



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Desarrollo y aplicación de técnicas innovadoras de biología molecular para mejorar la detección del SARS-CoV-2 durante la pandemia de COVID-19

Franklin Rómulo Aguilar-Gamboa^{1,2,a*} 

1. Laboratorio de Inmunología – Virología. Dirección de Investigación. Hospital Regional Lambayeque
2. Grupo de Investigación en inmunología y Virología del Norte. Lambayeque, Perú.
- a. Licenciado en Microbiología y Parasitología.

***Correspondencia:**Franklin Rómulo Aguilar-Gamboa
correo: faguilar@hrlamb.gob.pe**Resumen**

La biología molecular ha desempeñado un papel fundamental en el diagnóstico y detección del virus SARS-CoV-2 desde el inicio de la pandemia de COVID-19. Aunque la técnica de RT-PCR se considera el estándar de oro para la detección del virus, las realidades sociopolíticas y epidemiológicas de cada región del planeta han llevado a la implementación de otras técnicas complementarias para su detección. El uso de técnicas moleculares como PCR digital, LAMP-PCR, CrispR - Cas y NGS han permitido una detección precisa y rápida del virus, especialmente en pacientes con síntomas, pero con una carga viral baja. Por lo tanto, se busca mejorar el uso y la disponibilidad de estas herramientas en el campo futuro. El desarrollo de estas técnicas de diagnóstico molecular durante la pandemia ha demostrado su gran potencial para el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas, ya que ofrecen ventajas como una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico. En consecuencia, estas técnicas pueden mejorar significativamente la precisión y la velocidad del procesamiento, lo que contribuiría a una mejor gestión y prevención de enfermedades infecciosas en todo el mundo.

Palabras clave: Biología molecular; COVID-19; Técnicas y Procedimientos Diagnósticos (DECS: BIREME)

Development and application of innovative molecular biology techniques to improve the detection of SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic**Abstract**

Molecular biology has been key in the detection and diagnosis of SARS-CoV-2 virus since the beginning of the COVID-19 pandemic. Although RT-PCR is the Gold Standard technique to detect the virus, the socio-political and epidemiological reality of each region of the planet has motivated the use of other complementary techniques for its detection. The use of molecular techniques such as digital PCR, LAMP, CrispR cas and NGS have allowed rapid and accurate detection of the virus, especially in people with symptoms but with a low viral load. Thus, the aim for the future is to improve their use and availability in the field. In view of their development during the pandemic, it has been seen that these molecular diagnostic techniques have great potential for the diagnosis of other infectious diseases, as they offer advantages such as greater sensitivity and specificity compared to traditional diagnostic methods. Thus, they can significantly improve the accuracy and speed of processing, which can lead to better management and prevention of infectious diseases worldwide.

Keywords: Molecular Biology; COVID-19; Diagnostic Techniques and Procedures (MESH)

INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19 ha tenido un impacto sin

precedentes en la salud y el bienestar de millones de personas en todo el mundo. Desde el inicio de la pandemia, la biología molecular ha desempeñado un papel crucial en la detección

y diagnóstico del virus SARS-CoV-2, agente causante de la enfermedad COVID-19. Esta herramienta diagnóstica permitió identificar el origen de la epidemia, que comenzó el 12 de diciembre de 2019, mediante el análisis de secuencias proteicas de siete dominios no estructurales conservados en las primeras muestras recuperadas. Gracias a este enfoque, se pudo determinar que este virus pertenecía a la especie del SARS-CoV en tan solo un par de semanas ⁽¹⁾.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha sido clave para la detección rápida y precisa del SARS-CoV-2, lo que ha sido esencial para controlar la propagación de la enfermedad. En este sentido, la evolución de estas técnicas ha jugado un papel fundamental en la lucha contra la pandemia de COVID-19. Aunque la técnica de PCR se considera el estándar de oro para la detección del virus, la realidad sociopolítica y epidemiológica de cada región del planeta; que incluyen factores como los costos, la disponibilidad de reactivos y personal especializado, así como la necesidad de recopilar datos adicionales del virus, ha motivado el empleo de otras técnicas complementarias. Estas técnicas, algunas equivalentes al PCR, y otras con mejor especificidad para la detección del virus, han permitido detectar la presencia del virus en personas sintomáticas con una baja carga viral, mejorar su uso y disponibilidad en el campo e, incluso, determinar la presencia de nuevas variantes ^(2,3).

En este artículo se examinan los avances y logros alcanzados en la detección del SARS-CoV-2 a través de las técnicas de biología molecular, y cómo estos avances han permitido un diagnóstico temprano y preciso de la enfermedad. Asimismo, se discute cómo estas técnicas podrían emplearse en el futuro para mejorar la detección y diagnóstico de otras enfermedades, tanto infecciosas como no infecciosas.

DESARROLLO

Técnicas de flujo lateral para el apoyo al diagnóstico de COVID-19

La técnica de RT-PCR ha desempeñado un papel fundamental en el diagnóstico y control de la enfermedad COVID-19. Su alta sensibilidad y especificidad, así como su rapidez, la convirtieron en una herramienta clave en la lucha contra la pandemia. Es por ello que se considera como la prueba *gold standard* para la detección de SARS-CoV-2; sin embargo, también es importante tener en cuenta sus limitaciones ya que la técnica requiere equipos, reactivos y personal especializado, lo que genera costos elevados y dificultan su implementación en países con recursos limitados. Además, con la propagación acelerada del virus y la falta de conocimiento y recursos, se necesitaron de medidas rápidas y efectivas para controlar su expansión. En este contexto, se consideraron a las pruebas de flujo lateral o llamadas coloquialmente "pruebas rápidas" como herramientas para el diagnóstico y el control de la enfermedad, aunque su mal uso, aplicación e interpretación tuvieron consecuencias

negativas en la lucha contra la pandemia. La baja sensibilidad de las pruebas serológicas de flujo lateral en comparación con las pruebas moleculares, provocaron falsos negativos en pacientes con COVID-19. Además, la posibilidad de detectar anticuerpos contra otros coronavirus distintos al SARS-CoV-2, indujo a resultados falsos positivos ^(4,5).

Durante el inicio de la pandemia, muchas pruebas rápidas fueron adquiridas y utilizadas sin la debida validación y aprobación de las autoridades sanitarias; además, la interpretación de los resultados no siempre fue clara y los resultados positivos fueron utilizados como diagnóstico definitivo de COVID-19, sin la confirmación mediante pruebas moleculares. Las principales limitaciones de estas pruebas se evidenciaron durante los periodos de ventana. Estos son momentos en los que la carga viral puede ser lo suficientemente alta como para que una persona sea contagiosa, pero aún no se ha manifestado completamente en síntomas reconocibles. Durante estos periodos, existe el riesgo de una mala interpretación de los resultados de las pruebas, lo que puede tener repercusiones negativas en la propagación del virus.

Los periodos de ventana de la enfermedad en las pruebas de detección de COVID-19 pueden variar según la persona y las características individuales de la infección; sin embargo, en general, se considera que el periodo de ventana puede ocurrir antes de que los síntomas se manifiesten o en las etapas iniciales de la enfermedad. Por este motivo, las pruebas rápidas presentaron muchas limitaciones desde el inicio de su implementación. A pesar de ello, algunos estudios avalaron su uso y destacaron su mayor rendimiento en campo comparado con la RT-PCR ⁽⁶⁾, algo que probablemente estuvo motivado por temas socio políticos en los países donde se ejecutaron. De cualquier modo, el mal uso, aplicación e interpretación de las pruebas de flujo lateral llevó a dificultades en el diagnóstico y probablemente contribuyó a una propagación incontrolada del virus. Además, muchos pacientes fueron tratados incorrectamente o no recibieron tratamiento en absoluto debido a la falta de confirmación de los resultados ⁽⁷⁾.

Por otro lado, hacia finales del primer año de pandemia, se hizo extensivo el uso de pruebas de antígenos específicas del SARS-CoV-2 en las muestras de las vías respiratorias, las cuales fueron más útiles para determinar presencia del virus que las pruebas serológicas. Estas pruebas proporcionan resultados rápidos en comparación con las pruebas moleculares como la RT-PCR, y fueron menos costosas y más fáciles de realizar; aunque también presentaron limitaciones significativas respecto al *gold standard* ya que no son tan sensibles como las pruebas moleculares y suscitaron problemas de falsos negativos en pacientes con COVID-19 ⁽⁸⁾ y algunos otros pocos casos falsos positivos ⁽⁹⁾. Sin embargo, la sensibilidad de las pruebas de antígenos varía según la calidad de la muestra y el momento de la prueba en relación con el inicio de los síntomas. En general, se comprendió que estas pruebas son menos sensibles en las

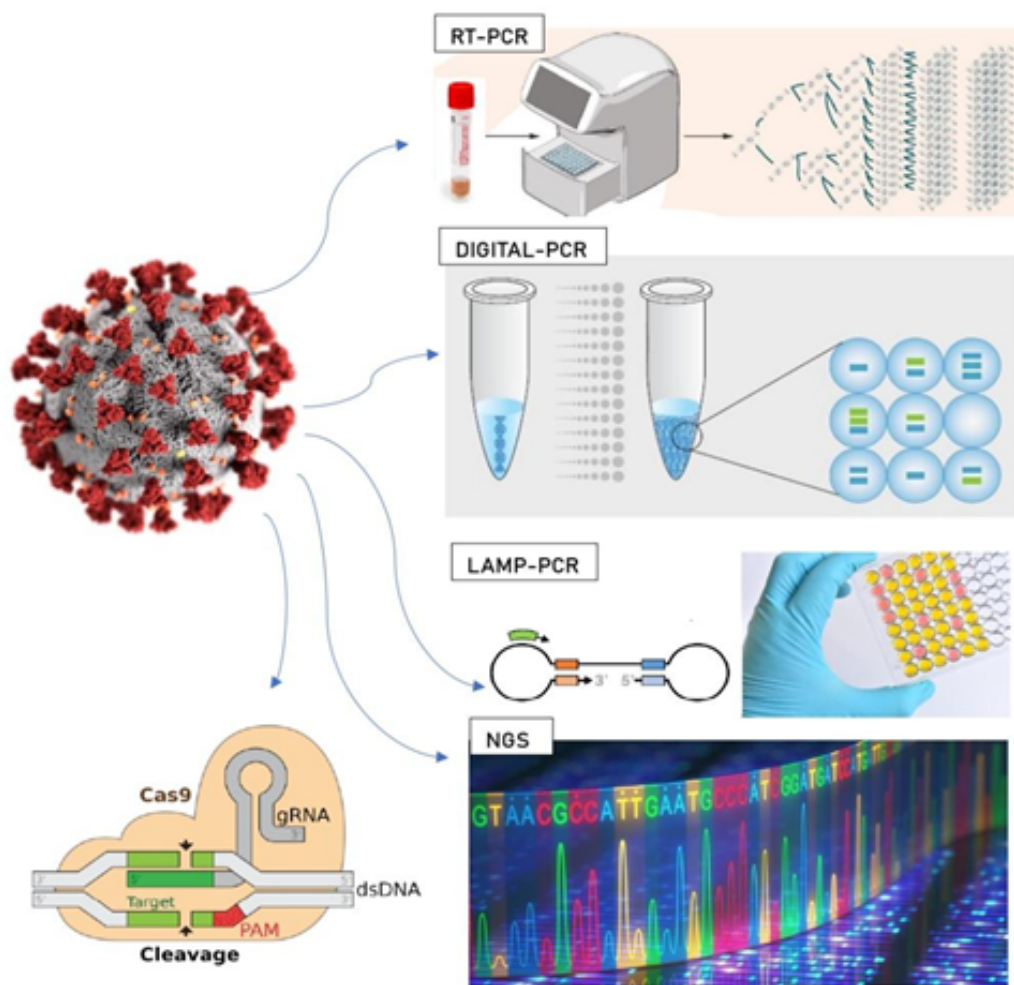


Figura 1. Técnicas en biología molecular que fueron empleadas para la detección SARS-CoV-2. Figura adaptada a partir de Bio-rad.com⁽³⁴⁾, tecnosolucionescr.net⁽³⁵⁾ y de iaea.org⁽³⁶⁾

primeras etapas de la infección y en pacientes asintomáticos. De este modo, al considerar estas variables posteriormente se mejoró la interpretación de las pruebas⁽¹⁰⁾.

Técnicas moleculares en la detección del COVID-19: éxitos y limitaciones

A pesar del uso extendido de los *test* antigénicos, la necesidad de contar con mejores herramientas para la detección del virus motivó la investigación de técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de SARS-CoV-2 que en general ofrecieran mayor especificidad y sensibilidad y que sean accesibles a todos los países, principalmente de los que se encuentran en vías de desarrollo. De este modo, durante los años de pandemia se probaron técnicas moleculares alternativas al RT-PCR que han demostrado resultados prometedores y cuya implementación representa un gran avance no solo para la detección de SARS-CoV-2 sino también para el desarrollo de estas tecnologías que tengan un uso más extendido frente a otras enfermedades

infecciosas. Es así que, durante la pandemia, varias técnicas moleculares emergieron como nuevas alternativas de diagnóstico de COVID-19. Algunas de ellas tuvieron un mayor éxito y difusión que otras. A continuación, se mencionan algunas de las técnicas más relevantes:

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y sus variantes

La RT-PCR es el *gold standard* para la detección de SARS-CoV-2; sin embargo, existen técnicas de PCR que se basan en la modificación de las temperaturas de hibridación, como la *Cold PCR*, *Touchdown PCR* y *Fast-Cold PCR*; algunas que se basan en el uso de cebadores internos y externos que se amplifican en una o dos rondas de amplificación como *heminested-PCR* y *nested-PCR* respectivamente y algunas otras en amplificar varias regiones del genoma a la vez como el PCR-Múltiplex. Todas estas variantes del PCR han sido ensayadas durante la pandemia de COVID-19, cada una con distinto éxito y

trascendencia. Así mismo, en cuanto a los protocolos que modifican la temperatura de hibridación, *Touchdown* PCR es la que se ha empleado de manera más extendida para la detección de varias enfermedades infecciosas, incluido el SARS-CoV-2 en la que incluso se ha adherido a protocolos de PCR-Múltiple⁽¹¹⁾. Esta es una técnica que utiliza una temperatura de hibridación inicial más alta de lo normal y luego se disminuye gradualmente en cada ciclo. Esto mejora la especificidad de la técnica y reduce la formación de productos secundarios no deseados⁽¹²⁾.

Por su parte, *nested* PCR es una técnica que utiliza dos pares de cebadores para amplificar una región específica cuando esta se encuentra a bajo nivel o en muestras que contienen una cantidad limitada de ADN o ARN. En la segunda ronda de PCR, se utilizan los productos de la primera amplificación como plantilla. La *nested* PCR puede aumentar la especificidad de la técnica y reducir la amplificación de productos secundarios no deseados, por lo que, en SARS-CoV-2 se ha aplicado en el diagnóstico activo de infecciones en gatos hallando un 100 % de sensibilidad y especificidad para la detección de SARS-CoV-2 en concentraciones tan bajas como 0,015 ng/ μ L⁽¹³⁾. Por su parte, en seres humanos, *Nested*-PCR también ha demostrado un mejor rendimiento en comparación con RT-PCR⁽¹⁴⁾.

En tanto, la *Multiplex* PCR es una técnica que permite la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN en una sola reacción. Se utilizan varios pares de cebadores específicos para amplificar diferentes fragmentos de ADN, lo que ahorra tiempo y reduce los costos de la prueba. Así, se han desarrollado kits que mediante un método multiplex RT-PCR que se dirige simultáneamente a los genes virales N y RdRP y al gen RP humano, lo que ha mejorado la detección del virus sobre todo en tiempos de circulación de nuevas variantes⁽¹⁵⁾; así mismo, otros ensayos de *multiplex* RT-PCR han permitido la identificación simultánea de cinco variantes de SARS-CoV-2 (Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron), proporcionando resultados rápidos con menor costo y mayor viabilidad y permitiendo así la detección de variantes y sus mutaciones para rastrear la evolución del SAR-CoV2. En la actualidad se han diseñado paneles comerciales basados en *multiplex* PCR que permiten la detección de múltiples patógenos virales y bacterianos responsables de infecciones respiratorias, incluido el SARS-CoV-2⁽¹⁷⁾.

La PCR digital (dPCR)

Es una técnica de PCR altamente sensible y precisa que se utiliza cada vez más en la detección de SARS-CoV-2. A diferencia de la PCR convencional, la dPCR permite la detección y cuantificación absoluta de moléculas de ADN o ARN sin la necesidad de una curva de calibración. La dPCR se basa en la división de una muestra de ADN en miles de pequeñas reacciones de PCR, lo que aumenta la sensibilidad y la precisión de la técnica⁽¹⁷⁾.

En el diagnóstico de SARS-CoV-2, la dPCR se ha utilizado para detectar y cuantificar el ARN del virus en muestras clínicas, como hisopos nasofaríngeos y saliva. Los estudios han demostrado que la dPCR puede detectar incluso bajos niveles de ARN del virus en muestras clínicas, lo que la convierte en una herramienta prometedora en la detección temprana y el monitoreo de la carga viral en pacientes con *COVID-19*⁽¹⁸⁾. Además, la dPCR también puede ser útil en la detección de mutaciones del virus, como la variante Ómicron, cuyos linajes se han vuelto cada vez más prevalentes en todo el mundo. La dPCR puede detectar mutaciones específicas del virus y proporcionar información valiosa sobre la propagación y la evolución del virus⁽¹⁹⁾.

Microarrays

Estas técnicas permiten la detección simultánea de múltiples patógenos, incluyendo el SARS-CoV-2. Sin embargo, su alto costo y la necesidad de equipos especializados han limitado su uso y difusión. Algunos ensayos de microarrays exhibieron una sensibilidad clínica del 77,2 % para detectar antígenos y no fueron muy utilizados debido a los elevados costos y equipamiento requerido⁽²⁰⁾. Asimismo, se propusieron plataformas que podían detectar anticuerpos⁽¹⁹⁾ pero tampoco fueron de uso extendido. De este modo, aunque microarrays son una buena plataforma diagnóstica para varias enfermedades infecciosas, no han tenido efectos en la detección de SARS-COV.

Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

La reacción en cadena de la polimerasa con amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) es una técnica de amplificación de ADN que ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, incluyendo SARS-CoV-2^(22,23). LAMP se basa en la amplificación isotérmica del ADN mediante la utilización de cuatro o seis cebadores específicos para la región de interés, lo que resulta en una mayor eficiencia y sensibilidad que la PCR convencional. En el diagnóstico de SARS-CoV-2, se incluye retrotranscripción dentro del proceso. En este sentido, la RT-LAMP PCR ha demostrado ser una técnica altamente sensible y específica en la detección del ARN del virus en muestras clínicas, como hisopos nasofaríngeos y saliva⁽²⁴⁾. RT-LAMP PCR se realiza en condiciones isotérmicas, lo que significa que no se requiere un termociclador, lo que la convierte en una técnica más simple y portátil que la PCR convencional. Además, RT-LAMP PCR también se ha utilizado en el diagnóstico de SARS-CoV-2 en combinación con otras técnicas de detección, como la detección de antígenos y la PCR convencional, lo que aumenta aún más la sensibilidad y especificidad de la técnica⁽²⁵⁾.

Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la LAMP PCR también tiene algunas limitaciones, como la susceptibilidad a la amplificación de productos no específicos y la necesidad de optimizar las condiciones de la reacción para cada muestra

⁽²⁶⁾. Por lo tanto, se necesita más investigación para evaluar la precisión y la aplicabilidad clínica de la técnica.

Secuenciamiento de próxima generación (NGS)

El Secuenciamiento de próxima generación (NGS) se ha empleado en el diagnóstico de SARS-CoV-2, para la identificación de casos positivos en muestras clínicas y la detección de mutaciones en el genoma viral. Además, la NGS también se ha utilizado para identificar la presencia de otras infecciones virales o bacterianas en pacientes con *COVID-19*, lo que ayudó a guiar el tratamiento y el manejo de la enfermedad ⁽²⁷⁾.

En la vigilancia de la evolución viral, la NGS ha permitido la identificación de mutaciones emergentes del virus en diferentes regiones geográficas, lo que puede ayudar a los investigadores y los organismos de salud pública a entender mejor la propagación y la dinámica de la pandemia. Además, la NGS también se ha utilizado para estudiar la respuesta inmunológica del huésped al virus, lo que puede ayudar a identificar posibles tratamientos y vacunas ⁽²⁸⁾, y para determinar la presencia de mutaciones sobre todo al inicio de la pandemia por *COVID-19* ⁽²⁹⁾.

Sin embargo, la NGS también tiene algunas limitaciones, como el costo, la complejidad del análisis de los datos y la necesidad de equipos y experiencia especializada para llevar a cabo la técnica. Además, la NGS también puede generar grandes cantidades de datos que requieren una gestión y análisis cuidadosos. De este modo, NGS es una técnica valiosa en la detección y la vigilancia de SARS-CoV-2, y ha proporcionado información crítica sobre la evolución y la diversidad del virus.

Sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR)

El sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), es la tecnología de edición del genoma más popular que se anuncia como la nueva era en el diagnóstico del SARS-CoV-2. El sistema CRISPR-Cas consta de dos partes, incluida la matriz CRISPR y las proteínas Cas. El CRISPR es una matriz de secuencias repetidas cortas en el genoma de las bacterias, separadas por fragmentos de ADN llamados espaciadores. Estos espaciadores se originan a partir del fago o genomas invasores, que se encuentran con el genoma de las bacterias. Las proteínas Cas son muy diversas y realizan muchas funciones, incluidas las de nucleasas, helicasas, y otras. La matriz CRISPR actúa como una memoria para reconocer genomas de forja y proteínas Cas como Cas 9 que destruyen genomas extraños. Hasta la fecha, se han desarrollado varios enfoques prometedores basados en la tecnología CRISPR para el diagnóstico temprano de *COVID-19*, como el sistema de desbloqueo de reportero enzimático específico de alta sensibilidad (SHERLOCK), el sistema de reportero trans CRISPR dirigido por endonucleasa de ADN (DETECTR), Fncas9 Editor Linked Uniform Ensayo de detección

(FELUDA), detección de ácido nucleico operado por Cas3 (CONAN) y variante de protección de nucleótidos (VaNGuard). Todos ellos basados en CRISPR, incluidos CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas12, CRISPR-Cas13 y CRISPR-Cas3 ⁽³⁰⁾.

Existen otras técnicas de detección con sistemas CRISPR, pero hacen uso de una actividad enzimática de corte inespecífico, lo que limita la detección multiplexada. Algunos sistemas no se basan en el corte de cadenas de ácidos nucleicos, sino en reconfiguraciones moleculares que se producen gracias a interacciones específicas, pudiendo así detectar en una misma reacción diferentes secuencias ⁽³¹⁾. Por otro lado, también hay técnicas que combinan protocolos de RT-LAMP con CRISPR ⁽³²⁾. Esto debido a que muchos de los kits RT-LAMP disponibles comercialmente brindan una detección razonable del SARS-CoV-2 pero sin la solidez o especificidad necesarias. Por ello algunos autores han agregado con éxito diferentes aditivos de reacción en búsqueda de una respuesta más consistente y sólida. Combinando la amplificación RT-LAMP múltiple de tres genes diferentes del virus SARS-CoV-2 con la detección simultánea de estos genes mediante CRISPR/Cas12a se ha logrado una sensibilidad muy alta manteniendo al mismo tiempo una especificidad del 100 %, eliminando así el principal problema de métodos de amplificación isotérmica ³³.

El sistema CRISPR-Cas, se anuncia como la nueva era en el diagnóstico del SARS-CoV-2. A diferencia de los métodos convencionales de laboratorio para la detección de *COVID-19*, tales como la técnica de RT-qPCR y la secuenciación de nueva generación (NGS), que exigen la pericia de técnicos altamente capacitados y el uso de instalaciones costosas, estas pruebas ofrecen una alta especificidad y sensibilidad sin requerir mucha inversión ⁽³⁰⁾. Es así como en un futuro cercano esta podría representar la principal herramienta frente al diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas en el futuro

Las técnicas de diagnóstico molecular que se han desarrollado y optimizado durante la pandemia de *COVID-19* tienen un gran potencial para el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas en el futuro. La PCR en tiempo real, la PCR digital, la LAMP y la NGS, por ejemplo, son técnicas que se han utilizado en la detección del SARS-CoV-2, pero también pueden ser aplicadas para el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas.

La PCR en tiempo real, por ejemplo, se ha utilizado en el diagnóstico de enfermedades como la tuberculosis, el VIH y la malaria ^(37,38). La PCR digital también se ha utilizado en la detección de enfermedades como la hepatitis B ⁽³⁹⁾; en esta enfermedad, esta herramienta puede utilizarse para evaluar la eficacia del tratamiento antiviral en pacientes, ya que permite una medición precisa y cuantitativa de la carga viral en la sangre. Esto es especialmente importante en la

monitorización de la respuesta del paciente al tratamiento antiviral y en la detección temprana de la resistencia viral a los medicamentos antivirales. La LAMP se ha utilizado en la detección de enfermedades como la leishmaniasis⁽⁴⁰⁾ y la ocasionada por el virus ZIKA⁽⁴⁰⁾. Mientras que NGS se ha utilizado en la identificación y caracterización de muchos patógenos diferentes en una sola muestra, lo que puede ser muy útil en el diagnóstico de enfermedades con múltiples agentes etiológicos.

Por su parte, CRISPR-Cas ofrece varias ventajas sobre la técnica de PCR y NGS en términos de especificidad, sensibilidad, velocidad y costo, lo que lo convierte en una herramienta diagnóstica prometedora para la detección del SARS-CoV-2 y otras enfermedades infecciosas en el futuro.

Es así que estas técnicas moleculares de diagnóstico difundidas con mayor amplitud durante la pandemia ofrecen varias ventajas, como una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico. Además, estas técnicas también permiten la detección temprana de infecciones, lo que puede ser crucial para el tratamiento y la prevención de la propagación de una enfermedad. Estas técnicas pueden mejorar significativamente la precisión y la velocidad del diagnóstico, lo que puede llevar a una mejor gestión y prevención de enfermedades infecciosas en todo el mundo.

CONCLUSIONES

La técnica de RT-PCR ha sido fundamental en el diagnóstico y control de COVID-19, siendo considerada la prueba *gold standard* para la detección de SARS-CoV-2 debido a su alta sensibilidad y especificidad. Hacia el final de la pandemia por COVID-19 algunas de las técnicas moleculares que han demostrado resultados prometedores para la detección rápida de casos son la PCR digital, LAMP-PCR y CRISPR Cas. Estas representan importantes herramientas de diagnóstico que pueden ser empleadas en futuras epidemias. Por su parte el secuenciamiento NGS aún es la técnica más importante para determinar la epidemiología molecular del virus.

Conflicto de intereses: El autor declara no tener conflictos de interés.

Financiamiento: Autofinanciado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang W, Si HR, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–273. Doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

2. Jayamohan H, Lambert CJ, Sant HJ, Jafek A, Patel D, Feng H, *et al.* SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem*. 2021;413(1):49–71. Doi: 10.1007/s00216-020-02958-1
3. Habibzadeh P, Mofatteh M, Silawi M, Ghavami S, Faghihi MA. Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2021;1–20. Doi: 10.1080/10408363.2021.1884640
4. Ismail AA. Serological tests for COVID-19 antibodies: Limitations must be recognized. *Ann Clin Biochem* 2020;57(4):274–276. Doi: 10.1177/0004563220927053
5. Bermingham WH, Wilding T, Beck S, Huissoon A. SARS-CoV-2 serology: Test, test, test, but interpret with caution! *Clin Med (Lond)*. 2020;20(4):365–368. Doi: 10.7861/clinmed.2020-0170
6. Vidal-Anzardo M, Solis G, Solari L, Minaya G, Ayala-Quintanilla B, Astete-Cornejo J, *et al.* Evaluación en condiciones de campo de una prueba serológica rápida para detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2020;203–9. Doi: 0.17843/rpmesp.2020.372.5534
7. Villanueva-Carrasco R, Domínguez-Samamés R, Salazar-De La Cruz M, Cubas-Fuentes M. Respuesta del primer nivel de atención de salud del Perú a la pandemia COVID-19. *An Fac Med*. 2020;81(3):337–341. Doi: 10.15381/anales.v81i3.18952
8. Bendix A. Rapid Covid tests give many false negatives, but that might mean you're not contagious [Internet]. NBC News. 2022 [citado el 9 de Julio del 2023]. Disponible en: <https://www.nbcnews.com/health/health-news/rapid-covid-tests-false-negatives-rcna33502>
9. Gans JS, Goldfarb A, Agrawal AK, Sennik S, Stein J, Rosella L. False-Positive Results in Rapid Antigen Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2022;327(5):485–486. Doi: 10.1001/jama.2021.24355
10. Shao W. Accurate Interpretation of SARS-CoV-2 Antigen Detection by Immunochromatography. *Frontiers in Medicine*. 2022;9. Doi: 10.3389/fmed.2022.949554
11. Suh IB, Lim J, Kim HS, Rhim G, Kim H, Kim H, Lee SM, *et al.* Development and Evaluation of AccuPower COVID-19 Multiplex Real-Time RT-PCR Kit and AccuPower SARS-CoV-2 Multiplex Real-Time RT-PCR Kit for SARS-CoV-2 Detection in Sputum, NPS/OPS, Saliva and Pooled Samples. *PLoS One*. 2022;17(2):e0263341. Doi: 10.1371/journal.pone.0263341
12. Green MR, Sambrook J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2018;2018. Doi: 10.1101/pdb.prot095133.
13. Sirakov I, Popova-Ilinkina R, Ivanova D, Rusenova N, Mladenov H, Mihova K, *et al.* Development of Nested PCR for SARS-CoV-2 Detection and Its Application for Diagnosis of Active Infection in Cats. *Veterinary Sciences*. 2022;9(6):272. Doi: 10.3390/vetsci9060272
14. Li Q, Xia Y, Liao D, *et al.* Dual-target one-step nested PCR for sensitive detection of SARS-CoV-2 nucleic acids. *Prep Biochem Biotechnol*. 2022;471–477. Doi: 10.1080/10826068.2021.1964084
15. Tombuloglu H, Sabit H, Al-Khallaif H, Kabanja J, Alsaed M, Al-Saleh N, *et al.* Multiplex real-time RT-PCR method for the diagnosis of SARS-CoV-2 by targeting viral N, RdRP and human RP genes. *Sci Rep*. 2022;12(1):2853. Doi: 10.1038/s41598-022-06977-z
16. El Panel BIOFIRE® Respiratory 2.1 (RP2.1) con SARS-CoV-2 obtiene la autorización De Novo de la FDA [Internet]. *Biomérieux*. 2021 [citado el 9 de julio del 2023]. Disponible en: <https://www.biomerieux.es/el-panel-biofirer-respiratory-21-rp21-con-sars-cov-2-obtiene-la-autorizacion-de-novo-de-la-fda>

17. Morley AA. Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif*. 2014;1(1):1–2. Doi: 10.1016/j.bdq.2014.06.001.
18. Nyaruaba R, Mwaliko C, Dobnik D, Neuzil P, Amoth P, Mwu M, et al. Digital PCR Applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 Era: a Roadmap for Future Outbreaks. *Clin Microbiol Ver*. 2022;35(3):e00168-21. Doi: 10.1128/cmr.00168-21
19. Holland SC, Holland LA, Smith MF, Lee MB, Hu JC, Lim ES. Digital PCR discriminates between SARS-CoV-2 Omicron variants and immune escape mutations. *MedRxiv*. 2022; Doi: 10.1101/2022.12.19.22283598
20. Beck S, Nakajima R, Jasinskas A, et al. A Protein Microarray-Based Respiratory Viral Antigen Testing Platform for COVID-19 Surveillance. *Biomedicines* 2022;10(9):2238. Doi: 10.3390/biomedicines10092238
21. Savvateeva E, Filippova M, Valuev-Elliston V, Nuralieva N, Yukina M, Troshina E, et al. Microarray-Based Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Proteins, Common Respiratory Viruses and Type I Interferons. *Viruses* 2021;13(12):2553. Doi: 10.3390/v13122553
22. Ocker R, Prompunjai Y, Chutipongvivate S, Karanis P. malaria diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (lamp) in thailand. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58:27. Doi: 10.1590/S1678-9946201658027
23. Escalante-Maldonado O, Vidal-Anzardo M, Donaires F, Solís-Sánchez G, Gallesi I, Pampa-Espinoza L, et al. Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in house para el diagnóstico de SARS-CoV-2. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2021;38(1):7–16. Doi: 10.17843/rpmesp.2021.381.7154
24. Huang X, Tang G, Ismail N, Wang X. Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva. *EBioMedicine*. 2021;75:103736. Doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103736
25. Fellner MD, Bonaventura R, Basiletti J, Alvaro M, Benedetti E, Campos A, et al. Evaluation of RT-qPCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for the Detection of SARS-CoV-2 in Argentina. *Genes (Basel)*. 2021;12(5):659. Doi: 10.3390/genes12050659.
26. Hema M, Konakalla NC. Chapter 16 - Recent developments in detection and diagnosis of plant viruses. In: Viswanath B, editor. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Academic Press; 2021, p. 163–80. Doi: 10.1016/B978-0-12-821406-0.00016-3.
27. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform* 2021;22(2):616–630. doi: 10.1093/bib/bbaa297.
28. Nasereddin A, Golan Berman H, Wolf DG, Oiknine-Djian E, Adar S. Identification of SARS-CoV-2 Variants of Concern Using Amplicon Next-Generation Sequencing. *Microbiol Spectr* 2022;10(4):e0073622. doi: 10.1128/spectrum.00736-22
29. Aguilar-Gamboa FR, Salcedo-Mejía LA, Serquén-López LM, Mechán-Llontop M, Túllume-Vergara P, Bonifacio-Briceño J, et al. Genomic Sequences and Analysis of Five SARS-CoV-2 Variants Obtained from Patients in Lambayeque, Peru. *Microbiol Resour Announc* 2021;10(1):e01267-20. Doi: 10.1128/MRA.01267-20
30. Ebrahimi S, Khanbabaie H, Abbasi S, Fani M, Soltani S, Zandi M, et al. CRISPR-Cas System: A Promising Diagnostic Tool for Covid-19. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2022;14(1):3–9. Doi: 10.18502/ajmb.v14i1.8165
31. Sadurní J. Patentan un método rápido y fiable basado en la tecnología CRISPR para detectar el SARS-CoV-2 [Internet]. *National Geographic España*. 2022 [citado el 9 de julio del 2023]. Disponible en: https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/patentan-metodo-para-detectar-sars-cov-2-y-otros-virus_18457
32. Selvam K, Najib MA, Khalid MF, Mohamad S, Palaz F, Ozsoz M, et al. RT-LAMP CRISPR-Cas12/13-Based SARS-CoV-2 Detection Methods. *Diagnostics (Basel)*. 2021; Doi: 10.3390/diagnostics11091646
33. Figueiredo D, Cascalheira A, Goncalves J. Rapid, multiplex detection of SARS-CoV-2 using isothermal amplification coupled with CRISPR-Cas12a. *Sci Rep*. 2023;13(1):849. Doi: 10.1038/s41598-022-27133-7
34. 34. Introduction to Digital PCR [Internet]. *Biorad*. 2022 [citado el 9 de julio del 2023]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/es-pe/life-science/learning-center/introduction-to-digital-pcr>
35. Mora-Sandi A. Servicios de Secuenciación de Nueva Generación para la obtención de SNPs [Internet]. *Tecnosoluciones integrales life science*. 2021 [citado el 9 de julio del 2023]. Disponible en: <https://tecnosolucionescr.net/blog/524-servicios-de-secuenciacion-de-nueva-generacion-para-la-obtencion-de-snps>
36. Nicole J. Detección del virus de la COVID-19 mediante la RT-PCR en tiempo real [Internet]. *Organismo Internacional de Energía Atómica*. 2020 [citado el 9 de julio del 2023]. Disponible en: <https://www.iaea.org/es/bulletin/deteccion-del-virus-de-la-covid-19-mediante-la-rt-pcr-en-tiempo-real>
37. Ameli-Marcozzi GI, Gutiérrez-García C, D'Angelo P, Rangel H. Optimización de la técnica de PCR reversa para la detección del VIH en plasma de pacientes infectados. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]* 2013 [citado el 9 de julio del 2023];33(2):157–161. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1315-25562013000200013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
38. Blanquiceth YP, Murillo Gómez Ó, Maestre AE, Corredor M. Detección de casos submicroscópicos de Plasmodium spp., utilizando técnicas clásicas y moleculares en pacientes gestantes de Córdoba, Colombia. *Iatreia [Internet]* 2014 [citado el 9 de julio del 2023];27(3):278–289. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-07932014000300004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
39. Hayashi S, Isogawa M, Kawashima K, Ito K, Chuaypen N, Morine J, et al. Droplet digital PCR assay provides intrahepatic HBV cccDNA quantification tool for clinical application. *Sci Rep*. 2022;12(1):2133. Doi: 10.1038/s41598-022-05882-9
40. Nzelu CO, Kato H, Peters NC. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(11):e0007698. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007698
41. Escalante-Maldonado O, Gavilán RG, García MP, Marcelo A, Pacheco E, Cabezas C, et al. Desarrollo y validación del método de amplificación isotérmica mediada en lazo para la detección del virus Zika. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2019;36(3):442–447. Doi: 10.17843/rpmesp.2019.363.3941