

ORIGINAL

HERRAMIENTAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA COVID-19

MOLECULAR BIOLOGY TOOLS FOR COVID-19 DIAGNOSIS

Luis Franco Vera^{1,2}

1. Académico Numerario de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
2. Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana

RESUMEN

Para diagnosticar correctamente una enfermedad se necesita, cada vez con más frecuencia, acudir a pruebas analíticas que, actualmente, incluyen técnicas de Biología Molecular y Celular. En el caso de la COVID-19, la letal pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2, se han hecho populares, entre otros, los nombres de PCR, test de antígenos y test de anticuerpos, pero quizá el conocimiento del significado y utilidad de estas pruebas no está al alcance de todos.

Puesto que, ante una pandemia como la actual, el desconocimiento o, peor, la desinformación son riesgos añadidos a los daños causados por el virus, en este artículo, tras comentar brevemente las características del SARS-CoV-2, se analiza la aplicación de la PCR, de los test de antígenos y de anticuerpos, así como de otros métodos menos habituales. En el caso de la PCR -reacción en cadena de la DNA polimerasa-, se revisa el mecanismo de esta enzima y su uso para la amplificación y cuantificación de DNA. Después se estudia la aplicación al análisis del RNA del virus. Para los métodos inmunológicos, se comienza por revisar el fundamento de la respuesta inmune, para abordar luego el desarrollo de los test de antígenos y anticuerpos y del ensayo ELISA. Sobre esta base, se discuten las aplicaciones y limitaciones de esas técnicas.

Palabras clave: PCR; Test de antígenos; Test de anticuerpos; Ensayos ELISA; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The need of analytical techniques to achieve an accurate diagnosis of diseases is constantly increasing and, presently, methods based in Molecular and Cellular Biology are often required. In the case of COVID-19, the lethal pandemic caused by the coronavirus SARS-CoV-2, the names of some techniques such as PCR, antigen or antibody tests, have become popular. Nevertheless, the fundamentals, significance and relevance of these methods is, perhaps, not widely known.

Because in the context of this durable pandemic, lack of knowledge or, worse still, disinformation are risks added to the harm naturally caused by the virus, in the present article, after briefly reviewing the SARS-CoV-2 characteristics, the applicability of PCR, antigen and antibody tests, as well as of other methods, is discussed. In the case of PCR -polymerase chain reaction- the mechanism of DNA polymerases and how it may be used to amplify and quantify DNA is reviewed. The specific application of PCR to the analysis of viral RNA is then studied. Prior to describing the immunological methods, the fundamentals of immune response are reviewed. Then the development of antigen and antibody tests and of the ELISA assays is described. On these grounds, the application and limitations of the above mentioned techniques are discussed.

Keywords: PCR; Antigen test; Antibody test; ELISA assays; SARS-CoV-2.

Correspondencia

Luis Franco Vera

Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de España

Calle Valverde, 22 · 28004 · Madrid, España

E-mail: secretaria@rac.es



1. INTRODUCCIÓN

El médico siempre ha necesitado disponer de métodos adecuados para llegar a diagnosticar una enfermedad y poder pronosticar su curso más probable. Son pasos esenciales para curar, o, al menos, aliviar el sufrimiento del enfermo, fin de la profesión médica. Los datos aportados por el propio paciente –la anamnesis–, la exploración física –palpación, auscultación, etc.–, la experiencia adquirida por el profesional, con la ayuda en no pocas ocasiones del “ojo clínico” –ese don que poseen algunos–, han sido las herramientas de que se han valido siempre los médicos para lograr los fines antes aludidos. Con el transcurso del tiempo, las diversas ramas de la ciencia fueron aportando métodos más y más sofisticados para realizar diagnósticos certeros y el “ojo clínico” se fue gradualmente completando con la evidencia científica (Gudiol, 2006).

Las técnicas de diagnóstico por imagen han permitido acceder a detalles anatómicos antes imposibles de captar. Las técnicas de radiodiagnóstico, asociadas a la medicina nuclear, han supuesto también importantes avances.

Los análisis clínicos constituyen otra herramienta de diagnóstico imprescindible. Se comenzó determinando parámetros hematológicos, así como los niveles de algunos metabolitos o elementos químicos en fluidos fisiológicos. Inicialmente, se analizaban mediante métodos bioquímicos sencillos componentes como la glucosa, el colesterol, el ácido úrico, pero poco a poco se fueron incorporando determinaciones de la actividad de enzimas cuyos niveles informan de alteraciones patológicas. Después, se incorporaron técnicas de biología molecular y hoy en día son frecuentes determinaciones más complejas, que requieren la utilización de técnicas sofisticadas.

Con la irrupción de la pandemia iniciada en 2019 por el coronavirus causante del síndrome respiratorio severo agudo (SARS-CoV-2) se han hecho populares los nombres de PCR, test de antígenos y test de anticuerpos. Posiblemente a todos los lectores de este artículo se les haya practicado alguna de estas pruebas, que han resultado de una eficacia inmensa para el diagnóstico de la enfermedad causada por ese virus, la COVID-19 (*corona virus disease*). Pero quizá muchos desconocen los fundamentos científicos y el valor de dichas técnicas. El objetivo del presente artículo es presentar, de forma sencilla, esos fundamentos y analizar la información que proporcionan los diversos métodos. Los pacientes tienen derecho a conocer el alcance de los métodos de diagnóstico habituales en la práctica clínica, aunque ese conocimiento no requiera la profundidad con que el especialista debe considerarlos. De esa manera,

se evitarán muchos malentendidos que, desgraciadamente, se han difundido de forma anticientífica.

2. EL SARS-CoV-2

Para comenzar, es preciso considerar, siquiera sea a grandes rasgos, algunos aspectos de la COVID-19 y de su agente causal. Puede surgir una primera pregunta: ¿qué es un coronavirus? Pero, quizá, aunque parezca una cuestión trivial, convenga plantear antes otra: ¿qué es un virus? El genetista alemán Carsten Bresch (1921-2020) planteaba una analogía muy simple, pero tremendamente ilustrativa. Un virus es *un pirata genético* (Bresch, 1964). Un pirata aéreo, por ejemplo, no tiene que saber pilotar ni poseer un avión. Basta con que se introduzca en uno y oblique al piloto a que le conduzca a donde él desee. Del mismo modo, un virus no posee una maquinaria biológica que le haga capaz de reproducirse; simplemente posee un material genético y la capacidad de introducirse en una célula viva y *obligarla* a usar su maquinaria para expresar su información genética, que, obviamente, incluye todo lo necesario para su reproducción. El material genético de los virus puede ser DNA o RNA.

Los coronavirus tienen RNA como material genético. Se conocen cerca de 50 especies, entre las que se encuentra, por ejemplo, alguno de los virus causantes del resfriado común. El RNA de un coronavirus está unido a una proteína –proteína N– formando un complejo, nucleocápsida, rodeado por una membrana lipídica en la que están embebidas varias proteínas. Además, incrustadas en la membrana se encuentran las espículas, las estructuras más características de los coronavirus, que son trómeros de proteína S y se organizan en forma de un tallo –la parte que se embebe en la membrana– y un ectodominio de aspecto globular. Un coronavirus típico posee unas 75 espículas, cuyas proyecciones globulares le dan, al observarlo al microscopio electrónico, el aspecto de la corona en un eclipse solar total. Precisamente de este hecho deriva el nombre con que se conocen estos virus (Almeida et al., 1968) y que se ha hecho tristemente famoso con la pandemia de la COVID-19. El diámetro de una partícula de SARS-CoV-2 oscila entre 60 y 140 nm (Zhu et al., 2020).

Cuando el SARS-CoV-2 penetra a través de las vías respiratorias, llega a los alvéolos pulmonares. Estos están recubiertos por neumocitos de dos tipos, 1 y 2. Los últimos poseen en su superficie receptores ACE2, cuya función fisiológica es interactuar con la enzima conversiva de la angiotensina (ACE2), como parte del mecanismo de regulación de la presión arterial (Figura 1). La interacción tiene lugar a través del

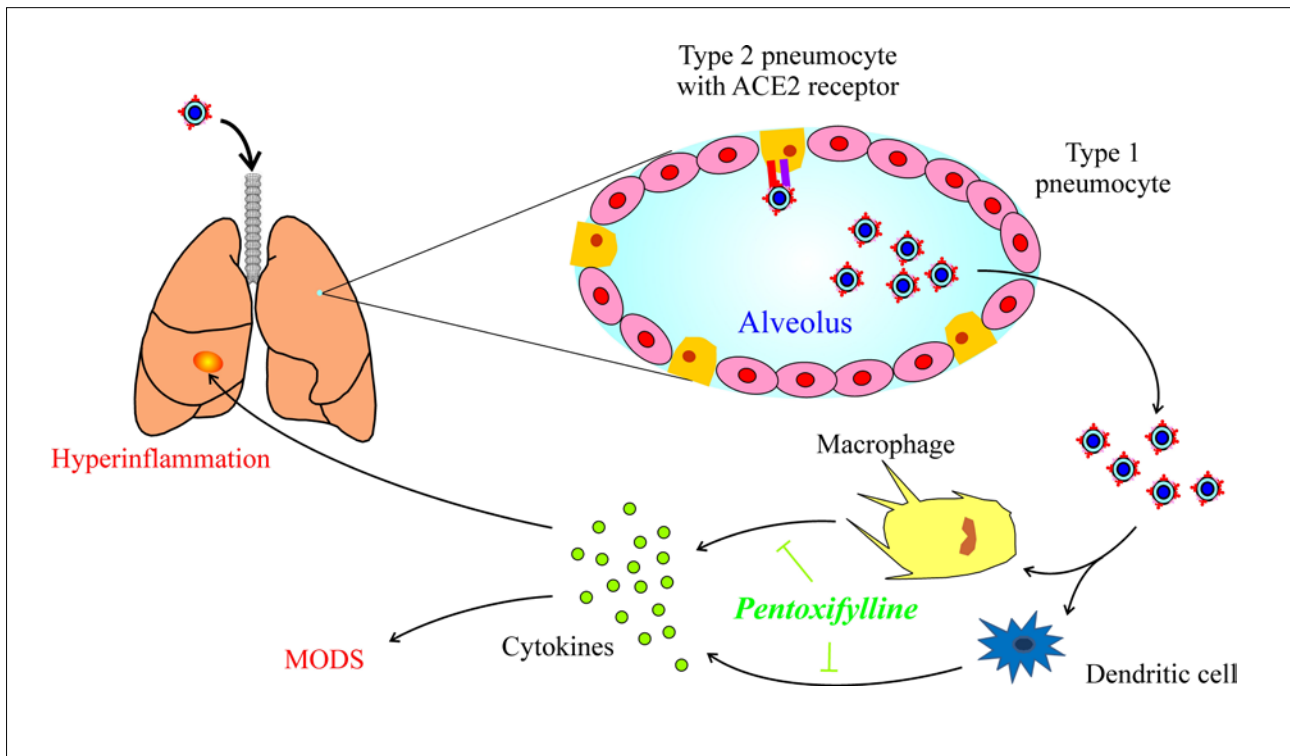


Figura 1. Mecanismo de la infección por SARS-CoV-2. El virus interacta en los alvéolos pulmonares con el receptor ACE2 de neumocitos tipo 2. En ellos se multiplica y las partículas virales se vierten al lumen alveolar, desde donde se dispersan vía sanguínea. La interacción del virus con células del sistema inmune induce la secreción de una gran cantidad de proteínas pro-inflamatorias (“tormenta de citoquinas”), que producen reacciones de hiperinflamación en los pulmones, pero también puede producir un síndrome de disfunción multiorgánica (MODS). La pentoxifilina puede disminuir la acumulación de citoquinas.

ectodominio del receptor, que está dirigido hacia el lumen alveolar. La proteína de la espícula del SARS-CoV-2 tiene un cierto parecido estructural con ACE2, con lo que el virus se fija al receptor (Hoffmann et al., 2020). Posteriormente, el virus se internaliza en el neumocito, donde queda alojado como un endosoma, una vesícula intracelular en la que los materiales externos que se han introducido en la célula –en este caso el SARS-CoV-2– quedan separados del resto del citosol por una envoltura membranosa. Pero después, bien por cambios de pH en el endosoma, bien por la acción enzimática de la cathepsina, acaba liberándose el RNA vírico en el citosol de la célula huésped.

Entonces el virus comienza a actuar como “pirata genético”. Es sobradamente conocido que el flujo de la información genética contenida en el DNA, que tiene capacidad de autorreplicarse, pasa a las proteínas a través del RNA (Crick, 1958) (Figura 2A). El RNA del SARS-CoV-2 puede traducirse en los ribosomas de las células huésped y dar lugar a las proteínas que codifica. Entre ellas, se encuentra una enzima con actividad de RNA polimerasa, dependiente de RNA, es decir, una RNA replicasa, enzima que no existe en eucariotas y es capaz de

producir múltiples copias del RNA viral (Figura 2B). El RNA del SARS-CoV-2 se multiplica así en la célula infectada y las demás proteínas codificadas por él, las proteínas de la membrana, de la nucleocápsida y de la espícula, se traducen con ayuda de los ribosomas celulares. El RNA y las proteínas del virus así producidas, se autoensamblan dando lugar a múltiples partículas víricas que, por exocitosis, se liberan de los neumocitos y se diseminan a través de la sangre. Llegan así a las células dendríticas y a los macrófagos, componentes del sistema inmunitario, que en respuesta liberan citoquinas.

Las citoquinas son proteínas pequeñas con múltiples funciones reguladoras. Ante la invasión de un elemento extraño, las citoquinas segregadas producen una leve inflamación en la zona infectada, que favorece el acceso de los anticuerpos. Pero, en el caso de la respuesta al SARS-CoV-2, la liberación incontrolada de citoquinas pro-inflamatorias (Mehta et al., 2020; Moore & June, 2020), produce reacciones de hiperinflamación que afectan a los pulmones y a otros órganos, causando un síndrome de disfunción multiorgánica, que puede llegar a causar la muerte del paciente (Fig. 1).

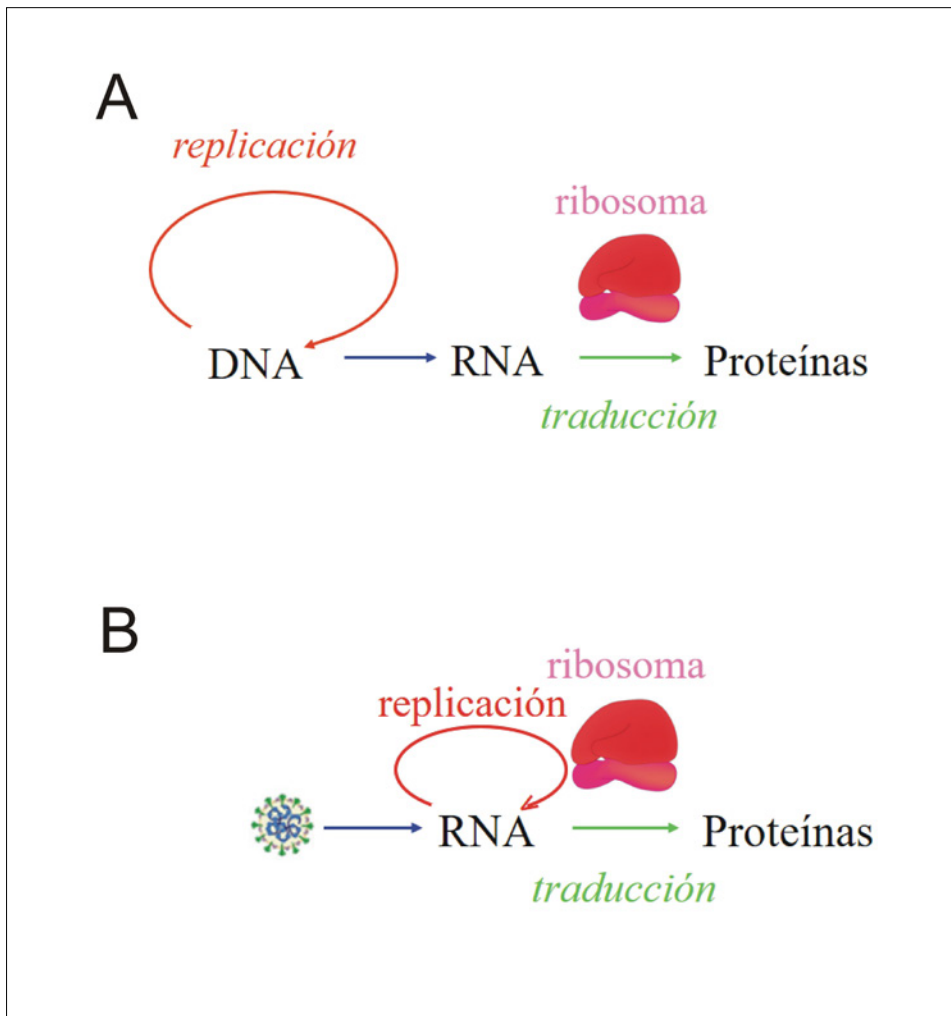


Figura 2. (A): El “dogma central” de la Biología Molecular. El DNA, capaz de autorreplicarse, se transcribe para producir un RNA mensajero (mRNA), que se traduce en los ribosomas para dar lugar a las proteínas. (B) El RNA del virus se traduce en los ribosomas de la célula huésped, donde se sintetizan las proteínas codificadas por el virus. Una de ellas es una RNA replicasa, que multiplica el RNA viral. Este se autoensambla con el resto de las proteínas víricas, produciendo múltiples partículas del virus.

La producción exagerada de citoquinas –que se conoce con el nombre gráfico de “tormenta de citoquinas”– se da también en otros graves procesos patológicos. Nuestro grupo participó en el estudio de los mecanismos epigenéticos que controlan la formación de la tormenta de citoquinas en la pancreatitis aguda (Escobar et al., 2012; Escobar, Pereda, Arduini, Sandoval, Sabater, Aparisi, López-Rodas, et al., 2010; Escobar, Pereda, Arduini, Sandoval, Sabater, Aparisi, Vento, et al., 2010; Sandoval et al., 2016) y comprobamos que la pentoxifilina, especialmente en combinación con oxipurinol, puede prevenir la aparición de la tormenta de citoquinas en la pancreatitis aguda experimental por un mecanismo epigenético, con la consiguiente disminución del daño hiperinflamatorio en páncreas y pulmón (Sandoval et al., 2009). En consecuencia, hemos propuesto que el tratamiento temprano con esa combinación de fármacos puede prevenir la aparición de respuestas hiperinflamatorias en pacientes de COVID-19 (López-Iranzo et al., 2020).

3. MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DE LA COVID-19

Aunque se han descrito otros métodos, en el presente artículo se comentan solo los más habituales, la PCR y los métodos inmunológicos, test de antígenos y anticuerpos y ensayos ELISA.

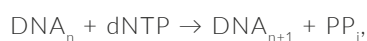
3.1. PCR

El método fundamental para el diagnóstico molecular de la COVID-19 es la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*). La técnica fue desarrollada por Kary Mullis (K. Mullis et al., 1986), que recibió por ello el premio Nobel de Química en 1993. En su *Nobel Lecture*, en la que reflejaba su peculiar personalidad, Mullis dejó constancia de la historia de su descubrimiento (K. B. Mullis, 1994). La PCR fue diseñada inicialmente para



amplificar DNA, es decir, para obtener, a partir de un número reducido de moléculas de DNA, múltiples copias de idéntica secuencia. Hoy en día es una técnica imprescindible en los laboratorios de investigación clínica, biológica, bioquímica y forense.

La técnica se basa en la reacción de las DNA polimerasas, enzimas que se encargan de la replicación del DNA en los organismos vivos. Para entender los fundamentos de la PCR es preciso comentar, siquiera sea de pasada, el mecanismo de la reacción catalizada por ellas. Aunque hay distintas DNA polimerasas, el mecanismo propuesto en 1958 por el grupo de Kornberg (Bessman et al., 1958; Lehman et al., 1958) es válido para todas. Añaden desoxirribonucleótidos, uno a uno, al extremo 3' de una cadena preexistente. La reacción es:



donde DNA_n representa una cadena de DNA con n nucleótidos y dNTP es un trifosfato de desoxirribonucleósido (dATP, dCTP, dTTP o dGTP). En la reacción, se añade un nuevo eslabón a la cadena, que pasa a tener $n+1$ nucleótidos. Uno de los fosfatos forma el enlace fosfodiéster que une al nuevo nucleótido con el resto de la cadena, mientras que los dos restantes se eliminan como pirofosfato inorgánico, PP_i .

Es evidente que el nucleótido añadido no puede ser uno cualquiera si se ha de conservar la especificidad de la secuencia. La replicación del DNA es semiconservativa (Meselson & Stahl, 1958), es decir, las dos cadenas se separan y sobre cada una de ellas, usada como molde, se va construyendo una hebra hija, de secuencia complementaria a la hebra parental. Como consecuencia, resultan dos moléculas de DNA, de secuencia idéntica a la inicial, en cada una de las cuales una de las hebras es de la molécula original y la otra es la recién sintetizada. La iniciación de la replicación del DNA *in vivo* es un proceso complejo, que requiere la formación de unos cebadores, moléculas de RNA de secuencia complementaria a determinadas regiones del DNA, a cuyos extremos 3' la DNA polimerasa va añadiendo los desoxirribonucleótidos. Pero, para entender los fundamentos de la PCR, no son necesarios estos detalles, que se pueden encontrar en cualquier texto de Bioquímica o Biología Molecular.

El proceso puesto a punto por Mullis consiste en mezclar el DNA original, con una cantidad en exceso de cebadores, oligodesoxirribonucleótidos cortos (alrededor de 20 bases) complementarios a cada una de las cadenas en los extremos de la región del DNA de partida que se desea amplificar, una mezcla de los distintos dNTPs y una DNA polimerasa. El primer paso consiste en desnaturar el DNA de partida por elevación de la temperatura, por ejemplo, a 95°C. De esta forma, se rompen los enlaces de hidrógeno que mantienen la doble hélice y las dos hebras del DNA

se separan. A continuación, se baja la temperatura, por ejemplo, a unos 60°C, con lo que los enlaces de hidrógeno pueden volver a formarse. Pero como hay un exceso de cebadores, es mucho más probable que se formen tramos de doble hélice con ellos en las regiones en que son complementarios a cada una de las cadenas. Así se forman los complejos idóneos para la actuación de la DNA polimerasa: regiones de DNA bicatenario, con el extremo 3' de los cebadores libre y un largo tramo de DNA monocatenario que actuará de molde. Como la DNA polimerasa ha de estar presente en la mezcla de reacción en todo momento, debe resistir la elevada temperatura que se requiere para la desnaturalización del DNA. Ordinariamente, se usa la DNA polimerasa de un organismo termófilo, *Thermus aquaticus*, que se abrevia como Taq polimerasa. La temperatura óptima de acción de la enzima es de 75–80 °C, pero resiste sin desnaturarse temperaturas superiores a 90°C (Abramson, 1995). Como hay dNTPs en la mezcla, tan pronto se ha formado el complejo, la DNA polimerasa, procesivamente, va añadiendo nucleótidos al cebador, construyendo la hebra hija complementaria. Tras un tiempo suficiente para que la DNA polimerasa complete su acción, se habrán obtenido dos copias de la región deseada del DNA, aunque la procesividad de la polimerasa se habrá extendido más allá de ella. Si ahora se repite el proceso, calentamiento para desnaturar el DNA, descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan y se deja actuar a la DNA polimerasa, se llegará en este segundo ciclo a 4 copias de DNA. El proceso se puede repetir automáticamente en un aparato que recibe el nombre de termociclador, que se puede programar para que la duración y la temperatura de cada fase –desnaturación, reasociación y elongación por parte de la DNA polimerasa– sean las adecuadas a la secuencia del DNA y de los cebadores, ya que de la secuencia dependen las temperaturas óptimas de desnaturación y reasociación. El software necesario para diseñar los oligonucleótidos más convenientes para amplificar un DNA de secuencia conocida, es de libre disposición. El proceso está esquematizado en la figura 3, en la que se puede ver que, inicialmente, las hebras sintetizadas por la polimerasa pueden exceder de la longitud de la secuencia que se desea amplificar (en azul en la figura). No obstante, la progresiva unión de los cebadores a sus secuencias diana a medida que aumenta el número de ciclos conducirá a que, tras un número suficientemente alto de ellos, la práctica totalidad de las moléculas sintetizadas correspondan únicamente a la secuencia deseada.

El número de moléculas sintetizadas por cada molécula inicial al terminar el ciclo n es 2^n . Si, por ejemplo, se han completado 25 ciclos, el factor de amplificación está próximo a 34 millones y si se han terminado 30 ciclos, el número de moléculas es 1000 millones de veces superior al inicial.

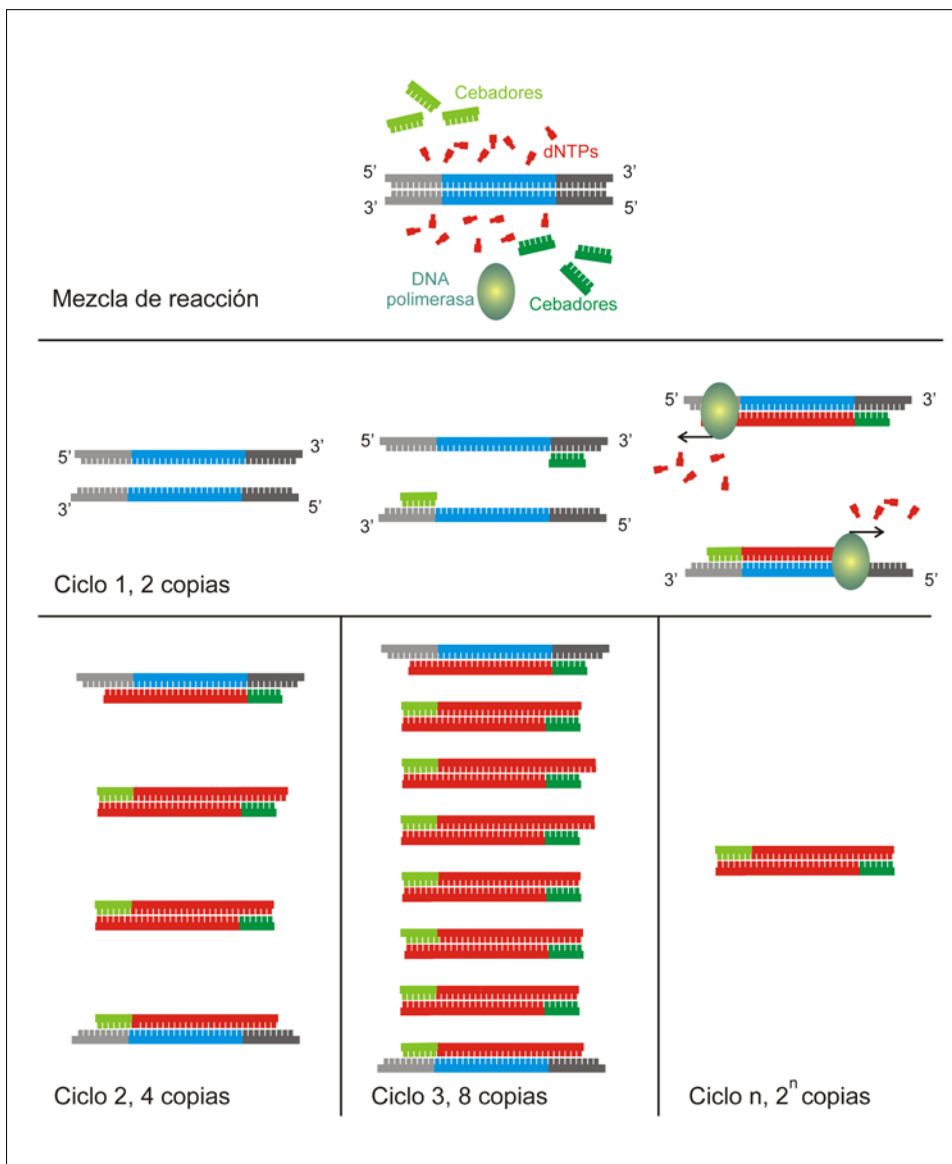


Figura 3. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). La secuencia que se desea amplificar en el DNA de partida, está marcada en color azul y las cadenas que sucesivamente se van formando por incorporación de los trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTP) al extremo 3' de los cebadores en la reacción catalizada por la DNA polimerasa están marcadas en rojo. El progresivo incremento en la cantidad de DNA se indica para los distintos ciclos de reacción.

Además de amplificar el DNA, la PCR puede usarse con finalidad cuantitativa y entonces, se abrevia qPCR. Para ello suelen utilizarse colorantes, como el denominado **SYBR Green**, que se une al surco menor del DNA bicatenario. El complejo resultante absorbe luz a 498 nm y emite fluorescencia a 522 nm, la zona verde del espectro, de donde deriva su nombre. Aunque se puede unir débilmente al DNA monocatenario, la considerable intensidad de la emisión fluorescente cuando se une al bicatenario hace que pueda usarse para cuantificar la concentración de este último. Esta es precisamente la base de la qPCR. Si se añade **SYBR Green** a la mezcla original de partida, a medida que van apareciendo nuevas moléculas de DNA dúplex a lo largo de los ciclos de PCR irá aumentando proporcionalmente la fluorescencia. Si el termociclador

dispone de un espectrofluorímetro, se puede seguir en tiempo real el proceso de amplificación por el incremento de la fluorescencia. La figura 4 muestra un típico resultado en el que se aprecia cómo aumenta la fluorescencia en función del número de ciclos. Es evidente que cuanto mayor sea la concentración inicial del DNA en la muestra de partida el número de ciclos necesario para llegar a una concentración dada será menor. En el ejemplo de la figura 4, la concentración inicial de DNA disminuye en el orden 1-6.

La determinación cuantitativa de la concentración inicial de DNA requiere un tratamiento de los datos. En muchos casos, no es necesario conocer la concentración absoluta y basta con obtenerla de modo relativo. Para ello, se utiliza como control el DNA

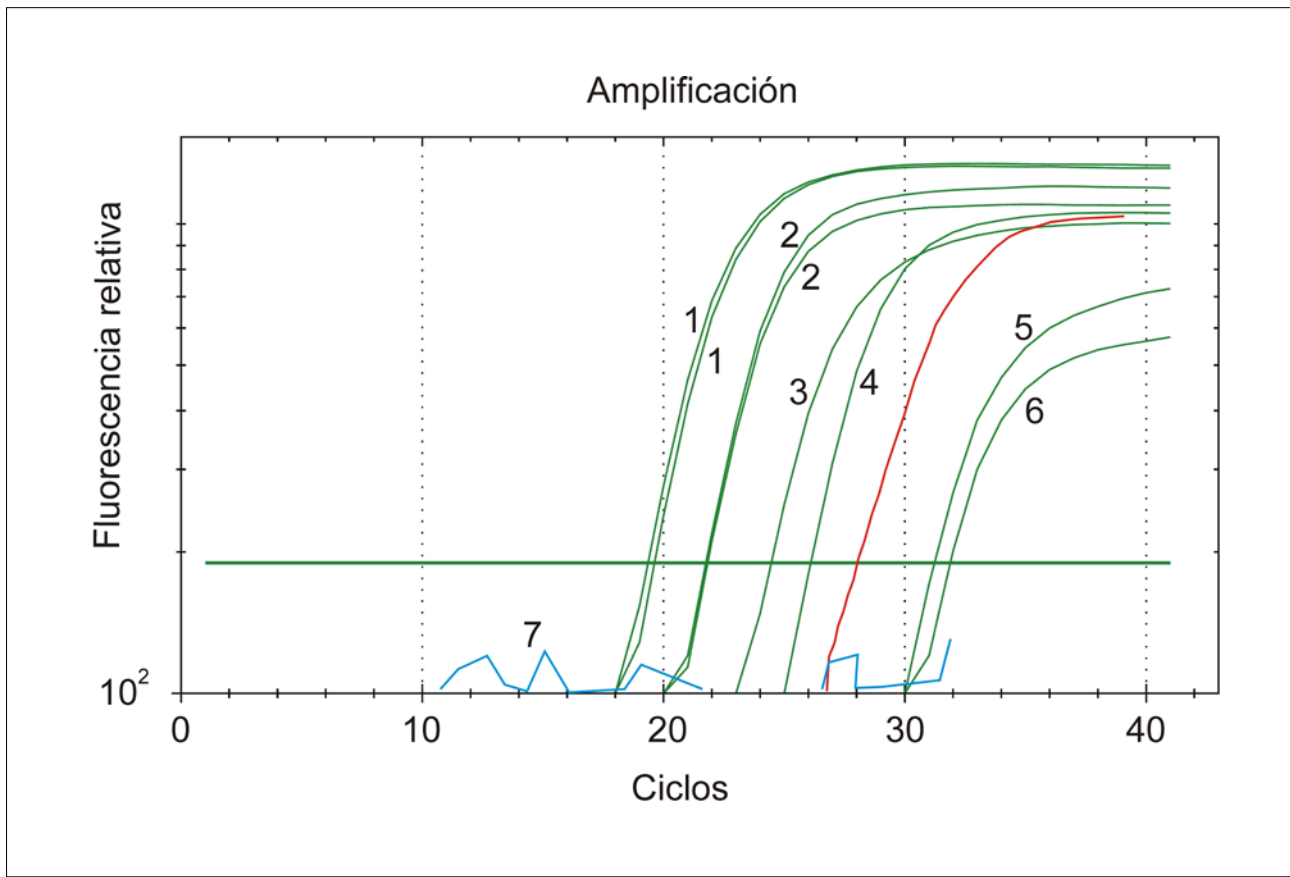


Figura 4. Resultado de un experimento de qPCR, realizado con el colorante SYBR Green. Las curvas recogen, en escala logarítmica, el aumento de la fluorescencia. Las marcadas con los números 1-6 corresponden a muestras en las que se encontraba presente el DNA para el cual se habían diseñado los cebadores; las muestras 1 y 2 se han analizado por duplicado. La curva roja corresponde a un control interno y la azul, numerada 7, procede de una muestra en la que no se encontraba presente el DNA que se deseaba analizar.

de un gen constitutivo, cuyo nivel de expresión sea constante en todas las condiciones.

Con esta base, ya se puede comprender el uso de la PCR para el diagnóstico de la COVID-19. Se comienza por tomar una muestra nasofaríngea del paciente con un hisopo que, después, se introduce en una disolución adecuada para lisar la envoltura del virus y liberar su material genético. Pero como la PCR amplifica DNA, primero hay que convertir el RNA vírico de la muestra en un DNA complementario (cDNA) mediante la acción de la transcriptasa inversa. Esta enzima, presente en algunos virus y descubierta por Temin & Mizutani, (1970), cataliza una reacción opuesta a la transcripción, la retrotranscripción, mediante la cual se obtiene un cDNA bicatenario de secuencia complementaria a la del RNA. El cDNA se somete entonces a qPCR, usando cebadores específicos. La combinación de la retrotranscripción con la qPCR se suele abreviar como RT-qPCR y se emplea como método de rutina en microbiología clínica

(Espy et al., 2006). Evidentemente, hay que utilizar cebadores específicos en función de la secuencia de cDNA que se desee analizar. En el caso del SARS-CoV2, suelen ser cebadores complementarios a regiones del genoma del virus con poca variabilidad (Aguar et al., 2020; Carter et al., 2020; Hirotsu et al., 2020). Como control estándar para la valoración se emplea habitualmente una región del gen **RPP30**, que codifica la subunidad 30 de la ribonucleasa P humana (Hirotsu et al., 2020).

Una vez obtenidas las curvas resultantes de la RT-qPCR, hay que establecer un umbral, que normalmente se sitúa a un valor de fluorescencia que exceda en 3-5 veces el ruido del sistema. Ese umbral (línea horizontal en la figura 4) corta las curvas en su región de crecimiento exponencial. Si las muestras procedían de pacientes en los que se deseaba analizar la presencia del SARS-CoV-2, se habrían utilizado cebadores adecuados, como se comenta más arriba. Cualitativamente, ya podría decirse que los pacientes de

los que proceden las muestras 1, 2, 3 y 4 están infectados y su carga vírica es alta, que las muestras 5 y 6 corresponden también a pacientes infectados, pero con una carga vírica menor, y que el paciente del que procede la muestra 7 está libre de virus. Pero, además puede determinarse cuantitativamente la carga vírica relativa de los pacientes infectados. Para ello, se determina el número de ciclos en que cada curva corta el umbral (C_t). En el ejemplo de la figura 4, en el que las muestras 1 y 2 se han analizado por duplicado, los valores de C_t son: 19,29 y 19,55 para la muestra 1; 21,70 y 21,78 para la muestra 2; y 24,40, 26,08, 31,19 y 31,86 para las muestras 3-6, respectivamente. La curva roja corresponde al control, que en caso del análisis de SARS-CoV-2, podría ser el gen **RPP30** y su valor de C_t es 28,07. El software proporcionado por el fabricante del termociclador es capaz de establecer el umbral y determinar los valores de C_t . Una vez conocidos estos, se puede calcular la concentración relativa del cDNA mediante un sencillo cálculo (Livak & Schmittgen, 2001).

Para que los cálculos sean válidos, se requiere que la eficiencia de los cebadores empleados para amplificar el cDNA vírico y el DNA de control sea similar. En caso contrario, hay que aplicar una corrección para dar cuenta de la diferencia de eficiencias. Para ello se realiza una titulación con una dilución seriada del DNA de la muestra. Se construye una curva estándar representando el cambio de C_t con la dilución y la eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la recta resultante.

Para una mayor fiabilidad en el diagnóstico cualitativo de la COVID-19, es aconsejable amplificar dos regiones del cDNA procedente del virus de modo que se considera positivo el resultado solo cuando se ha logrado amplificación de las dos regiones (Dhamad & Abdal Rhida, 2020).

3.2. Métodos inmunológicos

Como introducción a los métodos inmunológicos, es preciso tratar a grandes rasgos de los fundamentos de la respuesta inmune. El elemento clave de ella es la interacción antígeno-anticuerpo. Siguiendo al Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, un antígeno es una **sustancia capaz de inducir una respuesta inmune específica cuando se introduce en los tejidos de un animal. La respuesta puede consistir en la producción de anticuerpos** (www.vctrac.es). Las moléculas presentes en la envoltura del SARS-CoV-2, por ejemplo las proteínas de la espícula, al ser extrañas para el organismo humano, se comportan como antígenos y, en respuesta, el organismo produce anticuerpos. Siguiendo de nuevo al mencionado Vocabulario, un anticuerpo es una **proteína**

inducida por la administración de un antígeno, que tiene la propiedad de combinarse con los antígenos que estimulan su producción. Todas tienen estructura de inmunoglobulinas.

Existen 5 tipos de inmunoglobulinas, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En el presente artículo solo se hará mención de los dos últimos. Edelman describió por primera vez la estructura de una inmunoglobulina (Edelman & Poulik, 1961), trabajo que le valió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1972. Las inmunoglobulinas están formadas por 4 cadenas polipeptídicas, dos grandes (≈ 50 kDa) y dos pequeñas (≈ 23 kDa). Edelman las denominó, respectivamente, cadenas pesadas y ligeras, nombre que ha dado origen a su designación como cadenas H (**heavy**) y L (**light**). Las 4 cadenas están enlazadas entre sí mediante puentes disulfuro y su estructura tridimensional recuerda la letra Y, como se esquematiza en la figura 5.

Hay 5 tipos de cadenas H, denominadas α , δ , γ , ϵ y μ , que forman parte, respectivamente, de las IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En mamíferos, sólo hay dos tipos de cadenas L, designadas como λ y κ , que están presentes en todas las inmunoglobulinas, pero siempre son iguales las dos de cada molécula de anticuerpo.

Un problema que se plantea inmediatamente es el de la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo. Teniendo en cuenta que hay un número prácticamente ilimitado de antígenos, ¿cómo pueden reconocerlos específicamente las inmunoglobulinas? La primera respuesta que se dio a esta pregunta era que las inmunoglobulinas tendrían una estructura flexible, capaz de amoldarse complementariamente a la estructura de cualquier antígeno. Pero cuando comenzó a vislumbrarse que la estructura terciaria de las proteínas dependía fundamentalmente de su estructura primaria, esa idea hubo de abandonarse.

En 1955, Jerne propuso que las inmunoglobulinas se estarían sintetizando continuamente dando lugar a una enorme variedad de conformaciones, alguna de las cuales podría unirse al antígeno y, por una especie de selección natural, daría lugar a la multiplicación de ese anticuerpo (Jerne, 1955). Dos años más tarde Burnet propuso un mecanismo de selección para explicar la multiplicación de las inmunoglobulinas que se combinaran con el antígeno (Burnet, 1957). Este mecanismo, que denominó selección clonal, admitía la existencia de un gran número de células productoras de anticuerpos, cada una de las cuales poseería en su superficie un motivo estructural correspondiente al anticuerpo particular que esa célula produjera. Un antígeno cualquiera interaccionaría con la célula a cuyo motivo superficial se adaptara mejor, y eso dispararía la multiplicación de esa célula, con lo que se produciría un clon de

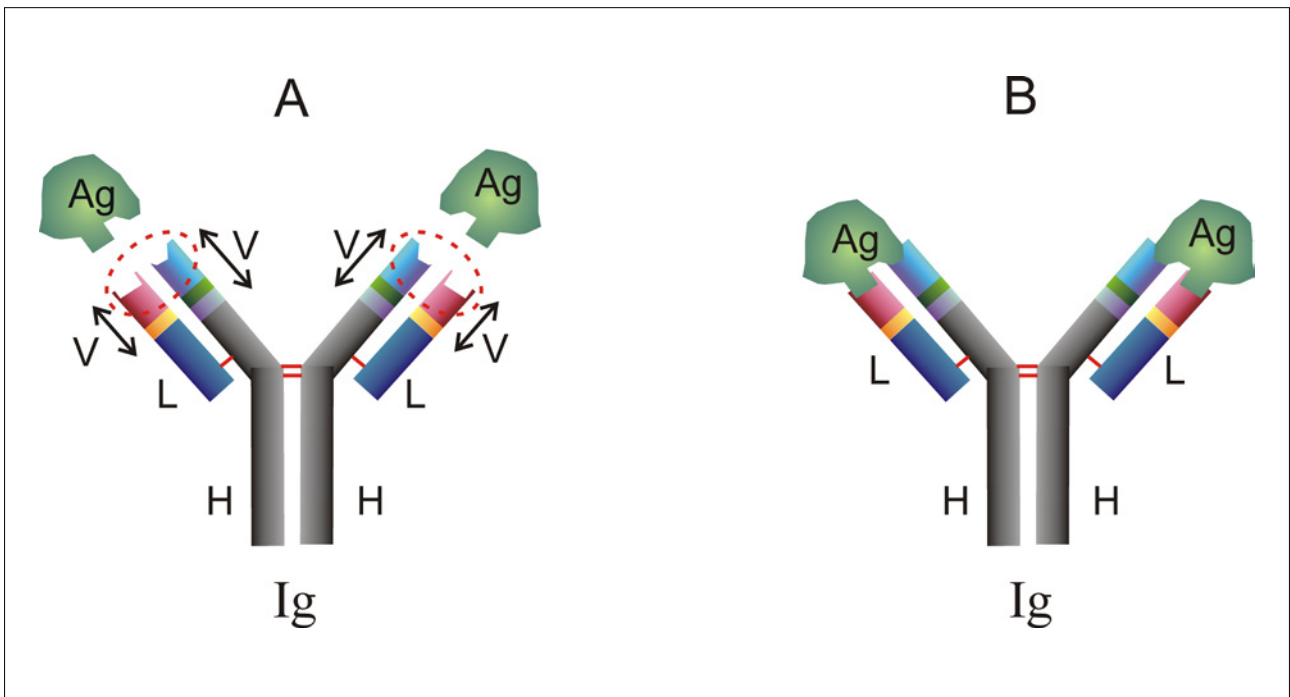


Figura 5. Estructura esquemática de una inmunoglobulina. Las regiones constantes de las cadenas pesadas (H) se representan en color gris y las de las cadenas ligeras (L) en azul oscuro. Las regiones variables de ambas cadenas (V) se representan en colores diferentes. En el panel A el dominio de unión al antígeno (Ag) está encerrado en un círculo con línea roja discontinua. En el panel B se representa el complejo formado con el antígeno.

células idénticas a la que se combinó con el antígeno. La propuesta de Burnet, aunque se publicó en una revista de escasa difusión, se llegó a conocer pronto; la historia de la selección clonal y las controversias que suscitó, se recogieron, con ocasión de su 50 aniversario, en un ilustrativo artículo (Hodgkin et al., 2007). La teoría de la selección clonal dejaba sin explicar el origen de la diversidad natural de los anticuerpos, pero, no obstante, supuso una auténtica revolución en el campo de la Inmunología, que facilitó el que años más tarde Burnet recibiera el premio Nobel de Fisiología o Medicina.

En la actualidad, se conocen con bastante precisión los mecanismos implicados en el proceso de selección clonal. Los linfocitos B, células sanguíneas pertenecientes a la serie blanca, poseen en su superficie unos receptores formados por IgM y otras proteínas. Esas inmunoglobulinas presentan hacia el exterior el sitio de reconocimiento de los antígenos. Cada linfocito sintetiza una inmunoglobulina específica y, como el número de linfocitos B presentes en un adulto es muy elevado (unos 2.000 millones), se estima que pueden existir centenares de millones de inmunoglobulinas diferentes. Cuando un antígeno invade el organismo, alguno de estos linfocitos B podrá unirse a él a través de la molécula de inmunoglobulina que forma parte del receptor de membra-

na. Entonces, con la ayuda de otros linfocitos –los linfocitos T–, la célula B se activa y se multiplica. Todas las células de ese clon resultante de linfocitos B sintetizan moléculas de IgG con la misma especificidad frente al antígeno que las de la superficie. Estas moléculas de IgG se segregan y constituyen los anticuerpos circulantes que, ya en gran cantidad, son capaces de unirse y neutralizar a los antígenos. Antes de que se haya alcanzado un pico de producción y liberación de IgG, los linfocitos segregan temporalmente IgM en forma de pentámeros (Alberts et al., 2002). La figura 6 recoge un esquema simplificado de la selección clonal.

Pero queda por responder una pregunta fundamental. Si la secuencia de una inmunoglobulina viene determinada por la de su mRNA y esta, a su vez, por la del gen, ¿cómo es posible que existan tantas secuencias de inmunoglobulinas, en un número que supera con creces al de genes humanos? Para responder a esta pregunta, es preciso volver a considerar algunos aspectos de la estructura de las inmunoglobulinas. Al secuenciar estas proteínas, se comprobó que, tanto en las cadenas H como en las L, había dos tipos de dominios, uno constante, común para cualquier anticuerpo, y otro variable, específico de cada anticuerpo. Este dominio variable contiene la región por donde se une el antígeno (Figura 5A).

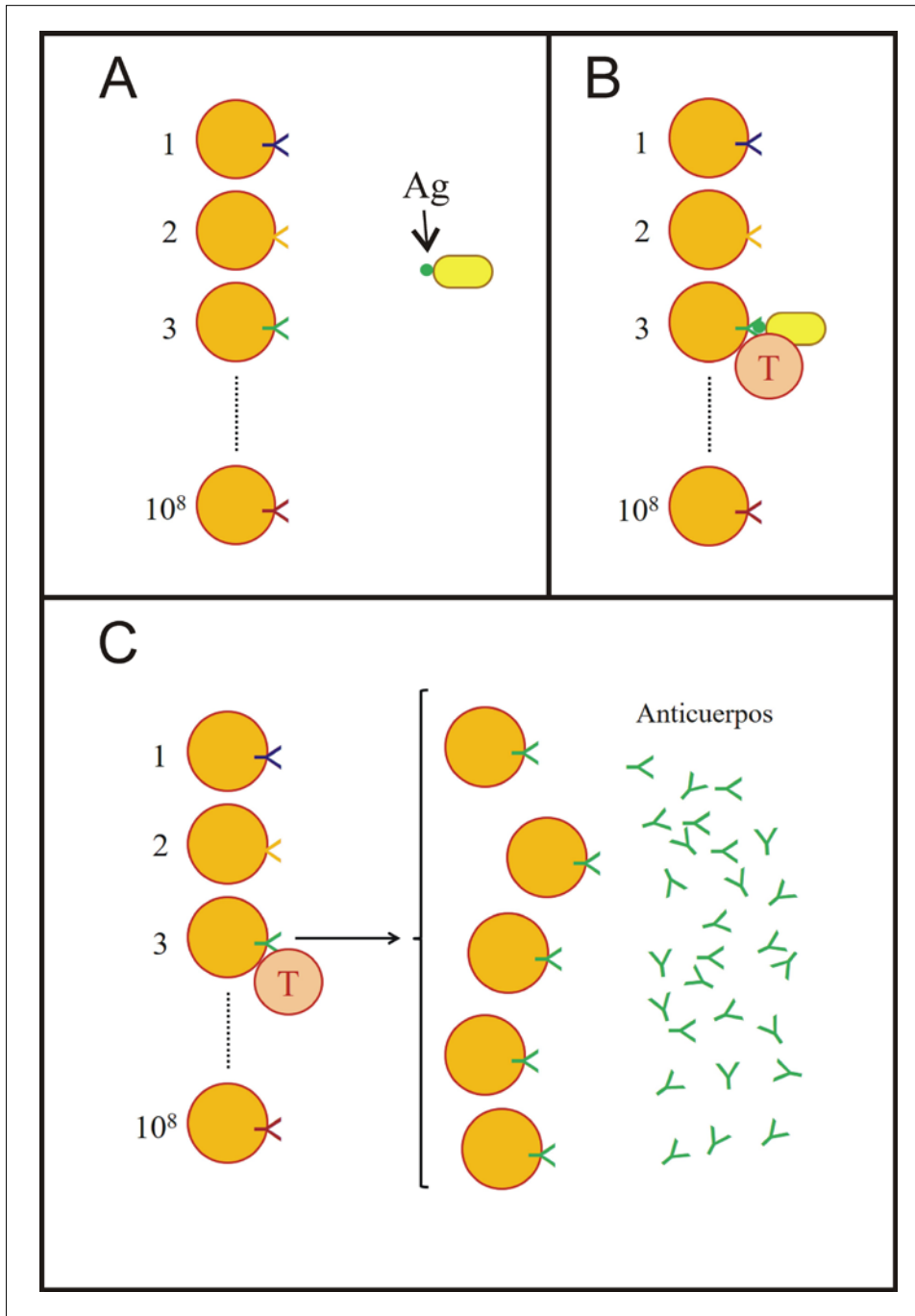


Figura 6. Modelo de selección clonal para la producción de anticuerpos. (A) Los linfocitos B presentan en su superficie receptores que contienen la región variable de inmunoglobulinas. Cuando penetra una sustancia extraña alguno de esos numerosos receptores podrá interaccionar con el antígeno (Ag). (B) El linfocito unido al antígeno recluta un linfocito T. (C) Se activa la proliferación del linfocito B, para dar un clon de numerosos linfocitos, todos ellos con la misma inmunoglobulina, que se libera al suero.

El factor más importante para producir la extraordinaria diversidad de las inmunoglobulinas es que las regiones variables, tanto de las cadenas H como de las L, están codificadas por segmentos de genes separados, que se agrupan en tres bloques, V, D y J, en el caso de las cadenas H y en dos, V y J, en el de las cadenas L. Cada uno de estos bloques posee numerosos segmentos, que, a través de un proceso de recombinación somática, se unen aleatoriamente

para producir el fragmento de DNA que codificará el dominio variable de las inmunoglobulinas. La variabilidad de las inmunoglobulinas resultantes aumenta por la delección variable de nucleótidos en los extremos terminales de algunas secuencias codificantes. Las regiones de DNA que codifican los dominios variables se unen al gen que codifica los dominios constantes y, tras la maduración del mRNA, las cadenas H y L resultantes dan lugar a



la molécula de inmunoglobulina completa. Y, como pueden incorporarse cadenas L de los subtipos λ y κ , se origina una nueva fuente de variabilidad. Finalmente, las secuencias codificantes de los dominios variables son susceptibles de hipermutación somática. De este modo, aparece un número ingente de moléculas de inmunoglobulina a partir de un repertorio limitado de genes. La descripción completa de todos estos procesos (Janeway Jr et al., 2001), se ha resumido en la figura 7.

3.2.1 El test de antígenos

Con estos antecedentes, se puede abordar el estudio del test de antígenos. La técnica se encuadra dentro de las denominadas ensayos de flujo lateral, en los que la muestra líquida que contiene el analito fluye

por capilaridad sobre un soporte que contiene los reactivos que permitirán detectar visualmente la presencia o ausencia de la sustancia buscada (Koczula & Gallotta, 2016), en este caso, el SARS-CoV-2. Desde los primeros meses tras el inicio de la pandemia se pensó aplicar esta técnica al diagnóstico de la COVID-19 y se realizaron cuantiosas inversiones para ello (Iacobucci & Coombes, 2020).

Como en el caso de la PCR, se comienza tomando una muestra del paciente, habitualmente por vía nasofaríngea. El hisopo se introduce en una disolución que libera los antígenos del virus. La gran mayoría de los test comercializados aprobados por la Unión Europea están concebidos para detectar la proteína de la nucleocápsida (https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-07/covid-19_eu-common-list-antigen-tests_en.pdf).

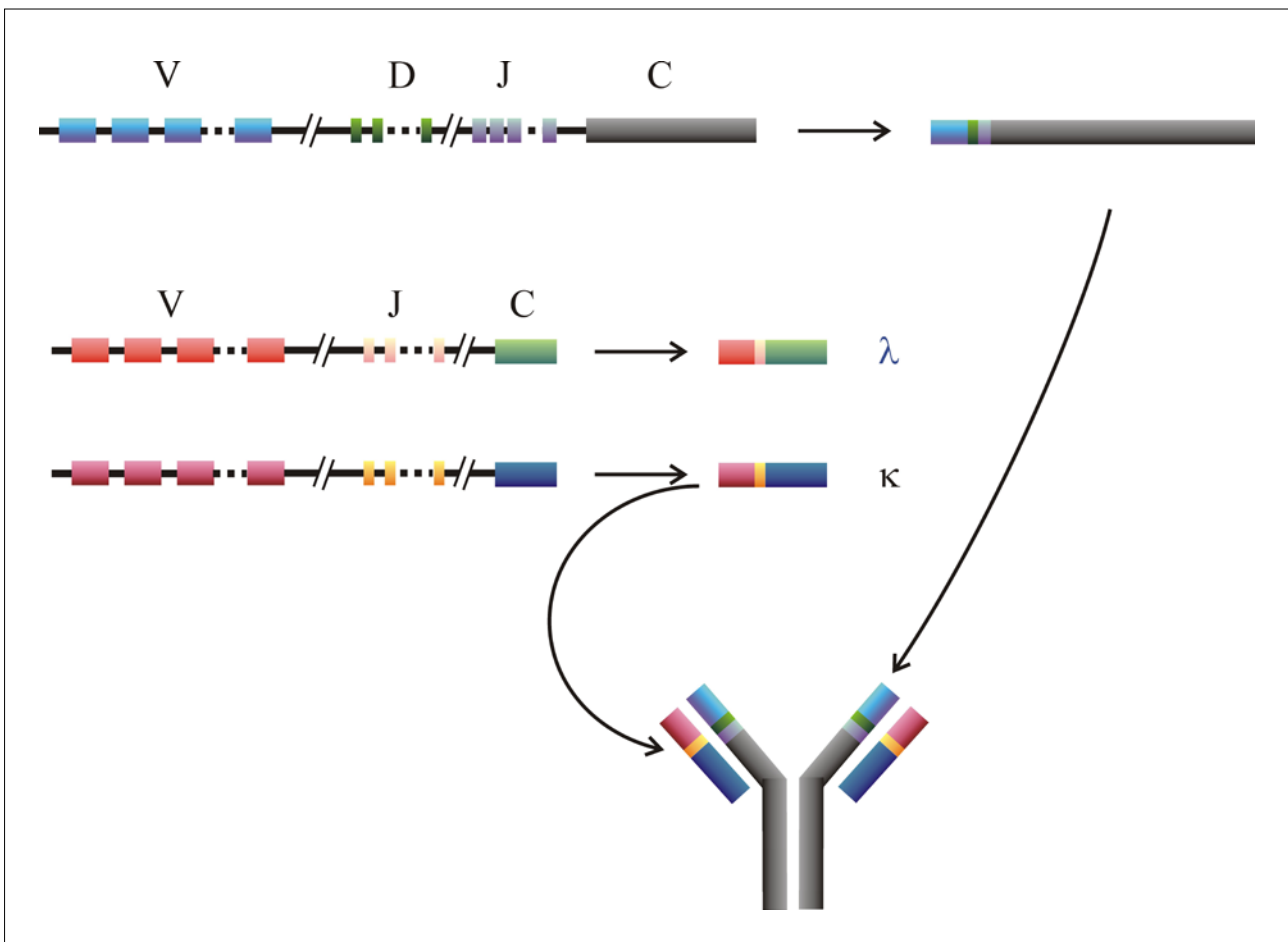


Figura 7. Organización de los genes de las inmunoglobulinas. Las regiones constantes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas están codificadas por un gen C, específico de cada uno de los 5 tipos de inmunoglobulinas. Para las cadenas ligeras, hay un gen C, específico de las cadenas λ y otro de las cadenas κ , que codifican la región constante de dichas cadenas. Además, hay un número grande de segmentos que codifican las regiones variables. Estos segmentos se distribuyen en tres grupos en el caso de las cadenas pesadas y en dos en las ligeras. La maduración de los genes pasa por la recombinación al azar de los segmentos V, D y J (en las cadenas pesadas) y los segmentos V y J en las ligeras, con lo que puede llegar a un número muy elevado de posibles secuencias proteicas.

El aspecto externo del dispositivo empleado es familiar; la carcasa exterior tiene una abertura para depositar la muestra líquida y una ventana que permite visualizar el resultado (Figura 8), pero ahora cabe examinar la organización interna del dispositivo. A lo largo del interior está extendida la membrana y en una zona comprendida entre la abertura de aplicación de la muestra y la ventana de observación están depositados anticuerpos específicos frente al antígeno, conjugados con alguna sustancia que permita su detección visual. Lo más ordinario es utilizar nanopartículas de oro coloidal, que poseen color rojo. Si en la muestra está presente la proteína N, al difundir por la membrana y llegar a la zona donde se encuentran los anticuerpos, se combinará con ellos (Fig. 8). Es importante que la cantidad de muestra que se aplique sea suficiente para dar lugar a una fijación

observable de anticuerpos, pero, al mismo tiempo, lo suficientemente baja como para que queden anticuerpos libres.

En la zona de la ventana se encuentran dos líneas. En una de ellas (T) se fijan anticuerpos frente a la proteína N, pero sin conjugar con oro coloidal. En la otra, (C) hay anticuerpos frente a la propia inmunoglobulina que constituye los anticuerpos frente a N. Evidentemente, las moléculas de anticuerpo unidas a la proteína N que vayan difundiendo a lo largo de la membrana, al llegar a la línea T quedarán retenidas, mientras que las que no vayan unidas a la proteína N pasarán de largo, pero quedarán retenidas en la línea C. De esta manera, si hay virus en la muestra, aparecerá una coloración roja en la línea T. Para que un test sea válido, debe aparecer colo-

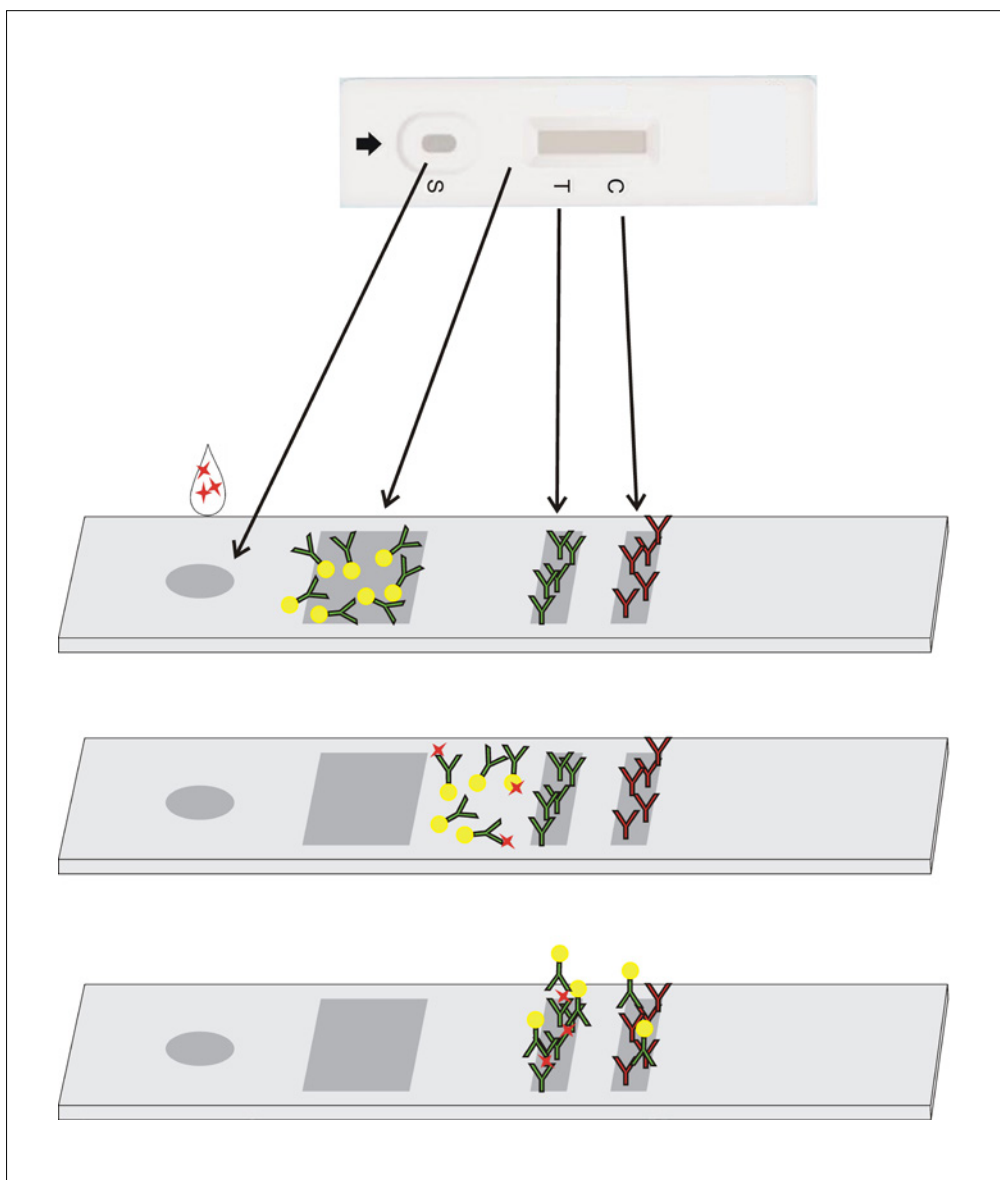


Figura 8. Fundamento del test de antígenos. La muestra se deposita en el pocillo S. Los antígenos que contiene se simbolizan como estrellas rojas. Entre el pocillo S y la ventana de observación se encuentran anticuerpos frente al antígeno conjugados con oro coloidal. En la línea T se encuentran inmovilizados anticuerpos frente al antígeno y en la línea C, anticuerpos frente a las inmunoglobulinas. Al difundir la muestra, el antígeno se unirá a las inmunoglobulinas marcadas con oro coloidal y estas, al seguir difundiendo, se unirán a los anticuerpos inmovilizados en la línea T. El exceso de inmunoglobulinas marcadas con oro coloidal lo hará en la línea C. La aparición de color en la línea C indica que el test se ha realizado correctamente y la coloración en la línea T indica que había antígenos en la muestra. Por el contrario, la ausencia de color en la línea T significa que la muestra no contenía antígenos.



reada la línea C (control); se considera positivo si además aparece color en la línea T (test) y negativo cuando no aparece color en ella.

Raro es el día que no aparezca en los medios de comunicación alguna noticia sobre nuevas variantes del virus. Es lógico que así suceda, porque, además de las mutaciones que alteran el genoma de los virus, al carecer de los sistemas de reparación que poseen los organismos superiores, en los coronavirus no se corrigen los errores que puedan darse en la replicación de su material genético. Todo ello favorece la aparición de nuevas variantes, algunas de las cuales, por un proceso de selección natural, tienden a imponerse sobre las variantes anteriores. Ante esta situación surge inmediatamente la pregunta de si los test de antígenos, diseñados para cepas iniciales del SARS-CoV-2, son eficaces para detectar las nuevas variantes.

Dado el tamaño pequeño del genoma del SARS-CoV-2, la secuenciación de su RNA -previa conversión al correspondiente cDNA- es tarea fácil con la tecnología de que se dispone actualmente. De hecho, el 3 de febrero de 2020, es decir, poco antes de cumplirse los dos meses de la hospitalización del primer paciente en Wuhan, ya se publicó la secuencia completa del virus (Wu et al., 2020). Y es habitual que, ante la sospecha de encontrarse ante una nueva variante del virus, los especialistas opten por secuenciar el genoma de los virus sospechosos. Buena muestra de ello es que a principios de 2022 se conocieran unos 7 millones de secuencias, número al que se vienen añadiendo unas 800.000 cada mes en todo el mundo, como se puede comprobar consultando la página web del National Center for Biotechnological Information de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de Estados Unidos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>). Así se han detectado las variantes más extendidas, de las que se incluyeron como preocupantes las designadas alfa, beta, y gamma; actualmente se consideran preocupantes delta y ómicron. De esta última se han descrito hasta la fecha 8 linajes. La mayoría de las mutaciones tienen lugar en las proteínas de la espícula. En el caso concreto de la variante ómicron, esas mutaciones hacen que la espícula se adapte mejor al receptor ACE2, con la consecuencia de que su infectividad es mayor que la de la cepa original del SARS-CoV-2. Las variantes en las que resulta afectada la espícula pueden presentar cierto escape a la protección inmunológica, puesto que la resistencia generada por la infección o por la vacunación se basa casi siempre en los antígenos de la espícula (Harvey et al., 2021). Pero la proteína N, que se usa como antígeno en la mayoría de los test, presenta mucha menos variación genética, de modo que el test de antígenos es también eficaz para detectar esas variantes.

3.2.2 El test de anticuerpos

El test de anticuerpos, aunque se basa en los mismos principios que el de antígenos, tiene una finalidad diversa. Más que para diagnosticar la infección, es útil para conocer sus consecuencias.

Es también un ensayo de flujo lateral, en el que se pretende determinar la existencia de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 en fluidos corporales, generalmente sangre. El dispositivo empleado es exteriormente similar al del test de antígenos, con la salvedad de que en la ventana de observación aparecen tres líneas (Figura 9). En la primera de ellas, marcada como IgM, está fijado a la membrana un anticuerpo frente a la IgM humana. En la segunda, rotulada IgG, se ha fijado un anticuerpo frente a IgG humana, mientras que, en la tercera, de control, se fija un anticuerpo frente a una inmunoglobulina no humana, por ejemplo, IgM de pollo o de conejo. En el espacio entre el pocillo de aplicación de la muestra y la ventana de observación, se disponen antígenos de SARS-CoV-2 conjugados con oro coloidal y un anticuerpo frente a la inmunoglobulina no humana que se haya fijado en la línea de control, también conjugado con oro coloidal.

La muestra de sangre se deposita en su lugar. En el ejemplo de la figura 9, la sangre del paciente, por haber padecido la infección, contenía anticuerpos frente al virus, IgM e IgG. Al comenzar la difusión, estos anticuerpos se encuentran con el antígeno marcado con oro coloidal, que queda unido a las inmunoglobulinas. A medida que continúa el proceso de difusión y se llega a la línea IgM, los complejos IgM-antígeno-oro coloidal se fijarán a la anti-IgM humana y aparecerá coloración roja en la línea. Cuando el frente de difusión llegue a la línea IgG, análogamente los complejos IgG-antígeno-oro coloidal se unirán a la anti-IgG humana y se coloreará la línea. Finalmente, la anti-Ig no humana marcada con oro coloidal se fijará a la Ig de la línea de control (Figura 9). De esta manera, la aparición de color en la línea de control indica que el proceso de difusión ha sido correcto, mientras que la coloración en las líneas IgM o IgG indica que el suero del paciente contenía los anticuerpos correspondientes.

Evidentemente, el test de anticuerpos no es útil para diagnosticar el inicio de la infección por coronavirus, sino para seguir su curso y la adquisición de defensas por el paciente. Los resultados que proporciona son -como mucho- semicuantitativos: la intensidad de color en las líneas da una idea de la concentración de anticuerpos en el suero. Pero en algunos casos, es preciso cuantificar el nivel de anticuerpos, por ejemplo, cuando se desea seguir el curso de la inmunización adquirida por infec-

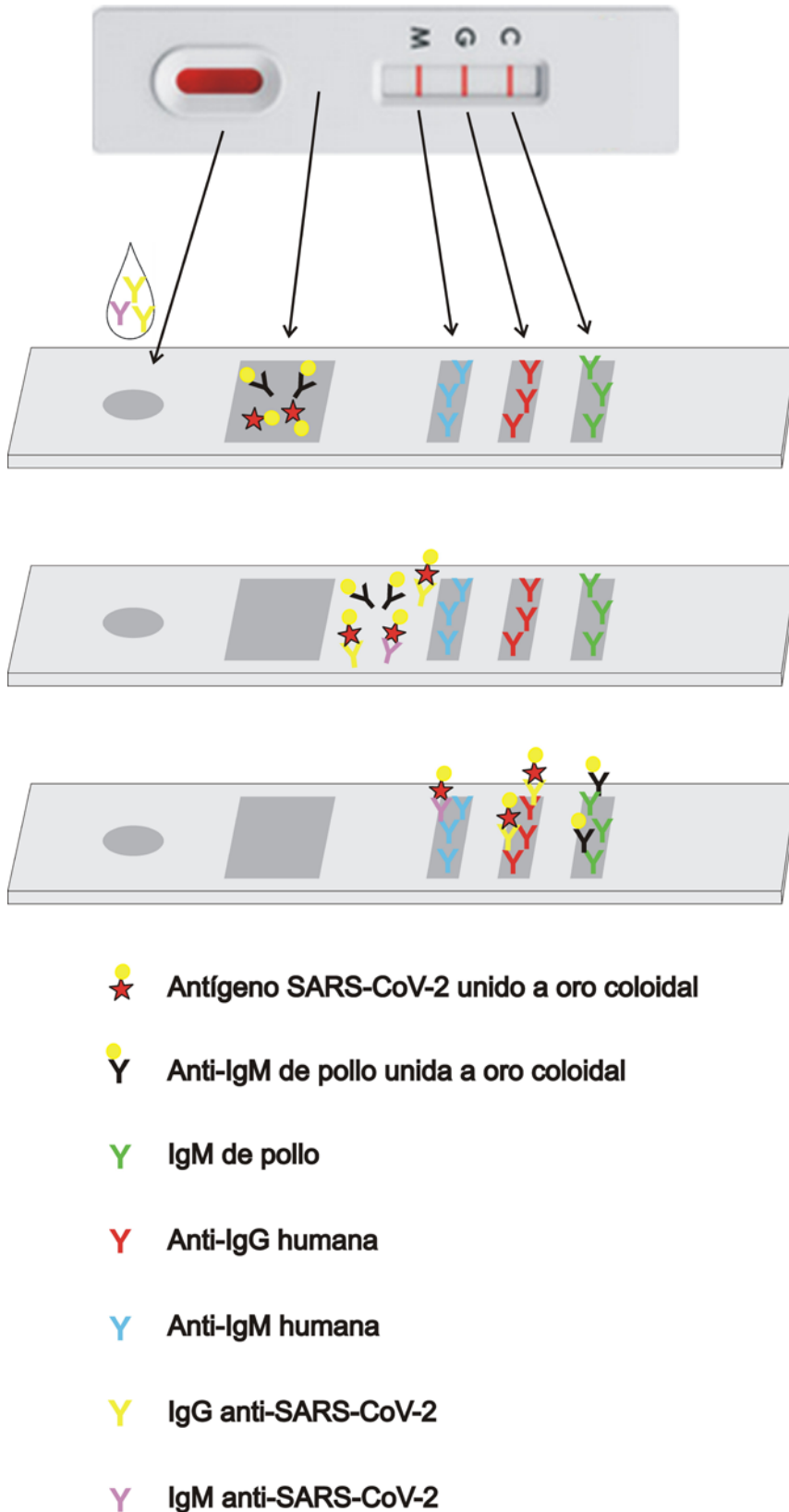
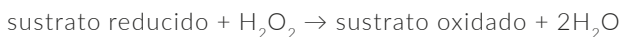


Figura 9. Fundamento del test de anticuerpos. El dispositivo tiene una organización similar a la del test de antígenos, pero en la ventana de observación hay tres líneas, M, G y C. En la zona entre el pocillo de aplicación de la muestra y la ventana de observación se encuentran antígenos y una inmunoglobulina no humana todo conjugado a oro coloidal. Las distintas inmunoglobulinas que se inmovilizan en las líneas M, G, y C se especifican en la leyenda de la propia figura. En el panel inferior de la figura se observa el resultado final: en este caso, la muestra contenía anticuerpos del tipo IgM y del tipo IgG, con lo que aparecen coloreadas las líneas M y G. La coloración de la línea de control, C, indica que el test se ha realizado correctamente.

ción o por vacunación. Entonces se suele recurrir a la técnica conocida por el acrónimo ELISA (**Enzyme-Linked Immunosorbent Analysis**), que se describe en la siguiente sección.

3.2.3 El ensayo ELISA

El ensayo ELISA, se describió en 1972 (Engvall & Perlmann, 1972). En la actualidad se suele realizar en placas desechables que contienen numerosos pocillos de reacción. En el fondo de ellos se fija el antígeno cuyo anticuerpo se desea analizar, por ejemplo, la proteína de la espícula del SARS-CoV-2. Sobre el pocillo se añade la muestra de suero sanguíneo del paciente. Si contiene anticuerpos frente al virus, estos se unirán al antígeno y quedarán adheridos al fondo de la placa. Tras un lavado para eliminar el exceso de componentes del suero, se añade un anticuerpo frente a la inmunoglobulina (IgG o IgM) que se desea analizar conjugado con una enzima, que catalice la formación de un producto coloreado a partir de un sustrato específico. Es frecuente utilizar la enzima peroxidasa, que cataliza la reacción:



Normalmente, se busca un sustrato reducido incoloro, cuya forma oxidada absorba luz visible. Tras lavar de nuevo el pocillo y añadir una disolución del sustrato reducido, aparecerá un color cuya intensidad será proporcional a la cantidad de enzima que quede adherida. Y como esta se encuentra conjugada con el anticuerpo frente a la inmunoglobulina que se desea analizar, la cantidad de enzima será proporcional a la cantidad de esta inmunoglobulina (Figura 10).

Existen en el mercado lectores de microplacas que permiten determinar la absorbancia de cada uno de los pocillos, con lo que la adquisición de los datos es fácil y rápida. Si se construye una curva de calibración con diluciones sucesivas, es posible determinar unos valores relativos de concentración del anticuerpo correspondiente, que son suficientes para evaluar la evolución de la inmunidad adquirida por un paciente.

Aunque se utilicen con menos frecuencia, los ensayos ELISA pueden también emplearse para la valoración cuantitativa de antígenos, si se fijan en el fondo de los pocillos los anticuerpos correspondientes y el anticuerpo conjugado con la enzima está dirigido contra el antígeno.

4. COMPARACIÓN DE LA VALIDEZ DE LA PCR Y DE LOS MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Los métodos que se han comentado hasta ahora, PCR, test de antígenos y de anticuerpos y ensayos ELISA, son los más frecuentes en el laboratorio para estudiar la infección por coronavirus. Pero no todos tienen igual valor. La PCR y el test de antígenos son útiles para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, mientras que el test de anticuerpos y el ensayo ELISA se emplean para el seguimiento del curso de la enfermedad. La tabla I recoge las principales características de los cuatro métodos.

Es frecuente la duda acerca del momento adecuado para realizar o repetir las diferentes pruebas de

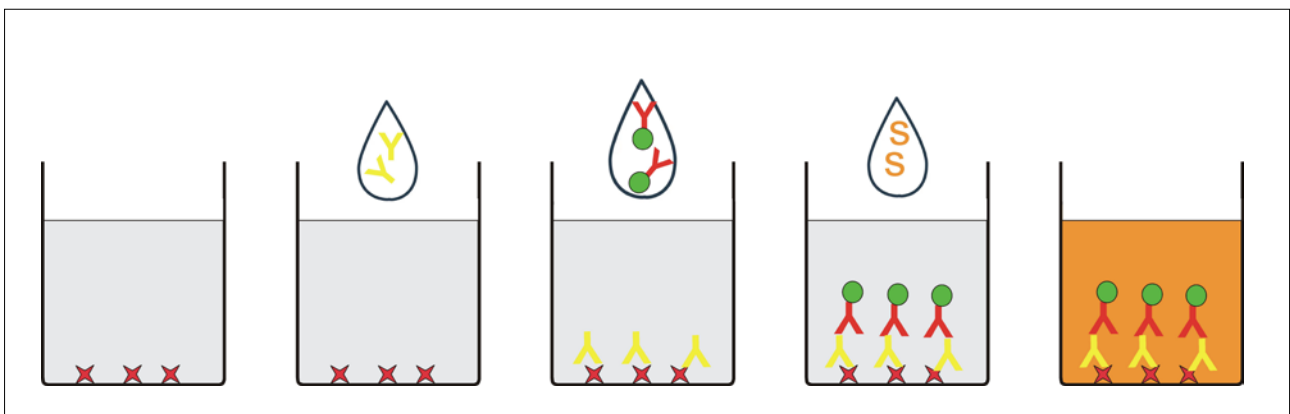


Figura 10. Esquema de un ensayo ELISA para cuantificar anticuerpos. De izquierda a derecha, se muestran las sucesivas operaciones que se realizan en un pocillo en cuyo fondo se ha fijado un antígeno (simbolizado por las estrellas rojas): adición de la muestra (en color amarillo los anticuerpos que se desean analizar); los anticuerpos se combinan con el antígeno; se añade un anticuerpo (en color rojo) frente al anticuerpo que se desea analizar, conjugado con una enzima (círculos verdes), que debe ser capaz de catalizar una reacción en la que el sustrato dé un producto coloreado; adición de una disolución del sustrato (S); aparecerá un color de intensidad proporcional a la cantidad de enzima fijada y, por tanto, en último término, a la del anticuerpo que se quiere cuantificar.

Método	Sensibilidad	Rapidez	Costo	Otras características	Utilidad
PCR	Alta	horas	Elevado	Requiere laboratorio	Diagnóstico
Test de antígenos	Baja	15 min	Bajo	Se puede hacer <i>in situ</i>	Diagnóstico
Test de anticuerpos	Media	15 min	Bajo	Se puede hacer <i>in situ</i>	Determinación inmunidad
ELISA	Alta	horas	Medio	Requiere laboratorio	Determinación inmunidad

Tabla 1. Comparación de características de los principales métodos para la detección del SARS-CoV-2 y para el seguimiento del curso de la enfermedad.

diagnóstico o seguimiento de la infección. Para resolverla, hay que tener en cuenta que una semana después del contagio, aún antes del inicio de los síntomas, los componentes del virus ya están presentes en las muestras nasofaríngeas en cantidad suficiente para ser detectados por la PCR y por el test de antígenos.

Sin embargo, el pico de ambas pruebas no se da hasta unos días después del inicio de los síntomas. Unos 8-10 días después de la aparición de los síntomas, el test de antígenos ya no suele detectar las proteínas del virus, pero la PCR, por su mayor sensibilidad, puede seguir dando resultados positivos hasta 5 o 6 semanas después de la aparición de los síntomas. Es posible que, a partir de la cuarta semana, aunque la PCR detecte la presencia del RNA viral, no se trate ya de partículas víricas infecciosas. Los test de anticuerpos, como requieren que se haya producido una respuesta inmune para poder detectarlos, no comienzan a dar resultados positivos hasta 8 o 10 días después de la aparición de los síntomas y su pico de respuesta suele estar en torno a las 3 semanas. Como el nivel de IgG es más duradero que el de IgM, esta última deja de observarse normalmente en torno a la sexta semana, mientras que la IgG, aunque su nivel va decreciendo, sigue siendo detectada por el test de anticuerpos meses después de la infección (Guglielmi, 2020).

CONFLICTO DE INTERESES

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en el presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Abramson, R. D. (1995). Thermostable DNA polymerases. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, & J. J. Sninsky (Eds.), PCR Strategies (pp. 39–57). Academic Press Inc.
2. Aguiar, E. R. G. R., Navas, J., & Pacheco, L. G. C. (2020). The COVID-19 diagnostic technology landscape: Efficient data sharing drives diagnostic development. *Frontiers in Public Health*, 8, 309.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). B cells and antibodies. En *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
4. Almeida, J. D., Berry, D. M., Cunningham, C. H., Hamre, D., Hofstad, M. S., Mallucci, L., McIntosh, K., & Tyrrell, D. A. J. (1968). Coronaviruses. *Nature*, 220, 650.
5. Bessman, M. J., Lehman, I. R., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 233, 171–177.
6. Bresch, C. (1964). *Klassische und molekulare Genetik*. Springer-Verlag. Traducción española, *Genética clásica y molecular*, Rialp, Madrid, 1966. ISBN 978-84-321-0244-8.
7. Burnet, F. M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *The Australian Journal of Science*, 20, 67–69.



8. Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., Beskid, T. R., Jervy, S. R., & Liu, C. (2020). Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Central Science*, 6(5), 591–605.
9. Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 12, 138–163.
10. Dhamad, A. E., & Abdal Rhida, M. A. (2020). COVID-19: Molecular and serological detection methods. *PeerJ*, 8, 1–18.
11. Edelman, G. M., & Poulik, M. D. (1961). Studies on structural units of the gamma-globulins. *Journal of Experimental Medicine*, 113(4), 861–884.
12. Eftekhari, A., Alipour, M., Chodari, L., Dizaj, S. M., Ardalan, M. R., Samiei, M., Sharifi, S., Vahed, S. Z., Huseynova, I., Khalilov, R., Ahmadian, E., & Cucchiari, M. (2021). A comprehensive review of detection methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms*, 9(2), 1–18.
13. Engvall, E., & Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 109(1), 129–135.
14. Escobar, J., Pereda, J., Arduini, A., Sandoval, J., Sabater, L., Aparisi, L., López-Rodas, G., & Sastre, J. (2010). Protein phosphatases and chromatin modifying complexes in the inflammatory cascade in acute pancreatitis. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 1, 75–80.
15. Escobar, J., Pereda, J., Arduini, A., Sandoval, J., Sabater, L., Aparisi, L., Vento, M., López-Rodas, G., & Sastre, J. (2010). Role of redox signaling, protein phosphatases and histone acetylation in the inflammatory cascade in acute pancreatitis: Therapeutic implications. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, 9, 97–108.
16. Escobar, J., Pereda, J., López-Rodas, G., & Sastre, J. (2012). Redox signaling and histone acetylation in acute pancreatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 819–837.
17. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., L., W. N., Rosenblatt, J. E., Cockerill III, F. R., & Smith, T. F. (2006). Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 165–256.
18. Gudiol, F. (2006). "Ojo clínico" y evidencia científica. *Educación Médica*, 8, S21–S23.
19. Guglielmi, G. (2020). Fast coronavirus tests are coming. *Nature*, 585, 496–498.
20. Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., Ludden, C., Reeve, R., Rambaut, A., Peacock, S. J., & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 409–424.
21. Hirotsu, Y., Maejima, M., Shibusawa, M., Nagakubo, Y., Hosaka, K., Amemiya, K., Sueki, H., Hayakawa, M., Mochizuki, H., Tsutsui, T., Kakizaki, Y., Miyashita, Y., Yagi, S., Kojima, S., & Omata, M. (2020). Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 99, 397–402.
22. Hodgkin, P. D., Heath, W. R., & Baxter, A. G. (2007). The clonal selection theory: 50 years since the revolution. *Nature Immunology*, 8(10), 1019–1027.
23. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.
24. Iacobucci, G., & Coombes, R. (2020). Covid-19: Government plans to spend £100bn on expanding testing to 10 million a day. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 370, m3520.
25. Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The generation of diversity in immunoglobulins. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (5th edition)*. Garland Science.
26. Jerne, N. K. (1955). The natural-selection theory of antibody formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41(11), 849–857.
27. Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 111–120.
28. Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 233, 163–170.
29. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.



30. López-Iranzo, F. J., López-Rodas, A. M., Franco, L., & López-Rodas, G. (2020). Pentoxifylline and oxypurinol: Potential drugs to prevent the “Cytokine release (Storm) syndrome” caused by SARS-CoV-2? *Current Pharmaceutical Design*, 26(35), 4515–4521.
31. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*, 395(10229), 1033–1034.
32. Meselson, M., & Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(7), 671–682.
33. Moore, B. J. B., & June, C. H. (2020). Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 368, 473–474.
34. Mullis, K. B. (1994). The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 33, 1209–1213.
35. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51, 263–273.
36. Rong, G., Zheng, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Zhu, P., & Sawan, M. (2023). COVID-19 diagnostic methods and detection techniques. *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*, January, 17–32.
37. Sandoval, J., Escobar, J., Pereda, J., Sacilotto, N., Rodríguez, J. L., Sabater, L., Aparisi, L., Franco, L., López-Rodas, G., & Sastre, J. (2009). Pentoxifylline prevents loss of PP2A phosphatase activity and recruitment of histone acetyltransferases to proinflammatory genes in acute pancreatitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331, 609–617.
38. Sandoval, J., Pereda, J., Pérez, S., Finamor, I., Vallet-Sánchez, A., Rodríguez, J. L., Franco, L., Sastre, J., & López-Rodas, G. (2016). Epigenetic regulation of early-and late-response genes in acute pancreatitis. *Journal of Immunology*, 197(10), 4137–4150.
39. Temin, H. M., & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211–1213.
40. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269.
41. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733.

Si desea citar nuestro artículo:

Franco Vera L. Herramientas moleculares en el diagnóstico de la Covid-19. *RACSG.2023;112(01): 49-66*. [rac.2023.112.1.org05](https://doi.org/10.11211.1.org05)