcionadas por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), previamente confirmadas por RT-qPCR. Las muestras fueron inactivadas por calor a 95 °C antes de su recepción y anonimizadas, de manera que están desligadas de datos sanitarios sensibles a la protección de datos, de acuerdo con el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria (UC). Las muestras obtenidas por el Servicio de Microbiología del Hospital Marqués de Valdecilla (HUMV) se recibieron y almacenaron a -20 °C hasta su uso. En total se obtuvieron 168 muestras anónimas durante los años 2.020 a 2.023.

Estas muestras (n=168) al ser recibidas a lo largo del tiempo, reflejan parte de la evolución natural del coronavirus. Del total, se han sometido 116 muestras (100 positivas (50 provenientes de exudado nasofaríngeo y 50 provenientes de saliva) y 16 negativas según RT-qPCR del Servicio de Microbiología del HUMV) a evaluación mediante RT-qPCR del kit de detección de Biomeme® Inc., (Philadelphia, Estados Unidos), usando un termociclador portátil de la misma casa comercial y mediante los test de autodiagnóstico de antígenos All test™ de Hangzhou All test Biotech Co., Ltd. (Hangzhou, China). Posteriormente, se realizó RPA a 71 nuevas muestras, para evitar que la degradación de las muestras anteriores interfiriese en los resultados, de las cuales, 52 muestras son positivas de exudado nasofaríngeo y 19 muestras negativas.

3.1.1. Descripción de las muestras de SARS-CoV-2 atendiendo al valor de Ct

Uno de los criterios clínicos para el manejo de la enfermedad de SARS-CoV-2 es el valor umbral que nos aporta la RT-qPCR. Aunque debe usarse con precaución, da una idea de la carga viral que posee la muestra al ser inversamente proporcional a esta. Existen clasificaciones del valor de Ct que establecen tres grupos (Ct < 25, Ct: 25-30 y Ct > 30) que han relacionado la gravedad y necesidad de intubación con estos valores de

umbral de ciclo, siendo los pacientes más graves los que mostraban en la prueba un valor de Ct más bajo¹⁷⁶.

Atendiendo a este principio, de las muestras que se sometieron a RT-qPCR portátil y test de antígenos, las **50 muestras de exudado nasofaríngeo** que se sometieron con respecto al Ct del gen S según *Tabla 2*. En detalle 19 muestras con Ct < 25 (lo que supone un 38% del total de las muestras); 7 muestras con Ct: 25-30 (14%) , 8 muestras con Ct > 30 (16%) y 16 muestras no se registraron el Ct para el gen S (32%). Respecto del gen R, los exudados se clasifican en 26 muestras con Ct < 25 (52%); 11 muestras con Ct entre 25 y 30 (22%); 12 muestras con Ct > 30 (24%) y 1 muestras sin registrar el valor de Ct para el gen R (2%). Respecto a las **50 muestras de saliva** para el gen S se clasifican según su valor de Ct en 3 muestras con Ct < 25 (6%) , 13 muestras con un Ct entre 25 y 30 (26%) y 22 muestras con un Ct > 30 (44%), habiendo 12 muestras sin registrar el Ct para el gen S (24%). Para el gen R, las salivas proporcionadas por el hospital se clasifican en 3 muestras con un Ct < 25, 21 muestras con un Ct entre 25 y 30 y 26 muestras con un Ct mayor a 30.

Las 52 muestras de exudados nasofaríngeos a los cuales se realizó RPA, 50 de ellos tienen un Ct < 25 y 2 de ellos tienen un Ct entre 25 y 30. No existe diferenciación entre genes para estas muestras debido a la circunstancia epidemiológica actual de PCR rápida y han sido determinados mediante el procesamiento automatizado por GenXpert® de Cepheid® (California, Estados Unidos)¹⁷⁷ para la detección del gen N, E y RdRp y por cobas® Liat® de Roche (Basilea, Suiza) que detecta gen E y ORFab1, pero ambos dan un Ct global, teniendo en cuenta los valores de todos los marcadores, no de manera independiente.

Tabla 2. Clasificación del valor Ct según el tipo de muestra positiva.

Muestra	Gen	Ct < 25	Ct: 25-30	Ct > 30	No Registrado
Exudado nasofaríngeo RT-qPCR portátil y antígenos (n=50)	Gen S	19	7	8	16
	Gen R	26	11	12	1
Saliva	Gen S	3	13	22	12

RT-qPCR portátil y antígenos (n=50)	Gen R	3	21	26	0
Exudado nasofaríngeo RPA (n=52)	Global	50	2	0	0

3.1.2. Descripción de las muestras de SARS-CoV-2 atendiendo a las variantes

De las muestras sometidas a RT-qPCR y test de antígenos, las correspondientes a exudados nasofaríngeos (n=50), 30 pertenecieron a la variante B.1.617. 2 (variante Delta) (60%), 11 pertenecieron a B.1. 629 (variante Ómicron) (22%), 1 muestra a C. 37 (variante lambda) (2%) y 8 muestras no fueron secuenciadas (16% No Registrado). Las muestras de saliva (n=66) pertenecieron 17 al linaje B.1.617.2 (variante Delta) (34%), 3 a la variante B.1.1.7 (variante Alpha) (6%) y 30 muestras no fueron registradas (60% NR).

Las 50 muestras de exudado nasofaríngeo analizadas mediante RPA pertenecen todas a la variante Ómicron, presentando distintos tipos de sublinajes, la mayoría al sublinaje XBB (47 muestras, el 94%) y 3 muestras compatibles con el sublinaje BA.2.75 de Ómicron (6%). Los datos de secuenciación (NGS) muestran la diversidad de recombinación dentro del sublinaje XBB (FL.4, G.C.1, XBB.1.5, XBB.1.5.7, XBB 1.5.37, EG. 5.1, GK.1, etc.).

3.2. Extracción del ARN viral

Para la extracción del ARN viral se utilizaron dos métodos de extracción: los cartuchos de extracción rápida denominados *M1 Sample Prep Cartridge*® de la empresa Biomeme, Inc. (Philadelphia, Estados Unidos), siguiendo el protocolo estandarizado por la casa comercial. Se seleccionó este kit por tratarse de un método de extracción sencillo que puede llevarse a cabo en menos de 5 minutos por personal no especializado, lo que lo convierte en un buen candidato para una prueba POC. Cada muestra necesita de un cartucho de extracción, por lo que las muestras están individualizadas, evitando así la probabilidad de contaminación cruzada. El método de extracción se basa en el

aislamiento del material genético por columna. En cada cámara se bombea la muestra con una jeringa con filtro, indicando el número de bombeos en la leyenda lateral (Ej. 10x, 10 veces primera cámara) siendo la penúltima 20x de secado de la membrana del filtro de la jeringa y la última de elusión de la muestra (*Figura 8*).



Figura 8. Cartucho de extracción *M1 Prep Cartridge* para la extracción de ARN de la empresa Biomeme, Inc. (Philadelphia, Estados Unidos). Tomada de Biomeme.com.

En primera instancia para las pruebas de RT-qPCR convencional y validación de la RT-qPCR portátil, el material genético se extrajo utilizando los cartuchos de extracción *M1 Sample Cartridge* diseñados específicamente para POCT obteniéndose material genético de calidad de forma rápida (menos de 5 minutos). Sin embargo, para las muestras clínicas sometidas a RT-qPCR y RPA se utilizó un protocolo de extracción de TRIzol/cloroformo modificado. Este hecho aconteció debido a que se detectó una peor conservación del material extraído utilizando los cartuchos de *M1 Sample Cartridge* que la mostrada anteriormente, dicho de otra forma, el material genético se degradaba rápidamente, así como defectos de fabricación y problemas de distribución.

El protocolo modificado de TRIzol/cloroformo¹⁷⁸ consistió en añadir a la muestra 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y añadir TRIzol (1:1) pipeteando de forma intensa para asegurar que se mezcle bien y se inactive completamente la muestra. Seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, tras la que se añaden 200 µl de cloroformo y se mezcla mediante la inversión del tubo 5 veces. Finalmente, se incubó 3 minutos a temperatura

ambiente y se centrifuga 15 minutos a 12.000 x g a 4 °C. Se recoge con cuidado la fase acuosa del tubo donde está el ARN y se mezcla con 120 µl de isopropanol invirtiéndolo de forma suave. Se deja incubar 30 minutos a 4 °C para que el ARN precipite, luego se centrifuga a 10.000 x g 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol frío al 70% y se centrifuga a 10.000 x g 10 minutos a 4 °C, este proceso de lavado se repite de nuevo. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el ARN en una estufa a 37 °C durante 5 minutos. Se añaden 20 µl de agua destilada libre de ARNasas y se resuspende bien el ARN. Se mide su concentración y pureza por espectrofotometría (DeNovix® (Delaware, Estados Unidos) y se almacena a -80 °C hasta su uso. Para todas las muestras, se evaluó la calidad del ARN extraído que estuviese en una absorbancia 260/280 nm en un rango de 1,6 a 2. Todo el ARN se utilizó en esta calidad para evitar fallos en las reacciones de amplificación por la presencia de contaminantes de la muestra que pudiesen interferir.

3.3. Diseño de cebadores

Se diseñaron parejas de cebadores para el gen Spike (S), gen de la nucleocápside (N), gen de la envoltura (E) y el gen de marco abierto ORF del coronavirus SARS-CoV-2 mediante el software PRIMER BLAST¹⁷⁹ y Primer3¹⁸⁰. Los parámetros de diseño y búsqueda utilizados para cada pareja de cebadores fueron: un contenido de guanina/citosina (G/C) alrededor del 60%, una temperatura de anillamiento o *melting* (Tm) en torno a 60 °C sin diferencias de cada Tm propia mayor de 4 °C, evitando que presentasen complementariedad entre sí o que fuesen auto complementarios en 3' o 5'. En la medida de lo posible, se buscó que el extremo 3' terminase en una guanina o citosina, ya que sellan mejor el extremo 3' al hibridar con la hebra molde por el triple enlace de hidrógeno. Estas secuencias se analizaron *in silico* en bases de datos para asegurar su especificidad a los distintos genes del SARS-CoV-2.

Como control del proceso de amplificación se utilizaron los cebadores de Charité (Berlín) desarrollados para la RT-qPCR¹¹⁹. Se buscó en la base de datos Nexstrain aquellas zonas de menor variabilidad génica en los genes mencionados anteriormente para evitar que no fuesen detectadas las distintas variantes a causa de zonas de mayor mutabilidad. A partir de

estos cebadores se desarrollaron cebadores de mayor longitud que favorecen las reacciones de RPA. La *Tabla 3* recoge todos los cebadores que han sido utilizados en esta tesis doctoral.

Tabla 3. Descripción de los cebadores utilizados para cada gen y el tamaño del amplicón esperado para cada pareja de cebadores. En el caso de los cebadores de RPA (tabla siguiente), el tamaño de los amplicones generados dependerá de las combinaciones entre los distintos cebadores y se incluirá más adelante en el apartado de optimización de RPA.

Gen	Nombres cebadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento
E	E-F Charité (Berlín)	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCG T	113 pb
	E-R Charité (Berlín)	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
	Env-F	CATTCGTTTCGGAAGAGACAG	161 pb
	Env-R	AAAAGAAGGTTTTACAAGACTCACG	
Orfab1	Orfab1-F	GTGATGATCAGCCATGCAAC	230 pb
	Orfab1-R	TGGCTGCTGTTGTAAGAGGT	
Spike	Spike-F	TGCACTTGACCCTCTCTCAG	206 pb
	Spike-R	TGCTGATTCTCTTCCTGTTCCA	
N	N-F	GCAGTCAAGCCTCTTCTCGT	193 pb
	N-R	CCTTGTTGTTGTTGGCCTTT	
Cebadores RPA			
Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	
E	E1-F	ATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCT	
	E1-R	GTTCGTTTAGACCAGAAGATCAGGAAGTCTA	
	E2-F	TAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTT	
	E2-R	ATTCAGATTTTTTAACACGAGAGTAAACGTA	
	E3-F	CGTACTTCTTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCTTG	
	E3-R	GTTCGTTTAGACCAGAAGATCAGGAAGTCTAG	
	E4-F	CACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTG	
	E4-R	ACAGCAGAGTAAACGTAAAAAGAAGGTTTT	
N	N1-F	GCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCTCATCAC	
	N1-R	GGCCTTGTTGTTGTTGGCCTTTACCAGACA	

	N2-F	CAAGCCTATTCTCGTTCCTCATCACGTCG
	N2-R	AAGCAGCAGCAAAGCAAGAGCAGCAGCATCACC
	N3-F	GCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCTCATCACGTCG
	N3-R	AGACATTTTGCTCTCAAGCTGGTTCAATCT

3.4. RT-PCR convencional del SARS-CoV-2

Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR en dos pasos: retrotranscripción y amplificación por PCR. La retrotranscripción del ARN viral con la retrotranscriptasa de la amieloblastosis aviar (AMV RT) de Promega Biotech Ibérica S.L. (Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante: se realizó un RT-mix con RT *buffer* 1x, 100 mM de DTT, 0,5 µl de AMV-RT y 0,5 µl de agua destilada. Se mezclaron 6 µl del RT-mix con 11 µl de la mezcla de ARN (1-6 µg), 2 µl de dNTPs y 1 µl del cebador inverso (*primer reverse*) en un volumen de reacción de 20 µl. Se incubó durante 1 hora a 50 °C y luego 5 minutos a 94 °C para inactivar a la retrotranscriptasa.

La reacción de PCR consistió en un *buffer* 1x, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs y 0,5 µM de cada cebador, 2 µl de ADNc de la muestra, 1 µl de ADN polimerasa (*Biotoools B&M Lab, S.A.*) y agua destilada en un volumen final de reacción de 25 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *MyCycler Thermal Cycler* de Bio-rad Ltd. (California, Estados Unidos) con una desnaturalización inicial de 95 °C 5 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C 40 segundos, anillamiento dependiendo del primer entre 57-60 °C 40 segundos y extensión a 72 °C 30 segundos, con 10 minutos de extensión final. Este protocolo se adaptó a cada par de cebadores modificando la temperatura y el tiempo de anillamiento.

Para la visualización de los amplicones, se realizaron geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio o con GelRed. Se utilizó como marcador de tamaño molecular *Perfect Plus™ 50-500 bp DNA Ladder* de EURx® Sp. (Gdansk, Polonia). Para cargar las muestras en el gel se usó 1 µl de un tampón de carga compuesto por azul de bromofenol al 0,25%, sacarosa al 40% y glicerol al 30%. Se visualizaron los geles en un transiluminador Gel Doc™ EZ Imager de Bio-rad Ltd. (California, Estados Unidos).

3.5. RT-qPCR mediante el termociclador portátil de muestras clínicas

El termociclador Franklin™ (*Figura 9*) es un termociclador portátil comercializado por la empresa Biomeme, Inc. (Philadelphia, Estados Unidos), distribuido en Europa por la empresa Ecohydros, S.L. (Maliaño, España) y utilizado, entre otros fines, para el análisis por PCR de muestras de ADN ambiental (eDNA). El termociclador es programado desde un teléfono móvil mediante una aplicación desarrollada por Biomeme, Inc. (Philadelphia, Estados Unidos), y transmite los resultados a tiempo real al teléfono y a la nube para su posterior análisis. Los resultados de la RT-qPCR se expresan mediante el parámetro Ct que, como se ha explicado en la introducción, es el número de ciclos necesario para que se produzca un aumento significativo de la fluorescencia y que está relacionado con la carga viral de forma inversamente proporcional (a menor Ct mayor es la carga viral de la muestra). La RT-qPCR se llevó a cabo mediante el kit *Biomeme SARS-CoV-2 Go-Plates* que consta de todos los reactivos necesarios para la RT-qPCR (*Hot start Taq* polimerasa, MMuLV retrotranscriptasa recombinante, desoxinucleótidos trifosfato y *buffer* Tris pH 8.8, sales y potenciadores de la reacción) liofilizados en tubos individualizados en los que sólo es necesario añadir el ARN de la muestra y el agua. En cada tubo hay una RT-qPCR multiplex que detecta el gen S y el ORFab del SARS-CoV-2 mediante sondas con distintos fluoróforos (ATTO647N/rojo y FAM/verde para ambos genes, respectivamente) y como control positivo un gen del bacteriófago MS2 con una sonda fluorescente TexasRedX/ámbar, en un volumen total de reacción de 20 µl. El programa de la reacción consiste en un paso de retrotranscripción de 120 segundos, una desnaturalización inicial de 95 °C a 60 segundos y 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 segundo y anillamiento-extensión 20 segundos.



Figura 9. Termociclador portátil Franklin™ junto a las placas Go-Plate 96 (Biomeme, Inc. (Philadelphia, Estados Unidos) con los reactivos liofilizados para la RT-qPCR y la aplicación de Biomeme Go con la cual se programa el termociclador y proporciona los resultados en el *smartphone* o en la nube (Adaptado de Biomeme.com).

3.5.1. Sensibilidad y límite de detección del termociclador portátil

Se tomó una muestra de saliva con valores de Ct conocidos por RT-qPCR del HUMV y de concentración conocida de ARN valorada mediante espectrofotómetro para hacer un banco de diluciones y poder determinar la sensibilidad del método empleado. Para ello, con la media de la concentración medida en el espectrofotómetro se hicieron diluciones seriadas en base 10 (de 10^{-1} hasta 10^{-8}). De cada dilución se tomaron 5 μ l para llevar a cabo la reacción de RT-qPCR y se añadieron 15 μ l de agua destilada hasta conseguir el volumen final de 20 μ l. Para calcular el límite de detección, se tomó esta muestra de saliva previamente descrita y dos muestras más de exudado y saliva. En este caso, se realizaron diluciones seriadas, escogiendo las diluciones donde se localice el límite de detección (LoD) previamente descrito. En este caso las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , basado en los resultados del experimento anterior.

3.5.2. *Pooling* y detección mediante termociclador portátil

El *pooling* o agrupamiento de muestras es una técnica que consiste en unir varias muestras de individuos diferentes. Es una técnica que se utiliza en diagnóstico para ahorrar tiempo y coste ante la alta demanda de pruebas, sin perder precisión¹⁸¹. Para llevarlo a cabo, se realizaron 4 mezclas de muestras diferentes de ARN extraído de exudado nasofaríngeo (dos mezclas de 5 muestras (5 siendo negativas (5-) y 5 habiendo 1 positiva de Cts conocidos (5+) y dos mezclas de 10 muestras negativas (10-) y 10 habiendo una positiva de Cts conocidos (10+) conforme a la *Tabla 4*. Se añadieron 5µl de cada mezcla en los tubos de Go Plate y 15 µl de agua destilada con el siguiente programa de RT-qPCR del termociclador Franklin™ que ya hemos definido anteriormente.

Tabla 4. Composición de cada mezcla de *pooling*. Las muestras con asterisco son muestras positivas de Cts conocidos.

Mezcla	Muestras
1. 5-	(Ex.2, Ex.3, Ex.4, Ex.6, Ex.7)
2. 5+	(Ex.2, Ex.3, Ex.4, Ex 5*, Ex.6)
3. 10-	(Ex.1, Ex.2, Ex.3, Ex.4, Ex.5, Ex.6, Ex.7, Ex.8, Ex.9, Ex.10)
4. 10+	(Ex.1, Ex.2, Ex.3, Ex.4, Ex.5, Ex.6, Ex.7, Ex.8, Ex.9, Ex.55*)

3.5.3. Monitorización de las enfermedades infecciosas usando el termociclador portátil

De manera preliminar, el Servicio de Microbiología del HUMV cedieron dos muestras para ensayar *in situ* el potencial del termociclador portátil en el servicio de urgencia, en el manejo y monitorización de la infección. A estas muestras de exudado nasofaríngeo se les realizó extracción con el kit *M1 RNA Extraction Cartridge* en campana y se le añadió el control positivo del fago MS2 al inicio de la extracción. Acto seguido se le realizó RT-

qPCR según el programa del termociclador, ya mencionado con anterioridad, para determinar si los valores de Ct diferían entre sí o no con el valor de referencia del hospital.

3.6. Test de antígenos

Se realizaron test de antígenos All Test™ - Test Nasal de Antígenos COVID-19 Autodiagnóstico (Hangzhou All test Biotech Co., Ltd. Hangzhou, China) (*Figura 10*) a las muestras de exudado y de saliva que se habían analizado por RT-qPCR específicamente para exudado nasofaríngeo y Prueba Rápida de Antígeno Oral específicamente para saliva también de la marca All Test™.



Figura 10. Test de antígenos para saliva de autodiagnóstico. La única diferencia metodológica con la prueba de antígenos para exudado es que trae un tubo colector de la muestra con un embudo, en vez de un hisopo y el *buffer* de adición lo trae por separado en una ampolla.

Se realizaron los test de antígenos siguiendo las instrucciones del fabricante, con la peculiaridad de que los exudados nasofaríngeos se depositaron 5 µl en un tubo Eppendorf y se apretó la torunda 10 veces en rotación (simulando una fosa nasal). La torunda se insertó en el tubo de extracción y se apretó de 10-15 segundos y se desechó. Del *buffer* de extracción se añadieron 3 gotas al pocillo de muestra de la prueba y se leyó el resultado a los 15 minutos. Las pruebas de saliva se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, con la peculiaridad de que se añadieron 500 µl de saliva en el tubo de recogida de la muestra.

A estos 500 µl de muestra, se le añadió el *buffer* de adición. Se mezcló en el tubo bien durante 10-15 segundos y se añadieron dos gotas al pocillo de muestra de la prueba. Los resultados se leyeron a los 15 minutos.

3.7. Técnicas de amplificación isotérmica (RPA)

3.7.1. Protocolo básico de RPA

Se realizó RPA utilizando el kit *Twist Amp® Basic* de la empresa *TwistDx™ Limited* (Cambridge, Reino Unido) utilizando ADNc de muestras de pacientes según las instrucciones del fabricante (*Figura 11*). Por cada reacción se añadieron 29,5 µl de *Twist Buffer*, 2,4 µl de cada cebador directo (*forward*) e inverso (*reverse*), 12,2 µl de agua destilada y 1 µl de ADNc. Esta mezcla se añade al tubo con los reactivos liofilizados y se le añade posteriormente 2,5 µl de acetato de magnesio en un volumen final de 50 µl de reacción. El control positivo se prepara con 8 µl de la mezcla de cebadores que proporciona el kit, 1 µl de ADN control, 9 µl de H₂O destilada junto con 29,5 µl del *buffer*, a esta mezcla se le añaden 2,5 µl de acetato de magnesio. La reacción se incubó en un termo bloque durante 20 minutos a 39 °C, agitándose después de 4 minutos de incubación.



Figura 11. Reactivos de RPA usados para la amplificación isotérmica y el termobloque seco. De izquierda a derecha, *buffer TwistDx™*, acetato de magnesio, cebadores del control positivo y ADN control.

Los productos de RPA deben limpiarse antes de cargarlos en un gel de electroforesis. Esto evita la aparición de *smear*, o rastro inespecífico, debido a proteínas de alto peso molecular. Para ello se usó un kit rápido de limpieza de productos de PCR: *Speedtools PCR Clean-Up Kit* de *Biotoools*, B & M Labs, S.A. (Madrid, España), según las instrucciones del fabricante. Básicamente, consiste en añadir a una columna de membrana de sílice la muestra con el doble del *buffer* de unión, centrifugar durante 30 segundos a 11.000 x g, descartar el tubo colector y añadir 700 µl de *buffer* de lavado a la columna. Se centrifuga durante 30 segundos a 11.000 x g. Descartar el tubo colector y centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g para secar la membrana. Descartar el tubo y emplazar uno nuevo. Posteriormente añadir 20 µl de *buffer* de elución e incubar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g. En el eluido estará nuestro producto de RPA, que podemos cargarlo en el gel de electroforesis directamente o almacenarlo a -20 °C.

3.7.2. Optimización de RPA en función de distintos parámetros

3.7.2.1. Retrotranscripción seguida de amplificación por recombinasa-polimerasa (RT-RPA)

Se incluyeron distintas retrotranscriptasas a la amplificación por RPA para poder llevar a cabo la reacción en un solo paso y acortar los tiempos de reacción en función de la disponibilidad de estas enzimas en el laboratorio: *High Retro* de *Biotoools*, B & M Labs, S.A. (Madrid, España), *ProtoScript II* de *New England Biolabs®* Inc. (Massachusetts, Estados Unidos) y *SmartMLV* de *Takara Bio Inc.* (Shiga, Japón). La empresa que comercializa los reactivos de RPA recomienda en su manual que la inclusión de la retrotranscripción conlleve un retraso del paso de agitación (5 minutos en vez de 4 minutos) y de un aumento de la temperatura a 40 °C. Se añaden 0,5 µl de la retrotranscriptasa (200 U/µl).

3.7.2.2. En función de la temperatura y de los cebadores

La reacción se testó a diferentes temperaturas a 39, 40, 41 y 42 °C para determinar si el cambio de temperatura favorecía el rendimiento de la reacción. Estas reacciones se hicieron de forma simultánea con distintos cebadores de PCR para los diferentes genes del SARS-CoV-2 de distintos tamaños de amplicón.

3.7.2.3. En función del tiempo

Se testó la reacción de RPA a distintos tiempos de incubación en el termobloque (5, 10, 15 y 20 minutos) para determinar si se podía obtener resultados con mayor rapidez y poder evaluar las discrepancias de los resultados obtenidos en base a los diferentes tiempos.

3.7.2.4. En función de la concentración de acetato de magnesio

La reacción de RPA ocurre con una concentración de 14 mM según las instrucciones del fabricante. Se testó a una concentración menor (12 mM) y a una concentración mayor (30 mM) para determinar si afectaban al rendimiento de la reacción, dentro del rango recomendado¹⁸².

3.7.2.5. En función del volumen

Para optimizar costes, se redujo la reacción inicial de 50 µl a 10 µl y de manera proporcional las concentraciones y de acuerdo con protocolos ya descritos en la bibliografía¹⁸³ con modificaciones. Se prepara una mezcla de 29,5 µl de *buffer TwistDx®* y 12,2 µl de agua destilada en las que se resuspenden los reactivos liofilizados. En cada tubo se colocan 5 alícuotas de 8,34 µl de la mezcla, 0,42 µl (10 µM) de cada cebador directo e inverso, 0,2 µl de ARN muestra (100 pg/ µl) y 0,5 µl de acetato de magnesio (280 mM). Al añadir 5 µl de DTT a la mezcla y añadir 0,5 µl de la retrotranscriptasa a cada tubo repartiendo la mezcla en 7,8 µl cada alícuota y añadiendo 4,7 µl de agua destilada para no alterar las concentraciones finales.

3.7.2.6. Diseño y *screening* de cebadores adecuados para RPA

Del gen E y el gen N se diseñaron cuatro y tres pares de cebadores respectivamente (descritos anteriormente en el apartado 3.3 de diseño de cebadores), de mayor longitud que los de PCR usando el software PRIMER BLAST¹⁷⁹, siguiendo el mismo protocolo de diseño salvo por las condiciones particulares de RPA como son menor longitud del fragmento amplificado y menor temperatura de amplificación (óptima en torno a 45 °C).

Cada pareja de cebadores se contrastó entre sí, cada cebador directo con su inverso en las condiciones óptimas descritas por el fabricante. La *Tabla 5* describe los tamaños esperados para cada pareja de cebadores testado.

Tabla 5. Contraste de cebadores diseñados para RPA y tamaño esperado por cada pareja.

Gen E					Gen N			
	E1R	E2R	E3R	E4R		N1R	N2R	N3R
E1F	198	162	198	149	N1F	195	137	170
E2F	197	161	197	148	N2F	190	132	165
E3F	187	151	187	138	N3F	195	137	170
E4F	146	110	146	97				

3.7.2.7. Adición de aditivos

Se añadieron distintos reactivos como dimetilsulfóxido (DMSO), formamida o betaína, descritos en la bibliografía que actúan como potenciadores de la reacción de RPA o disminuyen la inespecificidad por reducir la formación de dímeros de cebadores o por mejorar la amplificación de fragmentos ricos en guaninas y citosinas¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. La concentración de DMSO varió entre el 5 y el 15% , la de betaína entre 0,4-0,8 M y la de formamida del 2-5%; rangos donde han mostrado este efecto en la literatura.

3.7.2.8. Pretratamientos

Con el fin de evitar la extracción de ARN y poder realizar el proceso de la forma más rápida y sencilla, bajo los estándares de pruebas POC, se sometieron muestras en crudo a

pretratamientos simples como: calentamiento a 95 °C, adición de proteinasa K a razón de 20 mg/ µl, o *buffer* de lisis comerciales. Sobre estas muestras pretratadas se realizó RPA.

3.7.2.9. Multiplexado de RPA

A fin de intentar detectar de forma simultánea varios genes se probaron diferentes parejas de cebadores de distintos genes (gen E y gen N) a concentraciones iguales (desde 150 nM a 480 nM), con distinta longitud (cebadores de PCR y cebadores diseñados para RPA) y en condiciones de equilibrio (concentraciones de cebadores directo e inverso iguales como 240 nM) y condiciones de desequilibrio (65% de un cebador directo o *forward* (ej. 624 nM), 35% del cebador inverso o *reverse* (336 nM) y viceversa) ya que estas condiciones evitan la competición entre ellos. Las concentraciones de oligonucleótidos totales nunca deben superar los 2000 nM, las bajas concentraciones favorecen amplicones largos y las altas favorecen la cinética¹⁸⁷. En nuestro caso son amplicones esperados cortos (< 500 bp).

3.8. Análisis de muestras clínicas mediante RPA

Se analizaron un total de 66 muestras clínicas de exudado nasofaríngeo de pacientes infectados y no infectados por COVID-19, diferentes a las anteriormente analizadas por RT-qPCR y test de antígenos para evitar la degradación de la muestra entre la recepción de unas y de otras. Se escogió la pareja de cebadores que ofrecían mejor resultado empíricamente para el gen E y se desarrollaron las reacciones en las mismas condiciones ya descritas con anterioridad a 10 µl de reacción de RPA.

3.9. Reactividad cruzada

Seguida de la validación *in silico* para descartar posible reactividad cruzada con otros organismos (descrita en el apartado 3.3. Diseño de cebadores), se procedió a la validación *in vitro* de los marcadores genéticos desarrollados en esta tesis doctoral sometiendo a experimentos donde estaban presentes otros posibles patógenos frecuentes entornos hospitalarios y en pacientes con una sintomatología similar. Entre las muestras negativas se incluyeron muestras de otros virus respiratorios como el virus respiratorio sincitial (VRS), el

rinovirus (RhV), el metapneumovirus, la influenza A H3N1, la parainfluenza y otros coronavirus como el OC43 y el coronavirus NL63 para ensayar la especificidad del proceso y poder descartar la amplificación cruzada inespecífica sobre este tipo de muestras frecuentes en el servicio hospitalario. A las muestras se les extrajo el ARN y se les hizo RT-qPCR mediante el termociclador portátil y RPA. Se les realizó también test de antígenos específico de exudado nasofaríngeo.

3.10. Análisis estadístico

Se determinaron los parámetros estadísticos con sus respectivos intervalos de confianza mediante el *software* XLSTAT® (Addinsoft, New York, NY. <http://www.xlstat.com/en/>), *MedCalc Statistical Software* versión 19.2.6 (*MedCalc Software*, Ostend, Bélgica; <https://www.medcalc.org>; 2020) y *Analyse-it® Software*, Ltd. (<http://analyse-it.com/>; 2012) y se construyeron las curvas ROC de cada método diagnóstico con respecto al de referencia. Se realizó el contraste de hipótesis de *Mann-Whitney* al 95% de confianza para determinar si los resultados del área bajo la curva (AUC) se deben al azar o no. Se comparó la RT-qPCR con los test de antígenos porque se realizaron sobre las mismas muestras y el tamaño muestral es el mismo.

3.11. Secuenciación

Se enviaron los fragmentos de RPA al servicio de secuenciación de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Las secuencias se obtuvieron mediante secuenciación Sanger, MacroGen® (Madrid, España). Se utilizó el *software* Chromas®¹⁸⁸ para la revisión y edición de secuencias. Posteriormente, se contrastaron con las bases de datos del NCBI mediante BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*)¹⁸⁹ para determinar si el fragmento obtenido por RPA era el esperado.

Resultados

4. RESULTADOS

Se han dividido las siguientes secciones en función de los objetivos planteados de forma inicial para mejorar la comprensión del estudio llevado a cabo en esta tesis.

4.0. Revisión de los métodos de diagnóstico basados la amplificación de ácidos nucleicos

La revisión bibliográfica de los métodos de diagnóstico dio como resultado la publicación titulada “*Detection of SARS-CoV-2 Based on Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) and Its Integration into Nanomedicine and Microfluidic Devices as Point-of-Care Testing (POCT)*” publicada en la revista científica *International Journal of Molecular Sciences* (IJMS; Factor de Impacto:5.6). Esta revisión resume los métodos de diagnóstico y las tendencias sinérgicas con otras disciplinas como la microfluídica y la nanomedicina en diagnóstico POCT, gracias en parte al esfuerzo científico debido a la urgencia de la pandemia. En plena era de la digitalización, los métodos diagnósticos POCT, principalmente del SARS-CoV-2 así como del resto de enfermedades, tienden a integrar avances en otros campos que les permiten mantener una alta sensibilidad y precisión mientras reducen el tamaño y el coste. En esta revisión (incluida en el apartado publicaciones) se describen los métodos moleculares evaluados en la presente tesis, basados en detección de los ácidos nucleicos y antígenos, junto con otros enfoques innovadores que permiten o permitirán el desarrollo de dispositivos miniaturizados e integrados con smartphones u otros dispositivos electrónicos.

4. Parte I. Desarrollo inicial

4.I.1. Diseño de cebadores específicos para la detección de SARS-CoV-2

Como primer paso para el desarrollo de métodos propios de detección del coronavirus, se diseñaron cebadores para los distintos genes estructurales del SARS-CoV-2, tal y como se describe en materiales y métodos en la sección 3.3. La *Tabla 6* y la *Tabla 7* incluye los datos relativos a los cebadores diseñados en el desarrollo de esta tesis.

Tabla 6. Datos de los cebadores diseñados para PCR. Se incluye la secuencia, el fragmento esperado, la temperatura de anillado (T_m), el porcentaje de guaninas y citosinas (%GC) y la auto complementariedad, tanto la global (Aut.) como la 3' (Aut. 3').

Cebadores de PCR							
Gen	Nombres cebadores	Secuencia (5'-3')	T_m	%GC	Aut.	Aut. 3'	Fragmento
E	Env-F	CATTCGTTTCGGAAGAGACAG	59,9	47,6	5.00	3.00	161 pb
	Env-R	AAAAGAAGGTTTTACAAGACTCACG	59,3	36	4.00	2.00	
Orfab1	Orfab1-F	GTGATGATCAGCCATGCAAC	60,1	50	7.00	0.00	230 pb
	Orfab1-R	TGGCTGCTGTTGTAAGAGGT	59,24	50	4.00	0.00	
Spike	Spike-F	TGCACTTGACCCTCTCTCAG	59,1	55,00	4.00	3.00	206 pb
	Spike-R	TGCTGATTCTCTTCCTGTTCCA	62	45,5	3.00	1.00	
N	N-F	GCAGTCAAGCCTCTTCTCCT	59,8	55	3.00	0.00	193 pb
	N-R	CCTTGTTGTTGTTGGCCTTT	60	45	4.00	0.00	

Tabla 7. Datos relativos a los cebadores específicos de RPA diseñados para el gen E y el gen N. Se muestran la secuencia, temperatura de anillamiento (T_m), % de guaninas y citocinas (%GC) y auto complementariedad general (Aut.) y en 3' (Aut. 3').

Gen	Nombres cebadores	Secuencia (5'-3')	T _m	%GC	Aut.	Aut. 3'
E	E1-F	ATAGTTAATAGCGTACT TCTTTTCTTGCT	60,1	30	4.00	0.00
	E1-R	GTTTCGTTTAGACCAGAA GATCAGGAACTCTA	63,9 6	41,9 4	4.00	2.00
	E2-F	TAGTTAATAGCGTACTT CTTTTCTTGCTT	60,1	30	4.00	0.00
	E2-R	ATTCAGATTTTAAACAC GAGAGTAAACGTA	60,1	30	4.00	2.00
	E3-F	CGTACTTCTTTTCTTGCT TTTCGTGGTATTCTTG	65,1	38,2 4	4.00	0.00
	E3-R	GTTTCGTTTAGACCAGAA GATCAGGAACTCTAG	64,4 6	43,7 5	4.00	4.00
	E4-F	CACTAGCCATCCTTACT GCGCTTCGATTGTG	68,9	51,6 1	4.00	1.00
	E4-R	ACAGCAGAGTAAACGTA AAAAGAAGGTTTT	62,2	33,3 3	4.00	3.00
N	N1-F	GCAGTCAAGCCTCTTCT CGTTCCTCATCAC	68,5 4	53,3 3	3.00	0.00
	N1-R	GGCCTTGTTGTTGTTGG CCTTTACCAGACA	69,2 8	50	4.00	4.00
	N2-F	CAAGCCTATTCTCGTTC CTCATCACGTAGTCG	69,3 6	53,1 2	4.00	2.00
	N2-R	AAGCAGCAGCAAAGCA AGAGCAGCAGCATCACC	71,5 4	53,3 3	4.00	0.00
	N3-F	GCAGTCAAGCCTCTTCT	75,6	52,9	4.00	2.00

		CGTTCCTCATCACGTAG				
	N3-R	AGACATTTTGCTCTCAA GCTGGTTCAATCT	68,8	40	4.00	2.00

4.I.2. RT-PCR convencional de SARS-CoV-2

Partiendo del material genético y de los cebadores descritos en las secciones anteriores, se realizó la amplificación mediante RT-PCR convencional a diferentes muestras de saliva y exudado nasofaríngeo proporcionadas por el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos en la sección 3.4. La optimización de la reacción se realizó a través de distintas temperaturas, ciclos y concentraciones de cloruro de magnesio. Se observó que con la pareja de cebadores para el gen Orfab1, aparece la banda esperada de 230 pares de bases para las muestras de saliva, bajo las condiciones optimizadas de 45 ciclos (desnaturalización inicial a 95 °C de 5 minutos seguida de 45 ciclos de 30 segundos 95 °C de desnaturalización, 58 °C 30 segundos de anillamiento y 30 segundos de extensión) a 2,5 mM de MgCl₂ a 58 °C.

Por otro lado, se testaron los cebadores para el gen S. Las mejores condiciones en las que amplificó este gen fueron a 95 °C de desnaturalización inicial y 45 ciclos de desnaturalización 5 minutos, 30 segundos a 58 °C de anillamiento y 30 segundos de extensión y 2,5 mM de cloruro de magnesio. La banda esperada es de 206 pares de bases. Se obtuvo mejor amplificación y especificidad en las muestras de exudado nasofaríngeo que en saliva, donde aparecieron bandas inespecíficas de mayor tamaño que la banda esperada. El aumento de la duración de los ciclos aumentó la resolución de la banda (1 minuto de desnaturalización, 1 minuto de anillamiento y 30 segundos de extensión), pero también la inespecificidad.

Solo se testaron esta pareja de cebadores para RT-qPCR de forma convencional. El resto se diseñó con el propósito de utilizarlos para amplificación isotérmica que era el objetivo principal de esta tesis doctoral.

4. Parte II. Validación de la RT-qPCR portátil

4.II.1. Análisis preliminar por RT-qPCR mediante el termociclador portátil

Este conjunto de experimentos preliminares se realizó para probar que el producto del que disponía la empresa Ecohydros S.L. como distribuidor de Biomeme Inc. en España, tanto el kit de detección como el termociclador portátil, tenían utilidad en el ámbito clínico y era factible estudiar en donde presentaba su uso una mejor conveniencia.

Antes de analizar las muestras clínicas se realizó RT-qPCR usando el kit de Biomeme® sobre muestras de ARN que habían sido extraídas en el hospital a partir de saliva y exudado. Este análisis preliminar se realizó para ver si los resultados obtenidos por RT-qPCR diferían o no, de los resultados obtenidos en los sistemas automatizados de RT-qPCR utilizados en el hospital HUMV (*Tablas 8 y 9*).

Tabla 8. Tabla comparativa preliminar de las muestras de saliva de RT-qPCR portátil con respecto a RT-qPCR en el HUMV. Con asterisco aquellos valores con discrepancia entre el valor de Ct y el gráfico.

Muestra	Resultados RT-qPCR MICRO-HUMV		Resultado	Resultados Franklin™		Resultado
	N	Orf1ab		S	Orf1ab	
Saliva 1	27	30	Positivo	31,20	41,42*	Positivo
Saliva 2	28	30	Positivo	30,61	36,33	Positivo
Saliva 3	24	25	Positivo	25,12	26,41	Positivo
Saliva 4	30	28	Positivo	31,59	0	Positivo
Saliva 5	27	26	Positivo	28,17	36,65	Positivo
Saliva 6	31	29	Positivo	33,20	35,60 *	Positivo
Saliva 7	32	31	Positivo	38,83	0	Positivo
Saliva 8	21	19	Positivo	22,46	23,96	Positivo

Saliva 9	28	30	Positivo	33,99	43,50*	Positivo
Saliva 10	27	27	Positivo	32,44	0	Positivo
Saliva 11	37	39	Positivo	38,71	0	Positivo
Saliva 12	30	28	Positivo	29,01	33,09	Positivo
Saliva 13	26	26	Positivo	33,02	37,73	Positivo
Saliva 14	27	29	Positivo	29,08	0	Positivo
Saliva 15	24	23	Positivo	27,52	33,86	Positivo
Saliva 16	28	30	Positivo	35,12	0	Positivo

Tabla 9. Tabla comparativa preliminar de exudado nasofaríngeo de los resultados obtenidos con la RT-qPCR portátil frente a los resultados de RT-qPCR del HUMV.

Muestra	Resultados RT-qPCR MICRO-HUMV			Resultado	Resultados Franklin™		Resultado
	N	E	R		S	Orfab1	
Exudado 1	-			Negativo	0	36,86	Pos./Neg.
					41,59	0	
Exudado 5	31	31	34	Positivo	26,12	28,20	Positivo
					28,65	30,44	
Exudado 9	20	20	25	Positivo	18,63	19,44	Positivo
					18,99	20,76	

Exudado 11	22	24	27	Positivo	33,91	27,59	Positivo
Exudado 41	28	30	27	Positivo	28,76	32,95	Positivo
Exudado 50	34	30	32	Positivo	31,31	39,88	Positivo
Exudado 51	-			Negativo	0	0	Negativo
Exudado 79	41	40	42	Positivo	37,07	0	Positivo
Exudado 84	31	33	36	Positivo	29,39	34,11	Positivo
Exudado 94	27	30	29	Positivo	26,03	31,36	Positivo

Las muestras de ARN procedente de saliva del HUMV se correlacionan todas con la positividad de la RT-qPCR portátil. Si bien, resaltar que los valores de Ct para el gen S y el Orfab1 son ligeramente superiores a los obtenidos por el HUMV. Hay que mencionar que los criterios de considerar una muestra positiva a través del kit de Biomeme® son un Ct menor o igual a 40 y que la detección del gen S, al cual el kit es más sensible, es suficiente para determinar que la muestra es positiva.

Con respecto al ARN procedente de exudados, solo una muestra fue un falso positivo (exudado 90), el resto se correlacionó de manera satisfactoria con el resultado obtenido en el HUMV. La muestra en la que se obtuvieron resultados contradictorios con ambos marcadores e hizo dudar de su negatividad (Exudado 1) se repitió la prueba, obteniendo sólo un Ct para el gen S mayor a 40 y por tanto descartándola como positiva.

En el anexo I se incluyen las curvas de amplificación y los gráficos obtenidos a través de la aplicación GO Biomeme y depositadas en el servicio de *Biomeme Cloud* (en adelante la nube) para estas muestras (ver anexo I).

Por otro lado, se proporcionó al grupo de Biología Integrativa de Sistemas del CSIC (Valencia), 20 muestras de exudado nasofaríngeo positivas al SARS-CoV-2 pertenecientes a las variantes Delta y Ómicron en el periodo comprendido entre enero y febrero de 2022. Del conjunto de muestras pertenecientes a Delta se confirmó por RT-qPCR portátil y por

RT-qPCR automatizada la positividad de las muestras, mientras que del conjunto de Ómicron sólo se analizaron mediante RT-qPCR automatizada a petición del grupo receptor. Los resultados se reflejan en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Resultados de los valores de Ct obtenidos para las muestras de exudado proporcionadas al CSIC en el periodo comprendido de enero a febrero de 2.022.

N.º petición	Gen N	Gen R	Gen S	Gen R Franklin™	Gen S Franklin™	Secuenciación
Ex.1	NR	23,53	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.2	NR	21,82	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.3	NR	25,16	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.4	NR	19,36	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.5	NR	25,17	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.6	NR	24,87	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.7	NR	19,06	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.8	NR	18,85	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.9	NR	19,88	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.10	NR	19,88	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.11	NR	25,42	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.12	NR	22,12	N	-	-	Linaje B.1.1.529 (Ómicron)
Ex.13	NR	27,6	23,39	29,82	22,76	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.14	NR	24,45	23,21	26,17	23,34	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.15	NR	24,09	22,85	31,59	27,36	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.16	NR	18,02	17,41	26,73	20,46	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.17	NR	26,8	26,6	42,36	32,08	Linaje B.1.617.2 (variante

		8				Delta)
Ex.18	NR	23,4 5	21,5 9	28,75	25,45	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.19	NR	23,3 1	21,5 4	32,31	28,13	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.20	NR	28,2 2	27,0 5	35,9	29,97	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)

A partir de estas muestras se obtuvieron los resultados que dieron lugar al artículo titulado *‘Rapid and accurate detection of the SARS-CoV-2 Omicron variant with a CRISPR-Cas12a reaction on the RT-qPCR pot’* que se adjunta al final de esta tesis doctoral en el que se propone un método de diagnóstico diferencial de la variante Ómicron B1.1.529 con respecto a Delta utilizando un sistema CRISPR/Cas 12a que permite un ahorro en costes, ya que el método actual para determinar una variante en una muestra se realiza a través de la secuenciación.

4.II.2. Sensibilidad y límite de detección

Para determinar la sensibilidad del kit se realizaron diluciones seriadas a partir de una muestra de paciente de concentración conocida (Saliva 3 = 9,27 ng/μl). El genoma de SARS-CoV-2 mide 29.903 nucleótidos según el Instituto Nacional de Salud Americano (NIH), lo que corresponde a un peso del genoma en 9.241.201’80 Da (Dalton). Un Dalton son $1,66 \cdot 10^{-24}$ gramos por lo que una molécula de genoma del SARS-CoV-2 pesaría $1,53 \cdot 10^{-5}$ picogramos. En la muestra de saliva tenemos una concentración de 9,27 ng/μl por lo que en la muestra inicial hay una concentración estimada de $6,06 \cdot 10^8$ moléculas/μl. Partiendo de estos valores, se estimó también el número de copias por reacción, ya que al añadir 5 μl de la dilución en un volumen total de 20 μl de reacción se diluye el número de copias. La concentración de ARN estimada para las diluciones de la muestra junto con los resultados del experimento de la sensibilidad se muestra en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Resultado del experimento de sensibilidad de la RT-qPCR portátil.

Diluciones	N.º copias ARN estimada por µl	N.º copias ARN en la reacción estimadas	Gen diana	Valor Ct
Saliva sin diluir	6,06x10 ⁸	1,5.10 ⁸	Spike	25,42
			Orf1ab	26,18
1/10 (10 ⁻¹)	6,06 .10 ⁷	1,5.10 ⁷	Spike	28,77
			Ofr1ab	34,03
1/100 (10 ⁻²)	6,06. 10 ⁶	1,5.10 ⁶	Spike	33,06
			Orf1ab	0
1/1000 (10 ⁻³)	6,06.10 ⁵	1,5.10 ⁵	Spike	35,61
			Orf1ab	0
1/10000 (10 ⁻⁴)	6,06. 10 ⁴	1,5.10 ⁴	Spike	38,23
			Orf1ab	0
1/100000 (10 ⁻⁵)	6,06.10 ³	1515	Spike	0
			Orf1ab	0
1/1000000 (10 ⁻⁶)	6,06. 10 ²	151,5	Spike	0
			Orf1ab	0
1/10000000 (10 ⁻⁷)	6,06.10 ¹	15,15	Spike	0
			Orf1ab	0
1/100000000 (10 ⁻⁸)	6,06. 10 ⁰	1,5	Spike	0
			Orf1ab	0

El límite de detección en el experimento es de 1,5.10⁴ copias de ARN por microlitro (una concentración de muestra de 10⁻⁵). Se observa una alta sensibilidad ya que con muestras muy diluidas ya hay detección del ARN, con un aumento de los Ct progresivo conforme se diluye la muestra, con mayor amplificación del gen S con respecto al Orfab1. La *Figura 12* representa el gráfico de la fluorescencia descargado de la nube.

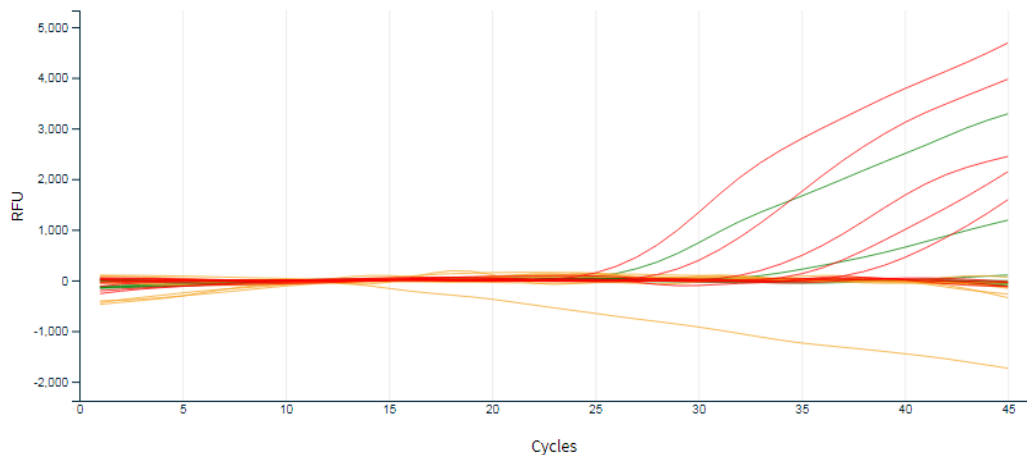


Figura 12. Gráfico de la fluorescencia proporcionado por el servicio de la nube para el experimento de sensibilidad. En rojo se muestran el gráfico del registro de la fluorescencia (RFU) para el gen S de las distintas muestras, en verde el registro de fluorescencia del gen Orfab1.

Para contrastar si realmente el límite de detección estaba en 10^{-4} , se seleccionaron tres muestras, entre ellas dos muestras de saliva y un exudado, y se diluyeron de forma seriada como se describió en materiales y métodos, escogiéndose las diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} donde se presentaría el límite de detección (LOD). Los resultados de este experimento se muestran en la *Tabla 12*.

Tabla 12. Resultados del experimento del límite de detección de RT-qPCR portátil.

Muestra	Dilución	N.º copias ARN estimada por μ l	N.º copias ARN en la reacción estimadas	Gen diana	Valor Ct
Exudado 1	10^{-3}	$8,31 \cdot 10^5$	$2,07 \cdot 10^5$	Spike	26,84
				Orf1ab	0
	10^{-4}	$8,31 \cdot 10^4$	$2,07 \cdot 10^4$	Spike	0
				Orf1ab	0
	10^{-5}	$8,31 \cdot 10^3$	2078	Spike	31,37
				Orf1ab	0
Saliva 3	10^{-3}	$6,06 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	Spike	35,56
				Orf1ab	0
	10^{-4}	$6,06 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	Spike	36,10
				Orf1ab	0
	10^{-5}	$6,06 \cdot 10^3$	1515	Spike	28,20
				Orf1ab	34,95

Saliva 2	10^{-3}	$7,19.10^5$	$1,79.10^5$	Spike	0
				Orf1ab	0
	10^{-4}	$7,19.10^4$	$1,79.10^4$	Spike	27,46
				Orf1ab	0
	10^{-5}	$7,19.10^3$	1797	Spike	29,44
				Orf1ab	33,92

Hay amplificación en todas las muestras en 10^{-5} , lo que supone un promedio de aproximadamente 1800 copias de ARN por microlitro, por lo que la sensibilidad de la RT-qPCR portátil es elevada. Se observa un aumento de la Ct de forma parcial para el gen S en las muestras de exudado 1 y saliva 2, lo que no ocurre con la muestra de saliva 3 que se corresponde con la misma muestra que el experimento de la sensibilidad anterior mostrado en la *Tabla 8*. La *Figura 13* muestra el gráfico de fluorescencia obtenida de este experimento descargada de la nube.

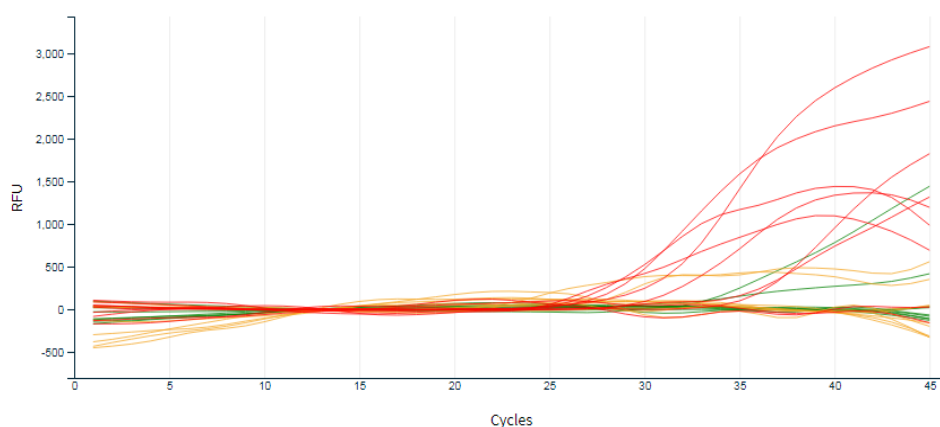


Figura 13. Gráfico de fluorescencia del experimento del límite de detección (LoD).

4.II.3. *Pooling* usando el termociclador portátil

El *pooling* (procedimiento por el cual se unen muestras procedentes de distintos individuos y se analizan de forma simultánea, descrito previamente en la sección 3.5.2 de materiales y métodos) es una forma de solventar las limitaciones físicas que posee el termociclador portátil, ya que sólo es capaz de realizar simultáneamente nueve reacciones. Por ello se realizó el siguiente experimento haciendo cuatro *pools* de cinco y diez muestras,

en dos de ellos añadiendo una muestra positiva de Ct conocido (5+ y 10+, respectivamente) cuyos resultados se reflejan en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Resultados de los experimentos de *pooling*.

Mezcla	Valores de Ct de las muestras	Valores Ct mezcla <i>pooling</i>	Diferencia Ct
5-	Negativas	0	0
5+	Positiva	Positiva	Δ gen S: 4,17; Δ gen Orf1ab: 3,28
	S: 26,12; Orf1ab:28,30	S: 31,58; Orf1ab: 30,29	
10-	Negativas	Positiva	Δ gen S: -
		S: 34,97; Orf1ab: 0	
10+	Positiva	Positiva	Δ gen S: 2,53 Δ gen Orf1ab:-
	S:28,00; Orf1ab:36,52	S: 30,53; Orf1ab: 0	

Ha habido amplificación en los grupos esperados de *pooling* de cinco y diez muestras que contenían la muestra positiva (5+ y 10+), aunque también ha obtenido amplificación positiva el grupo de *pooling* de diez muestras negativo (10-). Si comparamos la diferencia de Cts entre la RT-qPCR portátil de la muestra positiva sola y los Cts de la muestra de *pooling*, se observa que son ligeramente superiores al encontrarse las muestras positivas dentro de una mezcla de *pooling*. En el anexo II se incluye la fluorescencia de este experimento descargada de la nube.

4.II.4. Monitorización de las enfermedades infecciosas usando el termociclador portátil

Se procedió a testar *in situ* la RT-qPCR en dos muestras clínicas en el propio HUMV para determinar la exactitud diagnóstica y tiempo de respuesta, en contraste con lo que se había hecho anteriormente de testar los ARNs ya extraídos. La *Tabla 14* refleja los resultados obtenidos en este experimento.

Tabla 14. Resultados prueba in situ en el HUMV.

Muestras	Gen diana	Ct HUMV	Ct Franklin™	ΔCt
Exudado 1	Spike	21,00	37,25	16,25
Exudado 2	Spike	17,00	31,63	14,63

Sólo se observó detección del gen S, sin haberse detectado amplificación para el gen Orfab1. La diferencia de Cts observada entre las muestras, aunque no debe ser tomada de forma directa al ser dos métodos distintos, es demasiado alta por lo que la carga viral que reflejan ambos métodos es muy diferente entre sí (un Ct < 25 indica una carga viral muy alta y un Ct >30 es una carga viral baja).

4. Parte III. Rendimiento analítico de métodos de diagnóstico molecular

4.III.1. RT-qPCR mediante el termociclador portátil de muestras clínicas

Una forma de evaluar el potencial del termociclador en la práctica clínica es comparar que se obtiene con el kit sobre muestras procedentes de pacientes de Cts ya conocidos mediante los métodos estándar de referencia. La forma de extracción de ARN fue homogénea para todas las muestras utilizando el protocolo de TRIzol/ cloroformo como referencia. Los resultados de Ct obtenidos en las muestras clínicas de exudado nasofaríngeo (*Tabla 15*) y de saliva (*Tabla 16*) reflejan una alta correspondencia con respecto a la referencia del HUMV.

Tabla 15. Resultados obtenidos de Ct del termociclador portátil para los distintos genes (S y Orfab1) con respecto a la RT-qPCR de referencia a partir de muestras de exudado nasofaríngeo. (NR: no registrado).

N.º muestra	Resultados HUMV		Resultados Termociclador portátil		Δ Ct gen S	Δ Ct Gen Orf1ab	Secuenciación
	Gen R	Gen S	Gen S	Gen Orfab1			
Ex.1	19,65	18,98	33,79	0	14,81	-19,65	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.2	30,22	30	36,68	0	6,68	-30,22	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.3	22,68	22,29	29,3	0	7,01	-22,68	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.4	20,07	19,41	23,31	25,82	3,9	5,75	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.5	33,5	31,03	29,23	33,04	-1,8	-0,46	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.6	27,57	26,51	30,06	37,18	3,55	9,61	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.7	22,12	21,31	28,34	32,77	7,03	10,65	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.8	23,73	22,61	29,65	34,34	7,04	10,61	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.9	31,2	27,2	26,62	29,89	-0,58	-1,31	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.10	34,33	33,28	30,9	0	-2,38	-34,33	NR
Ex.11	26,43	25,69	29,78	0	4,09	-26,43	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.12	25,67	24,22	29,68	33,38	7,64	7,71	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.13	25,66	24,79	35,79	0	11	-25,66	NR
Ex.14	24	22,49	26,67	30,32	4,18	6,32	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)

Ex.15	24,28	20,11	23,78	27,37	3,67	3,09	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.16	22,8	21,48	21,22	25,01	-0,26	2,21	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.17	24,78	24,53	25,88	30,33	1,35	5,55	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.18	21,13	21,45	24,44	30,07	2,99	8,94	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.19	22,75	21,48	23,67	25,47	2,19	2,72	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.20	-	-	41,14	0	41,14	0	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.21	23,56	NR	26,25	0	-	-23,56	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.22	25,01	NR	32,33	0	-	-25,01	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.23	24,57	NR	29,49	0	-	-24,57	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex. 24	25,28	NR	29,93	30,65	-	5,37	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.25	21,21	NR	27,85	33,27	-	12,06	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.26	22,17	NR	27,96	0	-	-22,17	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.27	21,24	NR	25,56	33,55	-	12,31	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.28	23,53	NNR	24,98	30,27	-	6,74	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.29	18,86	18,59	24,41	30,28	5,82	11,42	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.30	28	NR	29,05	33,63	-	5,63	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)

Ex. 31	30,51	28,07	25,94	29,08	-2,13	-1,43	Linaje B.1.617.2 (Delta)
Ex.32	25,82	N	30,24	0	-	-25,82	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.33	23,37	N	21,71	32,76	-	9,39	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.34	22,7	N	25,37	35,85	-	13,15	Linaje B.1.1.529 (variante Ómicron)
Ex.35	29,44	27,62	27,49	0	-0,13	-29,44	NR
Ex.36	22,5	NR	32,31	35,67	-	13,17	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.37	26	NR	24,18	28,96	-	2,96	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.38	24,76	22,96	31,86	0	8,9	-24,76	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.39	33,43	32,21	33,18	0	0,97	-33,43	NR
Ex.40	32,59	32,44	33,21	0	0,77	-32,59	NR
Ex.41	26,67	22,66	24,58	36,3	1,92	9,63	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.42	20,8	NR	26,56	0	-	-20,8	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.43	17,2	NR	23,64	0	-	-17,2	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.44	23	NR	23,09	27,9	-	4,9	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.45	32,01	31,56	32,52	0	0,96	-32,01	NR
Ex.46	30,84	29,57	29,76	33,22	0,19	2,38	NR
Ex.47	18,46	17,67	22,98	24,45	5,31	5,99	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)

Ex.48	25,11	24,56	29,25	33,65	4,69	8,54	NR
Ex.49	21,91	20,29	28,53	0	8,24	-21,91	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
Ex.50	36,52	35,48	38,31	0	2,83	-36,52	Linaje C.37 (variante Lambda)

Tabla 16. Resultados obtenidos de Ct para los distintos genes (S y Orfab1) del termociclador portátil con respecto a la RT-qPCR de referencia a partir de muestras de saliva. (NR: No Registrado)

N.º muestra	Resultados HUMV		Resultados Termociclador portátil		Δ Ct gen S	Δ Ct gen Orfab1	Secuenciación
	Gen R	Gen S	Gen S	Gen Orfab1			
S1	31	NR	31,33	0	-	-31	NR
S2	26	NR	23,58	25,01	-	-0,99	Linaje B.1.1.7 (variante Alpha)
S3	29	NR	29,83	34,91	-	5,91	Linaje B.1.1.7 (variante Alpha)
S4	34	NR	33,38	0	-	-34	NR
S5	32,19	NR	32,47	35,85	-	3,66	NR
S6	28	NR	27,03	34,71	-	6,71	Linaje B.1.1.7 (variante Alpha)
S7	26,88	26	28,82	32,06	2,82	5,18	NR
S8	29,51	29	29,93	0	0,93	-29,51	NR
S9	26,5	26	31,06	0	5,06	-26,5	NR
S10	33,25	33,24	34,03	38,09	0,79	4,84	NR
S11	32	27	23,65	24,68	4,97	-32	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S12	33,22	31,41	31,97	0	0,56	-33,22	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S13	30	30	28,38	31,77	-1,62	1,77	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S14	31	31	33,12	42,01	2,12	11,01	NR

S15	25	23	22,99	27,62	-0,01	2,62	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S16	32,01	30,24	27,34	30,11	-2,9	-1,9	NR
S17	34,46	31,9	32,16	41,8	0,26	7,34	NR
S18	29,04	NR	33,06	41,47	-	12,43	NR
S19	30	NR	33,89	38,58	-	8,58	NR
S20	30	NR	28,86	0	-	-30	NR
S21	25	31,42	29,47	35,83	1,95	10,83	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S22	32,76	32,16	29,2	33,8	-2,96	1,04	NR
S23	35	NR	34,95	0	-	-35	NR
S24	34,88	34,11	38,6	0	4,49	-34,88	NR
S25	31,06	30,37	31,9	0	1,53	-31,06	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S26	28,49	27,07	33,15	0	6,08	-28,49	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S27	27,88	28,18	30,74	36,27	2,56	8,39	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S28	32,41	31,41	29,26	34,66	-2,15	2,25	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S29	29,45	29,46	32,68	0	3,22	-29,45	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S30	29,12	28,48	26,12	28,69	-2,36	-0,43	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S31	28,19	29,37	30,43	0	1,06	-28,19	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S32	36,57	38,09	34,91	0	-3,18	-36,57	NR
S33	32,43	31,25	28,35	32,8	-2,9	0,37	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S34	31,7	30,88	36,24	40,13	5,36	8,43	NR
S35	27,61	28,22	28,08	0	-0,14	-27,61	NR
S36	33,94	33,23	30,03	32,45	-3,2	-1,49	NR
S37	38	35	38,68	0	3,68	-38	NR
S38	29	28	32,65	38,7	4,65	9,7	NR

S39	33,2	32,18	24,85	26,88	-7,33	-6,32	NR
S40	23,47	NR	24,21	27,57	-	4,1	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S41	33,94	33,23	29,46	32,64	-3,77	-1,3	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S42	25,28	24,29	21,57	25,81	-2,72	0,53	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)
S43	33,15	34,29	32,25	0	-2,04	-33,15	NR
S44	33,01	34,42	34,96	0	0,54	-33,01	NR
S45	30	NR	32,74	0	-	-30	NR
S46	33	32	30,53	0	-1,47	-33	NR
S47	31,9	32,01	33,77	43,01	1,76	11,11	NR
S48	35,55	33,51	33,21	36,7	-0,3	1,15	NR
S49	24,67	25,38	29,92	0	4,54	-24,67	NR
S50	24,03	23,2	28,92	31,47	5,72	7,44	Linaje B.1.617.2 (variante Delta)

De las muestras determinadas como positivas según el estándar de referencia del HUMV (n=100) han resultado positivas por el termociclador portátil 99 muestras. Todas las muestras de saliva han sido positivas mediante RT-qPCR portátil. Sólo se ha observado un falso negativo, el exudado 20, con un Ct para el gen S de 41,40 (Ct mayor a 40, considerado umbral) y un Ct=0 para el gen Orfab1. Esta muestra procede del servicio de urgencias que cuenta con PCR rápida, por lo que no tiene un valor de Ct específico para ningún gen, sino que dispone de un valor combinado, el cual es Ct< 30 porque ha sido secuenciada.

Se ha observado una mejor detección del gen S respecto al gen Orfab1 del termociclador portátil, de hecho, como criterio de positividad de las muestras con que se detecte el gen S es suficiente (con un Ct <40) para dar la muestra como positivo según el manual de usuario de este kit. En todos los casos se detectó el gen S, mientras que el Orfab1 se detectó en 28 muestras de exudado nasofaríngeo (56%), en la saliva se detectó en 29 de las muestras (el 58%).

La diferencia de Ct entre ambos genes, aunque de nuevo no debe ser comparada de forma directa, se observa menor variación entre el gen S con respecto al gen Orfab1, excluyendo los casos en los que la diferencia es íntegra por no haber sido detectado en uno de los dos métodos. La diferencia de Ct para el gen S de los exudados es de media de 3,30 (teniendo en cuenta 32 casos) y para el gen Orfab1 de 6,67 (teniendo en cuenta 29 casos). En el caso de las muestras de salivas, la diferencia de Ct para el gen S es de media 0,48 en 44 muestras y la diferencia de Ct para el gen Orfab1 es de 2,55 en 36 muestras que cumplían las condiciones mencionadas con anterioridad. En el anexo III se describen las tablas de fluorescencia relacionados con este experimento, indicando el Ct (Cq) de cada gen diana (*target ID*) destacado en amarillo.

4.III.1.1. Reactividad cruzada usando el termociclador portátil y especificidad

Para poder analizar el conjunto de parámetros diagnósticos, fue necesario añadir muestras negativas al conjunto de muestras analizadas y poder así establecer la especificidad de la reacción. Se realizó RT-qPCR de muestras negativas, así como de otros virus respiratorios presentes en muestras del HUMV. De las muestras negativas, inicialmente dio reactividad cruzada el kit de Biomeme al coronavirus OC43 y a la influenza A, con un Ct para el gen Orfab1 de 29,43 en el caso de OC43 y un Ct para Spike de 25,01. Al repetir estas reacciones los resultados fueron negativos, tanto para estos dos virus como para la parainfluenza, el metapneumovirus, el virus respiratorio sincitial (VRS), el rinovirus (RhV) y el resto de los exudados negativos confirmados por el Servicio de Microbiología del HUMV. Se consideró que el kit no tiene reactividad cruzada al no reproducirse estos resultados en las réplicas analizadas de las mismas muestras, pero se penalizó este resultado como dos falsos positivos. Así, se consideró una muestra de 16 exudados negativos totales. En el anexo IV se puede ver en detalle la información de la fluorescencia descargada de *Biomeme Cloud*.

4.III.1.2. Estimación de los parámetros estadísticos de la RT-qPCR portátil

Con el conjunto de muestras a las que se les ha realizado RT-qPCR con el termociclador portátil podemos definir el siguiente cuadro de contingencia (*Tabla 17*).

Tabla 17. Cuadro de contingencia de los resultados obtenido por RT-qPCR portátil.

Resultado RT-qPCR portátil	Muestras positivas estándar	Muestras negativas estándar
Resultado positivo	Verdadero positivo (VP): 99	Falso positivo (FP): 2
Resultado negativo	Falso Negativo (FN): 1	Verdadero negativo (VN): 14
Total	n=100	n= 16

De esta tabla de contingencia se desprenden los siguientes parámetros diagnósticos. (Tabla 18).

Tabla 18. Parámetros estadísticos de la RT-qPCR mediante el termociclador portátil.

Parámetro	Valor	IC 95%	IC 95% Wilson
Sensibilidad (S)	0,99	(0,938-1,00)	(0,946-0,998)
Especificidad (E)	0,875	(0,642-0,977)	(0,64-0,965)
Valor predictivo positivo (VPP)	0,98		
Valor predictivo negativo (VPN)	0,93		
LR positivo (LR+)	8,25		
LR negativo (LR-)	0,011		
Índice de Youden (J)	0,87		
Odds ratio	6,1875		
Exactitud	0,974		

El coeficiente de kappa de Cohen (κ) se sitúa en $0,883 \pm 0,092$ (1,07-0,70; IC 95%) lo que nos indica que el grado de acuerdo es bueno entre ambos métodos y que los resultados no son los esperados al azar, ($\kappa \neq 0$). El LR positivo se clasifica como bueno al estar entre 5 y 10 y el LR negativo como excelente por ser menor a 0,1. El valor donde la sensibilidad y la especificidad es más alta en este método es el índice de Youden que se obtuvo a 0,87. El rango de valores de este índice varía entre -1 y 1, siendo en 1 una prueba diagnóstica perfecta de sensibilidad y especificidad del 100%. La odds ratio es mayor a 1, lo cual indica que la prueba tiene capacidad discriminatoria.

Se proporcionan ambos intervalos de confianza de la sensibilidad y la especificidad proporcionados por los dos softwares estadísticos utilizados para este análisis. Existe mayor variabilidad en la especificidad que en la sensibilidad, es decir, un intervalo de confianza

mayor. Cabe destacar que en un estudio de rendimiento analítico no tiene mucho sentido los valores predictivos, tanto positivos como negativos porque no se tiene en cuenta la prevalencia. La construcción de una curva ROC en base a estos parámetros viene definida por la siguiente forma (Figura 14):

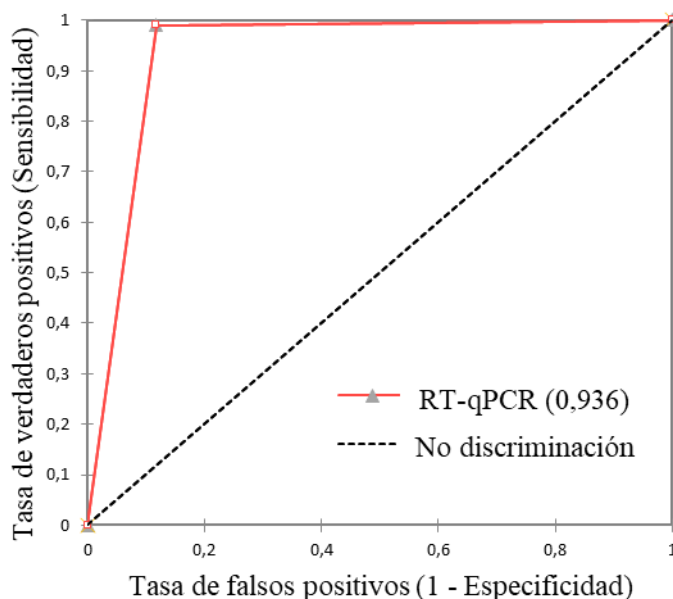


Figura 14. Curva ROC de la RT-qPCR mediante el termociclador portátil.

El valor del área bajo la curva (AUC) es igual a $0,936 \pm 0,041$ (0,857-1,000, con un 95% de confianza). Si contrastamos el valor del área bajo la curva (AUC) siendo igual a 0,5 mediante test de hipótesis, nos da un p-valor $<0,0001$, lo cual nos indica que existe diferencia entre la prueba y los resultados esperados al azar.

4.III.2. Test de antígenos

Con el fin de comparar la técnica de RT-qPCR con el test de antígenos, las muestras que se habían estudiado con RT-qPCR fueron también analizadas con la prueba de antígenos. Los resultados obtenidos mediante los test de antígenos concernientes a las 100 muestras de Ct conocido mediante el HUMV y la RT-qPCR portátil se reflejan en la siguiente tabla (Tabla 19):

Tabla 19. Resultados obtenidos en los test de antígenos tanto para las muestras de exudado nasofaríngeo como de saliva. (Denotado por Ex: exudado nasofaríngeo; S:saliva).

Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
Ex.1	positivo	S1	negativo
Ex.2	negativo	S2	positivo
Ex.3	positivo	S3	negativo
Ex.4	positivo	S4	negativo
Ex.5	negativo	S5	negativo
Ex.6	positivo	S6	negativo
Ex.7	positivo	S7	negativo
Ex.8	negativo	S8	positivo
Ex.9	positivo	S9	negativo
Ex.10	negativo	S10	positivo
Ex.11	negativo	S11	positivo
Ex.12	negativo	S12	negativo
Ex.13	negativo	S13	negativo
Ex.14	positivo	S14	negativo
Ex.15	positivo	S15	positivo
Ex.16	positivo	S16	negativo
Ex.17	positivo	S17	negativo
Ex.18	positivo	S18	negativo
Ex.19	positivo	S19	negativo
Ex.20	positivo	S20	negativo
Ex.21	positivo	S21	positivo
Ex.22	negativo	S22	negativo
Ex.23	positivo	S23	negativo
Ex.24	positivo	S24	negativo
Ex.25	positivo	S25	positivo
Ex.26	positivo	S26	positivo
Ex.27	positivo	S27	negativo
Ex.28	positivo	S28	negativo
Ex.29	negativo	S29	negativo
Ex.30	negativo	S30	positivo
Ex.31	positivo	S31	positivo
Ex.32	negativo	S32	negativo
Ex.33	positivo	S33	positivo
Ex.34	positivo	S34	negativo
Ex.35	negativo	S35	negativo
Ex.36	positivo	S36	negativo
Ex.37	negativo	S37	positivo
Ex.38	negativo	S38	negativo
Ex.39	negativo	S39	positivo
Ex.40	negativo	S40	positivo

Ex.41	positivo	S41	negativo
Ex.42	positivo	S42	positivo
Ex.43	positivo	S43	negativo
Ex.44	positivo	S44	negativo
Ex.45	negativo	S45	negativo
Ex.46	negativo	S46	negativo
Ex.47	positivo	S47	negativo
Ex.48	negativo	S48	negativo
Ex.49	positivo	S49	negativo
Ex.50	negativo	S50	positivo

Del total de muestras positivas (n=100), se han detectado por test de antígenos 46 muestras: 30 de exudado nasofaríngeo y 16 de saliva. De las muestras positivas por test de antígenos de exudado nasofaríngeo, 23 de ellas habían sido detectadas previamente con RT-qPCR con un Ct menor a 25 (alta carga viral) según el HUMV, 4 con un Ct entre 25 y 30 de carga viral media, 2 muestras de Ct menor a 30, como el caso del exudado 20 del cual se desconoce el Ct específico (como se ha explicado previamente en la sección 4.3) y el exudado 41 que tiene Cts con diferente clasificación para cada gen. En el caso de las muestras de salivas, de las 16 muestras detectadas como positivas, 2 muestras tienen una carga viral alta con un Ct menor a 25, 5 muestras tienen un Ct entre 25 y 30, 5 muestras tienen un Ct mayor a 30 y 4 muestras tienen un Ct de diferente clasificación para cada gen según el HUMV.

Si comparamos con los resultados del termociclador portátil, las 30 muestras de exudado detectadas se clasificarían en 2 muestras con Ct menor a 25, 9 muestras con un Ct entre 25 y 30, 2 muestras con Ct mayor a 30 y 17 muestras con Cts de diferente clasificación para cada gen. Respecto a las muestras de salivas comparadas con el termociclador portátil, se clasificarían las muestras detectadas por test de antígenos en 1 con un Ct menor a 25, 2 con un Ct entre 25 y 30, 5 muestras con un Ct mayor a 30 y 8 muestras con un Ct de diferente clasificación para cada gen. La *Tabla 20* recoge un resumen de estos datos y en la sección de anexos se incluyen las imágenes relativas a los ensayos de prueba de antígenos (ver anexo V).

Tabla 20. Relación de Cts entre los antígenos, los resultados proporcionados por el HUMV y el termociclador portátil.

Muestra test antígenos positiva		Ct<25	Ct: 25-30	Ct >30	Distinto Ct para cada gen
HUMV	exudados	23	4	1	1
	saliva	2	5	5	4
Franklin™	exudados	2	9	3	16
	saliva	1	2	5	8

Se puede observar una mejor detección de los test de antígenos a muestras de exudado nasofaríngeo con una carga viral alta al compararlo con los resultados obtenidos previamente en el HUMV (Ct menor a 25), mientras que en salivas se detectan menos muestras con cargas virales más bajas. Respecto al termociclador portátil, la mayor parte de detección tanto en exudados como salivas presentan Cts diferentes para cada gen. Si analizamos en qué límite se encuentran, la mayoría de las muestras de exudados detectadas poseen una carga viral media (Ct gen S entre 25-30 y el Ct del gen Orf1ab mayor a 30) y para las salivas detectadas la carga viral está más equilibrada hay tantas muestras entre el límite de menor a 25 y 25-30 (Ct para el gen S menor a 25 y para el Orfab1 entre 25 y 30) como muestras con Ct mayor a 30.

4.III.2.1 Especificidad y reactividad cruzada en test de antígenos

Para poder calcular la especificidad se analizaron las muestras negativas previamente analizadas por RT-qPCR. Las pruebas de antígenos dieron negativo a todas las muestras negativas por RT-qPCR del HUMV (n=16). No dieron reactividad cruzada para los distintos virus respiratorios incluidos en el ensayo (metapneumovirus, coronavirus OC43, influenza A H3N1, virus respiratorio sincitial (VRS), rinovirus y parainfluenza). En el anexo VI se reflejan los resultados de la reactividad cruzada (ver anexo VI).

4.III.2.2. Estimación de parámetros estadísticos de los test de antígenos

Con los datos obtenidos de las muestras positivas y negativas se estableció de la misma manera la tabla de contingencia de 2x2 (Tabla 21).

Tabla 21. Cuadro de contingencia de los resultados obtenido por test de antígenos.

Resultado test de antígenos	Muestras positivas estándar	Muestras negativas estándar
Resultado positivo	Verdadero positivo (VP): 46	Falso positivo (FP): 0
Resultado negativo	Falso Negativo (FN): 54	Verdadero negativo (VN): 16
Total	n=100	n= 16

De este cuadro de contingencia se calculan los siguientes parámetros estadísticos (Tabla 22).

Tabla 22. Parámetros estadísticos obtenidos por test de antígenos.

Parámetro	Valor	IC 95%	IC 95% Wilson
Sensibilidad (S)	0,46	(0,52-0,31)	(0,366-0,557)
Especificidad (E)	1	(0,78-1)	
Valor predictivo positivo (VPP)	1,00		
Valor predictivo negativo (VPN)	0,23		
LR positivo (LR+)	+∞		
LR negativo (LR-)	0,54		
Índice de Youden (Y)	0,46		
Odds ratio	0,0532		
Exactitud	0,53		

El coeficiente de kappa de Cohen (κ) se sitúa en $0,19 \pm 0,05$ (0,29-0,083; IC 95%) lo que nos indica que el grado de acuerdo está entre el límite entre insignificante y bajo entre ambos métodos y que los resultados no son los esperados al azar, ($\kappa \neq 0$). El LR positivo se clasifica como excelente por ser mayor a 10 y el LR negativo es regular por estar entre 0,5 y 1. El índice de Youden es de 0,46, el punto donde hay mayor sensibilidad y especificidad y la *odds ratio* ha resultado en 0,0532, es decir que no clasifica bien entre las muestras

positivas y negativas, dando más valores negativos entre las muestras positivas que las negativas.

De nuevo los valores predictivos carecen de sentido en este estudio de rendimiento analítico al no tener en cuenta la prevalencia de la enfermedad. Los test de antígenos destacan por su especificidad, más que por su sensibilidad. La curva ROC que se forma a partir de estos datos se muestra en la *Figura 15*.

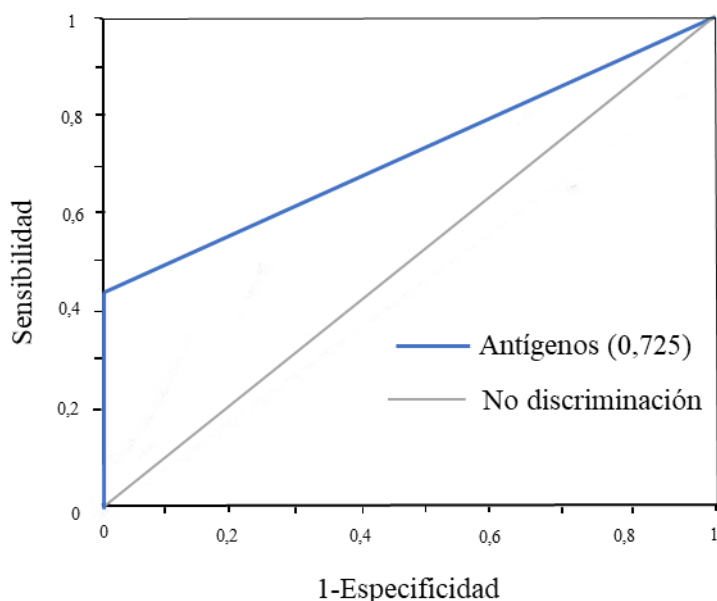


Figura 15. Curva ROC para los test de antígenos.

El valor de AUC para los test de antígenos es de $0,725 \pm 0,025$ (entre 0,676 - 0,774 con un 95% de confianza). Si hacemos un test de hipótesis para descartar que este AUC se debe al azar (H_0 : $AUC = 0,5$), nos da un p-valor $< 0,0001$ por lo que se rechaza la hipótesis nula, los resultados del test de antígenos no son esperados al azar (difieren de la diagonal) con un 95% de confianza.

4.III.3. Técnicas de amplificación isotérmica (RPA)

4.III.3.1. Optimización de RPA

Las reacciones de RPA se testaron al principio en dos pasos, primero retrotranscripción donde el ARN viral se retrotranscribía en ADN complementario (ADNc) y luego reacción de RPA, según las condiciones del fabricante, tal y como se describe en materiales y métodos (sección 3.4) y el protocolo básico de RPA (sección 3.8.1.) Se utilizaron los cebadores de PCR para el gen E de Charité (Berlín) desarrollados por Corman et al.¹¹⁹.

El primer experimento realizado consistió en confirmar si la reacción ocurría por igual en ambos tipos de muestra: de exudado nasofaríngeo y saliva (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados de las primeras pruebas de RPA en función del tipo de muestra, el resultado obtenido y la variante a la que pertenecía la muestra. La banda esperada corresponde a 113 pb del gen E.

Muestra	Resultado	Variante
C-	<i>smear</i>	-
C+	Banda definida	-
Saliva 1	<i>smear</i>	Alpha
Saliva 2	<i>smear</i>	Alpha
Exudado 3	Banda esperada (113 pb)	Beta
Exudado 4	Banda esperada (113 pb)	Delta
Exudado 5	Banda esperada (113 pb)	Ómicron

Los resultados mostraron que hay una banda más definida del tamaño esperado (113 pb) para los cebadores del gen E en exudado nasofaríngeo que en saliva donde aparece más *smear* o mayor rastro. El control positivo (C+) utilizado en esta reacción es un ADN de *E.coli* con unos cebadores propios proporcionado por el kit que amplifican una región de 143 pb. Adicionalmente, se confirmó que la amplificación isotérmica por RPA es capaz de detectar las diferentes variantes del coronavirus (Alpha, Beta, Delta y Ómicron).

En base a los resultados obtenidos en este primer experimento, se observó que las muestras de exudado nasofaríngeo mostraban bandas más precisas en geles de electroforesis, por lo que las posteriores experimentaciones se centraron en muestras de exudados. También se observó en múltiples repeticiones que la presencia de *smear* en los controles negativos solía repetirse.

Posteriormente, se testó si la amplificación por RPA seguía obteniendo valores positivos al tener acoplada en la misma reacción el proceso de retrotranscripción, es decir, se añadió la retrotranscriptasa a la mezcla de reacción (RT-RPA). Los resultados mostraron que es posible esta reacción. Las siguientes reacciones de optimización son de RT-RPA en un solo paso, exceptuando la optimización del tiempo de reacción que se realizó sobre ADNc, es decir, en dos pasos.

4.III.3.1.1 Temperatura

El ajuste de la temperatura influye en la cinética de la reacción de RPA, para ello se aplicaron diferentes temperaturas. De forma simultánea, se usaron diferentes cebadores de PCR para ahorrar costes de optimización y tiempo. Se testaron a 39 °C como indica el fabricante, 40, 41 y 42 °C (*Figura 16*). No se observa evidencia de que el incremento de la temperatura mejore el rendimiento de la reacción.

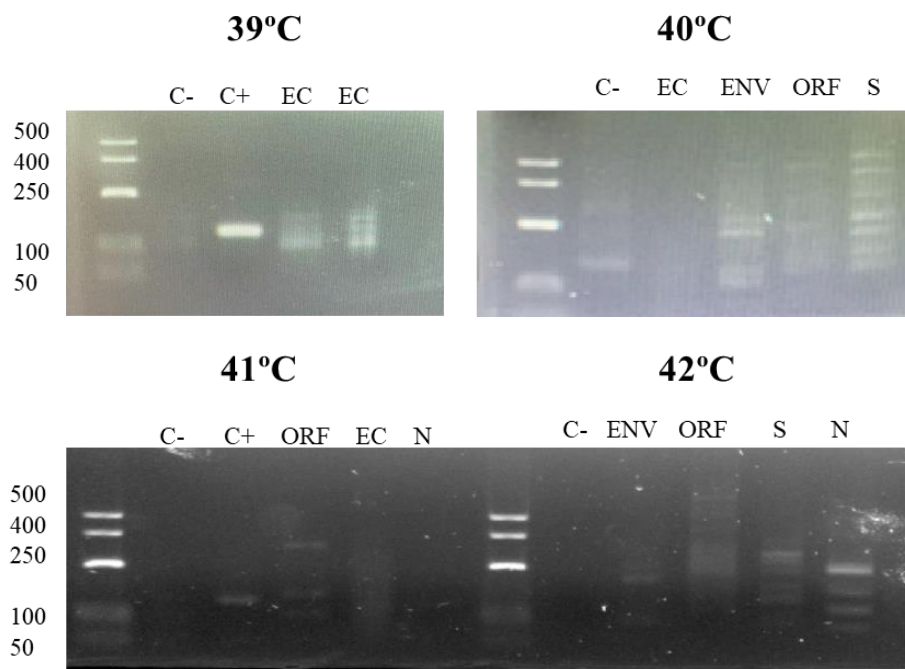
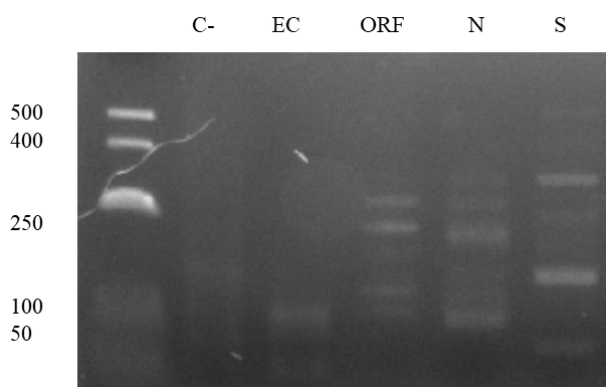


Figura 16. Optimización de la temperatura de reacción. (C-: control negativo; C+: control positivo ADN; en adelante leyenda de cebadores **EC**: cebadores E Charité (Berlín); **ENV**: cebadores E; **Orfab1**: cebadores OrfAb1; **S**: cebadores gen S y **N** cebadores para el gen N.

4.III.3.1.2. Cebadores de PCR

Se utilizaron distintos cebadores diseñados previamente para PCR a una temperatura de reacción de 40 °C descritos en la sección 4.I.1 y se optimizaron las reacciones para un volumen reducido de 10 µl con diferentes concentraciones de material genético extraído. Los fragmentos esperados para cada gen son 113pb para el gen E Charité (Berlín), 230 pb para el gen Orfab1 (ORF), 206 pb para el gen Spike (S) y 193 pb para el gen N y los resultados obtenidos están condensados en la *Figura 17*.

A)



B)

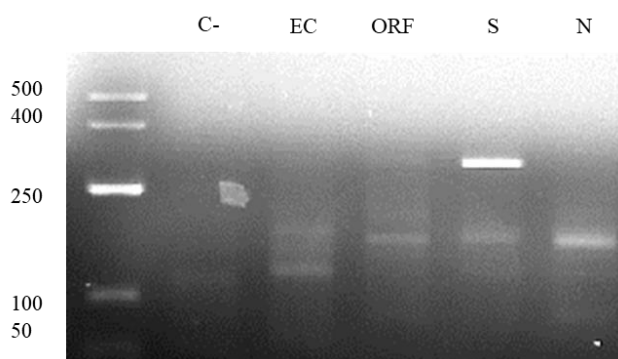


Figura 17. Amplificaciones realizadas con distintos cebadores de PCR en RPA. **A)** A 1ng/µl de concentración de ARN **B)** 100 ng/µl de concentración de ARN. (C-: control negativo; EC: cebador gen E Charité (Berlín), amplicón esperado de 113pb; **Orfab1**: cebador gen Orfab1, amplicón

esperado de 230 pb; **S**: cebador de Spike, amplicón esperado 206 y **N**: cebador del gen N, con un amplicón de 193 pb).

Se observan mejores resultados al emplear los cebadores para el gen E y los del gen N (113 y 193 pb respectivamente de banda esperada). Aunque hay amplificación para los genes S y Orfab1, hay mayor inespecificidad. La técnica de RPA es muy sensible ya que consigue amplificar en 10 µl de reacción a partir de 1 nanogramo por microlitro de ARN.

4.III.3.1.3. Tiempo de reacción

Desde el punto de vista de una técnica POCT la reacción debe transcurrir lo más rápido y eficientemente posible. Por ello, a partir de una muestra de ADNc se utilizaron diferentes tiempos de reacción. Los resultados obtenidos en este experimento se reflejan en la *Figura 18*.

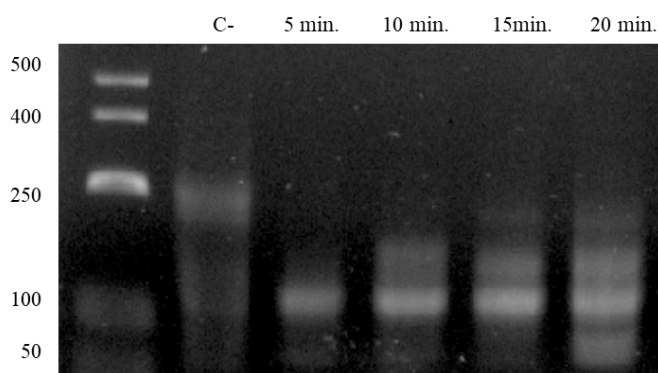


Figura 18. RPA a distintos tiempos de reacción. De izquierda a derecha se observa el marcador de tamaño, con los tamaños indicados a la izquierda de la imagen; C-, control negativo de la reacción; reacción a **5 minutos**; reacción a **10 minutos**; reacción a **15 minutos**; reacción a **20 minutos**.

La reacción ocurre desde los 5 minutos hasta los 20 minutos, que es el estándar de trascurso, donde el ATP que es la fuente de energía del complejo de la recombinasa se agota. Con el trascurso del tiempo de reacción se observa la aparición e incremento de *smear*.

4.III.3.1.4. Concentración de acetato de magnesio

La concentración de acetato de magnesio es un parámetro crítico en la cinética de la reacción, por ello se valoró si su concentración mejoraba o no la eficiencia de la amplificación. Este reactivo se incluye de manera independiente del resto de reactivos del kit porque su concentración depende de las características de los cebadores y del material genético a detectar¹⁹⁰. El experimento del cambio de concentración de acetato de magnesio, que es el iniciador de la reacción, para el gen E como para el gen N, se refleja en la *Figura 19*.

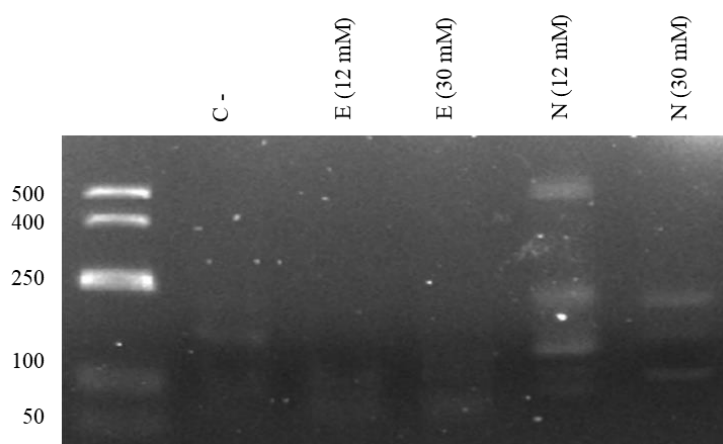


Figura 19. Concentración de acetato de magnesio en RPA. De izquierda a derecha, el marcador de tamaño molecular, C-: control negativo, **gen E a 12 mM** de acetato de magnesio, **gen E a 30 mM** de acetato de magnesio, **gen N a 12 mM** de acetato de magnesio y **gen N a 30 mM** de acetato de magnesio.

No hay evidencia de que la concentración de acetato de magnesio mejore la reacción, ni en sus valores mínimos de 12 mM ni en valores máximos de 30 mM para cada gen.

4.III.3.1.5. Cebadores específicos

Para mejorar el rendimiento de la reacción, los cebadores desarrollados específicamente para RPA (sección 4.1) deben contrastarse entre sí para determinar de manera empírica la pareja que ofrece un mejor rendimiento en la reacción isotérmica, según sugiere el fabricante. Se realizaron contrastes de todos los cebadores directos (E1F, E2F, E3F y E4F)

frente a todos los inversos (E1R, E2R, E3R y E4R). A modo de ejemplo, el contraste del par de cebador inverso ER4 frente a todos los cebadores directos E1F, E2F, E3F y E4F puede observarse en la *Figura 20*.

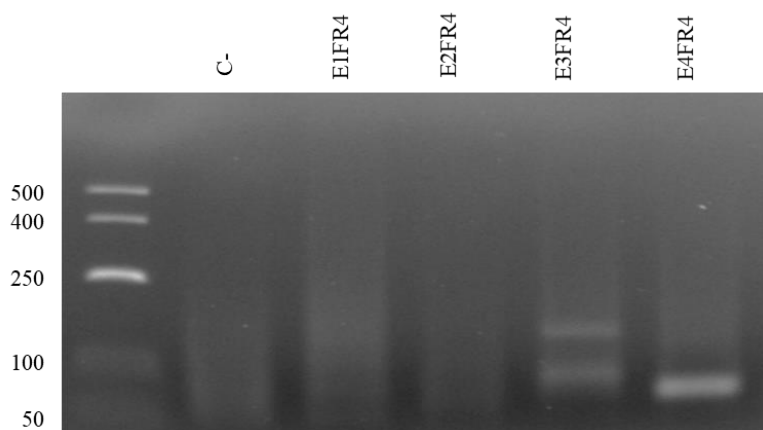


Figura 20. Contraste del cebador inverso ER4. Denotado con C-: control negativo, **E1FR4**: cebador directo E1F con cebador inverso ER4; **E2FR4**: cebador directo E2F con cebador inverso E4R; **E3FR4**: cebador directo E3F con cebador inverso E4R; **E4FR4**: cebador directo E4F con cebador inverso E4R.

Tras probar todas las combinaciones, la mejor pareja de cebadores para el gen E es E4FR4 que da una banda clara de un tamaño esperado de 97 pares de bases.

Se realizaron las mismas pruebas de contraste de los cebadores del gen N. En este caso, la mejor pareja de cebadores es N1FR2, con una única banda clara de un tamaño esperado de 137 pb, pero los contrastes con los cebadores para el gen N largos siempre producían bandas en el control negativo por lo que se descartó su uso.

4.III.3.1.6. Empleo de aditivos

Dimetilsulfóxido (DMSO) y formamida: La adición de DMSO y de formamida se emplearon para aumentar su astringencia y evitar la aparición de falsos positivos como por ejemplo bandas en el control negativo, tal y como indica la literatura¹⁹¹. En nuestro caso, ni por separado ni de manera conjunta aumentaron la especificidad de la reacción a distintas concentraciones.

Betaína. Con respecto a la betaína, se ha observado que aumenta de la especificidad de las reacciones de RPA, usándola en un rango de concentraciones de 0,3 a 0,9 M¹⁸⁴. De las concentraciones utilizadas del rango de 0,4 a 0,8 M, se obtuvo amplificación a partir de 0,4-0,5M para el gen E, aunque también amplificó el control y las muestras negativas, por lo que no se consideró la betaína un aditivo que aportase la eficacia deseada para esta reacción.

La adición de betaína producía una banda mayor y más precisa, pero también aparece amplificación en las muestras negativas, lo que no ocurre en la reacción sin betaína que se intuyen en las muestras positivas (ex. 3-4) un par de bandas débiles. La concentración a 0,4 M produjo un resultado similar (gel no mostrado) y en concentraciones mayores de 0,5 M no se obtuvo resultado.

4.III.3.1.7. Pretratamientos

Se realizaron varios pretratamientos sencillos a las muestras para probar si ocurría la reacción de RPA evitando la extracción del ARN del virus, el cual es un paso limitante de las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos debido al tiempo que conllevan y las posibilidades de contaminación de la muestra. Se aplicaron procedimientos ya descritos en la bibliografía¹⁹² como el calentamiento de la muestra a 95° C, el uso de proteinasa K a 20 mg por microlitro o de tampones de lisis comerciales y combinaciones de estos métodos sin obtener resultados satisfactorios (ausencia de amplificación; geles no mostrados). Esto puede ser debido a la presencia de inhibidores de la reacción en el medio de transporte viral en el que son incluidas las muestras, además de aquellos que de forma intrínseca poseen las muestras como se ha reflejado en las muestras de saliva en las que las reacciones ocurren con menor rendimiento.

4.III.3.2. Multiplexado de RPA

La detección de varios genes al mismo tiempo (multiplexado) en un método de diagnóstico que permite mejorar la sensibilidad del método al aumentar las posibilidades de dianas de detección (si no hay fenómenos de competición/inhibición entre los cebadores) y la robustez del método si ambas dianas son detectadas de forma simultánea. Por ello, se intentó multiplexar la reacción de RPA que estaba en desarrollo. El multiplexado de RPA se

llevó a cabo utilizando cebadores de PCR para el gen E y el gen N, a partir de concentraciones de 150 nM hasta el límite superior de concentraciones permitidas por la reacción. Incluso se probaron los cebadores para el gen S y Orfab1 a concentraciones iguales. Los resultados de ambos experimentos se muestran de manera conjunta en la *Figura 21*.

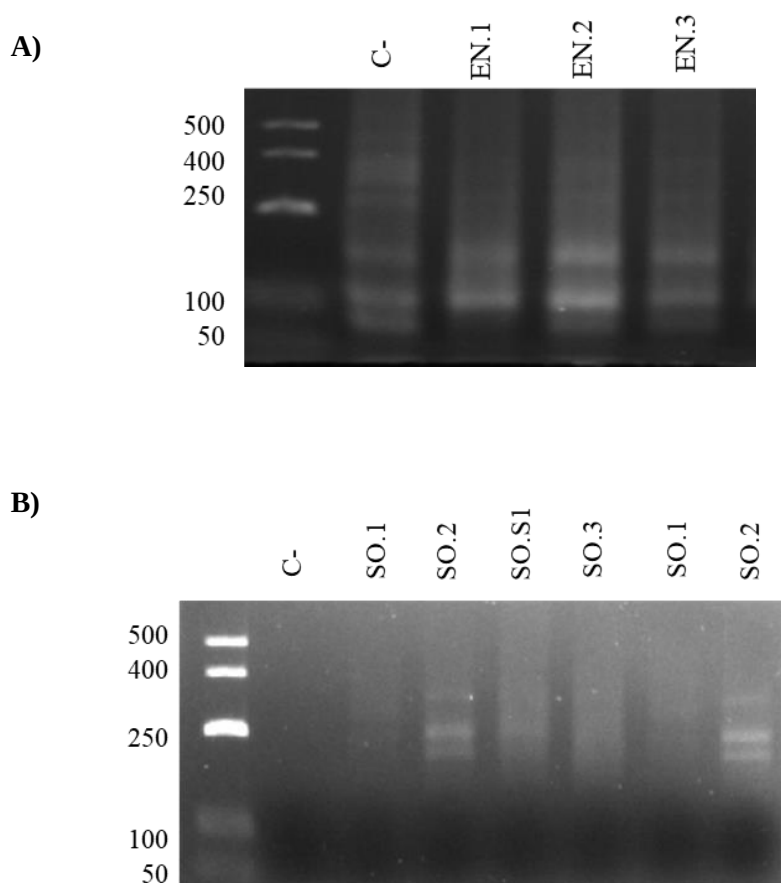


Figura 21. RT-RPA multiplex de los cebadores para los genes E, N, Orfab1 y S. **A)** RT-RPA multiplex para los genes E y N a distintas concentraciones **EN.1:** 250 nM; **EN.2:** 300 nM y **EN.3:** 400nM. **B)** RT-RPA para los genes Orfab1 y S de diferentes muestras: **SO.1, SO.2** y **SO.3** diferentes muestras de exudado y **SO.S1** muestra de saliva.

Aparecen bandas a la altura esperada para cada par de cebadores ensayados, para el par E y N bandas alrededor de 97 pb y 137 pb respectivamente; y para el gen S y Orfab1, 206 y

230 pares de bases, respectivamente. Sin embargo, aparecen bandas inespecíficas en el control negativo y los resultados obtenidos para los genes Orfab1 y S no son reproducibles, ya que al repetir las condiciones establecidas se observó que en algunas réplicas aparecían las bandas esperadas y en otros casos no ocurría la amplificación. Por ello se concluyó que los resultados no eran consistentes. Al añadir los cebadores para el gen N de PCR (en adelante N corto) a distintas concentraciones dio el mismo resultado.

Las reacciones de RPA de desequilibrio (tanto entre cebadores entre sí, como dentro de cada par de cebadores entre el cebador directo del inverso) más frecuentemente usadas son 65-35%. Estos resultados, aunque fueron prometedores, tienen poca reproducibilidad, ya que al repetir las condiciones establecidas se encontró gran disparidad de resultados donde las amplificaciones pueden ocurrir o no, por lo que, aun incluyendo réplicas de las reacciones, los resultados no son consistentes.

Otras condiciones testadas fueron utilizar condiciones de desequilibrio al 65-35% entre los cebadores E y N (cortos) y a 420 nM de cada cebador. Aparecen dos bandas en los geles, pero aparecen también dos bandas de idéntico tamaño en el control negativo, por lo que se descartaron estas condiciones para multiplexar la reacción y se prosiguió con la detección de un solo gen en muestras clínicas mediante amplificación isotérmica.

4.III.3.3. Secuenciación del fragmento de RPA

Para saber si el fragmento amplificado con los cebadores E4FR4 era el esperado por RPA o no, se enviaron productos de RPA purificados al HUMV con los cebadores directo e inverso para su secuenciación. El análisis por BLAST de las secuencias obtenidas determinó que la secuencia directa alinea con el SARS-CoV-2 en un 96,30 % en el gen E con un E-valor de 3.10^{-12} y la secuencia inversa alinea con el gen E del SARS-CoV-2 en un 93,02% con un *E-value* de 9.10^{-5} . Con estos datos se puede determinar que la secuencia que amplifica mediante estos cebadores pertenece al gen de la envoltura. En el anexo X se incluyen los análisis BLAST para las secuencias proporcionadas por el HUMV.

4.III.3.4. RPA en muestras clínicas

Tras los procesos de experimentación y optimización de la amplificación isotérmica mediante RPA se eligió la pareja de cebadores E4FR4 (descrita en la sección 4.6.1.5) para la realización de las pruebas de validación para poder evaluar las pruebas clínicas. Esta pareja de cebadores representaba todas las ventajas del conocimiento generado hasta el momento, como ser un par de cebadores de diseño propio, transcurrir las reacciones en volúmenes pequeños de 10 µl, posibilidad de hacer la reacción conjunta con la retrotranscripción, producían menos bandas inespecíficas o ninguna y los controles negativos eran más limpios.

Al conjunto de 71 muestras clínicas de exudado nasofaríngeo se le realizó RT-RPA en las condiciones descritas en materiales y métodos (sección 3.8). Los resultados de los geles fueron evaluados de forma externa y ciega para evitar el sesgo del observador, ya que al conocer el estado de la muestra podría influir si la prueba es considerada positiva o no. La *Figura 22* muestra un ejemplo de los geles obtenidos en este ensayo.

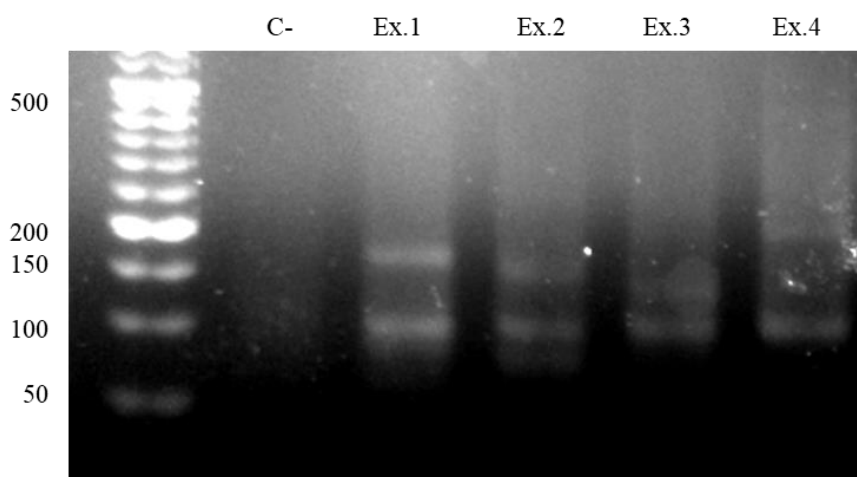


Figura 22. RT-RPA de las muestras clínicas de SARS-CoV-2. Denotado como **C-:** control negativo; **Ex.1:** muestra de exudado n°1; **Ex.2:** muestra de exudado n°2; **Ex.3:** muestra de exudado n°3; **Ex.4:** muestra de exudado n°4.

La banda esperada para el gen E es de exactamente 97 pb, aunque como puede observarse en la *figura 32* en ocasiones aparece alguna banda inespecífica de tamaño superior a esta banda. Se consideró como positiva para el SARS-CoV-2 aquella muestra con

banda alrededor de 100 pb, dadas las limitaciones en la precisión que ofrece la electroforesis como medio para revelar los resultados. La *Tabla 24* recoge los resultados de estas reacciones.

Tabla 24. Resultados de las reacciones de RPA en muestras clínicas de exudado nasofaríngeo.

Marcado en verde resultados concordantes positivos entre el resultado ciego y la referencia.

Muestra	Resultado referencia	Resultado RPA	Muestra	Resultado referencia	Resultado RPA
Ex.1	positivo	positivo	Ex.37	positivo	negativo
Ex.2	positivo	positivo	Ex.38	positivo	negativo
Ex.3	positivo	positivo	Ex.39	positivo	positivo
Ex.4	positivo	positivo	Ex.40	positivo	positivo
Ex.5	positivo	negativo	Ex.41	positivo	positivo
Ex.6	positivo	negativo	Ex.42	positivo	negativo
Ex.7	positivo	negativo	Ex.43	positivo	positivo
Ex.8	positivo	negativo	Ex.44	positivo	negativo
Ex.9	positivo	negativo	Ex.45	positivo	positivo
Ex.10	positivo	negativo	Ex.46	positivo	negativo
Ex.11	positivo	positivo	Ex.47	positivo	negativo
Ex.12	positivo	positivo	Ex.48	positivo	negativo
Ex.13	positivo	negativo	Ex.49	positivo	negativo
Ex.14	positivo	positivo	Ex.50	positivo	negativo
Ex.15	positivo	positivo	Ex.51	positivo	negativo
Ex.16	positivo	positivo	Ex.52	positivo	negativo
Ex.17	positivo	positivo	Ex.53	positivo	negativo
Ex.18	positivo	positivo	Ex.54	positivo	positivo
Ex.19	negativo	positivo	Ex.55	positivo	positivo
Ex.20	negativo	positivo	Ex.56	positivo	negativo
Ex.21	negativo	positivo	Ex.57	positivo	negativo
Ex.22	negativo	positivo	Ex.58	positivo	positivo
Ex.23	negativo	positivo	Ex.59	positivo	positivo
Ex.24	negativo	negativo	Ex.60	positivo	positivo
Ex.25	negativo	negativo	Ex.61	positivo	positivo
Ex.26	negativo	negativo	Ex.62	positivo	positivo
Ex.27	negativo	negativo	Ex.63	positivo	positivo
Ex.28	negativo	negativo	Ex.64	negativo	negativo
Ex.29	negativo	negativo	Ex.65	negativo	negativo
Ex.30	positivo	positivo	Ex.66	negativo	negativo
Ex.31	positivo	positivo	Ex.67	negativo	negativo
Ex.32	positivo	positivo	Ex.68	negativo	negativo
Ex.33	positivo	negativo	Ex.69	negativo	negativo
Ex.34	positivo	positivo	Ex.70	negativo	negativo

Ex.35	positivo	positivo	Ex.71	negativo	negativo
Ex.36	positivo	negativo			

El anexo VII incluye los geles del resto de muestras clínicas en los que se ha realizado las reacciones de RPA.

4.III.3.4.1. Reactividad cruzada y especificidad de RPA

Para calcular la especificidad y reactividad cruzada, se incluyeron muestras negativas y virus respiratorios distintos al SARS-CoV-2 que incluían el rinovirus (RhV), el virus respiratorio sincitial (VRS), la parainfluenza, el metapneumovirus y los coronavirus NL63 y OC43. Del total de 19 muestras negativas ensayadas han sido verdaderas negativas 14, siendo 5 falsos positivos.

No se ha hallado reactividad cruzada de la reacción de RPA con el resto de los virus respiratorios ensayados. Los ensayos de reactividad cruzada y especificidad están incluidos en el anexo VIII.

4.III.3.4.2. Estimación de los parámetros estadísticos de RPA

En base a los resultados obtenidos en el método ciego y los ensayos de especificidad se genera la siguiente tabla de contingencia (*Tabla 25*):

Tabla 25. Tabla de contingencia de las muestras clínicas para RPA.

Resultado RPA	Muestras positivas estándar	Muestras negativas estándar
Resultado positivo	Verdadero positivo (VP): 29	Falso positivo (FP): 5
Resultado negativo	Falso Negativo (FN): 23	Verdadero negativo (VN): 14
Total	n=52	n= 19

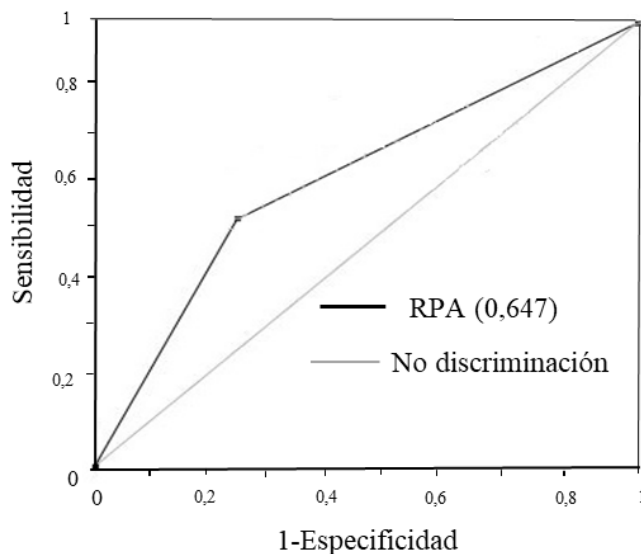
A partir de esta tabla de contingencia podemos calcular como en el resto de los métodos los parámetros estadísticos recogidos en la *Tabla 26*.

Tabla 26. Parámetros estadísticos de RPA en este estudio.

Parámetro	Valor	IC 95% Wilson
Sensibilidad (S)	0,558	(0,423-0,684)
Especificidad (E)	0,737	(0,512-0,882)
Valor predictivo positivo (VPP)	0,853	
Valor predictivo negativo (VPN)	0,378	
LR positivo (LR+)	2,1	
LR negativo (LR-)	0,6	
Índice de Youden (Y)	0,295	
Odds ratio	0,066	
Exactitud	0,60	

El coeficiente de kappa de Cohen (κ) se sitúa en $0,226 \pm 0,102$ (0,42-0,02; IC 95%) lo que nos indica que el grado de acuerdo es bajo entre ambos métodos y que los resultados no son los esperados al azar, ($\kappa \neq 0$). El LR positivo es regular por estar entre 5 y 2 y el LR negativo es inútil por estar entre 0,5 y 1. El índice de Youden es de 0,295 y el valor de *odds ratio* es de 0,066. La prueba no discrimina bien entre muestras positivas y negativas, clasificando peor las muestras positivas.

Si construimos una curva ROC en base a estos datos sería de la siguiente forma (*Figura 23*):

**Figura 23.** Curva ROC para RPA.

El AUC para RPA es de $0,647 \pm 0,06$ (0,525-0,770, IC 95%). El contraste de hipótesis si los resultados son debidos al azar o no, es decir AUC igual o distinto a 0,5 ($H_0: (\theta_i - \theta_j) = 0$ frente a $H_1: (\theta_i - \theta_j) \neq 0$), nos da un p-valor de 0,01 por lo que rechazamos la hipótesis nula con un 95% de confianza, los resultados de RPA no son los esperados al azar.

4. Parte IV. Evaluación comparativa de los métodos de diagnóstico

4.IV.1. Comparación de curvas ROC de RT-qPCR y test de antígenos

Una forma de comparar las distintas técnicas entre sí, dado que han sido realizadas sobre las mismas muestras, es comparar las áreas bajo la curva (AUC) obtenidas entre ambos métodos. Al superponer ambas curvas ROC entre sí y comparar si los valores AUC obtenidos entre ambos métodos son iguales entre sí o no, se obtiene el siguiente gráfico; (Figura 24).

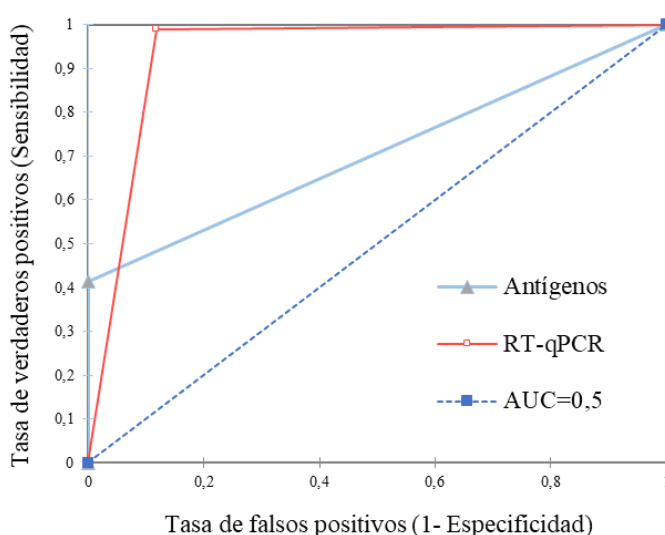


Figura 24. Comparación de curvas ROC entre la RT-qPCR portátil y el test de antígenos.

El contraste de hipótesis si las áreas bajo la curva (AUC) son iguales o no ($H_0: (\theta_i - \theta_j) = 0$ frente a $H_1: (\theta_i - \theta_j) \neq 0$) nos da un p-valor menor a 0,0001 por lo que se rechaza la hipótesis nula, las áreas bajo la curva entre ambos métodos son distintas, siendo mayor en el caso de la RT-qPCR portátil.

4.IV.2. Comparación de curvas ROC entre todos los métodos

La comparación de curvas ROC no se hizo de manera directa al ser muestras distintas entre RPA y RT-qPCR portátil y antígenos y tener diferente tamaño muestral. Para ello se redujo el tamaño muestral de RT-qPCR y antígenos al tamaño muestral de RPA de manera proporcional se calculó de nuevo las curvas ROC para cada método y se compararon entre sí¹⁹³ (Figura 25).

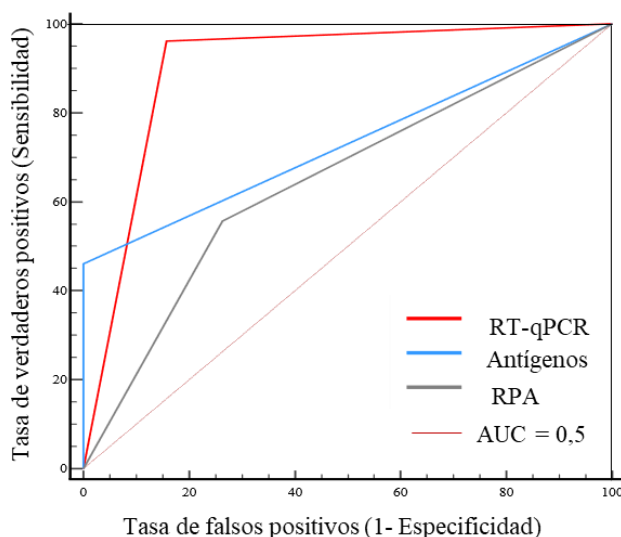


Figura 25. Gráfico de comparación de curvas ROC entre RT-qPCR portátil, antígenos y RPA.

Las AUC en este caso fueron para la RT-qPCR portátil de $0,90 \pm 0,045$ (0,808- 0,960 95% IC), la AUC para el test de antígenos fue de $0,731 \pm 0,0349$ (0,612-0,829 95% IC) y para RPA $0,647 \pm 0,06$ (0,525-0,770, IC 95%). El contraste de hipótesis si las áreas son iguales entre sí o no, es decir la diferencia entre ambas puede ser 0 se obtuvo un p-valor de 0,0020 y menor a 0,0001 entre RT-qPCR portátil comparado con antígenos y RPA, lo cual es estadísticamente significativo. El p-valor entre antígenos y RPA fue de 0,1349 el cual no es estadísticamente significativo, las AUC de ambos métodos pueden ser iguales. Esto significa que la RT-qPCR portátil discrimina mejor que ambos métodos al poseer un valor de AUC cercano a 1 y diferente de forma significativa a los test de antígenos y RPA y que el poder discriminativo de los test de antígenos utilizados y el método de RPA desarrollado es parecido entre sí, porque las AUC pueden llegar a valer lo mismo.

Discusión

5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de métodos de amplificación isotérmica para la detección del SARS-CoV-2 que puedan ofrecerse como bienes y servicios a terceros y que funcionen como POCT. Este objetivo principal es bastante ambicioso con respecto a lo ya existente en la competición de mercado donde se pueden encontrar productos y métodos de diagnóstico como kits de PCR portátiles y test de antígenos, evaluados en esta tesis. En este camino, se alcanzó de forma inicial la consecución de dicho objetivo al diseñar una mezcla propia de la reacción isotérmica y al acoplar la retrotranscripción en un paso. Los intentos de evitar la extracción de ARN, que es un paso previo de preparación de la muestra que consume tiempo, no han dado resultado, aunque se sabe que RPA resiste a mayor cantidad de inhibidores en muestra cruda que la PCR, según indican los fabricantes y algunos estudios en muestras directa o con pretratamiento^{187,192,194,195}. El método de detección de los amplicones de RPA también es mejorable, la fluorescencia mediante sondas y acoplamiento con reacciones CRISPR permiten una mayor sensibilidad y acortan los tiempos de reacción como se han desarrollado en otros estudios^{153,154,196}, lo cual es una interesante perspectiva de futuro para este estudio.

Respecto a los objetivos específicos, la validación del kit de RT-qPCR mediante el termociclador portátil ha mostrado una alta sensibilidad del orden de 10^{-5} ($6,06 \cdot 10^3$ moléculas de ARN estimadas). Esto concuerda con estudios previos como el de Voelker et al.¹⁹⁷ en muestras clínicas, pero en estudios de Onyilagha et al.¹⁹⁸ han demostrado límites de detección menores, alrededor de 15 copias por microlitro en muestra clínica. Según el fabricante, el kit es capaz de detectar 1,8 genoma equivalentes por microlitro, pero refiere estos datos en muestras artificiales que se han inyectado el ARN del SARS-CoV-2 por lo que presumimos que la muestra posee una alta calidad y no es la muestra clínica estándar donde hay procesos naturales de degradación del material genético del virus¹⁹⁹ o inhibidores del tipo mucopolisacáridos.

Los experimentos relacionados al *pooling* de muestras demuestran que es posible hacer *pooling* de muestras usando el kit de RT-qPCR para el termociclador portátil. El fabricante destaca que el *pooling* de muestras conlleva una pérdida de sensibilidad y nuestros

resultados reflejan esa pérdida de sensibilidad, al hacer *pooling*, los valores de Ct aumentaron en ambos genes para las muestras dentro del *pooling* que la muestra por separado¹⁹⁹. Nuestros resultados de *pooling* con diez muestras negativas resultó positivo, sin embargo, no podemos descartar que este resultado haya sido debido a contaminación durante el proceso. También debe puntualizarse que el interés clínico en hacer *pooling* de muestras decae cuanto mayor es el número de muestras incluidas, debido a que un resultado presuntivamente positivo debería resolverse individualizando las muestras por lo que el ahorro de tiempo y reactivos no sería rentable²⁰⁰.

El experimento *in situ* del termociclador portátil para ver su capacidad de monitorizar las enfermedades infecciosas dio una diferencia demasiado alta entre las Cts obtenidas por la RT-qPCR portátil y el método estándar de detección del HUMV. Sin embargo, de manera general al observar con perspectiva todas las muestras de exudado nasofaríngeo y saliva sometidas a RT-qPCR portátil, las diferencias de Ct entre ambos métodos no difiere demasiado entre ambos genes siendo el gen S el que menos diferencia de Ct presenta y el que mejor se detecta con el kit de RT-qPCR. Esto concuerda con que la detección del gen S sea suficiente para determinar que una muestra sea positiva según el fabricante¹⁹⁹.

En base a lo mencionado anteriormente y al rendimiento clínico, el mejor uso del kit de Biomeme y el termociclador portátil sería en centros de salud descentralizados, donde el número de muestras a analizar no es elevado y daría una respuesta rápida al clínico sobre el diagnóstico. Incluso podría pensarse adaptar su uso a farmacias, aduanas o aeropuertos como un servicio diagnóstico. La implementación de estos termocicladores portátiles y kits de detección rápida en ámbito sanitario permiten un manejo clínico adecuado del paciente si sus resultados se apoyan en la evidencia clínica y son interpretados por un profesional sanitario. Esta estrategia de detección rápida y aislamiento si es necesario permite un control del brote infeccioso mediante la identificación de los casos, el análisis de contacto y el corte de las cadenas de transmisión.

Las muestras clínicas incluidas en el estudio se han proporcionado de manera aleatorizada dependiendo de la situación de la pandemia. Solo se han incluido dependiendo del tipo de muestra, sin ninguna característica previa que pueda inducir a sesgo de composición del espectro o de selección como recogen guías clínicas.

El siguiente objetivo de determinación de los parámetros diagnósticos del kit de RT-qPCR mediante termociclador portátil en muestras clínicas resultó del total de 116 muestras en 99 muestras verdaderos positivos, 1 muestra falso negativo, 14 muestras verdaderos negativos y 2 muestras falsos positivos. Se calcula una sensibilidad del 99% (94-99 95% de IC), una especificidad del 88% (64-97 95% de IC). En estudios previos como el de Voetker et al¹⁹⁷ la sensibilidad del kit es menor en 3 de cada 5 muestras con respecto al método que usaron de referencia (*BioFire® Respiratory Panel 2.1* (RP2.1; *Salt Lake City, UT*) y la concordancia mediante el valor kappa de Cohen (κ) entre ambos métodos fue peor para el caso de las muestras de saliva. En nuestro caso, en las muestras de saliva han resultado todas positivas con mayor concordancia con respecto a la referencia y la sensibilidad mayor. Con respecto al fabricante los valores de VPP y VPN son similares a los de nuestro estudio (98 y 93% frente al 96'9 y 98'3 % indicado por el fabricante¹⁹⁹. Otros como el ya mencionado estudio de Onyilagha et al¹⁹⁸ mostraron una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, aunque se incluyó menor número de muestras positivas en ese estudio (48 frente a 100) pero mayor número de muestras negativas (41 frente a 16).

La reactividad cruzada es fundamental estudiarla debido a que con el diagnóstico se intenta detectar de forma correcta el agente etiológico de la enfermedad. Dado que la sintomatología del coronavirus es muy similar a la de otros virus respiratorios y puede generar confusión, es importante que el método discrimine entre distintos agentes infecciosos que cursan con patología similar para un diagnóstico certero clínico y estudios epidemiológicos²⁰¹. Los estudios de reactividad cruzada de RT-qPCR en nuestro caso, dio positivo en primera instancia a influenza A y coronavirus OC43, pero al repetir estos experimentos resultó negativo. No obstante, esta situación se registró como falsos positivos dentro de la tabla de 2x2 de contingencia. En base a esto concluimos que el kit no tiene reactividad cruzada como sugieren otros autores que lo han testado con otros patógenos respiratorios y han obtenido resultado negativo^{197,198}.

El valor de AUC en la RT-qPCR portátil obtenido fue de $0,936 \pm 0,041$ (0,857-1,000, con un 95% de confianza) y es estadísticamente significativo con respecto al azar. Este valor es similar al obtenido mediante 2019-nCoV: *Real-Time Fluorescent* RT-PCR kit de BGI, superior al 2019-nCoV *TaqMan* RT-PCR Kit de *Norgen Biotek* e inferior al valor AUC obtenido mediante el kit de BGI anterior con extracción mediante bolas magnéticas en un

estudio de Pearson et al.²⁰² y mayor a otros estudios de *droplet* digital PCR (ddPCR) de SARS-CoV-2 en plasma²⁰³ El coeficiente de kappa de Cohen (κ) tiene un valor de $0,883 \pm 0,092$ (1,07-0,70; IC 95%) lo que nos indica que el grado de acuerdo es bueno entre el método y la referencia y este valor no es atribuido al azar.

Además, la RT-qPCR portátil es un sistema abierto y versátil que se puede adaptar a la detección de otros patógenos y procesos (industria alimentaria, control biológico de tóxicos), lo cual es interesante de cara a su implementación y existen numerosos proyectos relacionados con el uso de este termociclador en enfermedades infecciosas, defensa frente a agentes biológicos, vigilancia epidemiológica de vectores de enfermedades como garrapatas, higiene e industria agroalimentaria²⁰⁴. Este interés creciente de esta metodología en la detección de ADN deriva de las propiedades intrínsecas que posee de precisión y facilidad de uso, utilidad en zonas de bajos recursos (su funcionamiento es a través de baterías) e integrado en el enfoque *One Health*. El enfoque *One Health* es una tendencia de vigilancia de la salud pública desde un ámbito multidisciplinar, donde confluye la sanidad humana, ambiental y animal. Controlando los tres ámbitos y entendiendo la salud de forma holística e interdependiente, se consigue un manejo efectivo de la misma y es donde incide de manera directa estos dispositivos cuya versatilidad les permite ser utilizados en cada una de estas áreas. La digitalización e integración con *smartphones* o dispositivos *Bluetooth* juega a su favor. En plena tendencia de la era de la medicina digital, la posibilidad de que los resultados sean comunicados al móvil o a un dispositivo médico o a través de la nube permite agilizar el proceso de la decisión del clínico con respecto al diagnóstico y esto puede marcar la diferencia en la estrategia de control de una enfermedad infecciosa.

El objetivo de evaluar los parámetros estadísticos de los test de antígenos nos dio una sensibilidad del 46% (52-30% al 95% IC) y una especificidad del 100% (78-100% al 95% IC). Los test de antígenos destacan por su especificidad y tienen sensibilidades variables según han reportado diferentes estudios²⁰⁵, en los que test de antígenos tienen sensibilidades similares a las encontradas en este estudio. Las muestras que han dado positivo por test de antígenos han sido mayores en el caso de exudados que de salivas, lo que también concuerda con resultados obtenidos en el estudio anterior²⁰⁵, pero puede explicarse en parte a que los exudados detectados por test de antígenos tenían un Ct menor a 25, lo que presupone una carga viral alta con respecto a las salivas positivas que tenían un Ct mayor a

30 con una carga viral baja. La especificidad fue alta y no hubo reactividad cruzada con ningún otro patógeno respiratorio, tal y como indica el fabricante. Aun así, este estudio confirma la superioridad en la precisión diagnóstica de la RT-qPCR frente a los test de antígenos dentro de que es un estudio de rendimiento analítico en un entorno controlado y la muestra es congelada, en otra situación los resultados obtenidos por este test podrían diferir de manera significativa, ya que la sensibilidad y especificidad reportada por el fabricante son del 96,4 y el 99% respectivamente para el test de exudado y del 90,1 y el 99,3 % para el test de saliva²⁰⁶. Respecto a la reactividad cruzada de los test de antígenos, se confirma que no hay reactividad cruzada frente a coronavirus OC43, influenza A H3N1, virus respiratorio sincitial y parainfluenza 3 y se aporta no reactividad cruzada frente a metapneumovirus y rinovirus.

Los datos obtenidos mediante RPA sugieren que, a pesar de la sencillez relativa de la reacción, es bastante sensible a cambios en la concentración de los reactivos, como la PCR, y a la contaminación de las muestras. Los resultados confirman que la reducción en volumen y tiempo de reacción son posibles, lo cual concuerda con estudios previos^{152,183}. En el caso que atañe a esta tesis doctoral, las muestras clínicas se realizaron a volúmenes reducidos de 10 µl, lo cual ahorra costes, pero no se redujo el tiempo de reacción. Aunque dio amplificación desde los 5 minutos en los experimentos realizados, concordando con otros autores²⁰⁷, se consideró el periodo de 20 minutos como el tiempo estándar para asegurar la resolución. Otros factores que han sido descritos que mejoran la especificidad de la reacción como son el acetato de magnesio o el uso de aditivos como la formamida²⁰⁸, betaína¹⁸⁴ o el dimetilsulfóxido¹⁸⁵ no mejoraron en nuestro caso y concuerdan más con los resultados de Kojima et al.²⁰⁹ en el que al 5% de formamida o DMSO se inhibe la reacción. En el caso de la betaína, se observó de forma parcial una mejora de la especificidad, pero no fue reproducible, al igual que los intentos de multiplexar la reacción, que en los casos que observamos amplificación no se repitieron los resultados en las mismas condiciones. Esto puede deberse a la reacción fuese hecha de forma manual y que influya factores como la viscosidad del medio al mezclar de forma intermedia, los cuales ya han sido descritos²¹⁰. El diseño de cebadores de mayor longitud permitió una mayor definición de la banda específica, no se probó el añadir nucleótidos modificados que redujesen la formación de dímeros²¹¹ como una mejora del método de amplificación isotérmica. Otro aspecto

mejorable que puede influir en los resultados de rendimiento clínico es el método de detección de los amplicones. La electroforesis le resta interés a RPA como técnica *point-of-care*, debido a que los productos de RPA deben ser purificados con kits antes de la electroforesis, para evitar la aparición de bandas inespecíficas debido a las proteínas de alto peso molecular según el fabricante¹⁸⁷. Esto supone un aumento del tiempo de la técnica. Además, las bandas de electroforesis pueden ser difusas por bajo rendimiento de la reacción o bandas inespecíficas, lo cual puede llevar a inexactitudes en la interpretación de los resultados. Aunque era el método de detección con el que podíamos realizar la técnica en nuestro entorno, otros autores han combinado RPA con fluorescencia²¹², flujo lateral²⁰⁷ o CRISPR¹⁵⁴ aumentando la especificidad de la reacción. Así, aunque nuestro método posee una sensibilidad del 55% y especificidad del 73% y es capaz de clasificar de forma correcta con respecto al azar ($AUC \neq 0,5$), podría ser mejorable si se implementasen mejores métodos de detección como era la intención al principio del desarrollo de esta tesis doctoral. La comparativa de los métodos de diagnóstico hacen de la RT-qPCR portátil la mejor candidata para POCT al ser diferente estadísticamente significativa con respecto a los otros métodos y con valor cercano la unidad. Si bien la comparativa hubiese sido más robusta si se hubiesen realizado sobre las mismas muestras los tres métodos, tal y como se comparó la RT-qPCR y las pruebas de antígenos. Sin embargo, este hecho no fue posible debido a la degradación de las muestras y hubo que aproximar los resultados entre sí. Por tanto, la hipótesis de partida de que los métodos de amplificación isotérmica ofrecen la misma validez que los métodos disponibles en el mercado queda parcialmente rechazada en las condiciones que ha sido realizada, dado que su eficacia es menor que la RT-qPCR en términos globales y equiparable a los tests de antígenos (valor de AUC pueden llegar a ser iguales). La mejora de los métodos de detección acoplados a la amplificación isotérmica, la automatización o liofilización de los reactivos potencialmente podría dar resultados equiparables al método *gold-standard*^{213,214}. Sin embargo, la sustitución por parte de los métodos de amplificación isotérmica a la PCR no ocurre aún debido a varios inconvenientes que han sido observados en este trabajo de tesis y es debido a las amplificaciones inespecíficas debido a que ocurre a temperatura constante. Un hecho observado con respecto a RPA que también ocurre con la RT-qPCR es la cantidad de falsos negativos, que podría indicar que la reacción de RPA podría verse afectada por la heterogeneidad de la muestra

como la RT-qPCR, dependiendo de la calidad de la muestra y el momento de la toma. En la RT-qPCR, no siempre el frotis nasofaríngeo es la muestra más adecuada y puede haber celularidad, es decir, que el virus esté dentro de las células epiteliales y no sea detectado de forma adecuada por la extracción o la toma, siendo pertinente la toma de las vías bajas como el lavado broncoalveolar, el cual resulta más invasivo ²¹⁵. En nuestro caso, todas las muestras de RPA fueron obtenidas a partir de exudado nasofaríngeo y se recibieron *a posteriori* de la toma, congeladas y anonimizadas por lo que no pudo evaluarse en qué momento sintomatológico se encontraba el paciente y la heterogeneidad de la muestra era evidente, desde muestras bastante claras y líquidas hasta muestras con signos de hemoptisis y expectoración, lo cual puede evidenciar un aumento de inhibidores de la reacción enzimática. Otra limitación importante observada es la reproducibilidad de la técnica, que puede estar muy relacionada con la manipulación manual de la mezcla de la reacción, tanto como con la concentración como la viscosidad y que puede afectar al rendimiento de la misma.

La importancia del estudio y los esfuerzos en el diagnóstico de las infecciones radica no sólo en situaciones extremas como las derivadas de la pandemia, que han supuesto un esfuerzo científico sin precedentes en aras de tratar de contenerla. Además, se observa una adaptación natural del coronavirus al ser humano (aumento transmisibilidad, descenso de la letalidad) pero no puede descartarse la aparición de variantes que provoquen reversión de la situación actual. Este hecho puede afectar a la inmunidad adquirida por la vacunación, a la sintomatología o al diagnóstico. Debemos recordar que existen coronavirus en reservorios naturales que podrían mutar y transmitirse de forma zoonótica al ser humano. Además, siguen apareciendo de subvariantes de Ómicron como VOIs que aumentan los contagios a nivel global mientras escribo esta tesis como JN.1^{216,217}. Una conclusión evidente ante este escenario de globalización, cambio climático, migración y fragmentación de los hábitats a los cuales nos enfrentamos es que estos fenómenos infecciosos ocurrirán con una mayor probabilidad inherente a la frecuencia en la que el salto interespecífico ocurre y el establecimiento de infecciones nuevas en las poblaciones humanas es un riesgo posible. A la vista de estos fenómenos, la perspectiva *One Health* vuelve a ser trascendental. Mediante la vigilancia epidemiológica de los agentes infecciosos en el ámbito animal, ambiental y

humano y la detección de potenciales riesgos sanitarios se puede evitar la diseminación de enfermedades infecciosas y prevenir posibles saltos zoonóticos.

Por ello, avances en el diagnóstico de las infecciones nos preparan para futuras epidemias y potenciales pandemias. En este trabajo observamos una tendencia gradual a la integración de la detección en dispositivos *point-of-care* que permiten una mayor agilidad a la hora de la toma de decisiones y son una línea prioritaria de investigación cuyo avance ha potenciado la urgencia de la pandemia y que debe ser tenido en cuenta para la mejora de la salud pública.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- La urgencia de la pandemia de SARS-CoV-2 ha supuesto una revolución en el diagnóstico. En plena era de la medicina digital, se observa una integración cada vez mayor del diagnóstico molecular con otras disciplinas como la nanomedicina o la microfluídica, adaptando en la medida de lo posible el uso como POCT.

- La RT-qPCR portátil, además de ser una técnica en un dispositivo de un tamaño óptimo para POCT, presenta una alta sensibilidad y un alto índice de detección (LoD del orden de 10^{-5} aproximadamente $6,06 \cdot 10^3$ moléculas de ARN estimadas).

- La RT-qPCR portátil mediante el kit de Biomeme presenta un rendimiento analítico óptimamente significativo con respecto al azar y con la técnica de referencia utilizada en el hospital por lo que es un candidato factible para su uso clínico.

- Se validaron los test de RT-qPCR, test de antígenos y RPA frente a otros patógenos respiratorios, resultado negativos en las pruebas de reactividad cruzada y demostrando que no muestran amplificación con patógenos frecuentes y cuya sintomatología puede confundirse con la COVID-19.

- Los test de antígenos presentaron un rendimiento analítico menor que la técnica de referencia utilizada en el hospital y de forma estadísticamente significativa y diferente a lo esperado al azar, confirmando que su rendimiento general es menor que la RT-qPCR, pero contando con una mayor capacidad de detectar casos negativos (especificidad).

- Respecto a la optimización, se confirma que RPA puede reducirse en volumen y tiempo, lo cual es interesante desde el punto de vista POCT. La adición de aditivos, cambios de concentración de acetato de magnesio y el multiplexado es de difícil ejecución y plantea problemas de reproducibilidad al detectarlo *end-point*.

- La reacción de RPA desarrollada en esta tesis doctoral presentó un rendimiento analítico menor que la RT-qPCR de referencia y diferente a lo esperado por el azar. Aunque cuenta

con un margen de mejora considerable, su incipiente desarrollo ofrece una alternativa a los métodos de detección tradicionales y una vía para la integración de métodos de detección basados en amplificación isotérmica.

- La RT-qPCR portátil y los test de antígenos comparados entre sí son diferentes de forma estadísticamente significativa con un 99% de confianza. Si adaptamos las AUC para comparar entre los tres métodos, la RT-qPCR es diferente de ambos de forma estadísticamente significativa y no hay diferencias entre la técnica de RPA desarrollada y los test de antígenos comerciales.

- El termociclador portátil Franklin y el kit de detección de Biomeme puede incluirse en clínica como POCT, en cuyo caso el ámbito más adecuado debido a sus características sería centros de salud de manera descentralizada o como servicio diagnóstico en farmacias.

Anexos

7. ANEXOS

Anexo I. Análisis preliminar por RT-qPCR mediante el termociclador portátil

Saliva

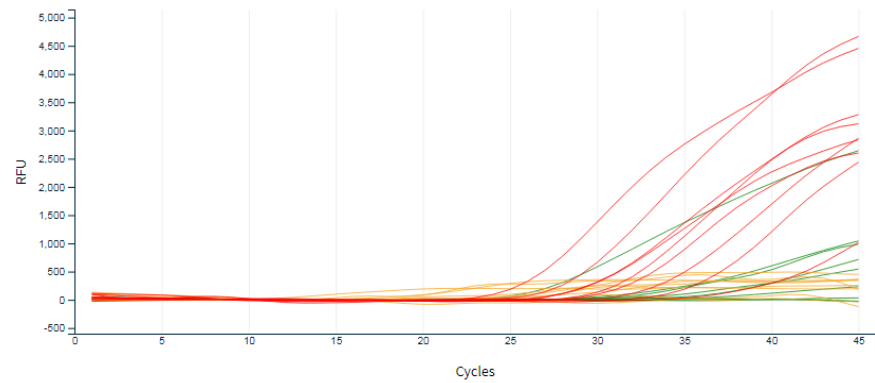
Sample ID	Saliva1	Saliva1	Saliva1	Saliva2	Saliva2	Saliva2	Saliva3	Saliva3	Saliva3
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	41,42	0	31,2	36,33	28,19	30,61	26,41	31,93	25,12
Threshold	150	200	200	150	200	200	150	200	200

Sample ID	Saliva-4	Saliva-4	Saliva-4	Saliva-5	Saliva-5	Saliva-5	Saliva-6	Saliva-6	Saliva-6
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0	0	31,59	36,65	30,26	28,17	35,6	0	33,2
Threshold	206,13	380,74	144,28	328,61	89,46	496,02	55,69	413,68	524,78

Sample ID	Saliva-7	Saliva-7	Saliva-7	Saliva-8	Saliva-8	Saliva-8	Saliva-9	Saliva-9	Saliva-9
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene
Cq	0	22,21	38,83	23,96	29,68	22,46	43,5	31,72	33,99
Threshold	159,35	62,31	440,15	150	200	200	150	200	200

Sample ID	Saliva-10	Saliva-10	Saliva-10	Saliva11	Saliva11	Saliva11	Saliva12	Saliva12	Saliva12
Target ID	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene
Cq	0,00	33,04	32,44	0	28,7	38,71	33,09	0	29,01
Threshold	150,00	200,00	200,00	150	200	200	150	200	200

Sample ID	Saliva13	Saliva13	Saliva13	Saliva14	Saliva14	Saliva14	Saliva15	Saliva15	Saliva15	Saliva16	Saliva16	Saliva16
Target ID	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	37,73	29,59	33,02	0	22,87	29,08	33,86	0	27,52	0	0	35,12
Threshold	150	200	200	150	200	200	150	200	200	150	200	200



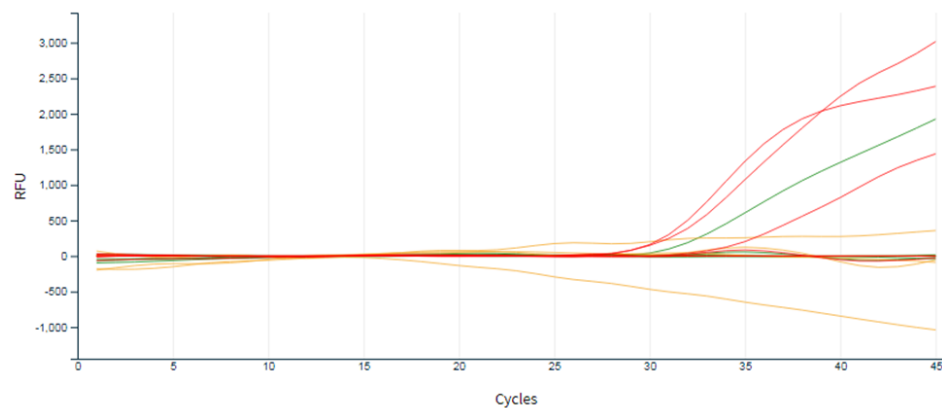
Exudados;

Sampl e ID	Exuda do-1	Exuda do-1	Exuda do-1	Exuda do-5	Exuda do-5	Exuda do-5	Exuda do9	Exuda do9	Exuda do9	Exuda do-11	Exuda do-11	Exuda do-11	Exuda do-41	Exuda do-41	Exuda do-41	Exuda do50	Exuda do50	Exuda do50
Target ID	Orfab1	MS2	Spike	Orfab1	MS2	Spike	Orf1ab	RNA Proces s Contro l (MS2)	Spike gene	Green	Amber	Red	Green	Amber	Red	Orf1ab	RNA Proces s Contro l (MS2)	Spike gene
Cq	0	0	41,59	28,20	0	26,12	20,76	36,00	18,99	27,59	33,91	22,52	32,95	0,00	28,76	39,88	25,01	31,31
Thresh old	150	200	200	150	200	200	150,00	200,00	200,00	285,05	132,18	395,24	141,93	149,32	281,10	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Exudad o8	Exudad o8	Exudad o8	Exudad 51	Exudad 51	Exudad 51	Exudad 79	Exudad 79	Exudad 79	Exudad 84	Exudad 84	Exudad 84	Exudad 94	Exudad 94	Exudad 94
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	37,07	34,11	25,88	29,39	31,36	0,00	26,03
Thresho ld	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sampl e ID	Exudad o55	Exudad o55	Exudad o55	Exudad o75	Exudad o75	Exudad o75	Exudad o78	Exudad o78	Exudad o78	Exudad o79	Exudad o79	Exudad o79	Exudad o82	Exudad o82	Exudad o82	Exudad o90	Exudad o90	Exudad o90
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Proces s Contro l (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Proces s Contro l (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Proces s Contro l (MS2)	Spike gene
Cq	36,52	0,00	28,00	34,84	0,00	27,53	17,45	33,66	16,44	22,70	0,00	21,36	20,74	0,00	17,76	0,00	0,00	37,74
Thresh old	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Anexo II. Experimento de *pooling*



Sample ID	5-	5-	5-	5+	5+	5+	10-	10-	10-	10+	10+	10+
Target ID	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene	Orf1ab	(MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	0,00	31,58	30,00	30,29	0,00	0,00	34,97	0,00	0,00	30,53
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Anexo III. RT-qPCR mediante el termociclador portátil de muestras clínicas

Exudados

Sample ID	Ex1	Ex1	Ex1	Ex2	Ex2	Ex2	Ex3	Ex3	Ex3	Ex4	Ex4	Ex4	Ex5	Ex5	Ex5
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	22,26	33,79	0,00	0,00	36,68	0,00	0,00	29,30	25,82	0,00	23,31	33,04	28,03	29,23
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	141,93	149,32	281,10

Sample ID	Ex6	Ex6	Ex6	Ex7	Ex7	Ex7	Ex8	Ex8	Ex8	Ex9	Ex9	Ex9	Ex10	Ex10	Ex10
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	37,18	31,97	30,06	32,77	29,03	28,34	34,34	32,65	29,65	29,89	0,00	26,62	0,00	29,39	30,90
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex11	Ex11	Ex11	Ex12	Ex12	Ex12	Ex13	Ex13	Ex13	Ex14	Ex14	Ex14	Ex15	Ex15	Ex15
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	29,78	33,38	0,00	29,68	0,00	30,71	35,79	30,32	0,00	26,67	27,37	0,00	23,78
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex16	Ex16	Ex16	Ex17	Ex17	Ex17	Ex18	Ex18	Ex18	Ex19	Ex19	Ex19	Ex20	Ex20	Ex20
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	25,01	24,12	21,22	30,33	26,05	25,88	30,07	0,00	24,44	25,47	0,00	23,67	0,00	0,00	41,14
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex21	Ex21	Ex21	Ex22	Ex22	Ex22	Ex23	Ex23	Ex23	Ex24	Ex24	Ex24	Ex25	Ex25	Ex25
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	26,25	0,00	0,00	32,33	0,00	0,00	29,49	30,65	30,90	29,93	33,27	37,76	27,85
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex26	Ex26	Ex26	Ex27	Ex27	Ex27	Ex28	Ex28	Ex28	Ex29	Ex29	Ex29	Ex30	Ex30	Ex30
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	28,42	27,96	33,55	41,96	25,56	30,27	27,33	24,98	24,41	0,00	30,28	33,63	0,00	29,05
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex31	Ex31	Ex31	Ex32	Ex32	Ex32	Ex33	Ex33	Ex33	Ex34	Ex34	Ex34	Ex35	Ex35	Ex35
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	29,08	27,66	25,94	0,00	0,00	30,24	32,76	29,23	21,71	35,85	42,56	25,37	0,00	0,00	27,49
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex36	Ex36	Ex36	Ex37	Ex37	Ex37	Ex38	Ex38	Ex38	Ex39	Ex39	Ex39	Ex40	Ex40	Ex40
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	35,67	0,00	32,31	28,96	0,00	24,18	0,00	0,00	31,86	0,00	0,00	33,18	0,00	0,00	33,21
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex41	Ex41	Ex41	Ex42	Ex42	Ex42	Ex43	Ex43	Ex43	Ex44	Ex44	Ex44	Ex45	Ex45	Ex45
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	36,30	0,00	24,58	0,00	0,00	26,56	0,00	0,00	23,64	27,90	0,00	23,09	0,00	0,00	32,52
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	Ex46	Ex46	Ex46	Ex47	Ex47	Ex47	Ex48	Ex48	Ex48	Ex49	Ex49	Ex49	Ex50	Ex50	Ex50
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	33,22	33,16	29,76	24,45	0,00	22,98	33,65	0,00	29,25	0,00	28,99	28,53	0,00	43,63	38,31
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Salivas;

Sample ID	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	20,85	31,33	25,01	24,64	23,58	34,91	24,45	29,83	0,00	23,62	33,38	35,85	27,87	32,47
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S6	S6	S6	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S10	S10	S10
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	34,71	0,00	27,03	32,06	0,00	28,82	0,00	0,00	29,93	0,00	22,26	31,06	38,09	34,91	34,03
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S11	S11	S11	S12	S12	S12	S13	S13	S13	S14	S14	S14	S15	S15	S15
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	24,68	0,00	23,65	0,00	0,00	31,97	31,77	0,00	28,38	42,01	0,00	33,12	27,62	0,00	22,99
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S16	S16	S16	S17	S17	S17	S18	S18	S18	S19	S19	S19	S20	S20	S20
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	30,11	0,00	27,34	41,80	0,00	32,16	41,47	0	33,06	38,58	0,00	33,89	0,00	0,00	28,86
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S26	S26	S26	S27	S27	S27	S28	S28	S28	S29	S29	S29	S30	S30	S30
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0	0	33,15	36,27	23,43	30,74	34,66	41,61	29,26	0,00	0,00	32,68	28,69	37,53	26,12
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S21	S21	S21	S22	S22	S22	S23	S23	S23	S24	S24	S24	S25	S25	S25
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	35,83	0,00	29,47	33,8	0	29,2	0,00	0,00	34,95	0,00	27,39	38,60	0,00	0,00	31,9
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S31	S31	S31	S32	S32	S32	S33	S33	S33	S34	S34	S34	S35	S35	S35
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	26,74	30,43	0,00	43,66	34,91	32,80	25,41	28,35	40,13	0,00	36,24	0,00	0,00	28,08
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S36	S36	S36	S37	S37	S37	S38	S38	S38	S39	S39	S39	S40	S40	S40
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	32,45	31,92	30,03	0,00	37,78	38,68	38,7	34,57	32,65	26,88	35,72	24,85	27,57	24,88	24,21
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S41	S41	S41	S42	S42	S42	S43	S43	S43	S44	S44	S44	S45	S45	S45
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	32,64	33,58	29,46	25,81	25,55	21,57	0,00	31,26	32,25	0,00	0,00	34,96	0,00	0,00	32,74
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	S46	S46	S46	S47	S47	S47	S48	S48	S48	S49	S49	S49	S50	S50	S50
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	25,75	30,53	43,01	35,61	33,77	36,70	33,77	33,21	0,00	26,37	29,92	31,47	0,00	28,92
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	VRS	VRS	VRS	0C43	0C43	0C43	Influenza	influenza	influenza	NL63	NL63	NL63
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	0,00	29,43	0,00	0,00	0,00	23,46	25,01	0,00	21,44	0,00
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Anexo IV. Reactividad cruzada y especificidad del termociclador portátil

Sample ID	ex.neg.1	ex.neg.1	ex.neg.1	ex. neg.2	ex. neg. 2	ex. Neg. 2	ex.neg.3	ex. neg 3	ex.neg.3	ex neg.6	ex neg.6	ex.neg. 6
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	0,00	0,00	23,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

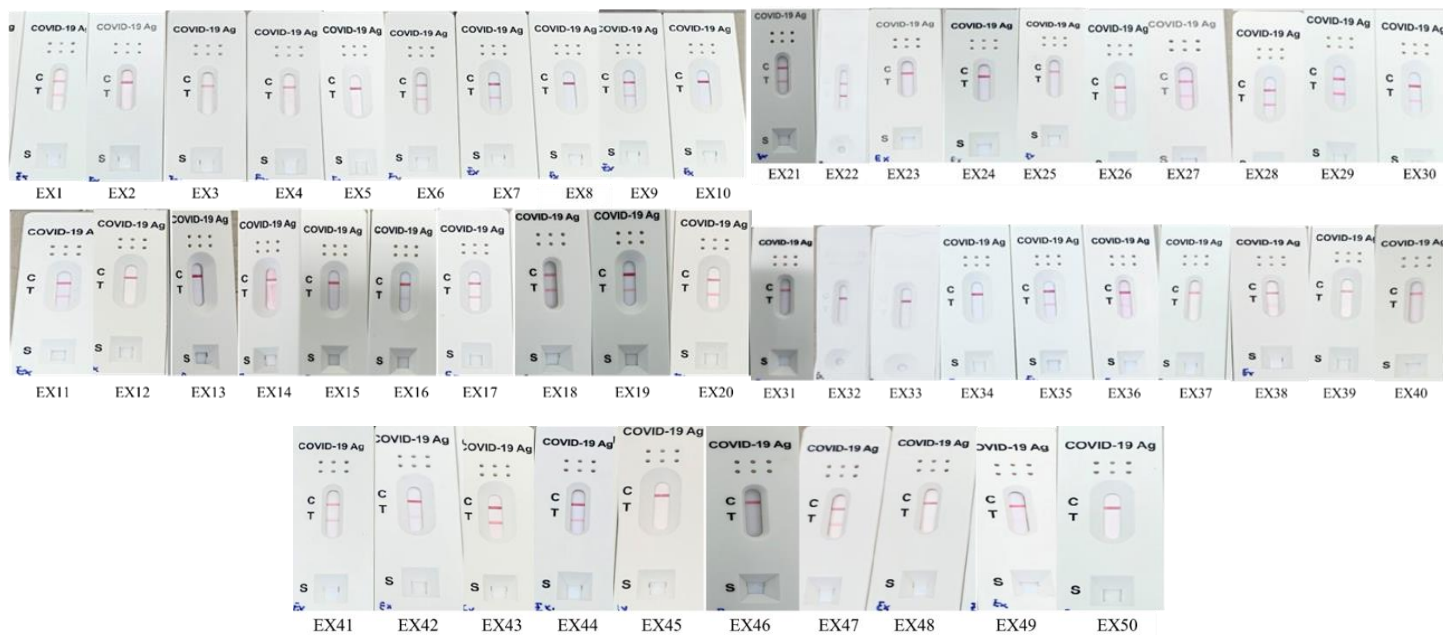
Sample ID	ex neg 7	ex neg 7	ex. neg 7	ex neg 8	ex neg 8	ex neg 8	ex neg 9	ex neg 9	ex neg 9	ex neg 10	ex neg 10	ex neg 10
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	39,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Sample ID	parain.	Parain.	parain.	rhino	rhino	rhino	(Metneu)/Oc43	(Metneu)/OC43	(Metneu)/OC43	(influenzaA)	(influenzaA)	(influenzaA)
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	42,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

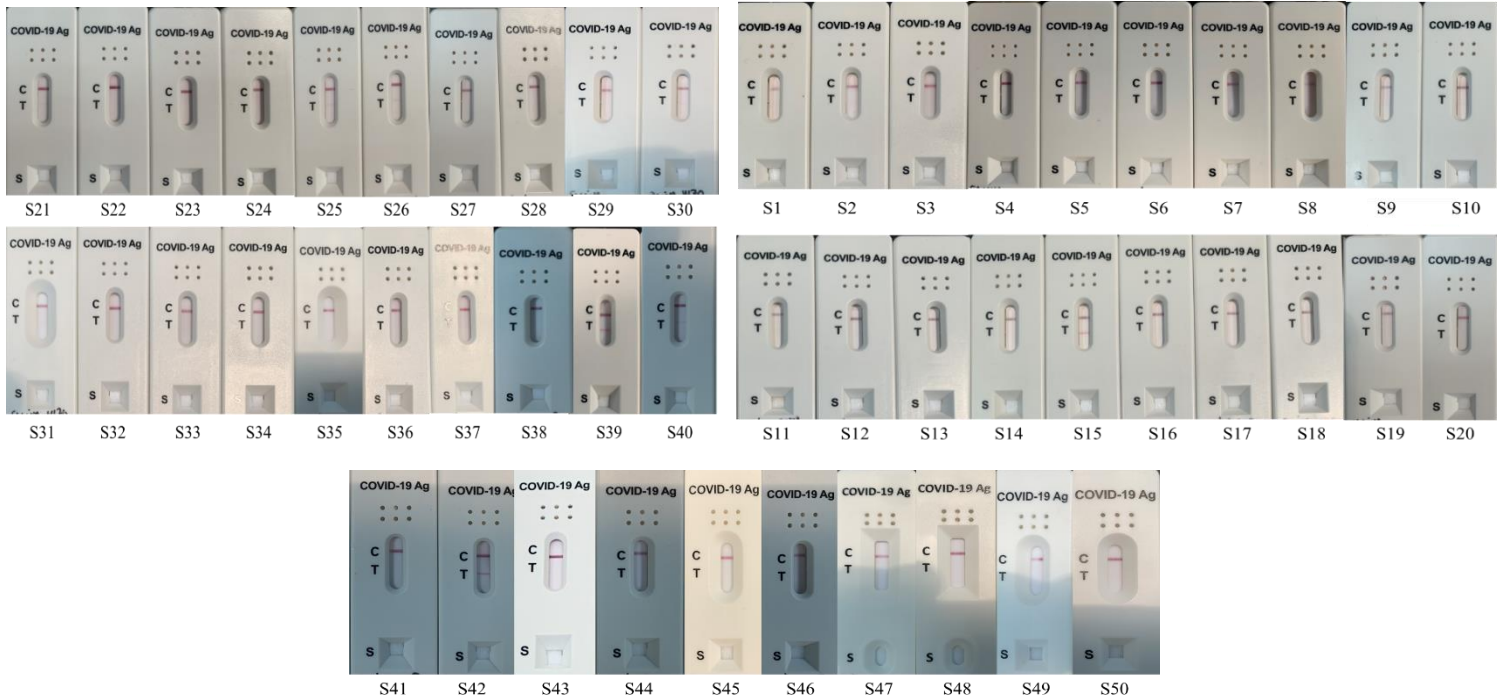
Sample ID	ex neg 11	ex neg 11	ex neg 11	ex. neg 12	ex. neg 12	ex neg 12
Target ID	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene	Orf1ab	RNA Process Control (MS2)	Spike gene
Cq	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Threshold	150,00	200,00	200,00	150,00	200,00	200,00

Anexo V. Test de antígenos

Exudados

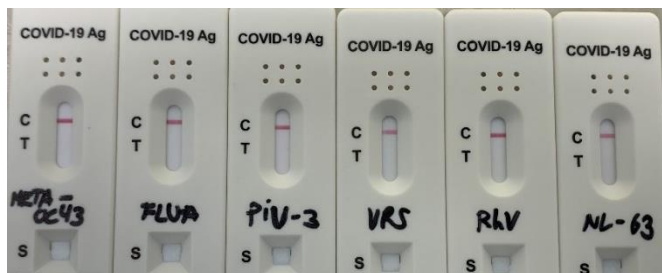


Salivas

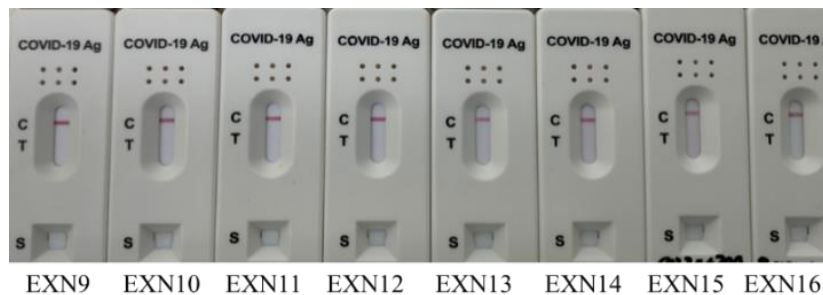
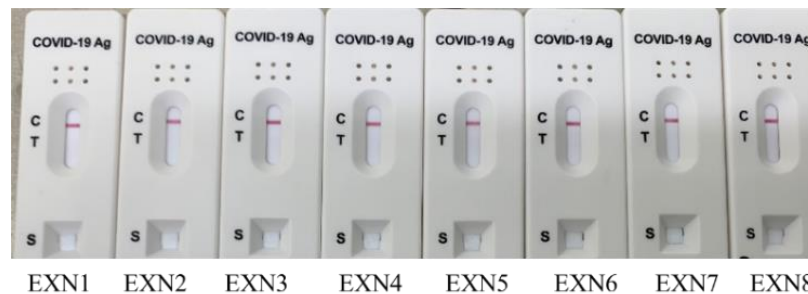


Anexo VI. Reactividad cruzada y especificidad test de antígenos

Reactividad cruzada

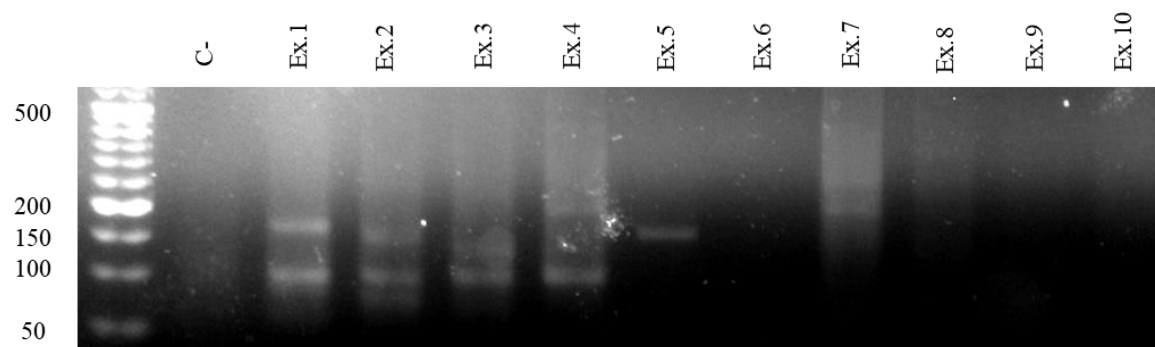


Especificidad

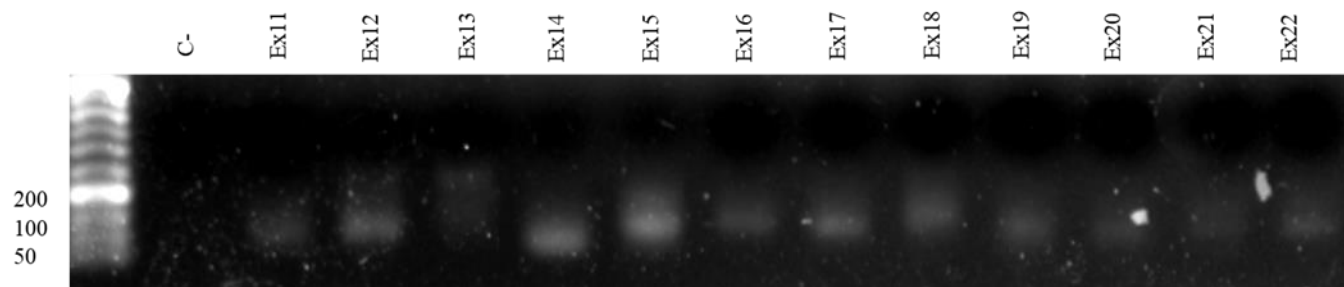


Anexo VII. RPA en muestras clínicas

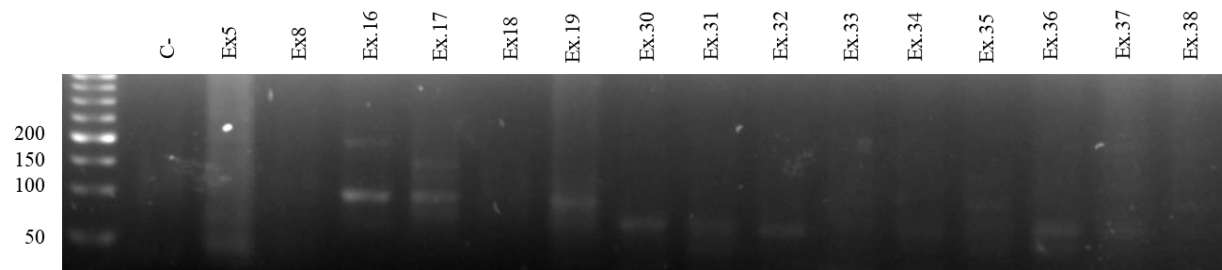
A) RT-RPA Ex 1-10.



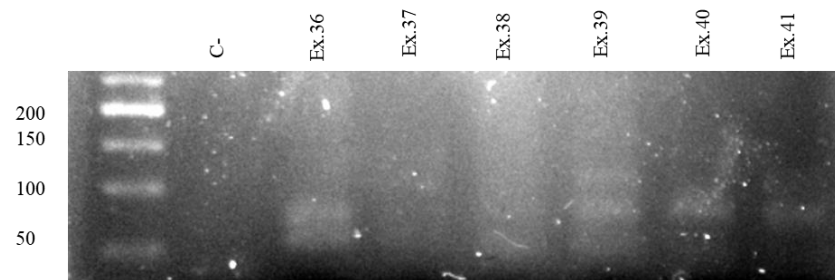
B) RT-RPA Ex11-22.



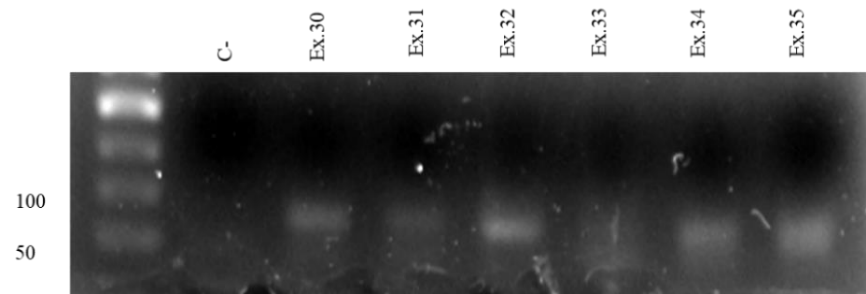
C) Ex 5-8; Ex 16-19; Ex 30-38.



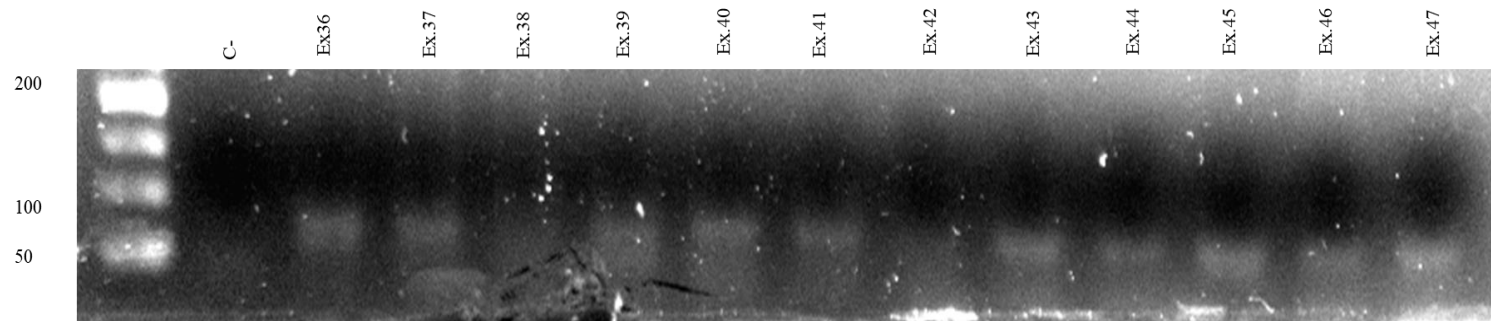
D) Ex.36-Ex.41.



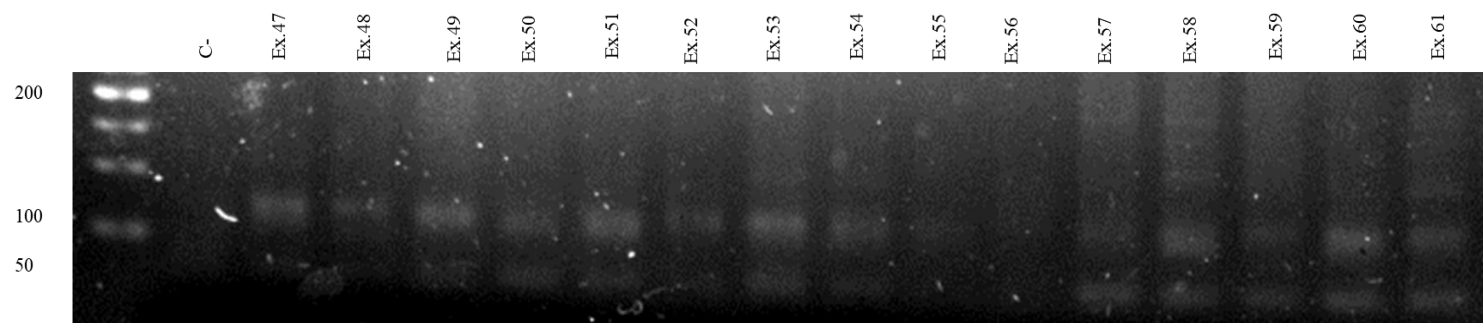
E) Ex 30-35.



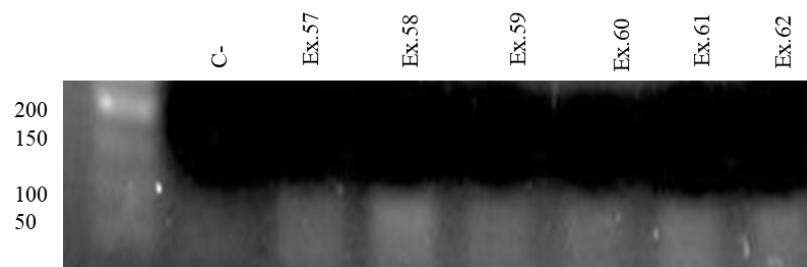
F) Ex 36-47



G) Ex.47-61.



H) Ex.57-62.



Anexo VIII. Secuenciación de fragmento de RPA

Análisis BLAST secuencia *forward*; E4F

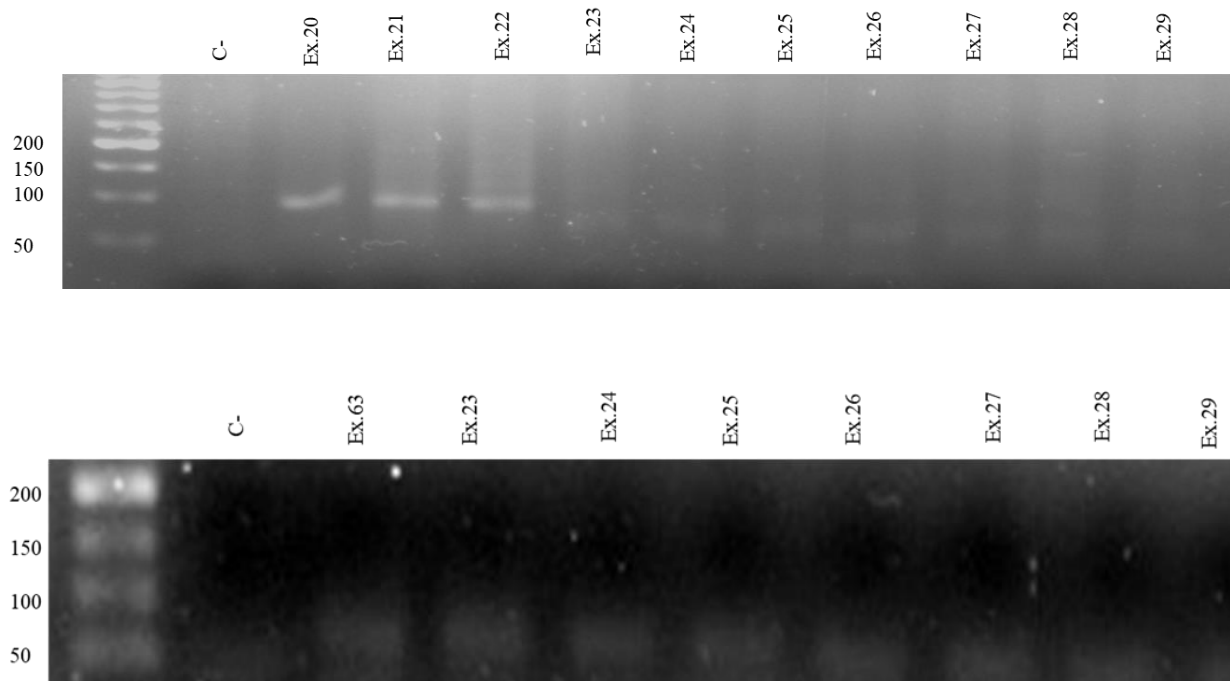
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100	?
☒ select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer	
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, complete genome, monopartite	Severe acute re...	87.9	146	14%	3e-12	96.30%	29889	OY612803.1					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate hCoV-19/Switzerland/GR-ETHZ-360264/2020 geno...	Severe acute re...	87.9	146	14%	3e-12	96.30%	29902	OE997497.2					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate hCoV-19/Switzerland/VD-ETHZ-500675/2021 geno...	Severe acute re...	87.9	146	14%	3e-12	96.30%	29902	OU008193.2					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, chromosome: 1	Severe acute re...	86.1	86.1	9%	9e-12	94.74%	29800	QW677737.1					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 genome assembly, chromosome: 1	Severe acute re...	86.1	86.1	9%	9e-12	94.74%	29843	QW677428.1					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/VA_FBCH_2552/2022_g...	Severe acute re...	86.1	144	15%	9e-12	94.74%	29724	ON100404.1					
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/CO-CDPHE-2100078312...	Severe acute re...	86.1	86.1	9%	9e-12	94.74%	29796	OL678784.1					

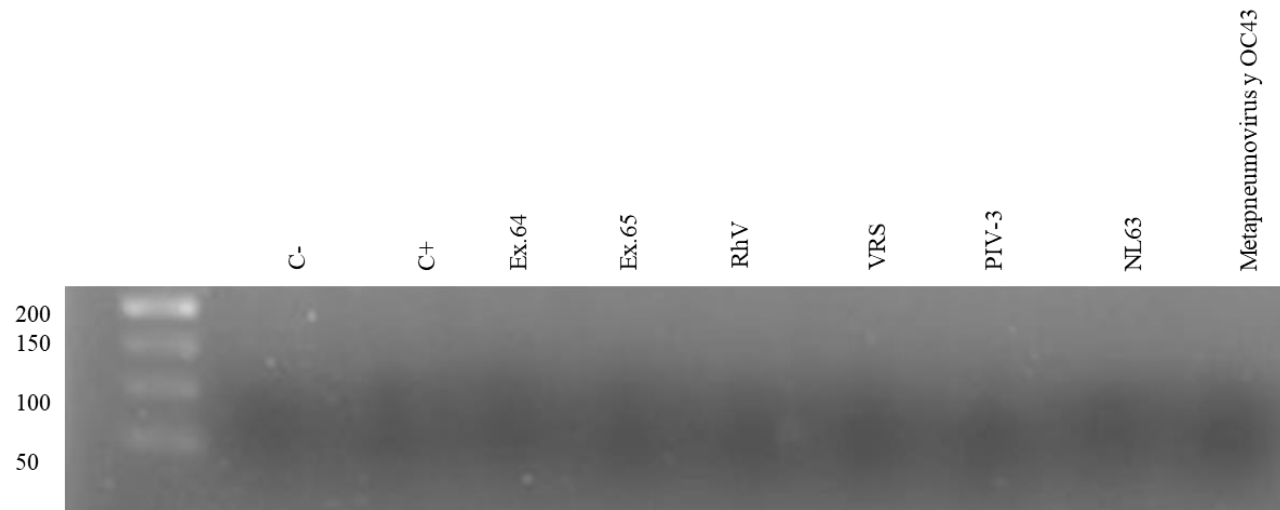
Análisis BLAST secuencia inversa, E4R

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy						
Sequences producing significant alignments				Download	Select columns	Show	100		
☒ select all 100 sequences selected				GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer		
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/UT-UPHL-23011997457...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29743	QQ336993.2
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/IL-CDC-QDX46137023/...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29721	OQ425770.1
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/WA-CDC-UW23011414...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29669	QQ352880.1
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/WA-CDC-UW22122435...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29745	QQ339014.1
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/WA-CDC-UW23010395...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29736	QQ271524.1
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/AZ-2022-2078/2022 OR...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29645	OQ249620.1
☒	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/USA/WA-CDC-UW22123002...	Severe acute re...	60.2	116	12%	9e-05	93.02%	29734	OQ204792.1

Anexo IX. Reactividad cruzada y especificidad de RPA

Ex.19: Falso positivo.





Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506 (2020).
2. Worobey, M. *et al.* The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan Was the Early Epicenter of the COVID-19 Pandemic. <https://www.science.org> (2022).
3. Gorbalenya, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology* vol. 5 536–544 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z> (2020).
4. Mallapaty S. What the cruise-ship outbreaks reveal about COVID-19. *Nature* **58 (7801)**,18, (2020).
5. Mizumoto, K., Kagaya, K. & Chowell, G. Early epidemiological assessment of the transmission potential and virulence of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Wuhan City, China, January-February, 2020. *BMC Med* **18**, (2020).
6. Russell T. *et al.* Estimating the infection and case fatality ratio for coronavirus disease (COVID-19) using age-adjusted data from the outbreak on the Diamond Princess cruise ship, February 2020. *Eurosurveillance* **25**, (2020).
7. Fisher, D. & Heymann, D. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Medicine* vol. 18 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01533-w> (2020).
8. Patel, A. & Jernigan, D. B. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. <https://emergency.cdc.gov/han/han00426.asp>. (2019).
9. Davis, J. T. *et al.* Cryptic transmission of SARS-CoV-2 and the first COVID-19 wave. *Nature* **600**, 127–132 (2021).
10. Sala de prensa del Departamento de Seguridad Nacional, Gobierno de España. (2020).
11. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
12. Boni, M. F. *et al.* Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol* **5**, 1408–1417 (2020).

13. Coutard, B. *et al.* The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* **176**, (2020).
14. Zhang, Y. Z. & Holmes, E. C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* vol. 181 223–227 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035> (2020).
15. Zhou, H. *et al.* A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology* **30**, 2196–2203.e3 (2020).
16. Delaune, D. *et al.* A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia. *Nat Commun* **12**, (2021).
17. Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM Structure of the 2019-NCoV Spike in the Prefusion Conformation. <https://www.science.org> (2019).
18. Decaro, N. & Lorusso, A. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology* vol. 244 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693> (2020).
19. Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* vol. 17 181–192 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9> (2019).
20. Liu, W. J. *et al.* T-cell immunity of SARS-CoV: Implications for vaccine development against MERS-CoV. *Antiviral Research* vol. 137 82–92 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.006> (2017).
21. Li, X. *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection. *Sci Adv* **6**, (2020).
22. Gupta, S. K., Minocha, R., Thapa, P. J., Srivastava, M. & Dandekar, T. Role of the Pangolin in Origin of SARS-CoV-2: An Evolutionary Perspective. *Int J Mol Sci* **23**, 9115 (2022).
23. World Health Organization. WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2. China Part: (2021).
24. Lam, T. T. Y. *et al.* Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* **583**, 282–285 (2020).

25. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C. & Garry, R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* vol. 26 450–452 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9> (2020).
26. Xiao, K. *et al.* Author Correction: Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins (Nature, (2020), 583, 7815, (286-289), 10.1038/s41586-020-2313-x). *Nature* vol. 600 E8–E10 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03838-z> (2021).
27. Oreshkova, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance* **25**, (2020).
28. Chavarria-Miró, G. *et al.* Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases Running Title: Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater. (2020) doi:10.1101/2020.06.13.20129627.
29. Fongaro G. *et al.* SARS-CoV-2 in human sewage in Santa Catalina, Brazil, November 2019. *medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)* (2020).
30. Basavaraju, S. V. *et al.* Serologic Testing of US Blood Donations to Identify Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-Reactive Antibodies: December 2019-January 2020. *Clinical Infectious Diseases* **72**, E1004–E1009 (2021).
31. Wacharapluesadee, S. *et al.* Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun* **12**, (2021).
32. Liu, P. *et al.* Cold-chain transportation in the frozen food industry may have caused a recurrence of COVID-19 cases in destination: Successful isolation of SARS-CoV-2 virus from the imported frozen cod package surface. *Biosaf Health* **2**, 199–201 (2020).
33. Almeida, J. D. & Tyrrell, D. A. J. *The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses That Grow in Organ Culture. J. gen. Virol* vol. 1 (1967).
34. Tyrell, D. A. J., Lm Eida, J. D. A., Akstelskaya, L. Z., Easterday, B. C. & Bingham, R. W. *Coronaviridae. Intervirology* vol. 5 (1975).
35. Guan, Y. *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* (1979) **302**, 276–278 (2003).

36. Vaqué Rafart Hospital Vall, J. & Barcelona España, H. *MESA REDONDA. PATOLOGÍA RESPIRATORIA IMPORTADA Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS). An Pediatr (Barc)* vol. 62 (2005).
37. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. in *Coronaviruses: Methods and Protocols* (eds. Maier, H. J., Bickerton, E. & Britton, P.) 1–23 (Springer New York, New York, NY, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
38. Li, W. *et al.* Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science* (1979) **310**, 676–679 (2005).
39. Lai, M. M. C. & Cavanaght, D. *THE MOLECULAR BIOLOGY OF CORONAVIRUSES. ADVANCES IN VIRUS RESEARCH* vol. 48 (1997).
40. Song, H.-D. *et al.* Cross-Host Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Palm Civet and Human. www.who.int (2004).
41. Zhao, Z. *et al.* Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications. *BMC Evol Biol* **4**, (2004).
42. Peiris, J. *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet* **361**, 1319–1325 (2003).
43. van der Hoek, L. *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**, 368–373 (2004).
44. Woo, P. C. Y. *et al.* Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol* **79**, 884–895 (2005).
45. Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine* **367**, 1814–1820 (2012).
46. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. in *Coronaviruses: Methods and Protocols* (eds. Maier, H. J., Bickerton, E. & Britton, P.) 1–23 (Springer New York, New York, NY, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
47. Alagaili, A. N. *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *mBio* **5**, (2014).

48. Hemida, M. G. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus Seroprevalence in Domestic Livestock in Saudi Arabia. *Euro Surveill* vol. 18 www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20659. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20659> (2010).
49. Müller, M. A. *et al.* Mers coronavirus neutralizing antibodies in camels, eastern Africa, 1983–1997. *Emerg Infect Dis* **20**, 2093–2095 (2014).
50. Corman, V. *et al.* Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedary Camels, Kenya, 1992–2013. *Emerging Infectious Disease journal* **20**, 1319 (2014).
51. Harcourt, J. L. *et al.* The prevalence of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) antibodies in dromedary camels in Israel. *Zoonoses Public Health* **65**, 749–754 (2018).
52. Yang, L. *et al.* MERS-Related Betacoronavirus in *Vespertilio superans* Bats, China. *Emerging Infectious Disease journal* **20**, 1260 (2014).
53. Raj, V. S. *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* **495**, 251–254 (2013).
54. Edwards, C. E. *et al.* Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 26915–26925 (2020).
55. Jung, K., Hu, H. & Saif, L. J. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. *Virus Res* **226**, 50–59 (2016).
56. Mora-Díaz, J. C., Piñeyro, P. E., Houston, E., Zimmerman, J. & Giménez-Lirola, L. G. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: A review. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00053> (2019).
57. International Comité de Taxonomía de Virus (ICTV). proposal 2019.0006G. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202201868.
58. Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* **382**, 727–733 (2020).
59. Kim, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **181**, 914–921.e10 (2020).

60. Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S. & Enjuanes, L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol* **2**, 265–288 (2015).
61. Snijder, E. J., Decroly, E. & Ziebuhr, J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. in 59–126 (2016). doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.008.
62. Finkel, Y. *et al.* The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature* **589**, 125–130 (2021).
63. Mousavizadeh, L. & Ghasemi, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **54**, 159–163 (2021).
64. Dorta-Gorrín, A., Navas-Méndez, J., Gozalo-Margüello, M., Miralles, L. & García-Hevia, L. Detection of SARS-CoV-2 Based on Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) and Its Integration into Nanomedicine and Microfluidic Devices as Point-of-Care Testing (POCT). *Int J Mol Sci* **24**, 10233 (2023).
65. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271–280.e8 (2020).
66. Cantuti-Castelvetri, L. *et al.* Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science (1979)* **370**, 856–860 (2020).
67. Ou, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* **11**, 1620 (2020).
68. Essalmani, R. *et al.* Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. *J Virol* **96**, (2022).
69. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 11727–11734 (2020).
70. Xia, S. *et al.* Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol* **17**, 765–767 (2020).
71. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* **92**, 418–423 (2020).
72. Guo, Y.-R. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil Med Res* **7**, 11 (2020).

73. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**, 155–170 (2021).
74. Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J. & Peiris, M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ* m3862 (2020) doi:10.1136/bmj.m3862.
75. Domingo, E. *et al.* Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* **19**, 55–63 (2000).
76. Domingo, E., García-Crespo, C., Lobo-Vega, R. & Perales, C. Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics. *Viruses* **13**, 1882 (2021).
77. Jary, A. *et al.* Evolution of viral quasispecies during SARS-CoV-2 infection. *Clinical Microbiology and Infection* **26**, 1560.e1-1560.e4 (2020).
78. Carabelli, A. M. *et al.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol* (2023) doi:10.1038/s41579-022-00841-7.
79. Xia, S., Wang, L., Zhu, Y., Lu, L. & Jiang, S. Origin, virological features, immune evasion and intervention of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 241 (2022).
80. Chen, J. *et al.* Emerging Dominant SARS-CoV-2 Variants. *J Chem Inf Model* **63**, 335–342 (2023).
81. Chakraborty, C. *et al.* Recently emerged omicron subvariant BF.7 and its R346T mutation in the RBD region reveal increased transmissibility and higher resistance to neutralization antibodies: need to understand more under the current scenario of rising cases in China and fears of driving a new wave of the COVID-19 pandemic. *International Journal of Surgery* **109**, 1037–1040 (2023).
82. World Health Organization. Seguimiento de las variantes de SARS-CoV-2. <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (2023).
83. Banerjee, A., Doxey, A. C., Mossman, K. & Irving, A. T. Unraveling the Zoonotic Origin and Transmission of SARS-CoV-2. *Trends Ecol Evol* **36**, 180–184 (2021).
84. Baize, S. *et al.* Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *New England Journal of Medicine* **371**, 1418–1425 (2014).

85. Bausch, D. G. *et al.* Marburg Hemorrhagic Fever Associated with Multiple Genetic Lineages of Virus. *New England Journal of Medicine* **355**, 909–919 (2006).
86. Peiris, J. S. M., Yuen, K. Y., Osterhaus, A. D. M. E. & Stöhr, K. The Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine* **349**, 2431–2441 (2003).
87. Assiri, A. *et al.* Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *New England Journal of Medicine* **369**, 407–416 (2013).
88. WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003> (2003).
89. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). (2019).
90. Rothe, C. *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine* **382**, 970–971 (2020).
91. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 51. (2020).
92. Tang, S. *et al.* Aerosol transmission of SARS-CoV-2? Evidence, prevention and control. *Environ Int* **144**, 106039 (2020).
93. Liu, Y. *et al.* Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* **582**, 557–560 (2020).
94. Geng, Y. & Wang, Y. Stability and transmissibility of SARS-CoV-2 in the environment. *J Med Virol* **95**, (2023).
95. Li, Y. *et al.* Probable airborne transmission of SARS-CoV-2 in a poorly ventilated restaurant. *Build Environ* **196**, 107788 (2021).
96. Randazzo, W. *et al.* SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res* **181**, 115942 (2020).
97. Bar-Or, I. *et al.* Regressing SARS-CoV-2 Sewage Measurements Onto COVID-19 Burden in the Population: A Proof-of-Concept for Quantitative Environmental Surveillance. *Front Public Health* **9**, (2022).
98. Meng, X.-J. & Liang, T. J. SARS-CoV-2 Infection in the Gastrointestinal Tract: Fecal–Oral Route of Transmission for COVID-19? *Gastroenterology* **160**, 1467–1469 (2021).

99. Termansen, M. B. & Frische, S. Fecal-oral transmission of SARS-CoV-2: A systematic review of evidence from epidemiological and experimental studies. *Am J Infect Control* (2023) doi:10.1016/j.ajic.2023.04.170.
100. Facchetti, F. *et al.* SARS-CoV2 vertical transmission with adverse effects on the newborn revealed through integrated immunohistochemical, electron microscopy and molecular analyses of Placenta. *EBioMedicine* **59**, 102951 (2020).
101. Kotlyar, A. M. *et al.* Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* **224**, 35-53.e3 (2021).
102. Chambers, C. *et al.* Evaluation for SARS-CoV-2 in Breast Milk From 18 Infected Women. *JAMA* **324**, 1347 (2020).
103. Centeno-Tablante, E. *et al.* Transmission of SARS-CoV-2 through breast milk and breastfeeding: a living systematic review. *Ann N Y Acad Sci* **1484**, 32–54 (2021).
104. Krogstad, P. *et al.* No infectious SARS-CoV-2 in breast milk from a cohort of 110 lactating women. *Pediatr Res* **92**, 1140–1145 (2022).
105. Meyerowitz, E. A., Richterman, A., Gandhi, R. T. & Sax, P. E. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med* **174**, 69–79 (2021).
106. Vizcaíno-Salazar, G. J. Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y Laboratorio* **23**, 365–386 (2017).
107. Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra Sekhar, G. & Thomas, R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol* **56**, 45 (2008).
108. Cohen, J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas* **20**, 37–46 (1960).
109. Martínez Pérez, J. A. & Pérez Martin, P. S. La curva ROC. *Medicina de Familia. SEMERGEN* **49**, 101821 (2023).
110. Burgos D, M. E. M. M. D. C. Cómo interpretar un artículo sobre pruebas diagnósticas. *Revista chilena de cirugía* **62**, (2010).
111. Cerda, J. & Cifuentes, L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología* **29**, 138–141 (2012).

112. Pan, Y. *et al.* Initial CT findings and temporal changes in patients with the novel coronavirus pneumonia (2019-nCoV): a study of 63 patients in Wuhan, China. *Eur Radiol* **30**, 3306–3309 (2020).
113. Martínez Chamorro, E., Díez Tascón, A., Ibáñez Sanz, L., Ossaba Vélez, S. & Borruel Nacenta, S. Diagnóstico radiológico del paciente con COVID-19. *Radiologia* **63**, 56–73 (2021).
114. World Health Organization. Interim guidance 17 January 2020. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. (2020).
115. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497–506 (2020).
116. Zhang, Y.-Z. & Holmes, E. C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* **181**, 223–227 (2020).
117. Virological. Novel 2019 coronavirus genoma. (2020).
118. National Center of Biotechnology Information (NCBI). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome GenBank: MN908947.3. (2020).
119. Corman, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **25**, (2020).
120. Centers for Disease control and Prevention (CDC). Overview of Testing for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. (2022).
121. Ashcroft, P., Lehtinen, S. & Bonhoeffer, S. Test-trace-isolate-quarantine (TTIQ) intervention strategies after symptomatic COVID-19 case identification. *PLoS One* **17**, e0263597 (2022).
122. Gobierno de Escocia. Covid-19 – Test, Trace, Isolate, Support. A Public Health approach to maintaining low levels of community transmission of COVID-19 in Scotland. Mayo 2020. . (2020).
123. Chung, S.-C. *et al.* Lessons from countries implementing find, test, trace, isolation and support policies in the rapid response of the COVID-19 pandemic: a systematic review. *BMJ Open* **11**, e047832 (2021).
124. Fajnzylber, J. *et al.* SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun* **11**, 5493 (2020).

125. Wölfel, R. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465–469 (2020).
126. Perera, R. A. P. M. *et al.* SARS-CoV-2 Virus Culture and Subgenomic RNA for Respiratory Specimens from Patients with Mild Coronavirus Disease. *Emerg Infect Dis* **26**, 2701–2704 (2020).
127. Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. & Ryo, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* **323**, 2249 (2020).
128. Fang, Y. *et al.* Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology* **296**, E115–E117 (2020).
129. Ai, T. *et al.* Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* **296**, E32–E40 (2020).
130. Patel, R. *et al.* Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio* **11**, (2020).
131. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. (2020).
132. Kevadiya, B. D. *et al.* Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater* **20**, 593–605 (2021).
133. Serrano-Cumplido, A. *et al.* Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. *Medicina de Familia. SEMERGEN* **47**, 337–341 (2021).
134. Smith, C. J. & Osborn, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 6–20 (2009).
135. Tom, M. R. & Mina, M. J. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clinical Infectious Diseases* **71**, 2252–2254 (2020).
136. Dahdouh, E., Lázaro-Perona, F., Romero-Gómez, M. P., Mingorance, J. & García-Rodríguez, J. Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load. *Journal of Infection* **82**, 414–451 (2021).
137. Ministerio de Sanidad. Instituto de Salud Carlos III. Instituto de Salud Carlos III. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19. (2021).

138. Oba, J. *et al.* RT-PCR Screening Tests for SARS-CoV-2 with Saliva Samples in Asymptomatic People: Strategy to Maintain Social and Economic Activities while Reducing the Risk of Spreading the Virus. *Keio J Med* **70**, 35–43 (2021).
139. Russo, A. *et al.* <p>Current Status of Laboratory Diagnosis for COVID-19: A Narrative Review</p>. *Infect Drug Resist* **Volume 13**, 2657–2665 (2020).
140. Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L. & Fan, C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem Rev* **115**, 12491–12545 (2015).
141. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**, 63e–663 (2000).
142. Amaral, C. *et al.* A molecular test based on RT-LAMP for rapid, sensitive and inexpensive colorimetric detection of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Sci Rep* **11**, 16430 (2021).
143. Kitagawa, Y. *et al.* Evaluation of rapid diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Virology* **129**, 104446 (2020).
144. Vilca-Alosilla, J. J. *et al.* A Systematic Review and Meta-Analysis Comparing the Diagnostic Accuracy Tests of COVID-19. *Diagnostics* **13**, 1549 (2023).
145. Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. & Armes, N. A. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* **4**, e204 (2006).
146. Strayer-Scherer, A., Jones, J. B. & Paret, M. L. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Field Detection of Tomato Bacterial Spot Pathogens. *Phytopathology* **109**, 690–700 (2019).
147. Gumaa, M. M. *et al.* Establishment of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the detection of *Brucella* spp. Infection. *Mol Cell Probes* **47**, 101434 (2019).
148. Bender, A. T. *et al.* HIV detection from human serum with paper-based isotachophoretic RNA extraction and reverse transcription recombinase polymerase amplification. *Analyst* **146**, 2851–2861 (2021).
149. Cossio, A. *et al.* Diagnostic performance of a Recombinant Polymerase Amplification Test—Lateral Flow (RPA-LF) for cutaneous leishmaniasis in an endemic setting of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* **15**, e0009291 (2021).

150. Chandu, D. *et al.* Development of a Rapid Point-of-Use DNA Test for the Screening of Genuity® Roundup Ready 2 Yield® Soybean in Seed Samples. *Biomed Res Int* **2016**, 1–12 (2016).
151. Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M. & Bergeron, M. G. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin Chem* **62**, 947–958 (2016).
152. Lobato, I. M. & O’Sullivan, C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **98**, 19–35 (2018).
153. Farrera-Soler, L., Gonse, A., Kim, K. T., Barluenga, S. & Winssinger, N. Combining recombinase polymerase amplification and <sc>DNA</sc>-templated reaction for <sc>SARS-CoV</sc>-2 sensing with dual fluorescence and lateral flow assay output. *Biopolymers* **113**, (2022).
154. Zhang, X. *et al.* Diagnostic efficiency of RPA/RAA integrated CRISPR-Cas technique for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **17**, e0276728 (2022).
155. Liu, J. *et al.* An ultra-sensitive and specific nanoplasmonic-enhanced isothermal amplification platform for the ultrafast point-of-care testing of SARS-CoV-2. *Chemical Engineering Journal* **451**, 138822 (2023).
156. Koczula, K. M. & Gallotta, A. Lateral flow assays. *Essays Biochem* **60**, 111–120 (2016).
157. Nerenz, R. D., Hubbard, J. A. & Cervinski, M. A. Review of SARS-CoV-2 Antigen and Antibody Testing in Diagnosis and Community Surveillance. *Advances in Molecular Pathology* **4**, 217–229 (2021).
158. Dinnes, J. *et al.* Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2020) doi:10.1002/14651858.CD013705.
159. Karlafti, E. *et al.* The Diagnostic Accuracy of SARS-CoV-2 Nasal Rapid Antigen Self-Test: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life* **13**, 281 (2023).

160. Food & Drug Administration (FDA). Potential for False Positive Results with Antigen Tests for Rapid Detection of SARS-CoV-2 - Letter to Clinical Laboratory Staff and Health Care Providers. (2020).
161. Smith, R. L. *et al.* Longitudinal Assessment of Diagnostic Test Performance Over the Course of Acute SARS-CoV-2 Infection. *J Infect Dis* **224**, 976–982 (2021).
162. McKay, S. L. *et al.* Performance Evaluation of Serial SARS-CoV-2 Rapid Antigen Testing During a Nursing Home Outbreak. *Ann Intern Med* **174**, 945–951 (2021).
163. Otoo, J. A. & Schlappi, T. S. REASSURED Multiplex Diagnostics: A Critical Review and Forecast. *Biosensors (Basel)* **12**, 124 (2022).
164. Vashist, S. K., Lippa, P. B., Yeo, L. Y., Ozcan, A. & Luong, J. H. T. Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing. *Trends Biotechnol* **33**, 692–705 (2015).
165. Food & Drug Administration (FDA). At-Home COVID-19 Antigen Tests-Take Steps to Reduce Your Risk of False Negative Results: FDA Safety Communication. (2022).
166. Fernandes, R. S. *et al.* Recent advances in point of care testing for COVID-19 detection. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **153**, 113538 (2022).
167. Robin, P. *et al.* A DNA biosensors-based microfluidic platform for attomolar real-time detection of unamplified SARS-CoV-2 virus. *Biosens Bioelectron X* **13**, 100302 (2023).
168. Qiu, G. *et al.* Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS Nano* **14**, 5268–5277 (2020).
169. Liu, J. *et al.* An ultra-sensitive and specific nanoplasmonic-enhanced isothermal amplification platform for the ultrafast point-of-care testing of SARS-CoV-2. *Chemical Engineering Journal* **451**, 138822 (2023).
170. Chen, Y. *et al.* Dual-CRISPR/Cas12a-Assisted RT-RAA for Ultrasensitive SARS-CoV-2 Detection on Automated Centrifugal Microfluidics. *Anal Chem* **94**, 9603–9609 (2022).

171. Sampaio, I., Takeuti, N. N. K., Gusson, B., Machado, T. R. & Zucolotto, V. Capacitive immunosensor for COVID-19 diagnosis. *Microelectron Eng* **267–268**, 111912 (2023).
172. Nguyen, P. Q. *et al.* Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection. *Nat Biotechnol* **39**, 1366–1374 (2021).
173. Vila Muntadas, M., Agustí Sunyer, I. & Agustí Garcia-Navarro, A. Pruebas diagnósticas COVID-19: importancia del contexto clínico. *Med Clin (Barc)* **157**, 185–190 (2021).
174. Heidt, B. *et al.* Point of Care Diagnostics in Resource-Limited Settings: A Review of the Present and Future of PoC in Its Most Needed Environment. *Biosensors (Basel)* **10**, 133 (2020).
175. Shaw, J. L. V. Practical challenges related to point of care testing. *Pract Lab Med* **4**, 22–29 (2016).
176. Magleby, R. *et al.* Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* **73**, E4197–E4205 (2021).
177. Cepheid O. S. (2020) Xpert Xpress SARS-CoV-2.
178. Won, J. *et al.* Ultimate COVID-19 detection protocol based on saliva sampling and qRT-PCR with risk probability assessment. *Exp Neurobiol* **30**, 13–31 (2021).
179. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134> (2012).
180. Untergasser, A. *et al.* Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, (2012).
181. de Salazar, A. *et al.* Sample pooling for SARS-CoV-2 RT-PCR screening. *Clinical Microbiology and Infection* **26**, 1687.e1-1687.e5 (2020).
182. Munawar, M. A. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology. *Expert Review of Molecular Diagnostics* vol. 22 725–737 Preprint at <https://doi.org/10.1080/14737159.2022.2109964> (2022).

183. Hu, J. *et al.* Sensitive and rapid visual detection of Salmonella Typhimurium in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks. *J Microbiol Methods* **158**, 25–32 (2019).
184. Luo, G. C., Yi, T. T., Jiang, B., Guo, X. lan & Zhang, G. Y. Betaine-assisted recombinase polymerase assay with enhanced specificity. *Anal Biochem* **575**, 36–39 (2019).
185. Jovikj, S. & Langelaar, T. Rapidemic, a versatile and label-free DNAzyme-based platform for visual nucleic acid detection. doi:10.1101/2020.10.14.337808.
186. Hubé, F., Reverdiau, P., Iochmann, S. & Gruel, Y. *Amplification of GC-Rich DNA 81 MOLECULAR BIOTECHNOLOGY HINTS AND TIPS Improved PCR Method for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. Molecular Biotechnology* <http://www.up.univ-mrs.fr/> (2005).
187. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual.
188. Wan, Q. ‘A New Quantitative Method for Detecting SNP Heterozygous Samples by Sanger First Generation DNA Sequencing’. *Biomed J Sci Tech Res* **42**, (2022).
189. Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. *Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol* vol. 215 (1990).
190. Juma, K. M. *et al.* Optimization of reaction condition of recombinase polymerase amplification to detect SARS-CoV-2 DNA and RNA using a statistical method. *Biochem Biophys Res Commun* **567**, 195–200 (2021).
191. Kojima, K. *et al.* Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification. *J Biosci Bioeng* **131**, 219–224 (2021).
192. Liu, Y. *et al.* Recent advances in RNA sample preparation techniques for the detection of SARS-CoV-2 in saliva and gargle. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 165 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117107> (2023).
193. NCSS, LLC. (n.d.). Comparing Two ROC Curves-Independent Groups Design. https://www.ncss.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Comparing_Two_ROC_Curves-Independent_Groups_Design.pdf.
194. Azmi, I. *et al.* A Saliva-Based RNA Extraction-Free Workflow Integrated With Cas13a for SARS-CoV-2 Detection. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, (2021).

195. Srivatsan, S. *et al.* SwabExpress: An End-to-End Protocol for Extraction-Free COVID-19 Testing. *Clin Chem* **68**, 143–152 (2021).
196. Ramachandran, A. *et al.* Electric field-driven microfluidics for rapid CRISPR-based diagnostics and its application to detection of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 29518–29525 (2020).
197. Voelker, C. R. *et al.* Evaluating sensitivity and specificity of the Biomeme Franklin™ three9 real-time PCR device and SARS-CoV-2 go-strips assay using clinical samples. *Journal of Clinical Virology* **146**, 105046 (2022).
198. Onyilagha, C. *et al.* Evaluation of mobile real-time polymerase chain reaction tests for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Sci Rep* **11**, 9387 (2021).
199. *Biomeme SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Test Instructions for Use, v5.0 For Use Under an Emergency Use Authorization (EUA) Only.*
200. Mishra, B., Behera, B., Mohanty, M., Ravindra, A. & Ranjan, J. Challenges and issues of SARS-CoV-2 pool testing. *Lancet Infect Dis* **20**, 1233 (2020).
201. Kozinska, A. *et al.* Viral Etiological Agent(s) of Respiratory Tract Infections in Symptomatic Individuals during the Second Wave of COVID-19 Pandemic: A Single Drive-Thru Mobile Collection Site Study. *Pathogens* **11**, 475 (2022).
202. Pearson, J. D. *et al.* Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct RT-qPCR detection methods. *Virol J* **18**, 99 (2021).
203. Tedim, A. P. *et al.* Comparison of real-time and droplet digital PCR to detect and quantify SARS-CoV-2 RNA in plasma. *Eur J Clin Invest* **51**, (2021).
204. Biomeme Inc. <https://biomeme.com/applications>. Accessed in February 2024
205. Kritikos, A. *et al.* Sensitivity of Rapid Antigen Testing and RT-PCR Performed on Nasopharyngeal Swabs versus Saliva Samples in COVID-19 Hospitalized Patients: Results of a Prospective Comparative Trial (RESTART). *Microorganisms* **9**, 1910 (2021).
206. ALLtest in Diagnosis Features of Antigen test. <https://www.alltests.com.cn/Home/ProductInfo/407>.

207. Guo, Q. *et al.* Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for Schistosomiasis Japonica Diagnosis in the Experimental Mice and Domestic Goats. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, (2021).
208. YASUKAWA, K., KONISHI, A. & INOUE, K. Effects of Organic Solvents on the Reverse Transcription Reaction Catalyzed by Reverse Transcriptases from Avian Myeloblastosis Virus and Moloney Murine Leukemia Virus. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1925–1930 (2010).
209. Kojima, K. *et al.* Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification. *J Biosci Bioeng* **131**, 219–224 (2021).
210. Lillis, L. *et al.* Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Mol Cell Probes* **30**, 74–78 (2016).
211. Sharma, N., Hoshika, S., Hutter, D., Bradley, K. M. & Benner, S. A. Recombinase-Based Isothermal Amplification of Nucleic Acids with Self-Avoiding Molecular Recognition Systems (SAMRS). *ChemBioChem* **15**, 2268–2274 (2014).
212. Farrera-Soler, L., Gonse, A., Kim, K. T., Barluenga, S. & Winssinger, N. Combining recombinase polymerase amplification and <scp>DNA</scp> -templated reaction for <scp>SARS-CoV</scp>-2 sensing with dual fluorescence and lateral flow assay output. *Biopolymers* **113**, (2022).
213. Zhang, X. *et al.* Diagnostic efficiency of RPA/RAA integrated CRISPR-Cas technique for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **17**, e0276728 (2022).
214. Chen, Y. *et al.* Dual-CRISPR/Cas12a-Assisted RT-RAA for Ultrasensitive SARS-CoV-2 Detection on Automated Centrifugal Microfluidics. *Anal Chem* **94**, 9603–9609 (2022).
215. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J. & Prescott, H. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA* **324**, 782 (2020).
216. Yang, S. *et al.* Fast evolution of SARS-CoV-2 BA.2·86 to JN.1 under heavy immune pressure. *Lancet Infect Dis* (2023) doi:10.1016/S1473-3099(23)00744-2.
217. Informe Organización Mundial de la Salud. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/18122023_jn.1_ire_clean.pdf.

Publicaciones



Review

Detection of SARS-CoV-2 Based on Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) and Its Integration into Nanomedicine and Microfluidic Devices as Point-of-Care Testing (POCT)

Alexis Dorta-Gorrín ^{1,2,3} , Jesús Navas-Méndez ^{1,2} , Mónica Gozalo-Margüello ^{2,4,5}, Laura Miralles ^{3,6,*} and Lorena García-Hevia ^{1,2,*}

- ¹ Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Cantabria (UC), 39011 Santander, Spain; alexis.dorta@alumnos.unican.es (A.D.-G.); navasj@unican.es (J.N.-M.)
² Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander, Spain; monica.gozalo@scsalud.es
³ Environmental Genetics Department, Ecohydros S.L., 39600 Maliaño, Spain
⁴ Microbiology Service of University Hospital Marqués de Valdecilla (HUMV), 39008 Santander, Spain
⁵ CIBER de Enfermedades Infecciosas-CIBERINFEC (CB21/13/00068), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
⁶ Department of Functional Biology, Area of Genetics, Faculty of Medicine, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain
* Correspondence: miralleslaura@uniovi.es (L.M.); lgarcia@idival.org (L.G.-H.)

Abstract: The coronavirus SARS-CoV-2 has highlighted the criticality of an accurate and rapid diagnosis in order to contain the spread of the virus. Knowledge of the viral structure and its genome is essential for diagnosis development. The virus is still quickly evolving and the global scenario could easily change. Thus, a greater range of diagnostic options is essential to face this threat to public health. In response to the global demand, there has been a rapid advancement in the understanding of current diagnostic methods. In fact, innovative approaches have emerged, leveraging the benefits of nanomedicine and microfluidic technologies. Although this development has been incredibly fast, several key areas require further investigation and optimization, such as sample collection and preparation, assay optimization and sensitivity, cost effectiveness, scalability device miniaturization, and portability and integration with smartphones. Addressing these gaps in the knowledge and these technological challenges will contribute to the development of reliable, sensitive, and user-friendly NAAT-based POCTs for the diagnosis of SARS-CoV-2 and other infectious diseases, facilitating rapid and effective patient management. This review aims to provide an overview of current SARS-CoV-2 detection methods based on nucleic acid detection tests (NAATs). Additionally, it explores promising approaches that combine nanomedicine and microfluidic devices with high sensitivity and relatively fast ‘time to answer’ for integration into point-of-care testing (POCT).

Keywords: COVID-19; diagnosis; clinical management; device integration; nanomedicine applications



Citation: Dorta-Gorrín, A.; Navas-Méndez, J.; Gozalo-Margüello, M.; Miralles, L.; García-Hevia, L. Detection of SARS-CoV-2 Based on Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) and Its Integration into Nanomedicine and Microfluidic Devices as Point-of-Care Testing (POCT). *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10233. <https://doi.org/10.3390/ijms241210233>

Academic Editor: Nitin Saxena

Received: 25 April 2023

Revised: 10 June 2023

Accepted: 14 June 2023

Published: 16 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

SARS-CoV-2 is a novel coronavirus that emerged in late 2019 and is responsible for causing the disease known as COVID-19. To date (11 February 2023), the coronavirus SARS-CoV-2 pandemic has resulted in 677,367,334 confirmed cases and 6 million deaths around the world. The United States, India, and France have been the most affected countries, with the USA reporting the highest number of deaths [1].

Knowledge of the SARS-CoV-2 genome and structure is essential for its diagnosis, therapeutic targets, pathophysiology, and genetic variation. SARS-CoV-2 is a betacoronavirus of the order *Nidovirales*. SARS-CoV-2 is the seventh coronavirus described as capable of infecting humans and the third capable of large-scale spread and pandemic disease, as did SARS-CoV in 2003 and MERS-CoV in 2012. The SARS-CoV-2 genome is a large, single

positive-sense RNA strand of 26–32 kb, capped and polyadenylated, encoding 16 non-structural genes at the 5′ end, and 4 structural genes (S, M, N, and E) and 11 accessory proteins (ORF3 to ORF10) at the 3′ end [2]. This structure allows the viral genome to be translated as mRNA, which is directly recognized by the ribosomes of cells [3] (Figure 1).

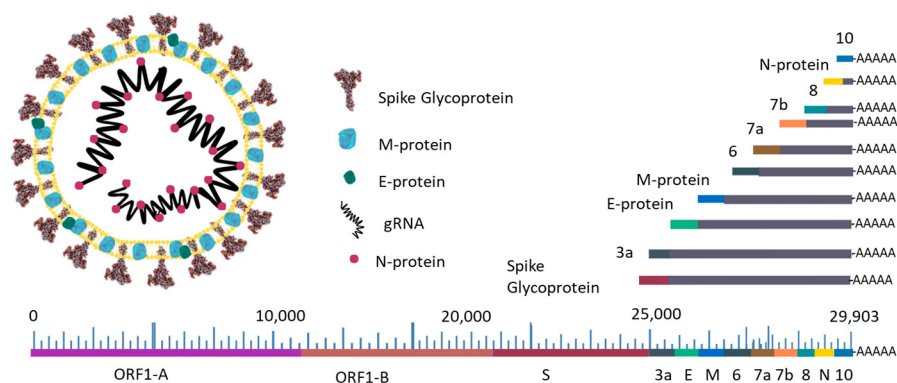


Figure 1. Schematic representation of the SARS-CoV-2 virion structure and genome. The subgenomic RNA transcripts of the structural genes and accessory proteins are represented by grey lines. Adapted from [3].

Viral RNA polymerases exhibit a low fidelity rate, leading to the introduction of mutations during each replication cycle [4–6]. Alongside the rapid replication of the virus, its large population size and other mechanisms, such as viral recombination and reassortment, contribute to the high diversity observed in coronaviruses, aligning with the concept of quasispecies [7]. Consequently, this favors the emergence of variants of concern (VOCs). The World Health Organization (WHO) defines VOCs as variants that exhibit increased transmissibility, detrimental changes in COVID-19 epidemiology, increased virulence, altered clinical presentation, reduced effectiveness of public health interventions (e.g., social measures, diagnostics, therapeutics, vaccines), or any combination thereof [8].

Genomic sequencing and the deposit of genomes into databases such as Pango [9], Nexstrain [10], and the Global Initiative of Share All Influenza Data (GISAID) [11] have made it possible to monitor, characterize, and classify the epidemiological evolution of SARS-CoV-2 in different VOCs. The principal sublineages of Omicron currently circulating are shown in Table 1.

Table 1. The main variants of interest (VOIs) and variants under monitoring (VUMs) currently circulating are classified by Pango and Nexstrain, and their designation and risk assessment data are available. These variants are characterized by genetic features, including the process of recombination that led to their emergence, and specific mutations in the spike protein. It is important to note that Lineage XBB does not include the sublineages mentioned as VOI and VUM (Source: WHO) [12,13].

VOIs			
Pango Lineage	Nexstrain Clade	Genetic Features	Date of Designation and Risk Assessment
XBB.1.5	23A	Recombinant of BA.2.10.1 and BA.2.75 sublineages, namely BJ1 and BM.1.1.1, with a breakpoint in S1 XBB.1 + S:F486P (similar spike genetic profile as XBB.1.9.1)	24 February 2023
XBB.1.16	23B	Recombinant of BA.2.10.1 and BA.2.75 sublineages, i.e., BJ1 and BM.1.1.1 XBB.1 + S:E180V, S:K478R and S:F486P	17 April 2023

Table 1. *Cont.*

VUMs			
BA.2.75	22D	BA.2 + S:K147E, S:W152R, S:F157L, S:I210V, S:G257S, S:D339H, S:G446S, S:N460K, S:Q493R reversion	6 July 2022
CH.1.1	22D	BA.2.75 + S:L452R, S:F486S	8 February 2023
BQ.1	22E	BA.5 + S:R346T, S:K444T, S:N460K	21 September 2022
XBB*	22F	BA.2 + S:V83A, S:Y144-, S:H146Q, S:Q183E, S:V213E, S:G252V, S:G339H, S:R346T, S:L368I, S:V445P, S:G446S, S:N460K, S:F486S, S:F490S	12 October 2022
XBB.1.9.1	Not assigned	Recombinant of BA.2.10.1 and BA.2.75 sublineages, i.e., BJ1 and BM.1.1.1 XBB.1 + S:F486P (similar spike genetic profile as XBB.1.5)	30 March 2023
XBB.1.9.2	Not assigned	Recombinant of BA.2.10.1 and BA.2.75 sublineages, i.e., BJ1 and BM.1.1.1, XBB.1 + S:F486P, S:Q613H	26 April 2023

The Omicron sublines are now classified as VOIs (variants of interest) and VUMs (variants under monitoring). The differences between VOIs are defined as variants that show preliminary evidence, including genomic, epidemiological, or in vitro data, suggesting a potential impact on transmissibility, severity, or immunological escape, but with greater uncertainty. VUMs, on the other hand, are additional variants that may have similar characteristics to VOCs but lack strong evidence or proper evaluation.

Risk assessment and classification as a VOI or VUM by the WHO or ECDC may vary among the sublineages of Omicron [14]. The concern with the Omicron variant lies in its more than 30 mutations in the spike protein, a key surface protein of coronaviruses responsible for binding to the ACE2 receptor on the host cells [15,16]. These mutations contribute to increased infectivity, enhanced transmissibility, and potential immune evasion, which could reduce vaccine efficacy [17,18]. Certain sublineages of Omicron, such as BA.4 and BA.5, have shown a loss of diagnostic accuracy and potential false-negative results in silico in RT-qPCR assays [19,20]. Recombination phenomena between these sublineages are also commonly observed.

Therefore, accurate and updated nucleic acid amplification tests (NAATs), such as RT-qPCR, are necessary to monitor the evolution of the virus. Hence, the diagnosis and surveillance of SARS-CoV-2 variants are crucial for controlling the spread of the virus and adapting public health measures [21,22]. The synergies between NAATs and new technical advances in medicine, such as microfluidics and nanomedicine, will be reviewed here, offering an updated scenario of promising approaches and highlighting emerging trends in diagnostic methods, which will drive future advancements not only in the diagnosis of SARS-CoV-2, but also in identifying newly emerging or re-emerging pathogens.

2. Importance of Diagnosis and the Use of POCT

As an emerging pathogen, SARS-CoV-2 has demonstrated the importance of an early and accurate diagnosis, the stratification of disease severity, and clinical management. Symptoms of COVID-19 can be easily confused with other respiratory infections and infected individuals may be asymptomatic (without clinical signs but able to spread the disease). Early accurate diagnosis, the detection of suspected cases, with or without symptoms, and appropriate clinical management are therefore essential to break the transmission chain and implement social interventions where necessary.

According to the WHO, molecular detection methods for SARS-CoV-2 can be divided into three categories:

- Detection of viral RNA: this involves nucleic acid amplification tests (NAATs), such as RT-qPCR.

- Detection of viral antigens: such as immunodiagnostic techniques, including lateral flow assays (LFA).
- Detection of viral antibodies: serological techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) or chemiluminescent immunoassays (CLIAs).

Briefly, antigen tests, which have been widely available during the pandemic, utilize immunoassays to detect viral antigens. Positive results are indicated by colored bands on the test line, while a control line confirms the test's accuracy [23]. Antigen tests generally have a lower sensitivity compared to NAATs, and their performance can vary among the different tests [24]. Moreover, the policies regarding the use of LFAs differ from country to country and have changed throughout the course of the pandemic. For instance, at the beginning of the pandemic, a confirmatory NAAT test was required after a positive LFA test, whereas nowadays an LFA test alone is considered sufficient.

The test defined as POCT, also called near patient or bedside testing, is one that can be performed in an outpatient setting, thereby shortening the clinical decision-making process for additional testing or therapy [25]. An ideal POCT test fulfils the REASSURED criteria of having REal-time connectivity, and being Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, and Delivery to the end user [26]. The integration of the diagnosis into POCT devices has been possible thanks to the development of microfluidic technology and nanomedicine. Microfluidics is a field that deals with the behavior, manipulation, and control of fluids at the microscale level. It involves the design and fabrication of devices that manipulate tiny amounts of fluids, typically on a microliter or nanoliter scale, within microchannels or microstructures [27]. Nanomedicine, on the other hand, refers to the application of nanotechnology in medicine. It involves the use of nanoscale materials and devices for the diagnosis, treatment, and prevention of diseases [28].

The relation between NAATs and microfluidics or nanomedicine lies in their potential synergies and applications in the field of molecular diagnostics. Microfluidic systems can be used to miniaturize and automate NAATs, enabling the rapid and efficient analysis of nucleic acids with reduced reagent consumption. Microfluidic devices can integrate the various steps of NAATs, such as sample preparation, nucleic acid extraction, amplification, and detection, into a single chip or platform [29].

3. Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs)

3.1. RT-qPCR Is the Gold Standard Method

Quantitative fluorescence-based reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) is widely acknowledged as the gold standard for SARS-CoV-2 detection and is extensively utilized in clinical settings due to its high sensitivity, specificity, and automation. The first step of sample preparation for RT-qPCR is the extraction of nucleic acids, specifically RNA for SARS-CoV-2, which can be time-consuming, labor-intensive, and prone to contamination. This is followed by the reverse transcription of the viral RNA into complementary DNA (cDNA). The third step is the qPCR amplification of the cDNA using specific primers. Both reverse transcription and amplification can be performed in a single tube. During each amplification cycle, the probe of the reaction, typically a TaqMan probe, hybridizes with the amplicon, and its hydrolysis emits fluorescence of different wavelengths. A real-time thermocycler monitors and records this fluorescence, allowing for the determination of the cycle threshold (Ct). Ct represents the number of cycles in which the fluorescence significantly exceeds the background, and enables the measurement of the exponential accumulation of amplicons. By comparing the Ct values of the controls and samples, the relative expression can be estimated [30,31]. The ability to multiplex the RT-qPCR reaction enhances its capacity to detect various targets of viral nucleic acid and improves the throughput of the assay. The automation of RNA extraction and RT-qPCR reduces time, manual labor, contamination risks, and handling errors. However, it requires expensive and bulky equipment.

In a diagnostic context, caution should be used when interpreting the Ct result. The Ct value does not represent infectious viral particles, nor the amount of viral RNA in the

sample. A low Ct may be obtained when the viral load is high, and a high Ct may be obtained when the viral load is low, so the Ct must be interpreted in the clinical context of the patient. For that reason, RT-qPCR usually is used as a qualitative method (a yes or no answer), differing within different countries. Furthermore, a positive RT-qPCR test does not necessarily mean that the patient was infectious; the test may remain positive for 5 weeks after the onset of symptoms. There is variability between the RNA extraction method, inter- and intra-test, and heterogeneity in sample collection in the different commercialized RT-qPCR tests available; each laboratory must evaluate the Ct cut-offs and validate the viral load. This is an important limitation [32–35]. Other limitations of the test are the need for well-trained personnel to perform it, the cost, the large equipment, and the time required. Results can be delayed by days due to the transport of samples and time to perform the test, which could lead to new infections [36,37].

Based on the first sequences of SARS-CoV-2 deposited in the GISAID database in January 2020, the WHO published an RT-qPCR protocol for the detection of the E and RdRp genes. The primers for the assay were obtained from the National Reference Centre for Respiratory Viruses, Institute Pasteur, Paris, and Corman [38,39]. On the other hand, the US CDC developed different protocols considering different genes than the WHO. However, quality control problems were found and the protocol was re-analyzed. These issues, along with the emergency public health situation, caused a delay in diagnostic tests at the beginning of the pandemic. As a result, the Food and Drug Administration (FDA) changed its policy and allowed other laboratories outside the US CDC to perform and validate COVID-19 diagnostic tests. Subsequently, biotechnology companies around the world made efforts and competed to validate and commercialize their diagnostic tests. The CDC website provides a current and updated list of diagnostic tests, the majority of which are based on the FDA-approved RT-qPCR, classified by the entity, date of approval, type of test, and authorized settings (different laboratories or patient-care settings certified according to the Clinical Laboratory Improvements Amendments of 1988 (CLIA)). The list also includes information on the performance of the tests based on their suitability for specialized laboratories, fact sheets for authorized end users, healthcare providers, and patients, as well as manufacturers' instructions. As for the POCTs that use RT-qPCR, the FDA has approved various tests, such as Xpert Xpress CoV-2 Plus and Xpert Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV tests from Cepheid GeneXpert, which include Influenza A/B and Respiratory Syncytial Virus [40], Accula SARS-CoV-2 test from Mesa Biotech, and a multiplex test for SARS-CoV-2 & Influenza A/B from Roche Molecular Systems, among others [41].

3.2. Digital Droplet Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

The method that comes closest to absolute quantification is ddPCR (digital droplet polymerase chain reaction). In ddPCR, the sample is divided into droplets, each containing few or no copies of the target DNA. These droplets act as separate micro-reactions of the PCR and are then compared by measuring the fluorescence. The partitions follow a Poisson distribution, so the ratio of positive partitions to the total number defines the amount of target DNA in the sample. ddPCR is less affected by the presence of inhibitors than qPCR, although it depends on the specific inhibitor used. Additionally, ddPCR is more reproducible than qPCR and can be integrated into microfluidic technologies or devices to adapt to the desired application [42,43] (Figure 2).

3.3. Isothermal Amplification

Isothermal amplification encompasses all the nucleic acid amplification tests (NAATs) that can be performed at a constant temperature, eliminating the need for a thermocycler. Since 1990, various isothermal amplification methods have been developed as alternatives to PCR and have shown great potential in the field of biomedicine. These methods can be integrated with nanoparticles, microsystems, and bioanalysis, offering new possibilities [44].

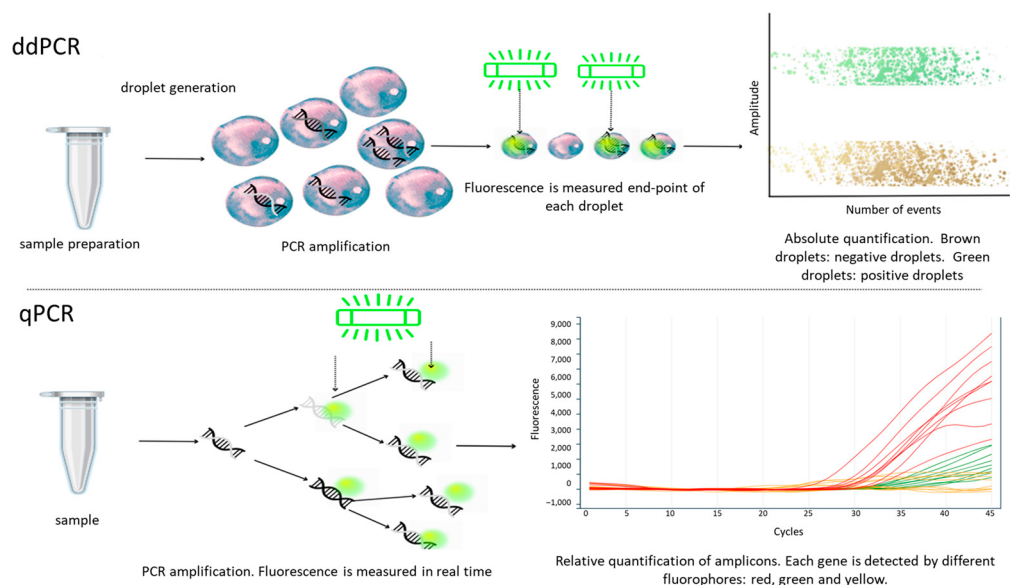


Figure 2. A schematic comparison of ddPCR and qPCR illustrates their differences in operation. In ddPCR, droplets are formed, each containing varying amounts of nucleic acid, enabling individual micro-PCR reactions within each droplet. The results are then analyzed based on Poisson's distribution for accurate quantification. On the other hand, qPCR involves real-time amplification, where the fluorescent probe hybridizes and is continuously measured during each cycle. This results in an exponential graph if the result is positive, indicating relative quantification. The figure has been adapted from Kokkoris et al. [30].

There is a wide range of isothermal amplification methods, each utilizing different enzymes, numbers of primers, temperatures, and reaction times. Compared to RT-qPCR, isothermal amplification methods generally exhibit lower sensitivity, reproducibility, specificity, and robustness. However, researchers have documented several strategies to address and improve these limitations [45].

The most widely used isothermal technique is reverse transcription coupled to loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). In RT-LAMP, multiple sets of primers (typically four to six) are designed to partially bind to the target sequence. This amplification process generates a new region with self-complementarity, forming a loop structure that can be recognized by additional primers (L-primers), resulting in a cascade of amplification. The results of RT-LAMP can be detected using various techniques, including end-point electrophoresis, turbidimetry, colorimetry, intercalating agent dyes, and real-time fluorescence. One of the attractive features of RT-LAMP is its versatility, as the reaction can be performed in a simple heat block or thermal bath, making it suitable for resource-limited settings. Several methods have been developed for the colorimetric detection of SARS-CoV-2 using RT-LAMP, which allows the reaction to be completed within 30 min at 65 °C, without the need for complex laboratory reagents [46] or through turbidimetry [47]. Although challenging, multiplexing the RT-LAMP reaction is possible and can be coupled with sequencing, enabling large-scale testing and the monitoring of variants of concern [48,49] (Figure 3).

Recombinase polymerase amplification (RPA) is another isothermal method of NAATs that is simpler (fewer enzymes required) and more sensitive (it can detect fewer copies) than LAMP. The reaction is shown in Figure 3. The process starts when the recombinase *usvX* binds to the primers and ATP to form a complex. This complex recognizes the DNA target in the sample. When it recognizes the complementary sequence, it produces a strand displacement that is stabilized by the SSB proteins. The complex is then disassembled and DNA polymerase polymerizes the strands at the 3' end. This happens in a cycle of exponential amplification until the ATP is used up. The amplification time is often 20 min [50]. Although it is a powerful tool, it has several limitations that need to be

overcome. It requires the full kinetic optimization of the reaction. It does not provide a Ct-like RT-qPCR, but a time threshold based on real time. The entire manual performance, e.g., the mixing step, affects the kinetics of the reaction, so it is recommended to automate and carefully control it. The false-positive amplification rate is higher than for other isothermal techniques. The dyes normally used in qPCR, such as SYBR Green or TaqMan probes, do not work in RPA reactions; the TaqMan polymerases digest the strands displaced by their 5'-3' exonuclease activity [51,52].

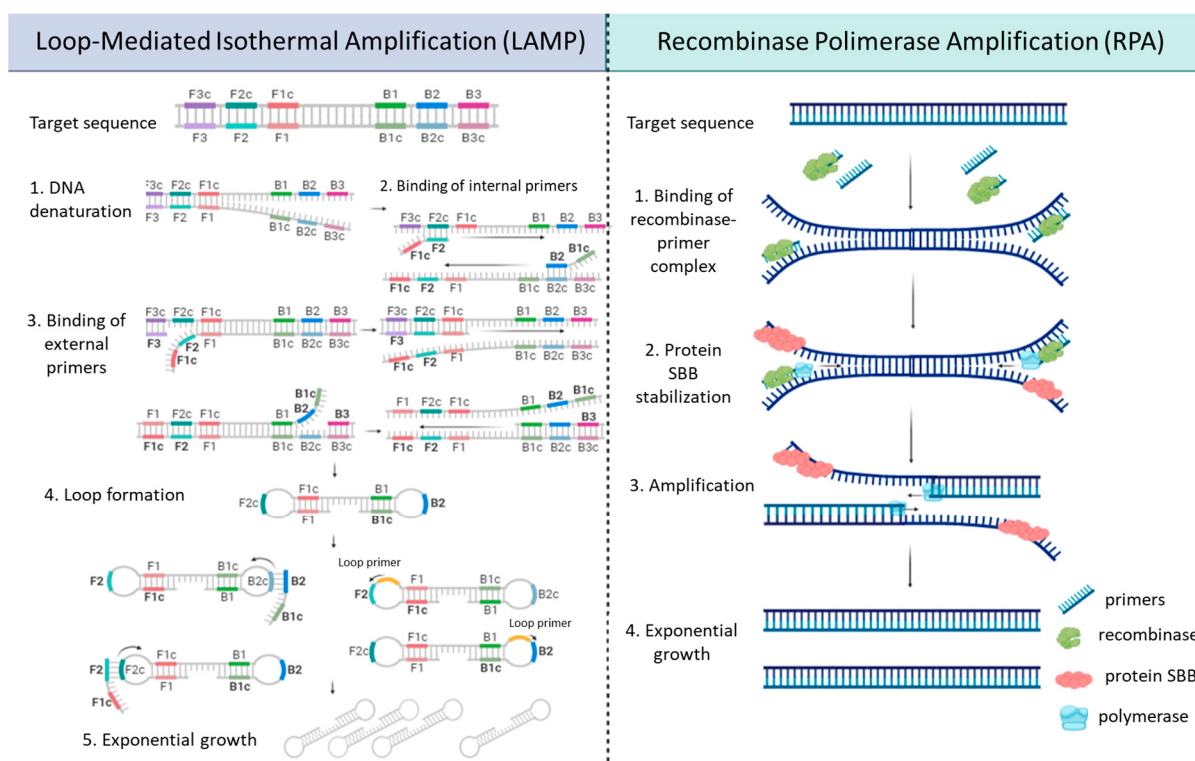


Figure 3. Schematic representation of LAMP and RPA. In LAMP, 4–6 primers are used to generate cohesive ends, allowing the formation of a loop structure and enabling exponential amplification. On the other hand, RPA employs two enzymes: a recombina-se, which forms a complex with the primers and displaces the DNA strand, and a polymerase, which carries out the amplification process. Single-stranded DNA-binding (SSB) proteins are involved in stabilizing the single strand during the displacement step.

The strength of RPA is that it could be coupled with other systems to improve sensitivity, reduce false-positive rates, and automate reactions. It could be coupled to a lateral flow assay (LFA) like other NAATs and provide visual readouts as a qualitative method, or be automated in microdevices or point-of-care biosensors. Some strategies will be reviewed in the next sections, but examples of the approaches that include RPA with CRISPR-based methods are SHERLOCK, with advances as presented by Song et al. (2023) [53], NanoPEIAs, etc. [54,55].

Other isothermal methods, such as transcription-mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA), and helicase-dependent amplification (HDA), have not been as widely used and reported for the detection of SARS-CoV-2. Although these isothermal methods have emerged in recent years as alternatives or competitors to LAMP and RPA, they have not been widely used; perhaps the accessibility of the kits and the stringency of the reagents favor a ‘niche’ application, and present difficulties in overcoming ‘proof-of-concept’ and becoming widely used, as has been suggested, for example, for HDA [56].

3.4. CRISPR-Based Methods

Clustered regularly interspaced short palindromic sequence repeats (CRISPR) has revolutionized molecular biology since its discovery, mechanism elucidation, and application [57–59]. Known in the scientific community as ‘genetic scissors’, it enables genome editing, with revolutionary applications and ethical challenges [60].

CRISPR-Cas systems can be classified into three classes, according to the type of endonucleases (Cas), based on their complexity: Class I, Class II, and Class III. Each class is subdivided into several types according to the structure and sequence of the Cas proteins. For diagnostic purposes, the type V (Cas12) and type VI (Cas13) proteins of class II have been adapted because of their simplicity.

The simplest, type V, requires only crRNA (RNA-guided CRISPR system) and Cas12a protein [61]. In short, an RNA-guide (crRNA) containing the target sequence is delivered to the CRISPR/Cas system. The CRISPR/Cas system, with the crRNA, scans the sequence and, if the target is present, specifically cuts the sequence at that location. The reaction can be monitored using fluorescent molecular reporters, probes or linked to enzymes [62]. In terms of diagnostics, several methods have been developed that combine isothermal amplification with CRISPR technology, such as SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) and DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter) (Figure 4).

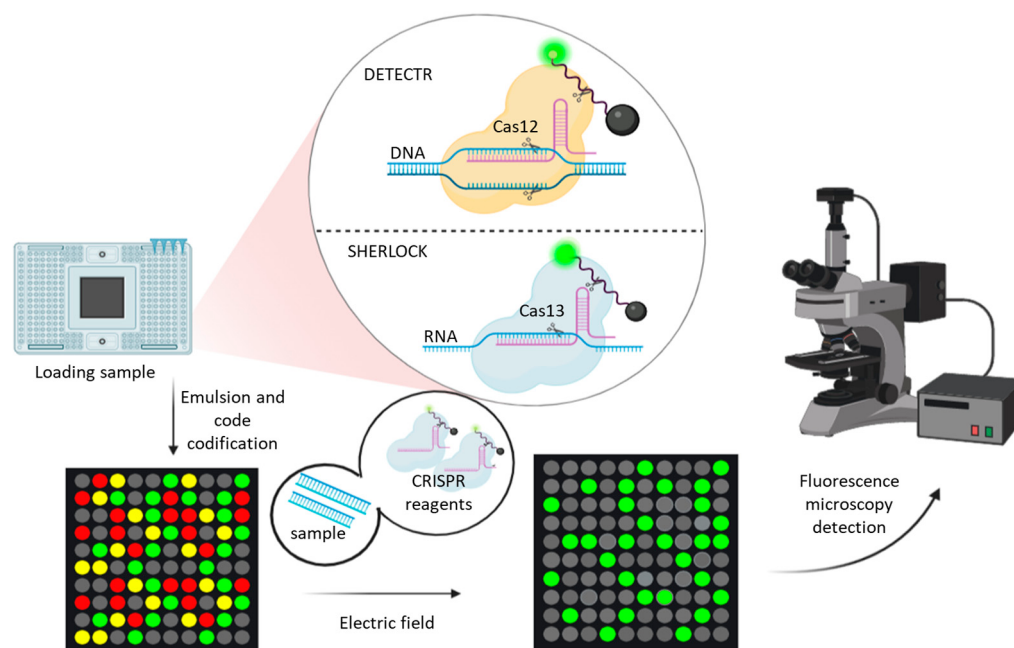


Figure 4. The DETECTR and SHERLOCK methods are schematically represented, with the main difference being the CRISPR/Cas system used. DETECTR utilizes CRISPR/Cas12 and targets double-stranded DNA, while SHERLOCK employs CRISPR/Cas13 and targets RNA. In both cases, when cleavage occurs, a fluorescent marker collaterally reports the cleavage and emits a signal. CRISPR/Cas systems can be integrated into microfluidic devices, such as the Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic Acids (CARMEN) method. Although theoretically possible with both CRISPR systems, CARMEN has been developed specifically for SHERLOCK assays. The sample is emulsified and barcoded to distinguish different targets or samples. An electric field combines each droplet with the necessary reagents for SHERLOCK. The presence or absence of a fluorescence signal allows for the quantification of positive samples for the target and enables multiplexed screening of several pathogens or targets of interest simultaneously.

Both assays have high sensitivity, can detect very low levels of viral RNA in the order of 2 aM, are rapid, allow visual signaling after performance, and could avoid complex laboratory infrastructure, which is attractive for POCT [63]. Published protocols have used

RPA and SHERLOCK to detect SARS-CoV-2 with results in less than an hour and a setup time of approximately 15 min. The detection method is coupled to a lateral flow device (LFD) to provide visual readouts and even to develop the entire process in a single tube, thus avoiding cross-contamination [64]. Interestingly, another approach called CRISPR-SPADE (CRISPR Single-Pot-Assay-Detecting-Emerging VOCs) combines RT-LAMP with CRISPR-Cas in one tube, allowing the detection of different VOCs [65].

An advantage, but also a limitation, of CRISPR-based assays is the possibility of avoiding RNA extraction, which is a time-consuming and costly step of RT-qPCR, but can in some cases inhibit the reaction due to the presence of DNA nucleases in the sample. For example, the method called CASSPIT (Cas13 Assisted Saliva-based & Smartphone Integration Testing) allows the detection of SARS-CoV-2 in saliva samples without RNA extraction, just heating, and using CRISPR/Cas13 and LFA showed a sensitivity of 97%, in agreement with RT-qPCR. Coupled with a smartphone, it allows quantification of the results and achieves the ease of use and connectivity that POCTs must have [66].

Another interesting approach as a POCT is STOP COVID (SHERLOCK Testing-in-One-Pot), which combines RT-LAMP with SHERLOCK in a one-tube reaction, without the need for RNA extraction and lateral-flow strip reading, offering high sensitivity, no cross-reactivity with SARS-CoV or MERS-CoV, and the results can be adapted to a cartridge to avoid contamination and a mobile device for quantification [67].

CRISPR-based assays can be integrated into a large-sample processing system, such as CARMEN (for Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic Acids), which can evaluate 4500 samples at a time. It consists of microdroplets of each CRISPR/Cas13 reaction emulsified in oil, and droplets of the sample, which are mixed by an electric field in a microarray well of the chip, generate a barcode of fluorescence when the cleavage reaction does or does not occur. The fluorescence is recorded and measured with fluorescence microscopy [68,69] (Figure 4).

CARMEN is a powerful tool that has shown high-specificity, -sensitivity, and -accuracy comparable to RT-qPCR and sequencing [69]. In terms of POCT, the main limitations are the cost, the need for qualified personnel, and well-equipped central laboratories to perform this test.

A promising technology related to SHERLOCK is INSPECTR (Internal Splint-Pairing Expression Cassette Translation Reaction), a DNA hybridization-based sensor that detects RNA or DNA single base-pair sensitivity coupled with a bioluminescent signal, co-founded by the SHERLOCK developers and the Harvard Wyss Institute [70–73].

3.5. Next-Generation Sequencing (NGS)

As a centralized technique, NGS is the best diagnostic tool for knowing which pathogen or pathogens are present in samples, what mutations they have, and key information about pathogenesis and phylogeny.

NGS is the next step up from the traditional Sanger sequencing method, based on labeled dideoxynucleotides (ddNTPs) incorporated into a branched extension of DNA, each of which emits a different fluorescence. NGS platforms, such as Illumina and IonTorrent, and also third-generation sequencing, such as Nanopore or PacBio, are based on the construction of a library of fragments from the genome of the sample with adapters (barcoding) and the use of labeled deoxynucleotides, pH change, or electrical mobility throughout a nanopore channel each time a dNTP is incorporated, to distinguish each nucleotide in parallel. The raw data is compiled by specific software, resulting in reads. The number of reads overlaps into contigs. The contigs need to be assembled and mapped to build the whole genome. Coverage is the percentage of the genome that is statistically correctly identified and assembled [74].

In the early stages of the COVID-19 outbreak, NGS provided important information about SARS-CoV-2. It allowed us to identify its relationship to bat-SL-CoVZC4, a bat coronavirus that has a protein spike more like the protein of SARS-CoV that caused the 2002 outbreak [75]. It also provides important information about the pathogenesis of viral

RNA, such as the presence of the furin cleavage site in the spike [76]. The mutations along the genome that enhance viral infectivity have also been predicted by NGS, and key viral processes, such as viral binding to ACE2, have been described by using NGS [77]. Finally, the structure of the viral genome and the deposit of the sequences in databases, such as GISAID and Nexstrain, have allowed the development of other diagnostic methods, such as the first RT-qPCR and other NAATs [78,79].

Currently, in a clinical context, positive patients with a Ct of less than 30 are selected as candidates for sequencing in order to track the locally circulating variants of concern. The WHO has published a guide for NGS-based epidemiological surveillance of different VOCs to assist clinical settings in tracking circulating VOCs [80].

4. Microfluidics Integration and Nanomedicine Advances

The development of microfluidic technology and microfabrication processes has enabled the creation of nanoscale lab-on-chip devices based on various molecular techniques, including NAATs. Microfluidics allows the miniaturization, integration, and portability of complex laboratory reactions, reducing cost and time to answer [81,82]. The microfluidic platform is mainly driven by capillarity, pressure, centrifugal forces, electrokinetics, or acoustic waves. These characteristics allow low energy consumption, portability/wearability, lower cost of instrumentation, precision, and programmability [83]. Paper-based microfluidics driven by capillarity or gravity are called μ PADs, and have many applications, not only in molecular diagnostics, but also in drug detection and environmental monitoring [84].

The potential and development of nanomedicine have been increasing in biomedical settings in recent years. Nanoscale materials possess inherent properties that are interesting and suitable for biological systems in terms of compatibility, manipulability, and functionality [85]. When combined with molecular methods, such as NAATs, nanomedicine helps overcome principal limitations. For instance, nanomaterials simplify sample collection and preparation, eliminating the need for time-consuming and laborious nucleic acid extraction in some cases. This combination with NAATs results in greater specificity and sensitivity, which are required for reliably detecting low viral loads and reducing the time to obtain results. Moreover, NAATs can assist in overcoming the drawback of poor signaling from a biosensor by amplifying it through a NAATs reaction [29,86].

However, these advantages are still being further studied along with other potentially important characteristics, such as device miniaturization. Miniaturization enables robust diagnostics without compromising sensitivity and specificity, making it feasible to deploy them in resource-limited settings. Cost-effectiveness and scalability pose challenges in nanomedicine, as the characteristics of nanoparticles, such as size, need to be individually assessed to ensure affordability and suitability for mass screening, thereby ensuring health accessibility [87,88]. This can add complexity to the technique, emphasizing the importance of knowledge and expertise in improving these aspects.

Moreover, the development of nanoparticles (NPs) has been widely used in biomedical settings, including SARS-CoV-2. Both dendrimers and polymersomes have been proposed as potential treatments or for the development of new vaccine formulations [89,90]. Even the current Pfizer/BioTech mRNA vaccines are based on liposomes [91]. Inorganic nanoparticles, including quantum dots, have been used to perform fluorescence immunochromatography combined with isothermal amplification and CRISPR-based assays to detect SARS-CoV-2, with high sensitivity and a result time of 40 min [92]. Other approaches using silver and gold NPs will be reviewed below. Microfluidic mixing-based fabrication methods offer better control for achieving the desired size, morphology, shape, size distribution, and surface properties of the synthesized NPs [93].

Nanoplasmonics is an optical phenomenon in which nanoscale light interacts with a metal surface, causing the conversion of free photons into localized oscillatory-density charges on the metal's surface (plasmonic surface). The metals commonly used for this phenomenon are gold and silver, although aluminum and copper can also support plasmonic

resonance. In a colloid solution, plasmonic-charged nanoparticles act as biosensors. When a biological target of interest, such as viral RNA, binds to the surface of the nanoparticles, it induces a change in the refractive index. This change is reflected in the electromagnetic field and can be measured by tracking the resonant wavelength in the spectrum of scattered or transmitted light [94,95]. An example of the use of nanoplasmonics in detecting SARS-CoV-2 is the study conducted by Huang et al., which employed a nanoplasmonic-sensor chip functionalized with captured antibodies and gold nanoparticles functionalized with the ACE2 receptor. This approach enabled the detection of a SARS-CoV-2 pseudo-virus in the range of $0\text{--}1.6 \times 10^{10}$ viral particles/mL within 15 min, demonstrating high specificity compared to SARS and MERS-CoV [96] (Figure 5).

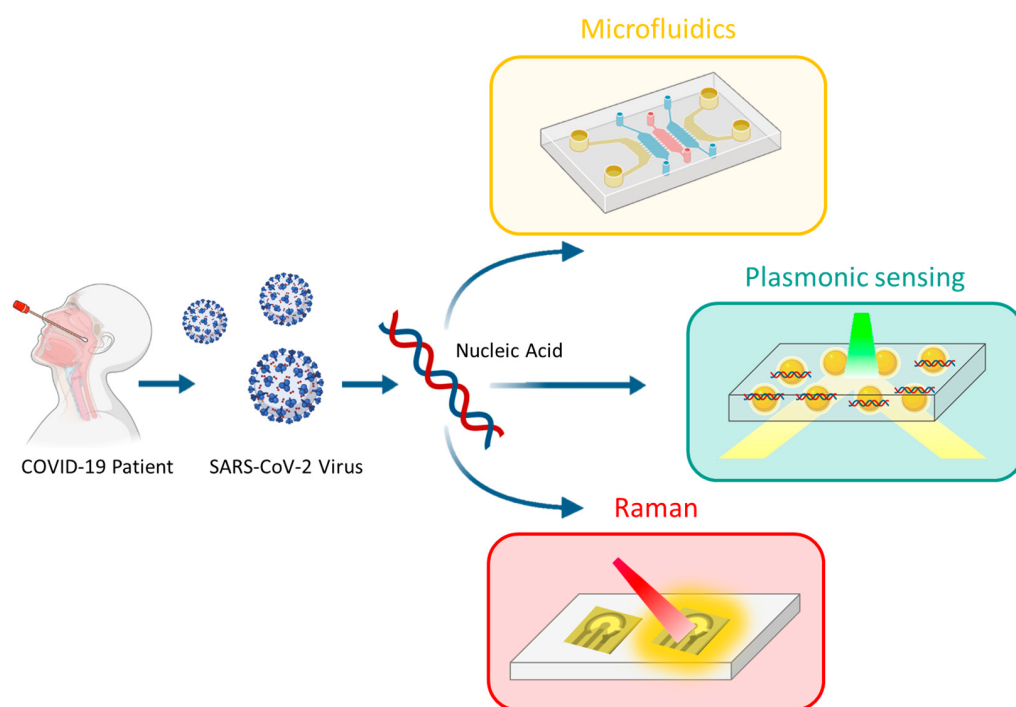


Figure 5. Schematic representation of the main nanomedicine-based molecular diagnostic systems for SARS-CoV-2 currently in use: microfluidics, plasmonic sensing, and Raman spectroscopy.

Another technique is Raman spectroscopy, which is based on measuring the radiation emitted when a solution is excited by infrared light. When the solution is excited, the electrons within it are moved to higher energy levels, and their relaxation produces inelastic and elastic wavelengths. The inelastic wavelengths are recorded in the spectroscopy data and provide a fingerprint spectrum of the molecules and molecular bonds present in the solution [97]. Raman spectroscopy has been used to detect SARS-CoV-2 in human blood serum, with distinct spectra observed among healthy, infected, and suspected cases, showing high sensitivity in distinguishing among different groups [98] (Figure 5).

In summary, by combining the advantages of microfluidics and the capabilities of nanoparticles, several point-of-care testing (POCT) devices have been developed. The well-known μ PADs are widely used for antigen tests. Paper-based antibody tests, such as serological IgG detection of SARS-CoV-2, have also been developed, improving the sensitivity of impedance electrochemical biosensors based on zinc nanowires and overcoming their limitations [99].

One example of integration is the use of a multiplexed CRISPR-based assay with RT-RPA as a μ PAD, for the simultaneous detection of the N and S genes of SARS-CoV-2, with the RNase P human gene serving as a control. A programmable sucrose valve separates the two reactions, allowing RPA amplicons to move into separate paper chambers where

CRISPR cleavage occurs. Detection is based on fluorescence, and the entire process takes just 1 h with a sensitivity of 102 copies of the viral genome [100].

Another example of integrating different techniques is the D μ chip. The D μ chip integrates RT-LAMP and CRISPR/Cas12 in a chip with screw valves, where the reagents are mixed in the bottom chamber with the top microchip. This integration allows for the simultaneous detection of SARS-CoV-2 and different influenza viruses in a portable device that measures fluorescence. The D μ chip demonstrates high sensitivity and specificity [101]. RT-LAMP has also been integrated into a 3D cartridge chip, along with a smartphone as a reader, enabling RNA extraction-free detection within 40 min [102].

RT-RPA has also been combined with lateral flow in a highly sensitive assay which is able to detect as little as one copy of each variant, with no cross-reactions with other respiratory viruses, and has a performance time of 25 min, with visual readouts [53].

The combination of plasmonic resonance with gold nanoislands (gold AuNIs) functionalized with complementary DNA receptors can provide for the sensitive and specific detection of RNA viruses using acid nucleic hybridization. The plasmonic photothermal energy can improve the discrimination of different gene sequences *in situ*, allowing the detection of 0.22 pM of the precise targets in a raw sample [103]. Other developments have combined the AuNPs in a particle bioinspired in a virus that interacts between them and the spike protein of SARS-CoV-2, creating a plasmonic gap. These plasmonic gaps cause an extinction peak near infrared light and could be measured in a micro-optoelectronic chip and coupled to a smartphone, with a detection limit of 1.4×10^1 pfu/mL [104].

Biosensors, in the form of nanoparticles of glass slides functionalized with specific SARS-CoV-2 probes immobilized on their surface and integrated into a microfluidic platform, are able to detect RNA/DNA duplexes with SYBR green from raw saliva samples, with a detection limit of 10 aM [105]. Another approach is the use of a DNA walker that binds to a silver-coated glass slide, with an enzymatic reaction of exonuclease that allows the release of DNA sequences if the target is present, by hybridization and cleavage of the exonuclease. The fluorescence emitted correlates with the amount of target present, and can be quantified using a smartphone [106].

Biosensors can enhance Raman spectroscopy, called SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) biosensors, based on a gold nanoparticle layer with antibodies to the spike protein, and a Raman reporter-labeled silver nanoparticle with an ultra-high sensitivity of 6.07 fg mL^{-1} in untreated saliva [107]. Another example is NanoPEIA (nanoplasmonic enhanced isothermal amplification), a nanoplasmonic chip array functionalized of gold with thiolated primers mixed with lyophilized reagents of RPA and the synthesis of DNA over the surface of the chip. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe is a real-time reporter of the reaction. This reaction can be coupled to a high-throughput detector, visual detection, or POCT diagnostic platforms with 100% sensitivity to detect gene N and orf4b1, and has a limit of detection of 28.5 and 23.3 copies per milliliter, respectively [108]. Using centrifugal microfluidics, RT-RAA (recombinase-aided amplification) has been integrated with CRISPR to detect the SARS-CoV-2 gene E ultra-sensitively, with an LoD of one copy per microlitre and 30 min of reaction time [109].

The combination of electrochemical microfluidics and nanoparticles created eCovsents, which immobilize SARS-CoV-2 monoclonal antibodies on a screen-printed carbon electrode (SPCE) and detects the antigen of the protein spike S1. The antigen–antibody binding generates an electrical charge that is measured in a few seconds, with a detection limit of 10 fM [110]. Other electrochemical approaches combine isoelectrophoresis (ITP), RT-LAMP, and CRISPR. Nucleic acid extraction using ITP and RT-LAMP amplifies the E and N genes and the molecular cleavage of CRISPR. Then, an electric field chip controls the reagents of CRISPR and produces a fluorescence readout, with a performance time of 40 min and a limit of detection of 10 copies per microlitre [111]. Other recent integrations of CRISPR assays with electrochemical sensors have been made using aptamers with a high affinity to the S1 domain of the spike protein in complex biological fluids as the raw samples. CRISPR cleavage is detected via the binding aptamer S1, and measured

using electrochemical impedance spectroscopy and differential pulse voltammetry, with an ultra-high sensitivity of 1.5 pg/mL. It has been tested in several variants of interest as a promising POCT [112,113].

Capacitive biosensors that react to metal by proximity above a certain capacitance were developed to detect SARS-CoV-2. A gold interdigitated electrode with antibodies immobilized on its surface was used to detect the spike protein by measuring capacitance changes. The biosensor showed high selectivity for Zika and Dengue viruses with no cross-reactivity [114].

The Wyss Institute developed a wearable mask combining RT-RPA and SHERLOCK in μ PADs membranes separated by polyvinyl alcohol and an LFA strip for visual readout. It is able to detect SARS-CoV-2 through the respiratory aerosols by pressing a button, in a wearable format with high sensitivity and specificity, with a 90 min performance time [115]. Table 2 summarizes the different approaches presented in this review and compares them to commercially approved POCTs, such as Cepheid Xpress or Abbott ID Now.

Table 2. Comparative table of the different methods for the detection of SARS-CoV-2, in terms of the type of test, target, detection limit, time-to-result, and need for the pre-treatment of samples. * Some assays utilize lateral flow as a visual reading method, which can be considered part of the microfluidics group due to this characteristic.

Type of Test	Name/Manufacturer	Target	Limit of Detection	Time-to-Result	Extraction of RNA/Pretreatment	Reference
RT-qPCR						
RT-qPCR	Cepheid Xpress® GenXpert	gene N, gene E	0.005 and 0.02 pfu/mL, respectively	45 min	Sample is mixed and transferred to the cartridge and loaded onto the system	[116]
Isothermal amplification						
RT-LAMP	Abbott ID Now™	gene RdRp	125 GE/mL with variations in different studies	≤13 min	Sample is transferred to the cartridge to the test base, initiating target amplification	[117]
RT-RPA/LF *	RT-RPA/LF	gene N	1 copy/μL	25 min	Without RNA (extraction infected samples with RNA)	[53]
CRISPR-Cas based systems						
CRISPR-Cas13/LF *	CASSPIT	genes S and N	~100 copies	≤1 h	Without RNA extraction (untreated samples)	[66]
Isothermal amplification with CRISPR-Cas						
RT-LAMP or RT-RPA/CRISPR-Cas13 *	SHERLOCK	DNA/RNA	2 aM	50 min	Without RNA extraction (heating samples)	[64]
RT-LAMP/CRISPR-Cas12b	CRISPR-SPADE	gene N of each VOC	15 copies/μL α 25 copies/μL β 50 copies/μL γ 12 copies/μL δ	30 min	Without RNA extraction (in vitro RNA transcripts chemically synthesized)	[65]
RT-LAMP/CRISPR-Cas13 *	STOP-COVID	gene N	100 copies of the viral genome	40–70 min depending on LF or fluorescence, respectively	RNA extraction using magnetic beads	[67]

Table 2. Cont.

Type of Test	Name/Manufacturer	Target	Limit of Detection	Time-to-Result	Extraction of RNA/Pretreatment	Reference
NAATs-Microfluidics						
RT-RPA/CRISPR-Cas12a	μ PAD CRISPR	genes S and N	100 copies of the viral genome	1 h	RNA extraction of 15 min	[100]
RT-LAMP/CRISPR-Cas	D μ chip	SARS-CoV-2, influenza A H1N1, H3N2 e influenza B RNA	10 copies	55 min	RNA extraction separated from the chip	[101]
RT-LAMP/cartridge and smartphone	RT-LAMP 3D cartridge	gene N	50 copies RNA (VTM), 5×10^4 copies in nasal solution	≤ 40 min	Without RNA extraction (lysis 1 min using heat, 95 °C)	[102]
RT-RAA/CRISPR-Cas	Centrifugal microfluidics	gene E	1 copy/ μ L	30 min	RNA extraction separated from the chip	[109]
Isochatophoresis-RT-LAMP/CRISPR-Cas	ITP/-RT-LAMP	gene E, gene N and human RNase P	10 copies/ μ L	35 min	Without RNA extraction (untreated samples)	[111]
Nanomedicine						
gold nanoparticle layer with antibodies	SERS-biosensor	protein S	6.07 fg per mL	Not specified	Without RNA extraction (untreated samples)	[107]
AuNPs/plasmonic sensor and smartphone	Nanoplasmonic sensor	protein S	370 viral particles/mL	15 min	Without RNA extraction (SARS-CoV-2 pseudovirus)	[96]
Aptamers/CRISPR-Cas12a and potentiostat	Aptamers	S1 domain Spike	1.5 pg/mL	30 min	Without RNA extraction (untreated samples)	[112]
Nanomedicine-microfluidics						
Hybridization DNA walker with a functionalized glass slide	DNA walker/glass slide	two parts of RdRp gene	1.19 pM	30 min	RNA extraction with commercial kit	[106]
Hybridization with a functionalized glass slide	Biosensor glass slide	RNA/DNA	10 aM	15 min	Fast RNA extraction automated	[105]
RT-RPA in gold-layer functionalized chip	NanoPEIA	gene E and orfab1	28.5 and 23.3 copies per mL	6 min in Ct ≤ 25	Samples lysed 95 °C 5 min	[108]
FTO electrode functionalized with antibodies	eCovSens	antigen protein spike	90 fM	10–30s	Without RNA extraction (buffer samples and spiked saliva samples)	[110]
capacitive biosensor	Capacitive biosensor	protein Spike	≈ 760 pg/mL–76 ng/mL	15–20 min	Without RNA extraction (spiked sample in phosphate-buffered saline)	[113,114]
SHERLOCK in a face mask-integrated sensor	FDCF Wearable face mask	gene S	500 copies/17 aM	~ 1.5 h	Viral lysis with lyophilized compounds	[115]

5. Discussion

The pandemic caused by SARS-CoV-2 has accelerated scientific knowledge in the field of diagnosis due to the urgency and severity of the disease. This increase has been possible thanks to scientific data sharing and multiple efforts to understand the biology of the virus: its genome and viral structure, how it enters its host's cells, its process of viral replication, and its phylogeny to understand the origin [2,3,118,119].

The strategy of test-trace-isolate is fundamental to contain the spread of a virus, complemented with other social measures [120,121]. In the first stage of the pandemic, RT-qPCR and NGS by themselves did not provide the fast response required to correctly isolate asymptomatic infected individuals, due to delays from transport sampling, reagents scarcity, the complexity of performing the test at centralized laboratories, and the need for well-prepared professionals [36,37]. In this situation, governments and health authorities created special funding calls to accelerate research on new methods of diagnosis and special POCT systems to control the widespread infection and mitigate its effects. Thus, all the diagnosis methods suffered from the importance placed on quick advancement, which was supported by biotechnology companies, and behind that was accuracy, speed, sensitivity, and specificity. Even RT-qPCR methods improved the time of performance, by lyophilizing the reagents and bringing to the market different portable thermocyclers to adapt the test as a POCT [122].

After extensively reviewing the various promising approaches that combine multiple molecular methods with ultra-high sensitivity, such as RT-RPA-LF, biosensor glass slides, centrifugal microfluidics, and quantum dots, we noted that some of these approaches relied on synthetic oligonucleotides or infected saline buffers instead of clinical samples for detection. However, it is important to highlight that clinical validation is the subsequent critical step following analytical validation, essential for a diagnostic technology to achieve the necessary level of development for its widespread acceptance and commercialization. This process presents real challenges, including the rigorous evaluation of infected and healthy patients, meticulous documentation and traceability, adherence to stringent parameters, compliance with country-specific regulations, and necessitates a multidisciplinary approach involving nanomedicine experts, engineers, molecular biologists, and clinicians.

Isothermal amplification and the use of nanomaterials and microfluidics have improved the detection of nucleic acids, providing high sensitivity, lower cost, and faster results [56,84,95,96]. Another important issue in diagnosis is the type of sample. The ideal sample is the least invasive that can be collected by the patient, preferably saliva rather than swabs or blood. Sample preparation must be minimal to avoid RNA extraction, which is a time-consuming step and affects sensitivity, depending on the extraction method [122]. Many of the approaches we have reviewed have taken this into account and can be performed rapidly, thanks to isothermal amplification kinetics and the tolerance of inhibitors, or the specificity of functionalized nanoparticles, such as glass slides or aptamers [53,66,104,105,108,109,112].

Accurate diagnosis is critical, and approaches have been focused on improving sensitivity and specificity. This allows us to avoid wrong diagnoses, as well as false negatives or false positives which, as we have explained, have undesirable consequences that affect clinical management. To minimize the occurrence of false negatives, several authors and commercial products have performed multiplexing of the targets in the test (different genes). We have reviewed some multiplexed approaches capable of detecting multiple targets of SARS-CoV-2, multiple respiratory viruses simultaneously, or different variants of concern within SARS-CoV-2 [65–67,98,101,103,108,111]. Multiplexed reactions within isothermal amplification can be a limitation, as it is possible that more unspecific amplification has occurred, as well as the competition between primers for each target, etc. CRISPR/Cas cleavage can help to increase specificity and minimize background noise.

The era of digital medicine is growing, probably accelerated by the SARS-CoV-2 outbreak and coupled with the massive development of the internet and smartphone accessibility. These technological developments are revolutionizing all fields, including health. Efforts to integrate microfluidic chips and transmit signals via smartphones are therefore evident, in line with the real connectivity promoted by the WHO for POCT devices. It allows for simplicity, lower cost, less energy, non-contamination, and direct detection. In addition, results can be obtained simultaneously by the end user and the clinician. It should not be forgotten that a diagnostic result alone is not enough; test results should always be evaluated in the clinical context. A few years ago in China, there was

a trend towards home self-testing of biomarkers, which could be bought online or even in vending machines, and which promoted the accessibility and ownership of health by the end user. It also decentralized the healthcare system and could be useful for triage. However, it should not replace the work of doctors and healthcare professionals, who should be the final arbiters of clinical management. These tests should be complementary to POCT devices, and smartphone/artificial intelligence (AI) integration can help with epidemiological surveillance and the correct interpretation of results. AI is particularly relevant to approaches that integrate Raman spectroscopy or biosensors, due to their complexity. For example, AI can help to discriminate between the results obtained and to interpret the results for healthcare workers who are not specialized in the techniques. Even for qualitative methods, AI can help to recognize whether or not there is a measurable change in color, turbidity, or flocculation, simply because the interpretation of results by the 'human eye' can sometimes be confusing. AI is not subject to the subjective factors humans are and can dismiss inconclusive results and avoid repeating tests. Furthermore, integration with smartphones and AI could ensure that health accessibility is widely attained. The impact of the pandemic has been worse in low- and middle-resource communities, where health systems are as fragile as the economies of their inhabitants, with indigenous and small populations being the most affected [123]. Thus, in this scenario, POCT devices are more convenient due to the high demand; the microfluidic integration can reduce the energy demand, thus lowering the cost and eliminating the need for well-trained professionals to perform the tests. Linking to health centers can help in this scenario by tracking patients, controlling proliferation, and avoiding, for example, long journeys for residents to health centers or hospitals when this is not necessary. Finally, epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 is still needed, and people living with long or persistent COVID should not be forgotten. The virus, as a quasispecies, may eventually mutate and VOC emergence is often likely. The prevalence of omicron lineages and the percentage of cases suggest that the virus may live with us for a long time with seasonal patterns. It is therefore necessary to trace variants and isolate cases as much as possible. The situation of long COVID is still under study, an understanding of its complexity and identifying its symptoms is difficult due to its heterogeneity [124]. However, the people who suffer from long COVID must receive an appropriate response from the health system and the scientific community. The development of real-connected POCT devices and diagnostic knowledge will help these people to communicate with the health system, helping to dismiss the impact of the disease in their lives, and aid in their recovery.

6. Conclusions

Diagnostic methods have evolved rapidly due to the pandemic, and have followed advances in nanomedicine and microfluidics, which allow for direct detection with lower costs, less energy, and no contamination. We have reviewed some promising diagnostic tools based on genetic-amplification detection tests, that could potentially become POCT tests combining new advances in the use of nanomaterials and digital medicine. POCTs had an opportunity for exponential growth during the pandemic as a qualitative method to rapidly test-trace-isolate. However, the development of any POCT must be clinically validated and this represents a real challenge, as it never replaces the role of the physician in evaluating the result of the test in its clinical context.

Nowadays, new genetic techniques, such as isothermal amplification, CRISPR-based methods, and NGS, have opened challenging opportunities to implement POCTs using nanomaterials and microfluidics towards a promising scenario where artificial intelligence (AI) integration can help with the correct interpretation of results and epidemiological surveillance. It is too soon to conclude which could be the most promising technique for developing the best POCT. However, after extensively reviewing the genetic detection approaches, it seems clear that a combination of multiple molecular methods allows for the performance of tests with ultra-high sensitivity and fast times. So, the future is undoubtedly linked to a multidisciplinary approach to bring together the advances of each field and each

technique. Furthermore, technological developments have enabled the full integration of POCTs with microchip devices, offering high sensitivity and connectivity to smartphones. This integration enhances health accessibility, reduces costs, and facilitates a seamless integration into the healthcare system.

Author Contributions: Conceptualization, investigation, writing, and original draft, A.D.-G., L.M. and L.G.-H.; review, editing, and data curation, L.M., L.G.-H., M.G.-M. and J.N.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially funded by ‘Formulación de bacteriófagos como liposomas y nanopartículas con aplicación potencial al tratamiento de infecciones de pacientes de fibrosis quística’, from Mutua Madrileña, and ‘Desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos del coronavirus SARS-CoV-2 mediante técnicas de amplificación isotérmica’, from the Instituto de investigación Valdecilla (IDIVAL) (reference INNVAL 20/22). Lorena García-Hevia wants to thank the Ministry of Innovation and Science of Spain for her Juan de la Cierva Incorporación grant (IJC2020-043746-I). Laura Miralles wants to also thank the Ministry of Innovation and Science of Spain for her Torres Quevedo grant (2018–2022) (PTQ2018-010019).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Figures have been created with BioRender software (BioRender.com, License ID: 9519A1C8-0002).

Conflicts of Interest: The authors declare there are no conflict of interest.

References

1. Worldometers Information of COVID-19 Pandemics. Available online: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (accessed on 11 February 2023).
2. Mingaleeva, R.N.; Nigmatulina, N.A.; Sharafetdinova, L.M.; Romozanova, A.M.; Gabdoulkhakova, A.G.; Filina, Y.V.; Shavaliyev, R.F.; Rizvanov, A.A.; Miftakhova, R.R. Biology of the SARS-CoV-2 Coronavirus. *Biochemistry* **2022**, *87*, 1662–1678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Kim, D.; Lee, J.-Y.; Yang, J.-S.; Kim, J.W.; Kim, V.N.; Chang, H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **2020**, *181*, 914–921.e10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Šimičić, P.; Židovec-Lepej, S. A Glimpse on the Evolution of RNA Viruses: Implications and Lessons from SARS-CoV-2. *Viruses* **2022**, *15*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Minskaia, E.; Hertzog, T.; Gorbalenya, A.E.; Campanacci, V.; Cambillau, C.; Canard, B.; Ziebuhr, J. Discovery of an RNA Virus 3′→5′ Exoribonuclease That Is Critically Involved in Coronavirus RNA Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5108–5113. [\[CrossRef\]](#)
6. Denison, M.R.; Graham, R.L.; Donaldson, E.F.; Eckerle, L.D.; Baric, R.S. Coronaviruses. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 270–279. [\[CrossRef\]](#)
7. Domingo, E. QUASISPECIES. In *Encyclopedia of Virology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1999; pp. 1431–1436.
8. Ahmad, A.; Fawaz, M.A.M.; Aisha, A. A Comparative Overview of SARS-CoV-2 and Its Variants of Concern. *Infez. Med.* **2022**, *30*, 328. [\[CrossRef\]](#)
9. Rambaut, A.; Holmes, E.C.; O’Toole, Á.; Hill, V.; McCrone, J.T.; Ruis, C.; du Plessis, L.; Pybus, O.G. A Dynamic Nomenclature Proposal for SARS-CoV-2 Lineages to Assist Genomic Epidemiology. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 1403–1407. [\[CrossRef\]](#)
10. Hadfield, J.; Megill, C.; Bell, S.M.; Huddleston, J.; Potter, B.; Callender, C.; Sagulenko, P.; Bedford, T.; Neher, R.A. Nextstrain: Real-Time Tracking of Pathogen Evolution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 4121–4123. [\[CrossRef\]](#)
11. Elbe, S.; Buckland-Merrett, G. Data, Disease and Diplomacy: GISAID’s Innovative Contribution to Global Health. *Glob. Chall.* **2017**, *1*, 33–46. [\[CrossRef\]](#)
12. WHO Tracking SARS-CoV-2 Variants. Available online: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (accessed on 27 May 2023).
13. World Health Organization. WHO Announces Simple, Easy-to-Say Labels for SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern 2021. Available online: <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern> (accessed on 12 February 2023).
14. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/country-overviews> (accessed on 12 February 2023).
15. Callaway, E. Heavily Mutated Omicron Variant Puts Scientists on Alert. *Nature* **2021**, *600*, 21. [\[CrossRef\]](#)

16. Wu, L.; Zhou, L.; Mo, M.; Liu, T.; Wu, C.; Gong, C.; Lu, K.; Gong, L.; Zhu, W.; Xu, Z. SARS-CoV-2 Omicron RBD Shows Weaker Binding Affinity than the Currently Dominant Delta Variant to Human ACE2. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 8. [CrossRef] [PubMed]
17. Meng, B.; Abdullahi, A.; Ferreira, I.A.T.M.; Goonawardane, N.; Saito, A.; Kimura, I.; Yamasoba, D.; Gerber, P.P.; Fatihi, S.; Rathore, S.; et al. Altered TMPRSS2 Usage by SARS-CoV-2 Omicron Impacts Infectivity and Fusogenicity. *Nature* **2022**, *603*, 706–714. [CrossRef] [PubMed]
18. Shah, M.; Woo, H.G. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 6031. [CrossRef] [PubMed]
19. Tallei, T.E.; Alhumaid, S.; AlMusa, Z.; Fatimawali Kusumawaty, D.; Alynbiawi, A.; Alshukairi, A.N.; Rabaan, A.A. Update on the Omicron Sub-variants BA.4 and BA.5. *Rev. Med. Virol.* **2023**, *33*, e2391. [CrossRef] [PubMed]
20. Sharma, D.; Notarte, K.I.; Fernandez, R.A.; Lippi, G.; Gromiha, M.M.; Henry, B.M. In Silico Evaluation of the Impact of Omicron Variant of Concern Sublineage BA.4 and BA.5 on the Sensitivity of RT-qPCR Assays for SARS-CoV-2 Detection Using Whole Genome Sequencing. *J. Med. Virol.* **2023**, *95*, e28241. [CrossRef]
21. Salehi-Vaziri, M.; Fazlalipour, M.; Seyed Khorrami, S.M.; Azadmanesh, K.; Pouriaeyevali, M.H.; Jalali, T.; Shoja, Z.; Maleki, A. The Ins and Outs of SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs). *Arch. Virol.* **2022**, *167*, 327–344. [CrossRef]
22. World Health Organization. *Methods for the Detection and Characterisation of SARS-CoV-2 Variants-Second Update*; Regional Office for Europe: Copenhagen, Denmark, 2022.
23. Koczula, K.M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 111–120. [CrossRef]
24. Dinnes, J.; Sharma, P.; Berhane, S.; van Wyk, S.S.; Nyaaba, N.; Domen, J.; Taylor, M.; Cunningham, J.; Davenport, C.; Ditttrich, S.; et al. Rapid, Point-of-Care Antigen Tests for Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2022**, *7*, CD013705. [CrossRef]
25. Lippa, P.B.; Müller, C.; Schlichtiger, A.; Schlebusch, H. Point-of-Care Testing (POCT): Current Techniques and Future Perspectives. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 887–898. [CrossRef]
26. Otoo, J.A.; Schlappi, T.S. REASSURED Multiplex Diagnostics: A Critical Review and Forecast. *Biosensors* **2022**, *12*, 124. [CrossRef]
27. Farré, M.; Kantiani, L.; Barceló, D. Chapter 7—Microfluidic Devices: Biosensors. In *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*; Picó, Y., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2012; pp. 177–217, ISBN 978-0-12-384862-8.
28. Joo, J. Diagnostic and Therapeutic Nanomedicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2021**, *1310*, 401–447. [CrossRef]
29. Tröger, V.; Niemann, K.; Gärtig, C.; Kuhlmeier, D. Isothermal Amplification and Quantification of Nucleic Acids and Its Use in Microsystems. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 1. [CrossRef]
30. Kokkoris, V.; Vukicevich, E.; Richards, A.; Thomsen, C.; Hart, M.M. Challenges Using Droplet Digital PCR for Environmental Samples. *Appl. Microbiol.* **2021**, *1*, 74–88. [CrossRef]
31. Smith, C.J.; Osborn, A.M. Advantages and Limitations of Quantitative PCR (Q-PCR)-Based Approaches in Microbial Ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *67*, 6–20. [CrossRef]
32. Jalandra, R.; Yadav, A.K.; Verma, D.; Dalal, N.; Sharma, M.; Singh, R.; Kumar, A.; Solanki, P.R. Strategies and Perspectives to Develop SARS-CoV-2 Detection Methods and Diagnostics. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110446. [CrossRef]
33. Serrano-Cumplido, A.; Ruiz Garcia, A.; Segura-Fragoso, A.; Olmo-Quintana, V.; Micó Pérez, R.M.; Barquilla-García, A.; Morán-Bayón, A. Aplicación Del Valor Umbral Del Número de Ciclos (Ct) de PCR En La COVID-19. *Med. De Familia. Semer.* **2021**, *47*, 337–341. [CrossRef]
34. Tom, M.R.; Mina, M.J. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 2252–2254. [CrossRef]
35. Dahdouh, E.; Lázaro-Perona, F.; Romero-Gómez, M.P.; Mingorance, J.; García-Rodríguez, J. Ct Values from SARS-CoV-2 Diagnostic PCR Assays Should Not Be Used as Direct Estimates of Viral Load. *J. Infect.* **2021**, *82*, 414–451. [CrossRef]
36. Russo, A.; Minichini, C.; Starace, M.; Astorri, R.; Calò, F.; Coppola, N. Current Status of Laboratory Diagnosis for COVID-19: A Narrative Review. *Infect Drug Resist.* **2020**, *13*, 2657–2665. [CrossRef]
37. Rong, X.; Yang, L.; Chu, H.; Fan, M. Effect of Delay in Diagnosis on Transmission of COVID-19. *Math. Biosci. Eng.* **2020**, *17*, 2725–2740. [CrossRef]
38. Protocol: Real-Time RT-PCR Assays for the Detection of SARS-CoV-2 Institut Pasteur, Paris. Available online: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf> (accessed on 16 February 2023).
39. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-NCoV) by Real-Time RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 2000045. [CrossRef] [PubMed]
40. U.S. Food and Drugs Administration (FDA). SARS-CoV-2 In Vitro Diagnostics EUAs—Molecular Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. Available online: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-molecular-diagnostic-tests-sars-cov-2> (accessed on 14 February 2023).
41. Bruijns, B.; Folkertsma, L.; Tiggelaar, R. FDA Authorized Molecular Point-of-Care SARS-CoV-2 Tests: A Critical Review on Principles, Systems and Clinical Performances. *Biosens. Bioelectron. X* **2022**, *11*, 100158. [CrossRef] [PubMed]
42. Quan, P.-L.; Sauzade, M.; Brouzes, E. DPCR: A Technology Review. *Sensors* **2018**, *18*, 1271. [CrossRef] [PubMed]

43. Shen, J.; Zheng, J.; Li, Z.; Liu, Y.; Jing, F.; Wan, X.; Yamaguchi, Y.; Zhuang, S. A Rapid Nucleic Acid Concentration Measurement System with Large Field of View for a Droplet Digital PCR Microfluidic Chip. *Lab A Chip* **2021**, *21*, 3742–3747. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhao, Y.; Chen, F.; Li, Q.; Wang, L.; Fan, C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12491–12545. [\[CrossRef\]](#)
45. Özay, B.; McCalla, S.E. A Review of Reaction Enhancement Strategies for Isothermal Nucleic Acid Amplification Reactions. *Sens. Actuators Rep.* **2021**, *3*, 100033. [\[CrossRef\]](#)
46. Amaral, C.; Antunes, W.; Moe, E.; Duarte, A.G.; Lima, L.M.P.; Santos, C.; Gomes, I.L.; Afonso, G.S.; Vieira, R.; Teles, H.S.S.; et al. A Molecular Test Based on RT-LAMP for Rapid, Sensitive and Inexpensive Colorimetric Detection of SARS-CoV-2 in Clinical Samples. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16430. [\[CrossRef\]](#)
47. Kitagawa, Y.; Orihara, Y.; Kawamura, R.; Imai, K.; Sakai, J.; Tarumoto, N.; Matsuoka, M.; Takeuchi, S.; Maesaki, S.; Maeda, T. Evaluation of Rapid Diagnosis of Novel Coronavirus Disease (COVID-19) Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Virol.* **2020**, *129*, 104446. [\[CrossRef\]](#)
48. Jang, W.S.; Lim, D.H.; Yoon, J.; Kim, A.; Lim, M.; Nam, J.; Yanagihara, R.; Ryu, S.-W.; Jung, B.K.; Ryoo, N.-H.; et al. Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for on-Site Diagnosis of SARS CoV-2. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0248042. [\[CrossRef\]](#)
49. Moon, Y.-J.; Lee, S.-Y.; Oh, S.-W. A Review of Isothermal Amplification Methods and Food-Origin Inhibitors against Detecting Food-Borne Pathogens. *Foods* **2022**, *11*, 322. [\[CrossRef\]](#)
50. Piepenburg, O.; Williams, C.H.; Stemple, D.L.; Armes, N.A. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* **2006**, *4*, e204. [\[CrossRef\]](#)
51. Daher, R.K.; Stewart, G.; Boissinot, M.; Bergeron, M.G. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin. Chem.* **2016**, *62*, 947–958. [\[CrossRef\]](#)
52. Lobato, I.M.; O'Sullivan, C.K. Recombinase Polymerase Amplification: Basics, Applications and Recent Advances. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *98*, 19–35. [\[CrossRef\]](#)
53. Song, Y.; Huang, P.; Yu, M.; Li, Y.; Jin, H.; Qiu, J.; Li, Y.; Gao, Y.; Zhang, H.; Wang, H. Rapid and Visual Detection of SARS-CoV-2 RNA Based on Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification with Closed Vertical Flow Visualization Strip Assay. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e02966-22. [\[CrossRef\]](#)
54. Farrera-Soler, L.; Gonse, A.; Kim, K.T.; Barluenga, S.; Winssinger, N. Combining Recombinase Polymerase Amplification and DNA-templated Reaction for SARS-CoV-2 Sensing with Dual Fluorescence and Lateral Flow Assay Output. *Biopolymers* **2022**, *113*, 5307–5315. [\[CrossRef\]](#)
55. Li, J.; Macdonald, J.; von Stetten, F. Review: A Comprehensive Summary of a Decade Development of the Recombinase Polymerase Amplification. *Analyst* **2019**, *144*, 31–67. [\[CrossRef\]](#)
56. Oliveira, B.B.; Veigas, B.; Baptista, P.V. Isothermal Amplification of Nucleic Acids: The Race for the Next “Gold Standard”. *Front. Sens.* **2021**, *2*, 752600. [\[CrossRef\]](#)
57. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (1979)* **2012**, *337*, 816–821. [\[CrossRef\]](#)
58. Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (1979)* **2013**, *339*, 819–823. [\[CrossRef\]](#)
59. Mojica, F.J.M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Soria, E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* **2005**, *60*, 174–182. [\[CrossRef\]](#)
60. Gostimskaya, I. CRISPR—Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry* **2022**, *87*, 777–788. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Liu, Z.; Dong, H.; Cui, Y.; Cong, L.; Zhang, D. Application of Different Types of CRISPR/Cas-Based Systems in Bacteria. *Microb. Cell Factories* **2020**, *19*, 172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Shebanova, R.; Nikitchina, N.; Shebanov, N.; Mekler, V.; Kuznedelov, K.; Ulashchik, E.; Vasilev, R.; Sharko, O.; Shmanai, V.; Tarassov, I.; et al. Efficient Target Cleavage by Type V Cas12a Effectors Programmed with Split CRISPR RNA. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 1162–1173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Mustafa, M.I.; Makhawi, A.M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases. *J. Clin. Microbiol.* **2021**, *59*, e00745-20. [\[CrossRef\]](#)
64. Kellner, M.J.; Koob, J.G.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Zhang, F. SHERLOCK: Nucleic Acid Detection with CRISPR Nucleases. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 2986–3012. [\[CrossRef\]](#)
65. Nguyen, L.T.; Macaluso, N.C.; Pizzano, B.L.M.; Cash, M.N.; Spacek, J.; Karasek, J.; Miller, M.R.; Lednický, J.A.; Dinglasan, R.R.; Salemi, M.; et al. A Thermostable Cas12b from *Brevibacillus* Leverages One-Pot Discrimination of SARS-CoV-2 Variants of Concern. *EBioMedicine* **2022**, *77*, 103926. [\[CrossRef\]](#)
66. Azmi, I.; Faizan, M.I.; Kumar, R.; Raj Yadav, S.; Chaudhary, N.; Kumar Singh, D.; Butola, R.; Ganotra, A.; Datt Joshi, G.; Deep Jhingan, G.; et al. A Saliva-Based RNA Extraction-Free Workflow Integrated with Cas13a for SARS-CoV-2 Detection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 632646. [\[CrossRef\]](#)
67. Joung, J.; Ladha, A.; Saito, M.; Kim, N.-G.; Woolley, A.E.; Segel, M.; Barretto, R.P.J.; Ranu, A.; Macrae, R.K.; Faure, G.; et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1492–1494. [\[CrossRef\]](#)

68. Ackerman, C.M.; Myhrvold, C.; Thakku, S.G.; Freije, C.A.; Metsky, H.C.; Yang, D.K.; Ye, S.H.; Boehm, C.K.; Kosoko-Thoroddsen, T.-S.F.; Kehe, J.; et al. Massively Multiplexed Nucleic Acid Detection with Cas13. *Nature* **2020**, *582*, 277–282. [\[CrossRef\]](#)
69. Kaminski, M.M.; Abudayyeh, O.O.; Gootenberg, J.S.; Zhang, F.; Collins, J.J. CRISPR-Based Diagnostics. *Nat. Biomed. Eng.* **2021**, *5*, 643–656. [\[CrossRef\]](#)
70. Portable CRISPR-Based Diagnostics. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 832. [\[CrossRef\]](#)
71. Jolany, V.S.; Katalani, C.; Boone, H.A.; Hajizade, A.; Sijercic, A.; Ahmadian, G. CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. *Biol. Proced. Online* **2020**, *22*, 22. [\[CrossRef\]](#)
72. Harvard Wyss Institute. INSPECTR™. Available online: <https://wyss.harvard.edu/technology/inspectr-a-direct-to-consumer-molecular-diagnostic/> (accessed on 16 February 2023).
73. Sherlock Biosciences. Available online: <https://sherlock.bio/platforms/synthetic-biology/> (accessed on 16 February 2023).
74. Hernández, M.; Quijada, N.M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Eiros, J.M. Aplicación de La Secuenciación Masiva y La Bioinformática al Diagnóstico Microbiológico Clínico. *Rev. Argent. De Microbiol.* **2020**, *52*, 150–161. [\[CrossRef\]](#)
75. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733. [\[CrossRef\]](#)
76. Coutard, B.; Valle, C.; de Lamballerie, X.; Canard, B.; Seidah, N.G.; Decroly, E. The Spike Glycoprotein of the New Coronavirus 2019-nCoV Contains a Furin-like Cleavage Site Absent in CoV of the Same Clade. *Antiviral Res.* **2020**, *176*, 104742. [\[CrossRef\]](#)
77. Chen, J.; Wang, R.; Wang, M.; Wei, G.-W. Mutations Strengthened SARS-CoV-2 Infectivity. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432*, 5212–5226. [\[CrossRef\]](#)
78. Yu, W.-B.; Tang, G.-D.; Zhang, L.T.; Corlett, R. Decoding the Evolution and Transmissions of the Novel Pneumonia Coronavirus (SARS-CoV-2/HCoV-19) Using Whole Genomic Data. *Zool. Res.* **2020**, *41*, 247–257. [\[CrossRef\]](#)
79. Zou, X.; Chen, K.; Zou, J.; Han, P.; Hao, J.; Han, Z. Single-Cell RNA-Seq Data Analysis on the Receptor ACE2 Expression Reveals the Potential Risk of Different Human Organs Vulnerable to 2019-nCoV Infection. *Front. Med.* **2020**, *14*, 185–192. [\[CrossRef\]](#)
80. World Health Organization. *Guidance for Surveillance of SARS-CoV-2 Variants: Interim Guidance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
81. Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M.R.; Weigl, B.H. Microfluidic Diagnostic Technologies for Global Public Health. *Nature* **2006**, *442*, 412–418. [\[CrossRef\]](#)
82. Yang, S.M.; Lv, S.; Zhang, W.; Cui, Y. Microfluidic Point-of-Care (POC) Devices in Early Diagnosis: A Review of Opportunities and Challenges. *Sensors* **2022**, *22*. [\[CrossRef\]](#)
83. Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; von Stetten, F.; Zengerle, R. Microfluidic Lab-on-a-Chip Platforms: Requirements, Characteristics and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Abdollahi-Aghdam, A.; Majidi, M.R.; Omid, Y. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) for Fast and Ultrasensitive Sensing of Biomarkers and Monitoring of Diseases. *BioImpacts* **2018**, *8*, 237–240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Rizzo, L.Y.; Theek, B.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. Recent Progress in Nanomedicine: Therapeutic, Diagnostic and Theranostic Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 1159–1166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Misra, R.; Acharya, S.; Sushmitha, N. Nanobiosensor-Based Diagnostic Tools in Viral Infections: Special Emphasis on COVID-19. *Rev. Med. Virol.* **2022**, *32*. [\[CrossRef\]](#)
87. A Matter of Scale. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 733. [\[CrossRef\]](#)
88. Shubhika, K. Nanotechnology and Medicine-The Upside and the Downside. *Int. J. Drug Dev. Res.* **2012**, *5*, 1–10.
89. Khaitov, M.; Nikonova, A.; Shilovskiy, I.; Kozhikhova, K.; Kofiadi, I.; Vishnyakova, L.; Nikolskii, A.; Gatteringer, P.; Kovchina, V.; Barvinskaia, E.; et al. Silencing of SARS-CoV-2 with Modified SiRNA-peptide Dendrimer Formulation. *Allergy* **2021**, *76*, 2840–2854. [\[CrossRef\]](#)
90. Volpatti, L.R.; Wallace, R.P.; Cao, S.; Raczy, M.M.; Wang, R.; Gray, L.T.; Alpar, A.T.; Briquez, P.S.; Mitrous, N.; Marchell, T.M.; et al. Polymersomes Decorated with the SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Elicit Robust Humoral and Cellular Immunity. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1368–1380. [\[CrossRef\]](#)
91. Thorn, C.R.; Sharma, D.; Combs, R.; Bhujbal, S.; Romine, J.; Zheng, X.; Sunasara, K.; Badkar, A. The Journey of a Lifetime—Development of Pfizer’s COVID-19 Vaccine. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2022**, *78*, 102803. [\[CrossRef\]](#)
92. Zhang, Q.; Li, J.; Li, Y.; Tan, G.; Sun, M.; Shan, Y.; Zhang, Y.; Wang, X.; Song, K.; Shi, R.; et al. SARS-CoV-2 Detection Using Quantum Dot Fluorescence Immunochromatography Combined with Isothermal Amplification and CRISPR/Cas13a. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *202*, 113978. [\[CrossRef\]](#)
93. Agha, A.; Waheed, W.; Stiharu, I.; Nerguizian, V.; Destgeer, G.; Abu-Nada, E.; Alazzam, A. A Review on Microfluidic-Assisted Nanoparticle Synthesis, and Their Applications Using Multiscale Simulation Methods. *Discov. Nano* **2023**, *18*, 18. [\[CrossRef\]](#)
94. Unser, S.; Bruzas, I.; He, J.; Sagle, L. Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. *Sensors* **2015**, *15*, 15684–15716. [\[CrossRef\]](#)
95. Piliarik, M.; Kvasnička, P.; Galler, N.; Krenn, J.R.; Homola, J. Local Refractive Index Sensitivity of Plasmonic Nanoparticles. *Opt. Express* **2011**, *19*, 9213. [\[CrossRef\]](#)
96. Huang, L.; Ding, L.; Zhou, J.; Chen, S.; Chen, F.; Zhao, C.; Xu, J.; Hu, W.; Ji, J.; Xu, H.; et al. One-Step Rapid Quantification of SARS-CoV-2 Virus Particles via Low-Cost Nanoplasmonic Sensors in Generic Microplate Reader and Point-of-Care Device. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *171*, 112685. [\[CrossRef\]](#)

97. Dietzek, B.; Cialla, D.; Schmitt, M.; Popp, J. Introduction to the Fundamentals of Raman Spectroscopy. In *Confocal Raman Microscopy*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 47–68.
98. Yin, G.; Li, L.; Lu, S.; Yin, Y.; Su, Y.; Zeng, Y.; Luo, M.; Ma, M.; Zhou, H.; Orlandini, L.; et al. An Efficient Primary Screening of COVID-19 by Serum Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2021**, *52*, 949–958. [\[CrossRef\]](#)
99. Li, X.; Qin, Z.; Fu, H.; Li, T.; Peng, R.; Li, Z.; Rini, J.M.; Liu, X. Enhancing the Performance of Paper-Based Electrochemical Impedance Spectroscopy Nanobiosensors: An Experimental Approach. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *177*, 112672. [\[CrossRef\]](#)
100. Yin, K.; Ding, X.; Li, Z.; Sfeir, M.M.; Ballesteros, E.; Liu, C. Autonomous Lab-on-Paper for Multiplexed, CRISPR-Based Diagnostics of SARS-CoV-2. *Lab A Chip* **2021**, *21*, 2730–2737. [\[CrossRef\]](#)
101. Wang, H.; Xu, J.; Li, S.; Wang, X.; Liu, G.; Yang, S.; Zhao, F.; Liu, Q.; Chen, X.; He, C.; et al. An Integrated Dual-Layer Microfluidic Platform for Multiple Respiratory Viruses Screening. *Anal. Chim. Acta* **2023**, *1242*, 340812. [\[CrossRef\]](#)
102. Ganguli, A.; Mostafa, A.; Berger, J.; Aydin, M.Y.; Sun, F.; de Ramirez, S.A.S.; Valera, E.; Cunningham, B.T.; King, W.P.; Bashir, R. Rapid Isothermal Amplification and Portable Detection System for SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 22727–22735. [\[CrossRef\]](#)
103. Qiu, G.; Gai, Z.; Tao, Y.; Schmitt, J.; Kullak-Ublick, G.A.; Wang, J. Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS Nano* **2020**, *14*, 5268–5277. [\[CrossRef\]](#)
104. Park, Y.; Ryu, B.; Ki, S.J.; Chen, M.; Liang, X.; Kurabayashi, K. Bioinspired Plasmid-Virus for Point-of-Care SARS-CoV-2 Detection. *Nano Lett.* **2023**, *23*, 98–106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Robin, P.; Barnabei, L.; Marocco, S.; Pagnoncelli, J.; Nicolis, D.; Tarantelli, C.; Tavilla, A.C.; Robortella, R.; Cascione, L.; Mayoraz, L.; et al. A DNA Biosensors-Based Microfluidic Platform for Attomolar Real-Time Detection of Unamplified SARS-CoV-2 Virus. *Biosens. Bioelectron. X* **2023**, *13*, 100302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Zhao, L.; Li, C.; Kang, X.; Li, Y. A Visual Detection Strategy for SARS-CoV-2 Based on Dual Targets-Triggering DNA Walker. *Sens. Actuators B Chem.* **2023**, *379*, 133252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Zhang, M.; Li, X.; Pan, J.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Wang, C.; Yan, X.; Liu, X.; Lu, G. Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein in Untreated Saliva Using SERS-Based Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *190*, 113421. [\[CrossRef\]](#)
108. Liu, J.; Chen, P.; Hu, X.; Huang, L.; Geng, Z.; Xu, H.; Hu, W.; Wang, L.; Wu, P.; Liu, G.L. An Ultra-Sensitive and Specific Nanoplasmonic-Enhanced Isothermal Amplification Platform for the Ultrafast Point-of-Care Testing of SARS-CoV-2. *Chem. Eng. J.* **2023**, *451*, 138822. [\[CrossRef\]](#)
109. Chen, Y.; Zong, N.; Ye, F.; Mei, Y.; Qu, J.; Jiang, X. Dual-CRISPR/Cas12a-Assisted RT-RAA for Ultrasensitive SARS-CoV-2 Detection on Automated Centrifugal Microfluidics. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 9603–9609. [\[CrossRef\]](#)
110. Mahari, S.; Roberts, A.; Shahdeo, D.; Gandhi, S. ECovSens-Ultrasensitive Novel In-House Built Printed Circuit Board Based Electrochemical Device for Rapid Detection of NCovid-19 Antigen, a Spike Protein Domain 1 of SARS-CoV-2. *bioRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
111. Ramachandran, A.; Huyke, D.A.; Sharma, E.; Sahoo, M.K.; Huang, C.; Banaei, N.; Pinsky, B.A.; Santiago, J.G. Electric Field-Driven Microfluidics for Rapid CRISPR-Based Diagnostics and Its Application to Detection of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 29518–29525. [\[CrossRef\]](#)
112. Xing, W.; Li, Q.; Han, C.; Sun, D.; Zhang, Z.; Fang, X.; Guo, Y.; Ge, F.; Ding, W.; Luo, Z.; et al. Customization of Aptamer to Develop CRISPR/Cas12a-Derived Ultrasensitive Biosensor. *Talanta* **2023**, *256*, 124312. [\[CrossRef\]](#)
113. Idili, A.; Parolo, C.; Alvarez-Diduk, R.; Merkoçi, A. Rapid and Efficient Detection of the SARS-CoV-2 Spike Protein Using an Electrochemical Aptamer-Based Sensor. *ACS Sens.* **2021**, *6*, 3093–3101. [\[CrossRef\]](#)
114. Sampaio, I.; Takeuti, N.N.K.; Gusson, B.; Machado, T.R.; Zucolotto, V. Capacitive Immunosensor for COVID-19 Diagnosis. *Microelectron. Eng.* **2023**, *267*, 111912. [\[CrossRef\]](#)
115. Nguyen, P.Q.; Soenksen, L.R.; Donghia, N.M.; Angenent-Mari, N.M.; de Puig, H.; Huang, A.; Lee, R.; Slomovic, S.; Galbersanini, T.; Lansberry, G.; et al. Wearable Materials with Embedded Synthetic Biology Sensors for Biomolecule Detection. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 1366–1374. [\[CrossRef\]](#)
116. Cepheid OS. Xpert Xpress SARS-CoV-2. 2020. Available online: <https://www.cepheid.com/content/dam/www-cepheid-com/documents/package-insert-files/Xpert%20Xpress%20SARS-CoV-2%20CE-IVD%20GeneXpert%20System%20With%20Touchscreen%20302-8405-NL%20Rev%20B.pdf> (accessed on 13 June 2023).
117. Tu, Y.-P.; Iqbal, J.; O’Leary, T. Sensitivity of ID NOW and RT-PCR for Detection of SARS-CoV-2 in an Ambulatory Population. *eLife* **2021**, *10*, e65726. [\[CrossRef\]](#)
118. Korber, B.; Fischer, W.M.; Gnanakaran, S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Abfalterer, W.; Hengartner, N.; Giorgi, E.E.; Bhattacharya, T.; Foley, B.; et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence That D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **2020**, *182*, 812–827. [\[CrossRef\]](#)
119. Aguiar, E.R.G.R.; Navas, J.; Pacheco, L.G.C. The COVID-19 Diagnostic Technology Landscape: Efficient Data Sharing Drives Diagnostic Development. *Front. Public Health* **2020**, *8*, 309. [\[CrossRef\]](#)
120. Center for Disease Control and Prevention (CDC). CDC’s Role in Tracking Variants. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/cdc-role-surveillance.html> (accessed on 20 February 2020).
121. Ashcroft, P.; Lehtinen, S.; Bonhoeffer, S. Test-Trace-Isolate-Quarantine (TTIQ) Intervention Strategies after Symptomatic COVID-19 Case Identification. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0263597. [\[CrossRef\]](#)

122. Duma, Z.; Chuturgoon, A.A.; Ramsuran, V.; Edward, V.; Naidoo, P.; Mpaka-Mbatha, M.N.; Bhengu, K.N.; Nembe, N.; Pillay, R.; Singh, R.; et al. The Challenges of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Testing in Low-Middle Income Countries and Possible Cost-Effective Measures in Resource-Limited Settings. *Glob. Health* **2022**, *18*, 5. [[CrossRef](#)]
123. Contreras, S.; Dehning, J.; Loidolt, M.; Zierenberg, J.; Spitzner, F.P.; Urrea-Quintero, J.H.; Mohr, S.B.; Wilczek, M.; Wibrál, M.; Priesemann, V. The Challenges of Containing SARS-CoV-2 via Test-Trace-and-Isolate. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 378. [[CrossRef](#)]
124. Rando, H.M.; Bennett, T.D.; Byrd, J.B.; Bramante, C.; Callahan, T.J.; Chute, C.G.; Davis, H.E.; Deer, R.; Gagnier, J.; Koraishy, F.M.; et al. Challenges in Defining Long COVID: Striking Differences across Literature, Electronic Health Records, and Patient-Reported Information. *MedRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Rapid and accurate detection of the SARS-CoV-2 Omicron variant with a CRISPR-Cas12a reaction in the RT-qPCR pot

Journal:	ACS Omega
Manuscript ID	ao-2023-09717z.R2
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	17-Jan-2024
Complete List of Authors:	Ruiz, Raul; CSIC, I2SysBio Montagud-Martínez, Roser; I2SysBio, Dorta-Gorrín, Alexis; Universidad de Cantabria Pablo-Marcos, Daniel; Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Gozalo, Mónica; Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Calvo-Montes, Jorge; Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Navas, Jesús; Universidad de Cantabria Rodrigo, Guillermo; CSIC, I2SysBio

SCHOLARONE™
Manuscripts

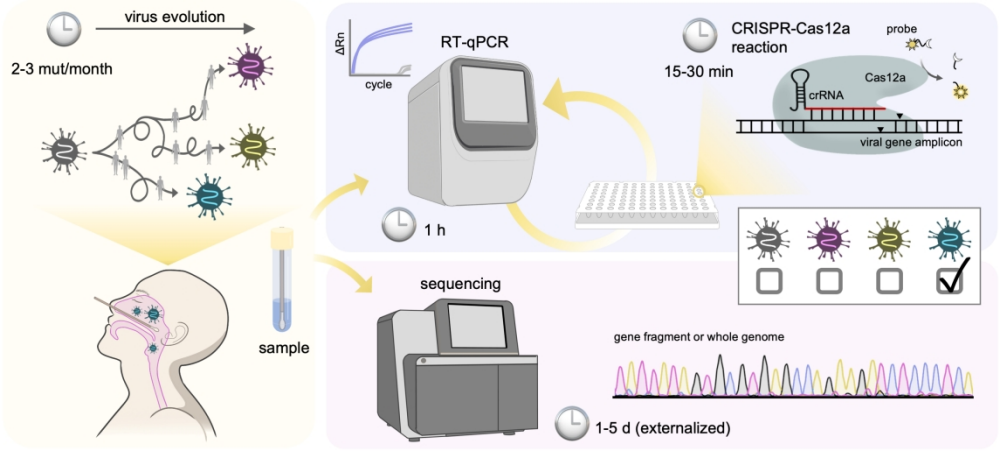


figure 1

180x81mm (423 x 423 DPI)

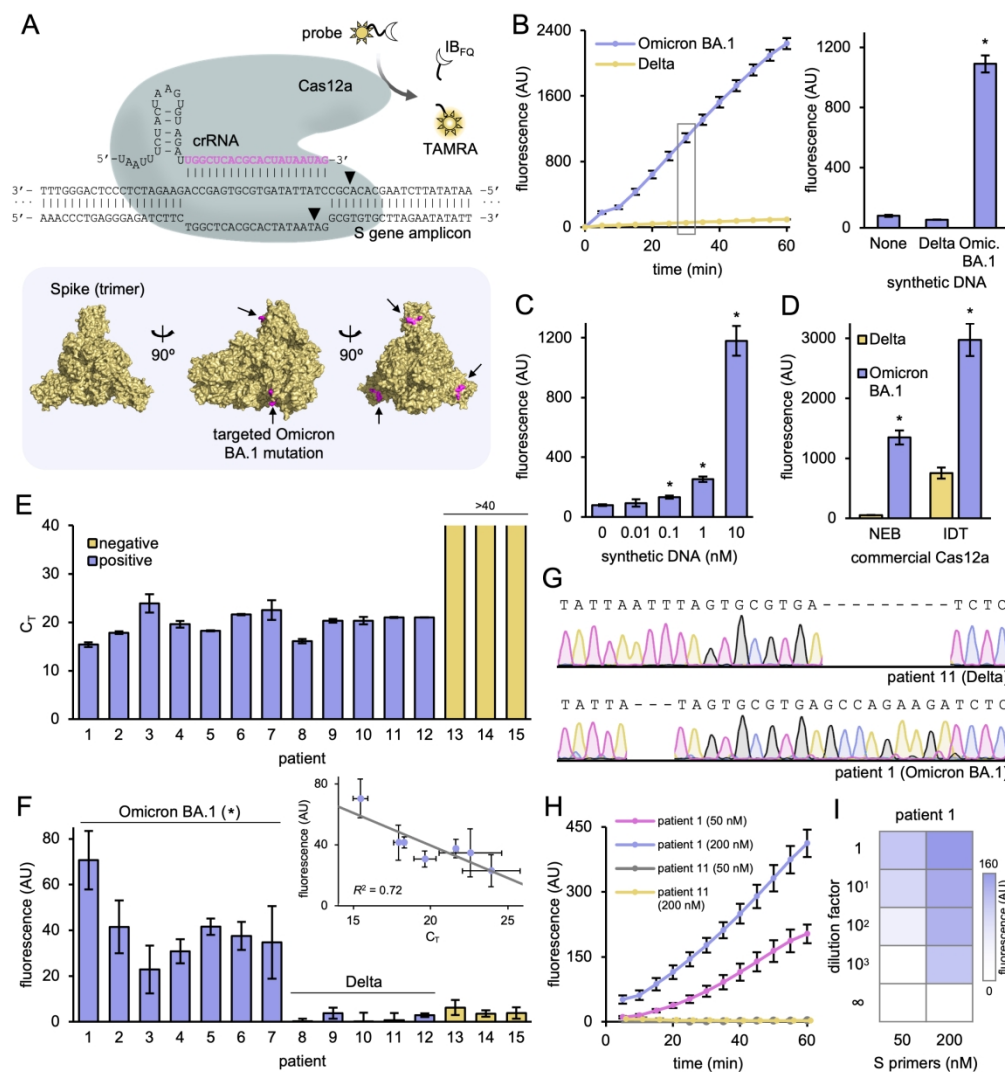
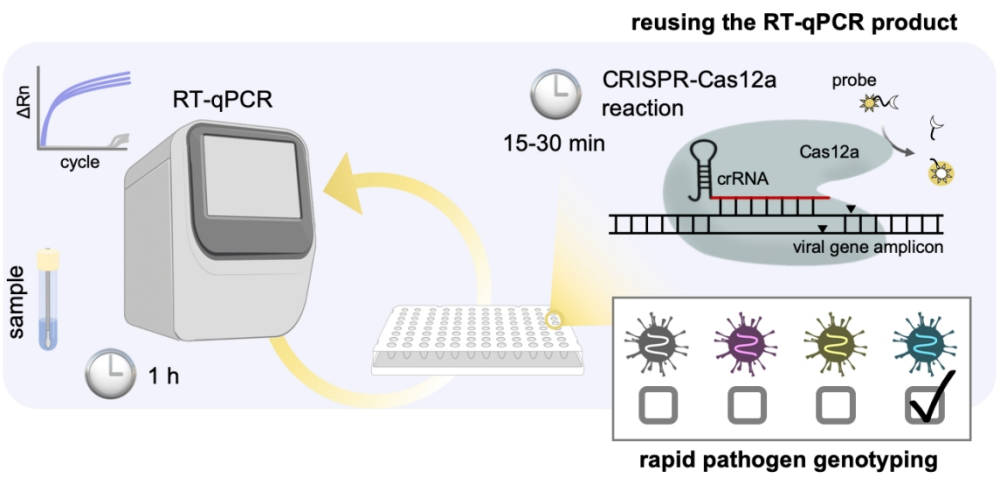


figure 2

180x193mm (423 x 423 DPI)



For Table of Contents Only

121x57mm (272 x 272 DPI)

Rapid and accurate detection of the SARS-CoV-2 Omicron variant with a CRISPR-Cas12a reaction in the RT-qPCR pot

Raúl Ruiz¹, Roser Montagud-Martínez¹, Alexis Dorta-Gorrín^{2,3}, Daniel Pablo-Marcos⁴,
Mónica Gozalo^{3,4,5}, Jorge Calvo-Montes^{3,4,5}, Jesús Navas^{2,3}, and Guillermo Rodrigo^{1,*}

¹Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), CSIC – Universitat de València,
46980 Paterna, Spain

²Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain

³Instituto de Investigación Sanitaria Marqués de Valdecilla (IDIVAL), 39011 Santander,
Spain

⁴Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008 Santander,
Spain

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC),
Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

*Correspondence: guillermo.rodrigo@csic.es

Keywords: CRISPR diagnostics; infectious disease; virus evolution.

Content: Abstract of 183 words. Body of the manuscript of ca. 1400 words. 21 references.

2 Figures. Supplementary Material available.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Gene sequencing in back of RT-qPCR is the current approach for discriminating infections produced by different SARS-CoV-2 variants in the clinic. However, sequencing is often a time-consuming step, which hinders the deployment of a very fast response during a pandemic. Here, we propose to run a CRISPR-Cas12a reaction after completing the RT-qPCR and in the very same pot to detect with high specificity genetic marks characterizing variants of concern. A crRNA was appropriately designed to detect the S gene of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant. A significant response with >20-fold dynamic range was obtained for the Omicron BA.1 S gene, while the Delta S gene did not produce any detectable signal. The sensitivity of the method was analyzed with a series of diluted samples and different Cas12a nucleases. A correlation between the RT-qPCR C_T values and the CRISPR-Cas12a reaction signals was observed. Variant discrimination with the CRISPR-Cas12a reaction was possible in some minutes with high accuracy from patient samples. In conclusion, CRISPR-Cas systems seem ready to be exploited in the clinic to boost personalized diagnoses and accelerate epidemiological surveillance in a cost-effective way.

INTRODUCTION

The huge public health crisis caused by the emergence and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [1] has underscored the importance of the readiness of fast and precise diagnostic systems. In the clinic, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the gold standard diagnostic technique for viral infections due to its high sensitivity and specificity [2]. However, due to the rapid evolution of viruses [3], it is important not only the detection of the infectious agent but to know which is the underlying genotype (variant or strain), in order to anticipate acute clinical courses [4] and adopt confinement measures to avoid superspreading events [5]. In this regard, viral genome sequencing (partial or total) has been widely carried out as a diagnostic backup after a positive signal by RT-qPCR [6,7]. Nonetheless, sequencing requires expensive equipment and specialized staff, so it is usually a time-consuming step (about 1 d in the case of Sanger sequencing and 5 d of whole-genome sequencing, if the service is externalized).

To overcome this issue, appropriate primers and probes have been designed to run RT-qPCRs aimed at detecting specific SARS-CoV-2 variants. These approaches comprise target amplification failure [8], allele-specific amplification and probing [9,10], and melting curve analysis [11]. Yet, these methods are not fully insensitive to spurious amplifications, as well as they often require extensive screening of concentrations and annealing temperatures. Here, we propose a novel and simple approach to detect virus variants with ultraspecificity by means of a CRISPR-Cas12a assay [12] on top of the routine RT-qPCR (**Fig. 1**; CRISPR stands for clustered regularly interspaced short palindromic repeats). CRISPR-Cas systems have been applied to detect a variety of pathogens, including SARS-CoV-2, envisioning point-of-care interventions (see ref. [13] for a review). In this regard, they are usually coupled to isothermal amplification methods and pursue a minimally-instrumented signal monitoring. In contrast, the innovation presented in this work is in the

ability to interface the CRISPR-Cas12a system with RT-qPCR for rapid pathogen genotyping in addition to detection (*i.e.*, running a CRISPR-Cas12a reaction in the RT-qPCR pot after its completion as a shallow sequencing step), which might be adopted straightforwardly into the clinic. Notably, we applied this approach to detect the Omicron variant [14] without the need for sequencing at a time in which this variant was firstly being introduced in many countries worldwide.

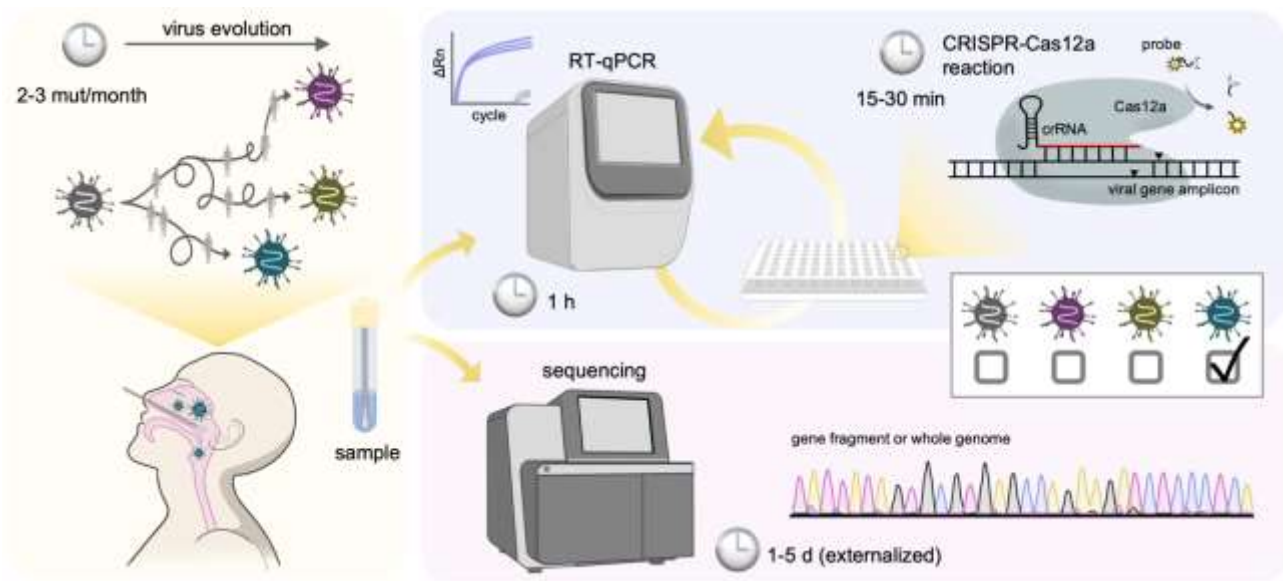


Figure 1: Schematics of the clinical approach followed in this work. Upon sample collection, virus detection can be performed by RT-qPCR (typically in 1 h) and variant discrimination by sequencing (typically in 1 d for a gene fragment and in 5 d for the whole genome). A CRISPR-Cas12a reaction can be run after completing the RT-qPCR for a rapid and accurate mutation identification, thereby allowing variant discrimination with less resources.

MATERIALS AND METHODS

Patient samples. Nasopharyngeal swab samples corresponding to 15 patients with symptoms compatible with coronavirus disease 2019 (COVID-19) were obtained from the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla in Spain between late 2021 and early 2022. The ethics committee of the hospital approved this study. Samples were anonymized and inactivated by a heat shock before performing any assay. Samples were purified by the RNA clean and concentrator kit (Zymo).

SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. The TaqPath 1-step RT-qPCR master mix, CG (Applied) was used with the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) N2 primers to amplify the SARS-CoV-2 N gene (kit provided by IDT) and custom design primers to amplify the S gene (*i.e.*, to perform a multiplexed amplification; **Table S1**). In a microplate (Applied), 1 μ L of sample was mixed with 200 nM of N2 primers, 50 nM of S primers (unless otherwise specified), 50 nM of qPCR probe [single-stranded DNA (ssDNA) labelled with carboxyfluorescein (FAM) and a quencher], and the master mix for a total volume of 20 μ L. The microplate was placed in a real-time PCR system (QuantStudio 3, Applied) to measure fluorescence (FAM channel) with the following protocol: 2 min at 25 °C for uracil-N-glycosylase incubation, 10 min at 53 °C for RT, 2 min at 95 °C for polymerase activation, and then 40 cycles of 3 s at 95 °C for denaturation and 30 s at 60 °C for annealing and extension. Samples with cycle threshold (C_T) values lower than 40 were considered as positive for SARS-CoV-2. Oligonucleotide sequences provided in **Table S1**.

DNA detection by CRISPR-Cas12a. Synthetic double-stranded DNA (dsDNA) molecules mimicking the Omicron BA.1 and Delta S genes were generated for testing purposes (hybridizing two oligonucleotides chemically synthesized by IDT; **Table S1**). The CRISPR RNA (crRNA) was generated by *in vitro* transcription with the TranscriptAid T7 high yield

transcription kit (Thermo) from a synthetic DNA template (sequence in **Table S1**). This element was then purified in a column (Zymo) and quantified in a spectrophotometer (NanoDrop, Thermo). Cas12a from *Lachnospiraceae bacterium* was a commercial preparation (NEB; some experiments were also performed with a preparation from IDT). The CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein was formed by incubating the crRNA and Cas12a in a suitable buffer (NEBuffer r2.1) for 30 min at room temperature. In a microplate (Applied), 10 nM of synthetic DNA (unless otherwise specified) was mixed with 50 nM of CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein and 500 nM of CRISPR probe [ssDNA labelled with carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) and a quencher] for a total volume of 20 μ L. The microplate was placed in the real-time PCR system to measure fluorescence (TAMRA channel) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Represented fluorescence values correspond to absolute signals minus the background signal of the CRISPR probe in the buffer.

Omicron detection by CRISPR-Cas12a after RT-qPCR. After completing the RT-qPCR with the primers targeting the SARS-CoV-2 N and S genes, the microplate was supplemented with 50 nM of CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein and 500 nM of CRISPR probe (in total, 2.5 μ L was added per well). The microplate was placed back in the real-time PCR system to measure fluorescence (TAMRA channel) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Represented fluorescence values correspond to absolute signals minus the background signal of a CRISPR-Cas12a reaction on top of an RT-qPCR without template.

Gel electrophoresis. Nucleic acid amplification from a commercial viral genome control (Vircell) or patient samples was confirmed by gel electrophoresis. Samples (10 μ L of amplified product) were loaded on a 3% agarose gel prepared with 0.5x TBE buffer, which was run for 30 min at room temperature (120 V). Gels were stained using RealSafe (Durviz). The GeneRuler ultra-low range DNA ladder (10-300 bp, Thermo) was used as a marker.

Virus sequencing. Amplified DNA from the SARS-CoV-2 S gene generated by RT-PCR was sent to Eurofins Genomics for Sanger sequencing with the SQF primer.

RESULTS

In a region of less than 20 nt of the S gene (coding for the spike protein), Omicron BA.1 carries the $\Delta 211/L212I$ and ins214EPE mutations [14], which represent a distinguishable genetic mark with respect to other SARS-CoV-2 variants. We exploited the fact that ins214EPE introduces a reverse complementary non-canonical protospacer adjacent motif (PAM) in the viral genome to design a suitable crRNA (**Fig. 2A**). This PAM (CTTC) can be recognized by Cas12a with sufficient affinity [15]. Using synthetic dsDNA molecules mimicking potential amplified products from Omicron BA.1 and the ancestral genotype, we show that a CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein specifically detected the intended target producing a significant fluorescence readout (**Fig. 2B**). The collateral catalytic activity of Cas12a upon dsDNA target recognition served to cleave a fluorogenic ssDNA probe to set apart the attached quencher, thereby obtaining a quantifiable readout. The detection was possible even in 5 min.

To study the responsiveness of the system, we varied the concentration of the target DNA. Concentrations above 0.1 nM started to produce a significant readout (**Fig. 2C**), thereby determining the minimal level to be reached in the preceding amplification step. Moreover, we tested two commercial preparations of Cas12a (one from NEB and another from IDT) obtained from the same bacterium. The IDT nuclease showed greater activity (2.2-fold in maximal fluorescence signal), but it displayed a smaller dynamic range to discriminate viral genotypes (24.5-fold at 30 min for the NEB nuclease and 3.9-fold for the IDT nuclease; **Fig. 2D**).

Motivated by these pilot results, we collected a series of nasopharyngeal swab samples from patients with symptoms compatible with COVID-19 in order to detect the virus by RT-qPCR and identify the variant by a subsequent CRISPR-Cas12a reaction. This was done in a time period in which the different national public health systems were concerned by the emergence of a new variant in South Africa with presumed higher transmissibility

[14]. According to the data from Nextstrain [16], the Delta variant (clade 21J) was displaced by Omicron BA.1 (clade 21K) in Spain during the development of this work (between November 2021 and January 2022; **Fig. S1**). To detect the presence of SARS-CoV-2 in the samples, we relied on the CDC N2 primers and probe, which were specifically designed for RT-qPCR-based diagnoses in the clinic. Here, we designed a custom pair of primers to amplify the S gene at the mutated region, and we checked their suitability to perform a multiplexed amplification (**Fig. S2**). By means of RT-qPCR, we identified 12 out of 15 patients infected by the virus ($C_T > 40$ for 3 patients; **Fig. 2E**).

The silent S gene amplicon in the multiplexed RT-qPCR was subsequently used to run a CRISPR-Cas12a reaction, which occurred in the very same RT-qPCR pot after adding a ribonucleoprotein-containing microdrop. The CRISPR probe was labelled with TAMRA to be orthogonal to the FAM-based qPCR probe. Importantly, we found that 7 out of the 12 infected patients carried the Omicron BA.1 variant (**Fig. 2F**), which produced a substantially different response to Delta (24.9-fold on average). Moreover, a correlation between the RT-qPCR C_T values and the CRISPR-Cas12a reaction signals was observed. We confirmed these results by Sanger sequencing of the S gene (**Fig. 2G**; see also **Fig. S3**). To enlarge the dynamic range of the response and achieve confident variant discrimination in less time, the concentration of the primers targeting the S gene was increased (response of 55.1-fold on average at 30 min; **Fig. 2H**). Finally, we analyzed the sensitivity of the method using dilutions of a patient sample, showing discrimination for $C_T < 30$ (**Fig. 2I**; see also **Fig. S4**).

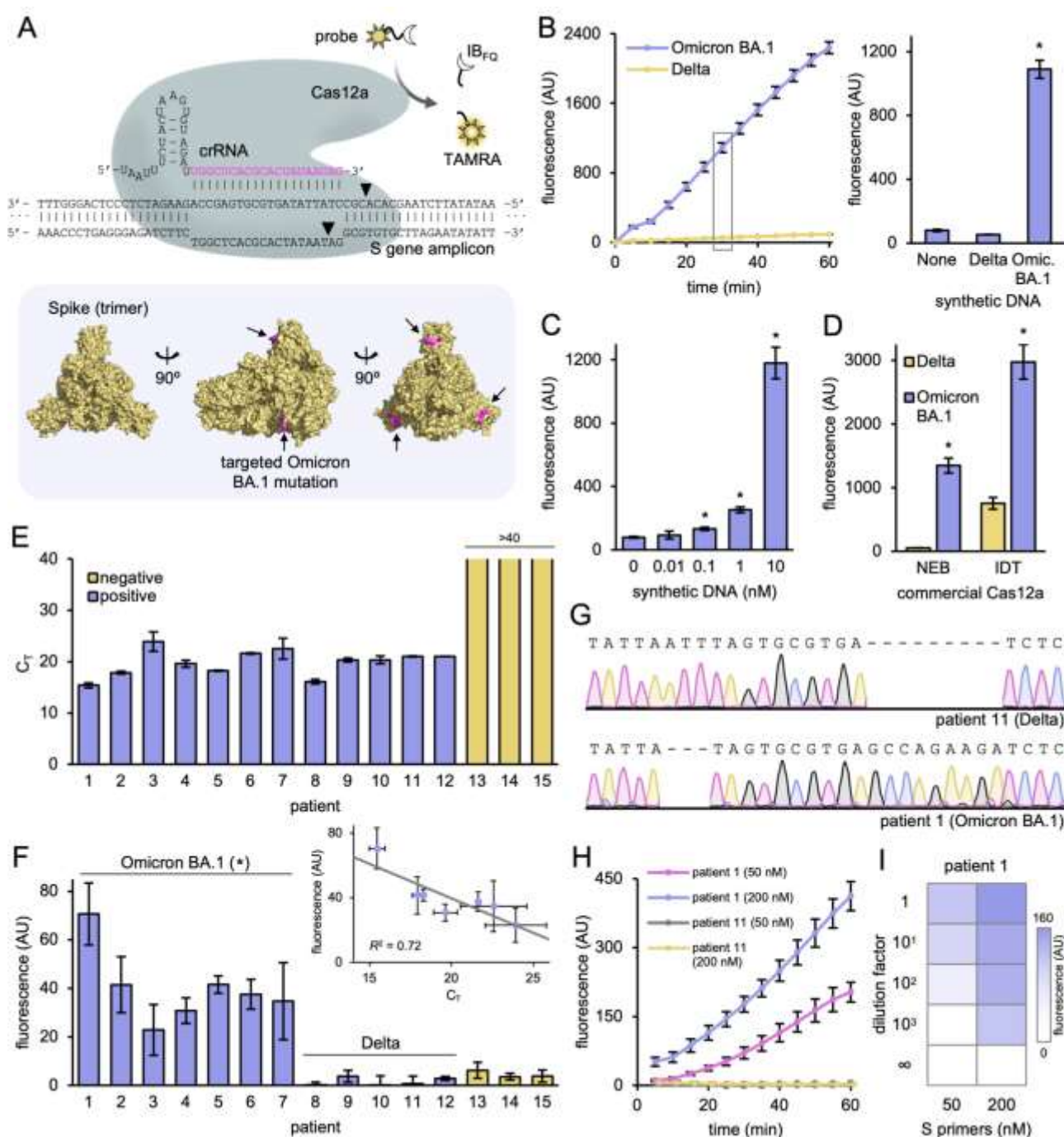


Figure 2: Combination of RT-qPCR and CRISPR-Cas12a to detect the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant. (A) Scheme of the CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein targeting the S gene amplicon (spacer of the crRNA shown in magenta). On the bottom, structural model of the spike protein ($\Delta 211$ /L212I and ins214EPE mutations colored in magenta). (B) Temporal fluorescence-based characterization of the CRISPR-Cas12a reaction with synthetic DNA as a target. On the right, results at 30 min (*against Delta). (C) Effect of the synthetic DNA concentration (*against 0). (D) Effect of the commercial preparation of

1
2 Cas12a (*against Delta). (E) Multiplexed RT-qPCR results with primers targeting the N and
3
4 S genes from patient samples. (F) Detection of the Omicron BA.1 S gene by a CRISPR-
5
6 Cas12a reaction in the RT-qPCR pot (*against Delta, pooled). In the inset, linear correlation
7
8 between fluorescence and C_T . (G) Sequence chromatograms from patient 1 (infected by
9
10 Omicron BA.1) and patient 11 (infected by Delta) of the S gene targeted region. (H)
11
12 Temporal fluorescence-based characterization of the CRISPR-Cas12a reaction with two
13
14 different concentrations of the S primers using the samples from patients 1 and 11. (I)
15
16 Sensitivity analysis by diluting the sample from patient 1. Overall, results obtained at 30 min.
17
18 Error bars correspond to standard deviations ($n = 3$). Statistical significance assessed by
19
20 Welch's t -test, two-tailed $P < 0.05$. AU, arbitrary units.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

CRISPR-Cas systems have been developed and applied for point-of-care testing together with isothermal amplification methods [17], and a direct detection of the viral genome has even been accomplished with an RNA-targeting effector bypassing the pre-amplification step [18]. In the clinic, CRISPR-Cas systems may also be useful due to their easy implementation and high interoperability with already approved protocols by the competent authorities. Through the use of a CRISPR-Cas12a reaction after completing a multiplexed RT-qPCR, we were able to discriminate infections produced by a particular SARS-CoV-2 variant. In less than 15 min, this supplementary reaction was able to provide a suitable indication, which saves valuable time compared to sequencing and allows informing the patient at diagnosis. Intriguingly, this procedure may even be complementary to those RT-qPCR-based methods developed for virus variant determination [8-11] to double-check the results or detect additional mutations of interest.

The crRNA here employed was designed to recognize mutations carried by the Omicron BA.1 lineage. However, this subvariant was later displaced by other Omicron lineages that did not carry the targeted mutations [19], which stresses the need for a continued design process of crRNAs in real time of pandemic (note that, overall, SARS-CoV-2 evolves by accumulating 2-3 mutations per month [20]). Sequence discrimination by CRISPR-Cas12a relies on both the interaction of the spacer of the crRNA with the target [21] and the PAM recognition by the Cas12a nuclease [22], thereby offering enough flexibility to target many different mutations occurring in the viral genome. In addition, the use of the CRISPR-Cas12a system is competitive in economic terms. We estimate a cost of \$0.2 per reaction, while Sanger sequencing is about \$3 per sample. All in all, CRISPR-Cas systems are increasingly being proven to be ready to complement current diagnostic procedures in the clinic. Our procedure may be of great utility for future personalized diagnoses and epidemiological surveillance.

FUNDING

Work supported by Generalitat Valenciana (GVA-COVID19/2021/036), Ministerio de Ciencia e Innovación (PDC2022-133941-I00; co-funded by NextGenerationEU), CRUE and Banco Santander (Fondo Supera Covid-19), CSIC PTI Salud Global (NextGenerationEU Fund, regulation 2020/2094), and IDIVAL (INNVAL21/13).

AUTHORS' CONTRIBUTION

GR designed the research. RR and RMM performed the experiments. ADG, DPM, MG, JCM, and JN collected the patient samples and performed the initial diagnoses in the hospital. RR, RMM, and GR analyzed the data. RR and GR wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

None.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material available.

It contains the nucleotide sequences of the elements used in this work (**Table S1**), information about virus evolution (**Fig. S1**), viral sequence alignments from patient samples (**Fig. S3**), and additional experimental results (**Figs. S2, S4**).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Li, J., Lai, S., Gao, G.F., Shi, W. (2021) The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature* 600, 408-418.

2. Yang, S., Rothman, R.E. (2004) PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect. Dis.* 4, 337-348.

3. Elena, S.F., Sanjuán, R. (2007) Virus evolution: insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 27-52.

4. Jassat, W., Karim, S.S.A., Mudara, C., Welch, R., Ozougwu, L., Groome, M.J., *et al.* (2022) Clinical severity of COVID-19 in patients admitted to hospital during the omicron wave in South Africa: a retrospective observational study. *Lancet Glob. Health* 10, e961-e969.

5. Michaelsen, T.Y., Bennedbæk, M., Christiansen, L.E., Jørgensen, M.S.F., Møller, C.H., Sørensen, E.A., *et al.* (2022) Introduction and transmission of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7, Alpha variant, in Denmark. *Genome Med.* 14, 47.

6. Bezerra, M.F., Machado, L.C., De Carvalho, V.C.V., Docena, C., Brandão-Filho, S.P., Ayres, C.F.J., *et al.* (2021) A Sanger-based approach for scaling up screening of SARS-CoV-2 variants of interest and concern. *Infect. Genet. Evol.* 92, 104910.

7. Lind, A., Barlinn, R., Landaas, E.T., Andresen, L.L., Jakobsen, K., Fladeby, C., *et al.* (2021) Rapid SARS-CoV-2 variant monitoring using PCR confirmed by whole genome sequencing in a high-volume diagnostic laboratory. *J. Clin. Virol.* 141, 104906.

8. McMillen, T., Jani, K., Robilotti, E.V., Kamboj, M., Babady, N.E. (2022) The spike gene target failure (SGTF) genomic signature is highly accurate for the identification of Alpha and Omicron SARS-CoV-2 variants. *Sci. Rep.* 12, 18968.

9. Brito-Mutunayagam, S., Maloney, D., McAllister, G., Dewar, R., McHugh, M., Templeton, K. (2022) Rapid detection of SARS-CoV-2 variants using allele-specific PCR. *J. Virol. Methods* 303, 114497.

10. Sibai, M., Wang, H., Yeung, P.S.W., Sahoo, M.K., Solis, D., Mfuh, K.O., *et al.* (2022) Development and evaluation of an RT-qPCR for the identification of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *J. Clin. Virol.* 148, 105101.
11. Juul, S., Spiegelhauer, M.R., Petersen, M.N., Flugt, K.K., Hansen, N.V., Larsen, H., *et al.* (2022) Validation and advantages of using novel RT-qPCR melting curve analysis assays for the identification of SARS-CoV-2 variants. *Sci. Rep.* 12, 13069.
12. Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J.M., *et al.* (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* 360, 436-439.
13. Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Zhang, F., Collins, J.J. (2021) CRISPR-based diagnostics. *Nat. Biomed. Eng.* 5, 643-656.
14. Viana, R., Moyo, S., Amoako, D.G., Tegally, H., Scheepers, C., Althaus, C.L., *et al.* (2022) Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature* 603, 679-686.
15. Chen, P., Zhou, J., Wan, Y., Liu, H., Li, Y., Liu, Z., *et al.* (2020) A Cas12a ortholog with stringent PAM recognition followed by low off-target editing rates for genome editing. *Genome Biol.* 21, 78.
16. Hadfield, J., Megill, C., Bell, S.M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., *et al.* (2018) Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* 34, 4121-4123.
17. Lin, M., Yue, H., Tian, T., Xiong, E., Zhu, D., Jiang, Y., Zhou, X. (2022) Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay. *Anal. Chem.* 94, 8277-8284.
18. Fozouni, P., Son, S., de León Derby, M.D., Knott, G.J., Gray, C.N., D'Ambrosio, M.V., *et al.* (2021) Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell* 184, 323-333.
19. Tegally, H., Moir, M., Everatt, J., Giovanetti, M., Scheepers, C., Wilkinson, E., *et al.*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(2022) Emergence of SARS-CoV-2 omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. *Nat. Med.* 28, 1785-1790.

20. Neher, R.A. (2022) Contributions of adaptation and purifying selection to SARS-CoV-2 evolution. *Virus Evol.* 8, veac113.

21. He, C., Lin, C., Mo, G., Xi, B., Li, A., Huang, D., *et al.* (2022) Rapid and accurate detection of SARS-CoV-2 mutations using a Cas12a-based sensing platform. *Biosens. Bioelectron.* 198, 113857.

22. Marqués, M.C., Ruiz, R., Montagud-Martínez, R., Márquez-Costa, R., Albert, S., Domingo-Calap, P., Rodrigo, G. (2021) CRISPR-Cas12a-based detection of SARS-CoV-2 harboring the E484K mutation. *ACS Synth. Biol.* 10, 3595-3599.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematics of the clinical approach followed in this work. Upon sample collection, virus detection can be performed by RT-qPCR (typically in 1 h) and variant discrimination by sequencing (typically in 1 d for a gene fragment and in 5 d for the whole genome). A CRISPR-Cas12a reaction can be run after completing the RT-qPCR for a rapid and accurate mutation identification, thereby allowing variant discrimination with less resources.

Figure 2: Combination of RT-qPCR and CRISPR-Cas12a to detect the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant. (A) Scheme of the CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein targeting the S gene amplicon (spacer of the crRNA shown in magenta). On the bottom, structural model of the spike protein ($\Delta 211/L212I$ and $ins214EPE$ mutations colored in magenta). (B) Temporal fluorescence-based characterization of the CRISPR-Cas12a reaction with synthetic DNA as a target. On the right, results at 30 min (*against Delta). (C) Effect of the synthetic DNA concentration (*against 0). (D) Effect of the commercial preparation of Cas12a (*against Delta). (E) Multiplexed RT-qPCR results with primers targeting the N and S genes from patient samples. (F) Detection of the Omicron BA.1 S gene by a CRISPR-Cas12a reaction in the RT-qPCR pot (*against Delta, pooled). In the inset, linear correlation between fluorescence and C_T . (G) Sequence chromatograms from patient 1 (infected by Omicron BA.1) and patient 11 (infected by Delta) of the S gene targeted region. (H) Temporal fluorescence-based characterization of the CRISPR-Cas12a reaction with two different concentrations of the S primers using the samples from patients 1 and 11. (I) Sensitivity analysis by diluting the sample from patient 1. Overall, results obtained at 30 min. Error bars correspond to standard deviations ($n = 3$). Statistical significance assessed by Welch's t -test, two-tailed $P < 0.05$. AU, arbitrary units.

