



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: PROPUESTA DE UN GENOSENSOR
ELECTROQUÍMICO PARA EL DIAGNÓSTICO
DEL SARS-CoV-2**

Autor: Miryam Flórez Martín

Fecha: 1 de Septiembre de 2020

Tutor: Beatriz López Ruiz

ÍNDICE:

1. RESUMEN	2
ABSTRACT	2
2. PALABRAS CLAVE Y LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
Palabras clave:	2
Reference words:.....	2
Abreviaturas:	2
3. INTRODUCCIÓN:.....	3
a) Antecedentes	3
b) Actualidad.....	4
I. Etiología y epidemiología	4
II. Genoma	5
III. Transmisión.....	6
IV. Manifestaciones clínicas	6
V. Diagnóstico	8
VI. Tratamiento	8
VII. Prevención	8
4. OBJETIVOS:.....	8
5. MATERIAL Y MÉTODOS:	8
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	9
Diagnóstico SARS-CoV-2	9
Biosensores.....	10
A. Inmunosensores	11
B. Genosensores.....	12
C. Diseños actuales de inmuno y genosensores	13
i. Inmunosensor piezoeléctrico	13
ii. Genosensor electroquímico	14
iii. Determinación de micro ARN	15
D. Propuesta de un diseño de diagnóstico hipotético	16
7. CONCLUSIÓN:.....	18
8. BIBLIOGRAFÍA.....	19

1. RESUMEN

En el presente Trabajo de Fin de Grado se presenta una revisión bibliográfica de la pandemia mundial de 2020 que dio comienzo a finales de 2019 en China, originada por el SARS-CoV-2. Es un virus comúnmente conocido como coronavirus, pertenece a una de las dos subfamilias de la familia *Coronaviridae* y afecta al sistema respiratorio del ser humano. En este trabajo se exponen dos tipos de diagnóstico basados en un inmunosensor piezoeléctrico y un genosensor electroquímico, además de los métodos rutinarios empleados en el momento de mayor número de contagios. Así mismo, se propone el diagnóstico mediante un hipotético biosensor que reúne las mejores características de los ensayos citados, tratando de corregir sus deficiencias. El diagnóstico propuesto podría mejorar el tiempo de análisis siendo de gran ayuda para reducir el número de contagios.

1. ABSTRACT

This Final Degree Project presents a bibliographic review of the 2020 global pandemic that began in late 2019 in China, originated by SARS-CoV-2. It is a virus commonly known as coronavirus; it belongs to one of the two subfamilies of the *Coronaviridae* family and affects the human respiratory system. In this work, two types of diagnosis based on a piezoelectric immunosensor and an electrochemical genosensor are presented, in addition to the routine methods used at the time of greatest number of infections. Likewise, the diagnosis is proposed using a hypothetical biosensor that meets the best characteristics of the aforementioned tests, trying to correct its deficiencies. The proposed diagnosis could improve the analysis time being of great help to reduce the number of infections.

2. PALABRAS CLAVE Y LISTA DE ABREVIATURAS

Palabras clave: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, diagnóstico, electroquímico, detección.

Reference words: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, diagnosis, electrochemical, detection.

2. Abreviaturas:

- SARS: Síndrome Agudo Respiratorio Severo
- ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- GOARN: Global Outbreak Alert and Response Network, o Red Mundial OMS de Alerta y Respuesta ante Brotes Epidémicos
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Producto Sanitario
- EMA: Agencia Europea del Medicamento
- ECA-2: Enzima convertidora de angiotensina 2
- PBS: solución salina tamponada con fosfato filtrada
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- Ag: antígeno
- Ac: anticuerpo

3. INTRODUCCIÓN:

En los últimos años se ha producido la aparición de epidemias, como el SRAS-CoV, Ébola, Zika, Gripe A, MERS-CoV,... muchas de ellas son causadas por virus y ocasionan gran alarma social.

a) Antecedentes

Los coronavirus han sido los causantes de varias epidemias a lo largo de este siglo. Destaca por su similitud con la actual, la epidemia del SARS (Síndrome Agudo Respiratorio Severo, en inglés, Severe Acute Respiratory Syndrome), cuyo primer caso apareció el 16 de noviembre de 2002, en la provincia de clima subtropical del sudeste de China, Guangdong (1). Las condiciones ambientales y la gran mezcla de especies de animales de esta región facilitan que se produzcan mutaciones en los patógenos, lo que fomenta la potencial capacidad que tienen los coronavirus de saltar de una especie a otra.

El SARS-CoV-1 fue originalmente una zoonosis viral que pasó a los humanos a través de la ingesta de animales exóticos como la civeta (*Paguma lavarta*). El SARS-CoV era un virus procedente de los murciélagos. Las civetas adquirieron el virus tras la ingesta de frutos contaminados por los murciélagos. De modo que desarrolló de forma accidental la capacidad de infectar civetas y seres humanos (2,3).

El SARS-CoV-1 fue un virus ARN relativamente resistente que se contagiaba muy fácilmente por sus múltiples vías de transmisión y por tanto fue muy complejo contenerle. Entre las vías de transmisión se encuentran de persona a persona por las gotículas de los estornudos y toses, por contacto de fómites contaminados, sin olvidarse de la transmisión fecal.

Se ha demostrado que la enfermedad presentó un grado alto de infecto-contagiosidad, por lo que la OMS recomendó como prevención la protección de las vías respiratorias para el personal sanitario y los visitantes en contacto directo con los casos reportados. La gran preocupación de este virus fue el elevado número de infecciones, más de 8.000 casos en 27 países con una letalidad del 10% (4).

El exitoso control de la pandemia puede asentarse en las drásticas medidas de prevención para evitar el contagio, en el aislamiento riguroso de los pacientes y en la aplicación de medidas específicas para prevenir la transmisión. Cabe destacar la gran labor de los países junto con el CDC y la OMS en la coordinación tanto a nivel nacional como internacional gracias al Sistema GOARN, formada por diferentes expertos e Institutos. Esta pandemia constituye un referente para la Salud Pública, dado que fue la primera epidemia del siglo XXI y por los buenos resultados obtenidos en el control del brote y, definitivamente, la erradicación del mismo (5).

Gracias a esta pandemia la Unión Europea fundó el ECDC, ya que anteriormente carecía de un organismo encargado de regular de forma común la salud pública. No obstante, toda esa coordinación es inútil si no se sabe contra lo que se está luchando, por lo que la investigación epidemiológica contribuyó en gran medida al éxito durante y después de la pandemia, siendo identificado el agente etiológico cuando aún había brotes activos (5).

b) Actualidad

I. Etiología y epidemiología

A finales de 2019, el 31 de diciembre saltó una alerta en la región de Wuhan (provincia de Hubei, China) en la cual la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan informó sobre 27 casos de neumonía de etiología desconocida que había iniciado con síntomas el 8 de diciembre, incluyendo siete casos graves. El factor común entre los pacientes era la exposición a un mercado mayorista de marisco, pescado y animales vivos en la ciudad de Wuhan, aunque no se ha logrado identificar la fuente del brote (6).

El 7 de enero de 2020, las autoridades chinas identificaron como agente causante del brote un nuevo tipo de virus de la familia *Coronaviridae*, que ha sido denominado SARS-CoV-2 (coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo), y que causa la enfermedad infecciosa por coronavirus 19 (COVID-19). Este nombre se ha establecido basándose en criterios filogenéticos, de taxonomía y de clínica, demostrándose que comparte una secuencia genética del 79% con el SARS-CoV-1. Pese a las similitudes de este nuevo agente aislado con *Betacoronavirus* detectados en murciélagos, es diferente del SARS-CoV-1 y del MERS-CoV, y conforma un nuevo linaje del subgénero *Sarbecovirus* dentro del género *Betacoronavirus* (4,6).

Se produjo una rápida transmisión de la infección, primero por China y luego por el resto del planeta, de modo que la OMS declaró formalmente la pandemia el 11 de marzo de 2020, cuando se habían diagnosticado más de 118.000 casos en 114 países y habiendo perdido la vida 4.291 personas (7).

Los coronavirus llevan conviviendo con el ser humano mucho tiempo como especie y afectan a otras muchas especies. Pertenecen a la subfamilia *Orthocoronaviridae*, de la familia *Coronaviridae*, perteneciente al orden de los Nidovirales. Dentro de la subfamilia *Orthocoronaviridae* podemos clasificar los virus en cuatro géneros diferentes: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus* (6).

Los géneros más importantes desde el punto de vista patógeno para el ser humano (Figura 1) y, por tanto, los más estudiados, son (5):

- *Alfacoronavirus*: los virus HCoV-229E y HCoV-NL63, ambos causan de forma habitual infecciones de carácter leve del tracto respiratorio superior, como resfriados, bronquitis,...
- *Betacoronavirus*: los virus SARS-CoV-1, **SARS-CoV-2** y MERS-CoV, originan neumonías atípicas, y los virus HCoV-HKU1, y HCoV-OC43, que causan infecciones de menor gravedad en el tracto respiratorio superior.

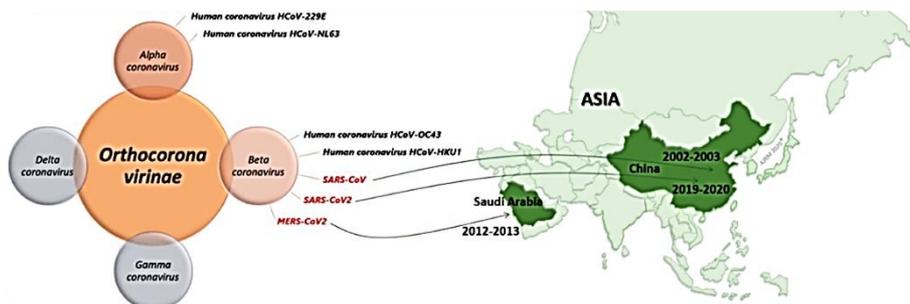


Figura 1. Género de coronavirus de la subfamilia *Orthocoronaviridae*. Se destacan los que afectan a los humanos, particularmente, los tres que pueden producir una patología severa y se incluye su origen geográfico en Asia (8).

Los estudios filogenéticos revisados indican que es muy probable que el virus provenga de los murciélagos y que de estos haya pasado al ser humano a través de mutaciones o recombinaciones sufridas en un hospedador intermediario, probablemente algún animal vivo del mercado de Wuhan, pero todavía no se conoce el origen (6).

El coronavirus es capaz de entrar y replicarse en el interior de células epiteliales respiratorias del ser humano, ocasionando síndromes respiratorios principalmente.

Los coronavirus son una familia de virus con genoma ARN monocatenario de cadena positiva de gran tamaño. Los viriones están recubiertos por una nucleocápside helicoidal, presentan forma esférica de entre 60 y 220 nm y, poseen unas protuberancias de glicoproteínas con forma de “porra” en su superficie, esto se asemeja a una corona, lo que les da el nombre (9).

II. Genoma

El genoma del SARS-CoV-2 presenta un tamaño de 29,811 nucleótidos de longitud (10) y la estructura típica de los coronavirus, en el extremo 5', que se puede dividir en dos tercios, se encuentra un CAP metilado y en el extremo 3' (el tercio final del genoma) hayamos una cola de poli-A, dándole un gran parecido al ARN mensajero del hospedador (6,9).

- Los dos tercios del extremo 5' contienen la codificación ORF1ab poliproteínas de replicasa, permitiendo que el ARN viral se adhiera a los ribosomas del huésped para su traducción a proteínas virales, de modo que puede funcionar directamente como si fuese ARN mensajero de la célula animal. La replicasa es la primera proteína que es sintetizada.
- Mientras que el tercio 3' comprende genes que codifican proteínas estructurales, entre ellas tenemos: espícula (S), envoltura (E), membrana (M) y proteínas de la nucleocápside (N). Como se aprecian en el esquema de la Figura 2.

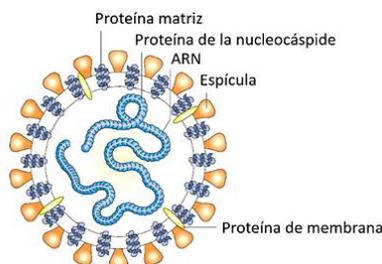


Figura 2: Representación esquemática de la estructura general de un coronavirus, donde se indican las partes más importantes y comunes a todos los coronavirus (11).

Los genomas de la progenie también se forman por transcripción a partir de la cadena negativa de ARN. Los viriones se ensamblan en el aparato de Golgi, el principal orgánulo secretor de las células eucariotas, dando viriones completos que son transportados y liberados en la superficie celular.

La replicación del coronavirus comienza con su entrada en la célula. Una vez dentro de ella, la partícula descubierta deposita el ARN en el citoplasma. El genoma de ARN se replica y se forma una larga poliproteína, donde todas las proteínas están unidas. Los coronavirus tienen una proteína no estructural que es capaz de separar de la cadena las

distintas proteínas. Esta es una forma de economía genética para el virus, que le permite codificar el mayor número de genes con un número pequeño de nucleótidos(6).

III. Transmisión

Nos encontramos ante una pandemia de rápida extensión debido a su elevada transmisibilidad. A ello debemos sumarle la globalización en la que vivimos y la gran facilidad que hay para viajar de una punta a otra del globo terráqueo lo que facilita la extensión de la enfermedad.

La transmisión del SARS-CoV-2 se produce principalmente por el contacto directo con las secreciones respiratorias de una persona enferma a través de gotas y contacto. Las gotas pueden ser de saliva expulsadas con la tos o el estornudo, con un diámetro de 5-10 μm capaces de transmitirse a distancias de hasta 2 m. Estas secreciones pueden infectar a otra persona al entrar en contacto con las mucosas nasal, oral y ocular, ya sea directamente o a través de las manos. Además estas gotas pueden contaminar fómites y transmitirse indirectamente a través de la contaminación de las manos, que luego se ponen en contacto con las mucosas (12).

La elevada contagiosidad es una característica muy importante del virus dado que su número de reproducción básico (R_0), revela el promedio de nuevas infecciones generadas por una sola persona infecciosa en una población susceptible, es de 3'28 (13). La presencia de pacientes con infección asintomática por SARSCoV-2 capaces de transmitir la enfermedad es, también, un aspecto muy importante (4).

Se ha encontrado ARN de SARS-CoV-2 en muestras fecales en 2% al 10% de pacientes infectados con síntomas gastrointestinales como diarrea, por lo que ésta podría ser una vía potencial de transmisión (12,14).

IV. Manifestaciones clínicas

La información aportada por la OMS indica que se contagian personas a partir de 2 años de edad, con una edad media de 45 años y siendo el 71% hombres. La población infantil es la gran transmisora puesto que lo pasan como un simple catarro o incluso de forma asintomática, y la población más afectada son los ancianos y aquellas personas con patologías previas como diabéticos, consumidores de tabaco y sobre todo pacientes con afecciones respiratorias y cardíacas.

El período de incubación de la COVID-19 es de 1 a 14 días, pese a que comúnmente se da de 3 a 7 días (12).

La glicoproteína S del SARS-CoV-2 desempeña un papel esencial en la unión a los receptores ECA-2 (Enzima Convertidora de angiotensina 2) en las células del hospedador. La afinidad de la unión que presenta es de 10 a 20 veces mayor que el SARS-CoV-1. Se ha demostrado que en las primeras 48 h de la infección, la replicación del SARS-CoV-2 en pneumocitos tipo I y II y en macrófagos alveolares es significativamente mayor que la del SARS-CoV-1, produciendo 3'2 veces más partículas virales. Concordantemente, la carga viral en la saliva de la pared posterior de la faringe es mucho más elevada durante la primera semana desde el inicio de los síntomas de COVID-19. Estos hallazgos pueden explicar la rápida evolución, la gran capacidad de transmisión de persona a persona y la transmisión presintomática en COVID-19 (12).

Los coronavirus entran al interior de las células epiteliales respiratorias por el contacto de la espícula de la cápside viral con sus receptores en la célula diana, de este modo se permite la entrada de los viriones al citoplasma por endocitosis. El aspecto de las células infectadas es vacuolado, presentando dañados los cilios y la capacidad de formar sincitios. Esto desencadena la producción de mediadores inflamatorios, incrementando las secreciones y provocando la inflamación de la zona, originando las manifestaciones clínicas (12).

Los casos de COVID-19 pueden presentar cuadros asintomáticos, leves, siendo el 80% de los infectados, moderados, el 14% o grave, el 5%, incluyendo: neumonía, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), sepsis y shock séptico. En el momento que se padece tos seca, fiebre y disnea, se debe sospechar de un posible contagio y por tanto permanecer en cuarentena para evitar la propagación (12,15).

El síndrome clínico de Covid-19 presenta un amplio espectro de severidad, se observan desde síntomas sutiles hasta neumonía severa, shock séptico o enfermedad sistémica inflamatoria. La OMS la clasifica en 5 categorías (15):

- Leve: pacientes con una infección respiratoria superior sin complicaciones asociadas. Pueden presentar síntomas inespecíficos aislados como fiebre, malestar general, debilidad, coriza, odinofagia o incluso diarrea.
- Neumonía: pacientes con neumonía sin necesidad de oxígeno suplementario ni otros criterios de severidad.
- Neumonía severa: pacientes que asocian frecuencia respiratoria mayor a 30 respiraciones por minuto, edema pulmonar lesional o saturación de oxígeno menor a 93% sin oxígeno suplementario.
- Shock Séptico
- Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Los principales síntomas descritos en pacientes infectados por SARS-CoV-2 se recogen en la tabla 1.

Síntomas clínicos	Pacientes con COVID-19 grave	Pacientes con COVID-19 no grave
Fiebre	88'4%	81'4%
Tos	71'1%	65'7%
Fatiga	60'3%	44'2%
Disnea	44'2%	5'7%
Expectoración	37'6%	28%
Dificultad respiratoria	35'7%	12'8%
Mialgias	26%	13'1%
Escalofríos	26%	10'9%
Mareos	16,1%	12'2%
Dolor de cabeza	11'3%	13'5%
Dolor de garganta	7'8%	9'7%
Nauseas o vómitos	5'9%	5'7%
Diarrea	5'7%	5'8%
Congestión nasal	2'8%	5'1%

Figura 3: Tabla de los síntomas en pacientes infectado por SARS-CoV-2 (4).

La sintomatología gastrointestinal, que parece relacionarse con una gastritis y enteritis ocasionada por el virus, ha hecho pensar en una mutación del virus respecto de los primeros casos aparecidos en Wuhan en los que la sintomatología era principalmente respiratoria (4).

V. Diagnóstico

Para llevar a cabo el diagnóstico se realizan PCR a partir de exudados de tracto respiratorio superior (nasofaríngeo u orofaríngeo) o inferior (lavado broncoalveolar, esputo y/o aspirado endotraqueal). También es posible el serodiagnóstico.

VI. Tratamiento

Hasta la fecha, no existe un tratamiento específico para el SARS-CoV2, se debe asegurar un tratamiento de soporte precoz. La OMS ha habilitado una guía de recomendaciones de tratamiento fundamentada en la evidencia tras el tratamiento del SARS-CoV-1, MERS-CoV o gripe grave. Además se están llevando a cabo una serie de estudios de tratamientos específicos: inhibidores de la neuraminidasa, análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa, anticuerpos monoclonales y numerosos estudios de profilaxis con hidroxiquina. En este campo al igual que en el de la vacuna se está en continua investigación y avance.

VII. Prevención

Hasta el momento y mientras no se disponga de vacuna, la prevención es la herramienta más eficaz con la que contamos para luchar contra este virus. Para prevenir la transmisión se debe (12):

- Evitar frecuentar espacios cerrados con aglomeración de personas.
- Mantener al menos 2 metros de distancia de las personas.
- Higiene de manos con agua y jabón o con un desinfectante a base de alcohol.
- En caso de toser y/o estornudar, debe cubrirse la nariz y la boca con la cara interna del codo flexionado o con un pañuelo, e inmediatamente después de usarlo, desechar el pañuelo y realizarla higiene de manos.
- Evitar tocarse la nariz y la boca.
- Los sanitarios deben tomar medidas específicas porque son una población en riesgo y sufren mayores contagios.
- Asilamiento de los casos sospechosos o confirmados.
- Suspensión de actividades públicas o privadas y restricciones de viajes.
- Distanciamiento social y restricción de movimiento incluyendo el cierre de fronteras.

4. OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es llevar a cabo una revisión bibliográfica del diagnóstico del SARS-CoV-2 y detección de la COVID-19 mediante el empleo de biosensores electroquímicos. En la revisión se estudiarán distintos métodos de diagnóstico y se propondrá un hipotético sistema de diagnóstico.

5. MATERIAL Y MÉTODOS:

Realización de una revisión bibliográfica dedicada al estudio de los biosensores como dispositivos analíticos de diagnóstico y se consultaron también diferentes fuentes bibliográficas sobre el SARS-COV y SARS-COV-2.

Se ha llevado a cabo una revisión sistemática en las principales bases de datos bibliográficas (PubMed, SCOPUS, Google Scholar) y en revistas científicas consultadas a través de internet (Elsevier B.V., International Journal of Molecular Science, Analytical Chemistry, etc), así como páginas web de organismos internacionales (OMS, EMA, Ministerio de Sanidad de España). Además de libros de microbiología, tesis doctorales y diversos congresos, webinars y cursos que se han ido emitiendo vía online a lo largo de la cuarentena.

Se definieron unos criterios de inclusión y exclusión en función de la fecha de publicación de los artículos, siendo elegidos aquellos estudios publicados en los últimos años, del 2003 hasta la actualidad, que ofrecían información relevante acerca de los biosensores electroquímicos y su aplicación en el campo de la química clínica.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Diagnóstico SARS-CoV-2

La prueba de uso común y más confiable para el diagnóstico de COVID-19 es la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (en tiempo real) (RT-PCR), los distintos fabricantes emplean gran variedad de dianas de genes de ARN, apuntando la mayoría de las pruebas a genes de la envoltura (E), nucleocápsida (N), espiga (S), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y ORF1 (16). Para la realización de la prueba es precisa la toma de muestras de frotis nasofaríngeo y muestra de esputo (4). Estas muestras se llevan a laboratorio para realizar la RT-PCR. La carga viral es elevada en la primera semana de infección siendo el pico álgido entre el tercer y sexto día, a partir del octavo día desciende paulatinamente. Esta carga viral también es menor en los pacientes con síntomas leves (12).

Inicialmente la RT-PCR puede ser no concluyente o negativa pese a la alta sospecha clínica. Debido a que al inicio del cuadro clínico es menos sensible, se realizarán hallazgos radiológicos como radiografía, tomografía axial computarizada y ultrasonido que dan resultados positivos y se confirman con una segunda RT-PCR. A estas pruebas radiológicas se les considera principales hallazgos pulmonares (12,15).

El momento inadecuado de recolección de muestras con respecto al inicio de la enfermedad y la deficiencia en la técnica de muestreo, que ocurre con los hisopos nasofaríngeos, conllevan a la aparición de falsos negativos. En un estudio de 205 pacientes con infección confirmada por COVID-19, la positividad de RT-PCR fue más alta en muestras de lavado broncoalveolar (93%), seguida de esputo (72%), torunda nasal (63%) y torunda faríngea (32%) (16).

Como el diseño del cebador es específico de la secuencia del genoma del SARS-CoV-2, la especificidad de la mayoría de las pruebas de RT-PCR es del 100% (16).

Otras muestras clínicas donde es posible encontrar genoma viral son la sangre, materia fecal y orina, aunque no se utilizan rutinariamente (12).

Otra herramienta importante en la detección de la infección por COVID-19 es el diagnóstico serológico, midiendo la respuesta inmune del hospedador a la infección por SARSCoV-2. El diagnóstico serológico es especialmente importante para pacientes con enfermedad leve a moderada que pueden presentar retraso, más allá de las primeras 2

semanas de inicio de la enfermedad. Además esta detección permite conocer el alcance de COVID-19 en la población e identificar a las personas inmunes y potencialmente "protegidas" contra la infección (16).

Los Ac totales son el marcador serológico más sensible y más temprano, los niveles aumentan a partir de la segunda semana de inicio de los síntomas, aunque es posible la detección de IgM e IgG a través de la prueba ELISA al cuarto día tras el comienzo de los síntomas (16).

- IgM: Respuesta inmune primaria. Es la primera que se desencadena y representa la respuesta inicial de nuestro sistema de defensa. Tienen una vida limitada.
- IgG: Respuesta inmune secundaria. Se generan en una "segunda oleada" y permanecen durante más tiempo en el organismo. Respecto al SARS-CoV-2 no sabemos aún cuánto tiempo van a estar en plasma ni siquiera si van a tener una función protectora.

Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que constan de un elemento biológico de reconocimiento selectivo (bioreceptor), asociado con un transductor que está preparado para detectar el reconocimiento molecular entre el analito y la biomolécula y transformarlo en una señal analítica (17,18).

El material biológico permite la selectividad del biosensor, mientras que la sensibilidad se debe al transductor. Por eso es muy importante la selección adecuada de ambos componentes (17,19).

El material biológico se inmoviliza sobre el transductor. Hay distintos métodos de inmovilización que permiten proporcionar un control adecuado de la densidad de empaquetamiento y de la orientación de las moléculas, de manera que se facilite el reconocimiento molecular. Esta inmovilización debe garantizar una mínima pérdida de la capacidad de unión entre analito y bioreceptor, además de una adsorción inespecífica de material biológico sobre el transductor despreciable (20).

Los tipos de inmovilización son adsorción, atrapamiento en películas, incorporación a bicapas lipídicas, inclusión en el material de electrodo, enlace de afinidad, enlace covalente y quimisorción (20).

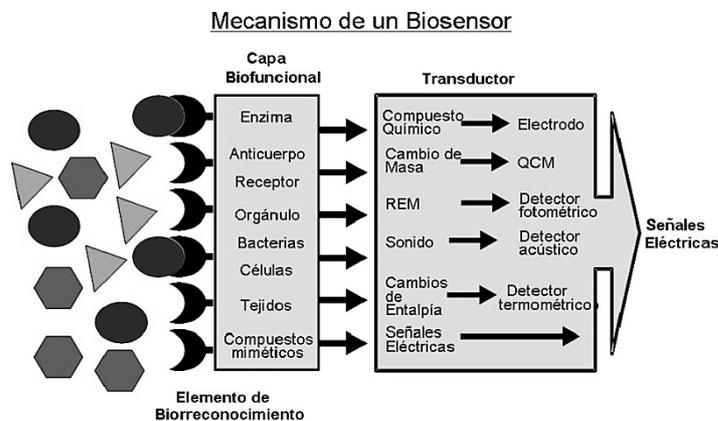


Figura 4. Esquema de un Biosensor, incorporando los diferentes componentes que pueden integrarlo (17).

Entre las características de los biosensores encontramos su especificidad, elevada sensibilidad, capacidad de respuesta rápida que desemboca en un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización y miniaturización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo coste (18). Todas estas buenísimas propiedades los convierten en opciones muy atractivas como herramientas analíticas.

Como se aprecia en la Figura 5, el funcionamiento de un biosensor consta de tres etapas (17):

1. Interacción específica del analito presente en la muestra con el material biológico inmovilizado sobre el transductor.
2. Detección de la variación de alguna propiedad física o química del sistema, por el transductor, debido a la reacción de reconocimiento selectivo.
3. Procesamiento de la señal y obtención de resultados.

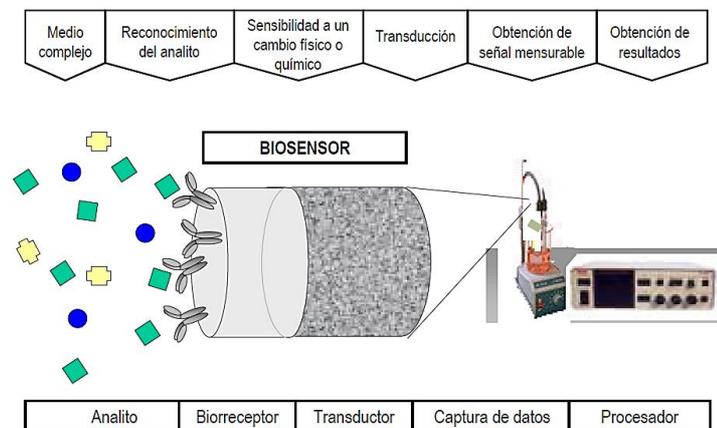


Figura 5: Principio de funcionamiento de un biosensor (17).

Tras esta breve presentación de los biosensores pasaré a describir un inmunosensor y un genosensor electroquímico como sistemas para el posible diagnóstico del SARS-CoV-2.

A. Inmunosensores

Los inmunosensores son dispositivos que emplean anticuerpos (Ac), proteínas que se unen de manera selectiva a un antígeno (Ag) específico y que en condiciones determinadas también puede reconocer moléculas de pequeño tamaño conocidas como haptenos. Ambos, antígenos y haptenos son los analitos susceptibles de ser determinados con estos inmunosensores (18).

Cada Ag o hapteno necesitan la creación de un Ac específico, su aislamiento y su posterior purificación pudiéndose utilizar tanto Ac policlonales como monoclonales. Los Ac monoclonales tienen la ventaja de presentar mayor especificidad, pero su sensibilidad es menor que la de los Ac policlonales (18).

Los Ac son un grupo de glicoproteínas que participan en el sistema inmune (pertenecen a la inmunidad específica) conjugándose con los Ag, marcándolos y destruyéndolos posteriormente. Pertenecen a la familia de las proteínas globulares, las inmunoglobulinas. Existen cinco clases de Ac o inmunoglobulinas (Ig) denominadas como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (21).

En los últimos años con mayor frecuencia, se ha avanzado en la producción de Ac recombinantes y el uso de fragmentos (Fab, Fab' o Fv) de Ac con el único fin de aumentar la selectividad y disminuir las interacciones no específicas.

En la Figura 6 se observa el esquema de un inmunosensor competitivo. Sobre un electrodo de grafito-teflón con oro coloidal se inmoviliza el Ac correspondiente al analito y se añade albúmina para proteger la superficie del electrodo de adsorciones inespecíficas. Una vez preparado el electrodo se añade una mezcla de Ag marcado con un enzima y la muestra problema. Finalmente se añade el sustrato del enzima y se monitoriza el producto enzimático.

En este caso, al ser un ensayo competitivo, al aumentar la concentración de analito en la muestra disminuye la señal. Esta señal es proporcional a la concentración de enzima, que aumentará cuanto mayor sea la cantidad de Ag marcado unido al Ac, es decir, cuanto menos analito hay en la muestra.

Siempre se añade la misma cantidad de Ag marcado y de sustrato enzimático, para así poder realizar el calibrado y conocer la concentración de analito.

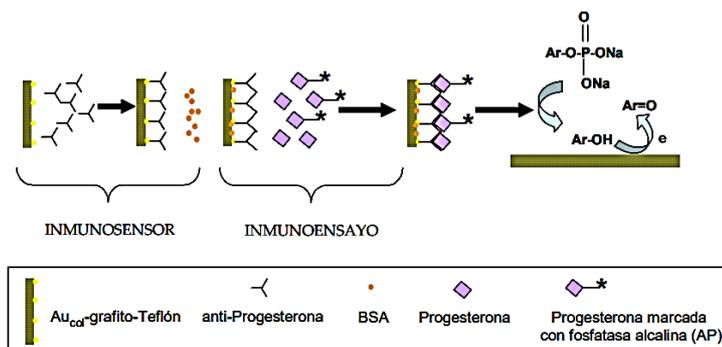


Figura 6. Esquema de un inmunosensor competitivo simultáneo para la detección de progesterona (22).

B. Genosensores

Un genosensor es un biosensor en el que el elemento de reconocimiento biológico son hebras de ADN (llamada sonda de ADN). El fundamento de su funcionamiento es la hibridación con las hebras complementarias, a través de la renaturalización de la doble hélice controlada por el rigor o la astringencia en el apareamiento (17,19).

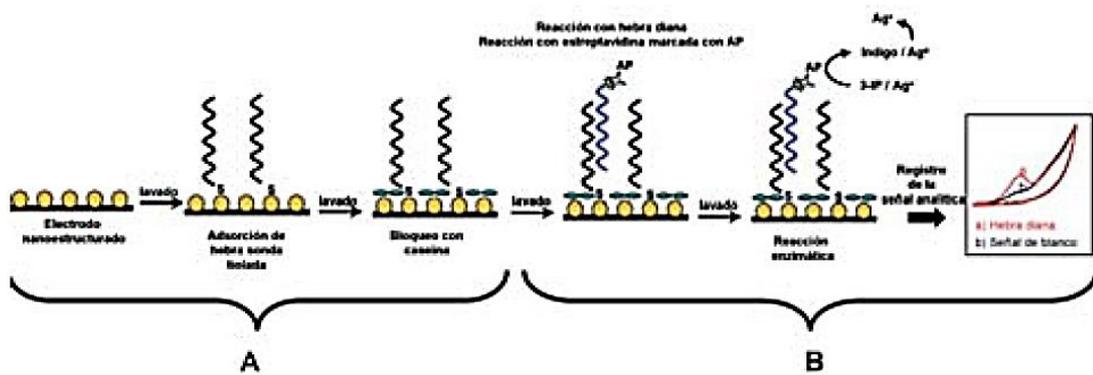
La interacción ADN-ADN o ADN-ARN es el fundamento de la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Se denomina hibridación al proceso por el cual dos hebras de ácidos nucleicos se unen por reconocimiento de la complementariedad de sus secuencias de bases, para formar una doble hélice estabilizada por puentes de hidrógeno cooperativos. Es un proceso de reconocimiento muy selectivo que nos permite realizar el diagnóstico de microorganismos, y en este caso del virus (23).

Inicialmente el origen del material genético de la sonda era ADN o ARN purificado ya fuese humano, vírico o bacteriano, pero en la actualidad, gracias a los avances disponemos de secuencias sintéticas de oligonucleótidos de elevada pureza, obtenidos por tecnología del ácido nucleico recombinante o la síntesis química (20).

Los más frecuentes son los biosensores electroquímicos. En este caso la sonda de captura se inmoviliza sobre la superficie del transductor electroquímico y la interacción sonda-analito producirá un cambio que el transductor transformará en una señal eléctrica. La inmovilización de la sonda sobre el transductor electroquímico debe realizarse con cuidado para evitar que ninguno pierda sus características funcionales. La inmovilización ideal debe realizarse sobre una superficie por un punto único de unión de la molécula en el extremo 3' o 5'. Obteniéndose así mayor eficiencia en la reacción de hibridación, es una situación similar a lo que se produce en disolución. Asimismo, las capas resultantes deben ser estables en las condiciones de la operación y almacenamiento (17).

Como ejemplo se presenta la Figura 7 en la que se observa un biosensor para la detección del SARS-CoV-1. En este se emplea como transductor un electrodo serigrafado nanoestructurado con partículas de oro. El elemento de reconocimiento es un oligonucleótido de 30 bases tiolado en el extremo 3' complementario a la diana concreta del genoma del virus biotinilado en el extremo 3' para su marcaje mediante la adición del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (AP).

Se añade la mezcla 3-indoxil fosfato/ Ag^+ (3-IP/ Ag^+) y tras un tiempo de espera se produce la catálisis enzimática, la plata elemental acumulada en la superficie del electrodo producida en la reacción enzimática, se redissuelve por voltamperometría lineal de redisolución anódica. Debido a la catálisis enzimática se genera la señal analítica que es proporcional a la concentración de enzima sobre el electrodo, y a su vez, a la concentración de analito (19).



Etapa de construcción del elemento de reconocimiento. Se ordenan las sondas sobre nanopartículas de oro por la interacción S-Au.

Metodología analítica seguida para la obtención de la señal analítica

Figura 7. Esquema del funcionamiento de un biosensor para la detección de SARS-CoV-1 (19).

C. Diseños actuales de inmuno y biosensores

i. Inmuno sensor piezoeléctrico

Zuo et al. (24) desarrollaron un inmuno sensor piezoeléctrico (PZ) para la detección SARS-CoV en esputo en fase gaseosa. El Ac policlonal de caballo contra el SARS-CoV se une a la superficie del cristal PZ en una orientación ordenada a través de la proteína A.

La muestra que contiene el Ag se atomiza en aerosol mediante ultrasonido, por el cual el Ac en el cristal se une específicamente al Ag SARS-CoV. Esto desencadena una variación en la masa de cristal, lo que provoca un cambio de frecuencia. Se registran los

cambios de frecuencia producidos tras la reacción Ag-Ac. El esquema de este inmunosensor piezoeléctrico puede verse en la Figura 8.

En las condiciones óptimas, los cambios de frecuencia dependen linealmente de la concentración de Ag en el intervalo de 0,6-4 μ g/mL.

El dispositivo tiene buena reproducibilidad dado que podría reutilizarse 100 veces sin pérdida de actividad detectable, buena estabilidad debida a que el inmunosensor fue estable durante más de dos meses tras el almacenamiento sobre gel de sílice azul a 4-6°C, además de presentar un tiempo de análisis corto, con menos de 2 min, y gran especificidad.

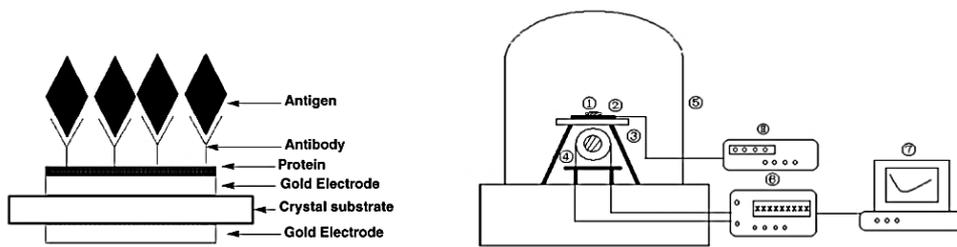


Figura 8. Esquema de un inmunosensor piezoeléctrico (24).

ii. Genosensor electroquímico

Un estudio realizado por Agustín Costa-García y col. (25) utilizaron un complejo de oro como marcador electroactivo para monitorizar los ensayos de hibridación en electrodos de carbono vitrificado.

El oro iónico está unido a una secuencia de 30 mer del virus SARS, responsable de la neumonía atípica, utilizando aurotiomalato de sodio. Con el fin de marcar ésta sola hebra, se prepara una mezcla de aurotiomalato de sodio junto con la hebra. Se incuba durante 24 h a 37°C y, finalmente, el oro libre se separa de la cadena marcada mediante una membrana de diálisis en una disolución de NaCl 0,15 M (pH 7'5).

El sensor de hibridación de ADN fue diseñado para inmovilizar la sonda complementaria en la superficie del electrodo pretratado. La reacción de hibridación tiene lugar con la hebra marcada con oro. La determinación electroquímica se basa en el efecto catalítico del oro electrodepositado en la reducción de iones de plata añadidos posteriormente al electrodo. El esquema se muestra en la Figura 9.

En condiciones experimentales no extremas, se obtuvo un límite de detección de 15 fmol (30 μ L), y se logró la discriminación entre un oligonucleótido complementario y un oligonucleótido complementario con tres bases diferentes. Para la discriminación de una secuencia complementaria con un error de una sola base, fue necesario el uso de condiciones más severas (50% de formamida en el tampón de hibridación).

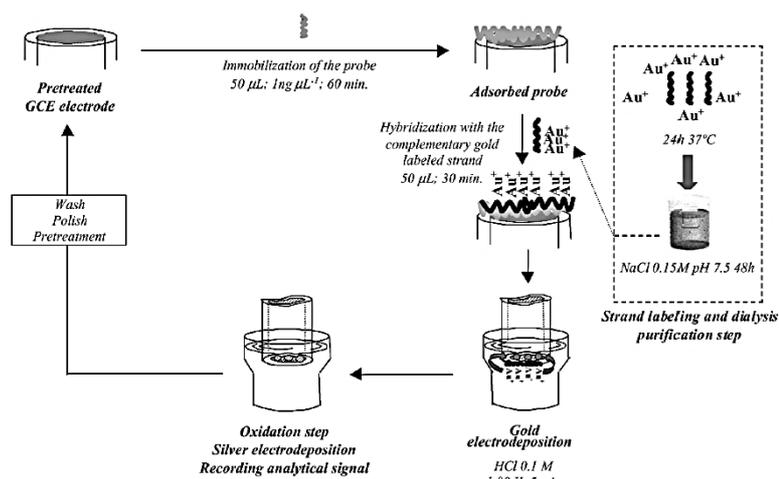


Figura 9. Esquema de un genosensor de hibridación de ADN (25).

iii. Determinación de micro ARN

Vargas et al. (26) realizaron un trabajo en el que describieron un magnetobiosensor amperométrico sensible para la determinación rápida y sencilla de microARN (miARN).

En la estrategia desarrollada se implica el uso de la hibridación directa del miARN objetivo (miARN-21) con una sonda de ADN biotinilada complementaria inmovilizada en micropartículas magnéticas modificadas con estreptavidina (MB) y la reacción de los heterodúplex resultantes con un Ac específico de ADN-ARN marcado con la proteína A (ProtA) conjugada con un homopolímero de peroxidasa (HRP) (Poly-HRP40) como un marcador enzimático para la amplificación de la señal.

La detección amperométrica se realiza tras la captura magnética de las micropartículas sobre la superficie del electrodo de trabajo, electrodos de carbono serigrafiados desechables (SPCE) utilizando el sistema H₂O₂/hidroquinona (HQ). La magnitud de la señal catódica obtenida a -0,20V (frente al electrodo de pseudo-referencia Ag) mostró una relación lineal con la concentración del miARN sintético en el intervalo de 1,0 a 100 pM. El método proporcionó un límite de detección (LOD) de 10 attomoles (en una muestra de 25µL) sin ninguna amplificación de miARN en solo 30 minutos (una vez que se prepararon los MB de la sonda de captura de ADN). Este enfoque mostró una mejor sensibilidad en comparación con la de los biosensores construidos con el mismo Ac anti-ADN-ARN de captura en lugar de un segundo anticuerpo de detección, y además se marcó con un conjugado Strep-HRP en lugar del homopolímero Poly-HRP40. Esquema que se muestra en la Figura 10.

La estrategia desarrollada implica un protocolo de trabajo de un solo paso, así como la posibilidad de aumentar la sensibilidad debido a que se aumenta el número de moléculas HRP unidas a la proteína A, por lo que incrementa proporcionalmente la concentración de enzima por heterodúplex ADN/miARN formado. La utilidad práctica se demostró mediante la determinación de los niveles endógenos del miARN diana maduro en 250ng de ARN total bruto (ARNt) extraído de células epiteliales normales mamarias humanas (MCF-10A) y células cancerosas (MCF-7) y tejidos tumorales.

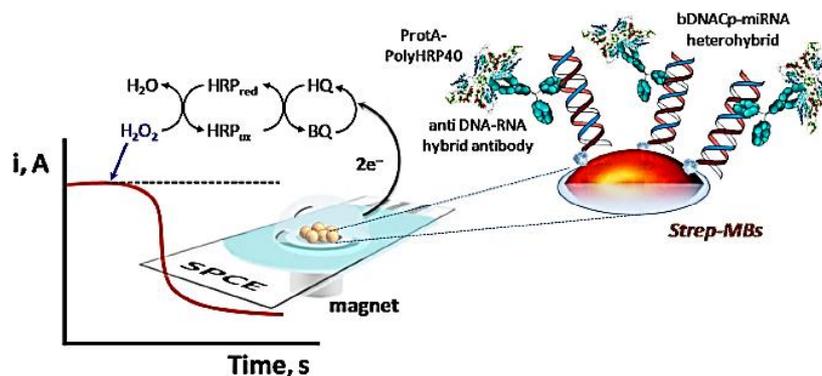


Figura 10. Esquema de los fundamentos del biosensor amperométrico desarrollado para la determinación de microARN (miARN) (26).

D. Propuesta de un diseño de diagnóstico hipotético

Para la detección del COVID-19 se plantea el diseño de un biosensor electroquímico formado por electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) desechables. Estos SPCE constan de un electrodo de trabajo de carbono de 4 mm de diámetro, un electrodo contador también de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata (Ag), pudiéndose usar como transductores electroquímicos. Se muestra en la Figura 11.

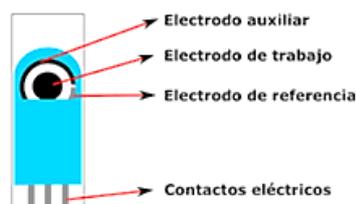


Figura 11: Biosensor electroquímico formado por electrodos de carbono serigrafiado (SPCE) desechable (27).

Se pueden aprovechar la gran afinidad mostrada por los Ac contra heterohíbridos ARN/ADN. El diagnóstico se asienta en la determinación del ARN del SARS-CoV-2. Este se basa en la hibridación del ARN de la muestra con la sonda de ADN complementaria biotinilada (b-ADNCp) inmovilizada en micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Strep-MPs), el reconocimiento de los heterohíbridos ADN-ARN perfectamente combinados con un Ac específico para heterodúplex ADN-ARN, marcado con proteína A conjugada con un homopolímero HRP (ProtA-PolyHRP40); y detección amperométrica en SPCE. Este proceso se puede ver en el esquema de la Figura 12.

En este caso el Ac actúa como elemento de detección, en vez de elemento de captura, de los heterodúplex ADN-ARN previamente unidos a las micropartículas.

Una vez que se ha realizado la captura magnética de las MP sobre los electrodos de carbono, se añade una mezcla de H₂O₂/hidroquinona (HQ), y tras la reacción enzimática se mide la corriente catódica generada por la BQ formada enzimáticamente. La magnitud de la corriente catódica se relaciona con la concentración del ARN diana de la muestra analizada.

Es necesario que se lleve a cabo la captura selectiva del ARN objetivo en las MP modificadas con b-ADNCp y el marcaje de los heterodúplex b-ADNCp-ARN con el Ac anti-

ADN-ARN unido al conjugado ProtA–PolyHRP40. Además de la detección amperométrica de la corriente catódica producida por la adición de H_2O_2 , utilizando HQ como mediador redox en disolución, después de la captura magnética de las MP modificados en la superficie del electrodo de trabajo del SPCE.

La extracción de ARN se puede realizar de la siguiente manera, se lavan las células de la muestra de exudado con PBS, se rascan y centrifugan. Después de homogeneizar el sedimento durante 5 min en reactivo Tri Reagent a temperatura ambiente, se realiza la extracción con cloroformo y el ARN, en la fase acuosa superior, se precipita con alcohol isopropílico y se lava dos veces en EtOH al 70%. Finalmente, el sedimento se seca durante 10 minutos en una placa de calentamiento a $80^\circ C$, se disuelve en agua libre de ARNasa y se almacena a $-80^\circ C$. La calidad y concentración del ARN se evalúa midiendo la absorbancia a las longitudes de onda apropiadas (260, 230 y 280nm), obteniendo valores de relación que confirman ARN puro.

Para realizar el paso de hibridación es posible utilizar diferentes protocolos, como se trata de un diagnóstico es importante que sea rápido, mejor emplear un protocolo en el que la hibridación y el marcaje se realicen en un solo paso incubando los bADNCp-MP en una disolución que contiene una mezcla del ARN objetivo, el Ac anti-ADN-ARN y ProtA- HRP40 durante 30 min.

La muestra no debe ser superior a 250ng de ARN para no superar la cantidad de bADNCp inmovilizado en los MP y por tanto disminuiría la respuesta amperométrica.

Para capturar las micropartículas magnéticamente en la superficie del electrodo de carbono de trabajo, se sitúa el SPCE en una carcasa de teflón con un imán encapsulado. Las reacciones de hibridación se controlan midiendo la corriente de reducción que genera de la benzoquinona (BQ) formada en la oxidación catalizada por HRP de HQ tras la adición de una disolución de H_2O_2 usando amperometría en disoluciones agitadas. Se sumerge el conjunto de bloque de retención de SPCE/imán en una célula electroquímica que contiene 10 ml de disolución tampón de fosfato de sodio 0,05 M (pH 6,0) y HQ 1,0 mM (preparado justo antes de realizar la medición electroquímica) y aplicando un potencial de detección de -0,20V vs electrodo de pseudoreferencia Ag. Una vez la línea de base se estabiliza (~60 s), se agregaron 50 μL de H_2O_2 (0.1 M) y se registra la corriente hasta alcanzar el estado estable (100 s). La magnitud de la corriente catódica medida está relacionada con la cantidad de HPR inmovilizada en la superficie de las MP, que está a su vez relacionado con el número de heterodúplex formados y por tanto, es proporcional a la concentración de ARN en la muestra.

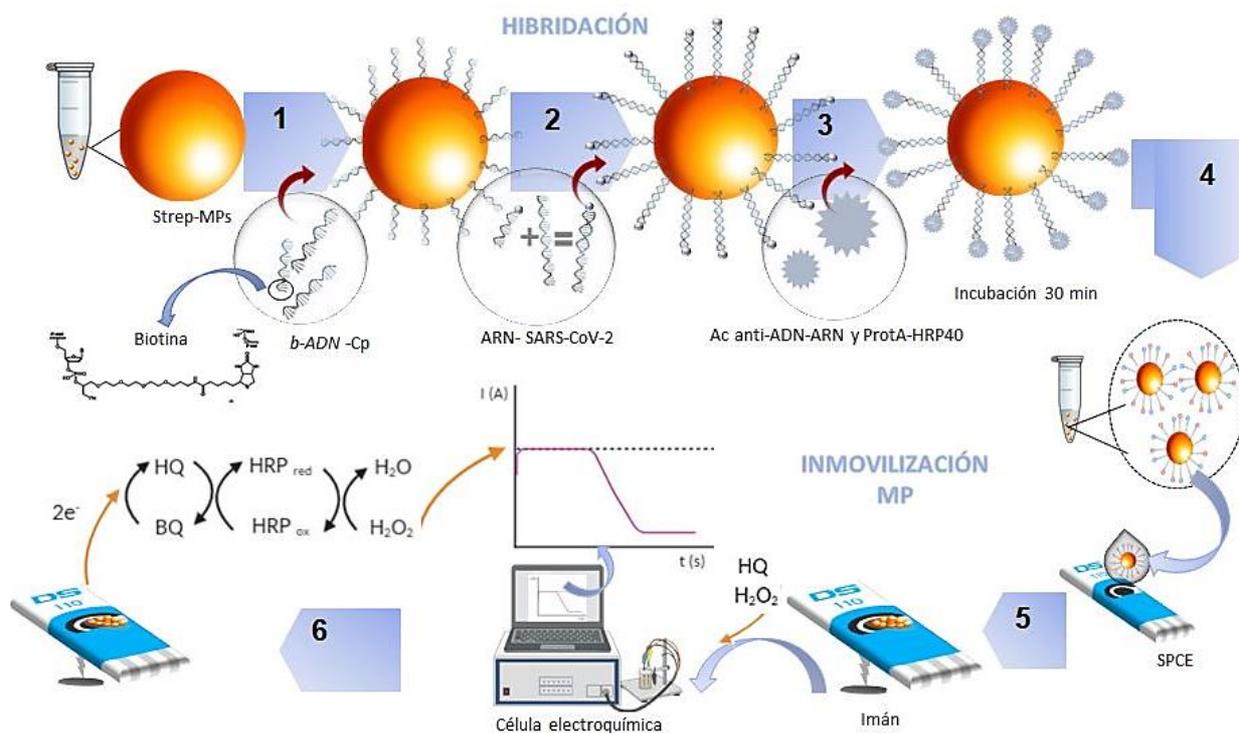


Figura 12: Esquema del diseño de la propuesta del diagnóstico de SARS-CoV-2.

7. CONCLUSIÓN:

Este trabajo describe un nuevo biosensor electroquímico desechable para la detección rápida, fácil y sensible de la COVID-19. Combina el uso de una sonda de captura selectiva de ADN específico con tecnología de macropartículas magnéticas para la identificación del material genético, ARN, del SARS-COV-2.

Dentro del grupo de los inmunosensores, aquellos que están basados en la detección electroquímica, son los más usados debido al bajo coste de los instrumentos empleados, la sensibilidad, facilidad de miniaturización y potencial de portabilidad para análisis in situ.

Poseen diversas ventajas que los consolidan como métodos de transducción ampliamente utilizados. Entre estas ventajas se encuentra la naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas, que posibilita la monitorización de volúmenes pequeños de muestra, lo que hace que los inmunosensores electroquímicos sean especialmente adecuados para la monitorización "in vivo". Además, son altamente sensibles, sencillos, de fácil manejo, bajo coste y fácil miniaturización.

Los genosensores electroquímicos representan un gran impacto en el diagnóstico debido a que son técnicas de gran rapidez y, sensibilidad, son capaces de simplificar el procedimiento de manera que lo reducen a un par de etapas en comparación a las metodologías clásicas, bajo coste, posibilidad de producción masiva y de hibridación en fase sólida. Su transferencia a la industria está en proceso de evaluación, debido a la falta de relación entre el desarrollo científico y las expectativas comerciales. Las limitaciones que presentan vienen dadas por la dificultad en la detección del ADN:

- La detección electroquímica directa posterior a la hibridación puede ser difícil.

- Es necesario el marcaje para poder monitorizar la reacción de hibridación y producir la señal de detección relacionada con la concentración de analito.

Hasta ahora se cuenta con un inmunosensor electroquímico y con un genosensor electroquímico para poder diagnosticar el contagio por SARS-CoV. Pero si aunamos las ventajas de ambos en un nuevo método tratando de eliminar las limitaciones de cada uno de ellos, podemos estar ante un nuevo método de diagnóstico competente que puede ahorrar tiempo a la hora de la determinación de la enfermedad y comenzar antes con el tratamiento sintomático.

Entre las ventajas de este hipotético método de diagnóstico propuesto, se encuentran que es una estrategia sensible y selectiva que no necesita la amplificación de los ácidos nucleicos. Además de la obtención de los resultados en un corto periodo de tiempo, la simplicidad, el bajo coste y la viabilidad de adaptar la sensibilidad final, lo convierte en una técnica prometedora. Todo ello hace que esta técnica pueda ser útil para la determinación de cualquier ARN y realizar múltiples análisis.

El hecho de que se pueda utilizar como muestra a analizar un aerosol, implica gran beneficio a la hora de diagnosticar esta enfermedad respiratoria, porque facilita y abarata la adquisición de muestras, ya que simplifica el proceso de toma de muestra.

Este biosensor es un dispositivo muy interesante y atractivo dado que ofrece una alternativa a las metodologías basadas en PCR para detectar secuencias de ARN. También permite abordar gran variedad de problemas biológicos como análisis de alimentos, biodiagnóstico, monitorización ambiental y cribado genético.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández G. SARS: Epidemiología y mecanismos de transmisión. Med Intensiva [Internet]. 2003;27(10):686–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0210-5691\(03\)79993-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0210-5691(03)79993-8)
2. Hui DSC, Zumla A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. Infect Dis Clin North Am [Internet]. 2019;33(4):869–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.07.001>
3. John Carter. Virology Principles and Application.
4. Garcia-alamino JM. Aspectos epidemiológicos, Clínica y Mecanismos de control de la pandemia por SARS-CoV-2. Enfermería Clínica [Internet]. 2020;1–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2020.05.001>
5. CRISTINA CASTILLO. Infecciones Emergentes Causadas Por Coronavirus. Los Virus Sars-Cov Y Mers-Cov [Internet]. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia. 2016. Available from: [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65125/CASTILLO MARTIN%20CRISTINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65125/CASTILLO_MARTIN%20CRISTINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
6. Ramses Salas-Asencios, Iannacone-Oliver J, Guillén-Oneeglio A, Fieno JT-D, Alvaríño-Flores L, Castañeda-Pérez L, et al. Coronavirus Covid-19: Knowing the Cause of the Pandemic. Biol. 2020;18(1):9–27.
7. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19- 11 March 2020.
8. Bonilla-Aldana DK, Villamil-Gómez WE, Rabaan AA, Rodríguez-Morales AJ. Una nueva zoonosis viral de preocupación global: COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019 TT - A new viral

- zoonosis of global concern: Coronavirus COVID-19 disease in 2019. *Iatreia* [Internet]. 2020;33(2):107–10. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932020000200107&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/iat/v33n2/0121-0793-iat-33-02-107.pdf
9. Madigan MT, Clark DP. Broch Biología de Los microorganismos.
 10. Isolated S-S. crossm Complete Genome Sequence of a 2019 Novel Coronavirus. 2020;(February):19–21.
 11. Bormann J. The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(1):16–9.
 12. Herrera F. Nuevo coronavirus SARS-COV-2 y enfermedad COVID-19 La pandemia que cambió al mundo . 2020;(8).
 13. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. Vol. 27, *Journal of Travel Medicine*. 2020.
 14. Kolifarhood G, Aghaali M, Saadati HM, Taherpour N. Epidemiological and Clinical Aspects of COVID-19 ; a Nar- rative Review. 2020;8(1):1–9.
 15. Madrigal-rojas JP, Quesada-lor M, Solano-chinchilla A, Costarricense C, Social S, Jos S, et al. SARS-CoV-2, manifestaciones clínicas y consideraciones en el abordaje diagnóstico de COVID-19. *Rev Med Costa Rica* [Internet]. 2020;85:13–21. Available from: <http://www.revistamedicacr.com>
 16. Sethuraman N, Stanleyraj S, City Y, Ryo A, City Y. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. 2020;2019:2019–21.
 17. Pividori MI. Nuevos genosensores amperométricos Diseño y Construcción. 2002;
 18. Ortiz FO. Biosensores Y Biochips: Herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. 2006;
 19. Garc LEZ, Garc C. Los biosensores electroquímicos : herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Inmuno electroanálisis*. 2010;197–222.
 20. Castro RM. Sensores electroquímicos de ADN para el diagnóstico de *Legionella pneumophila*. *Pathologist*. 1984;38(10):668.
 21. Kergaravat SV. Diseño de inmunosensores electroquímicos para la detección de biomoléculas marcadoras en el diagnóstico clínico. 2013;250.
 22. Carralero Sanz V. Preparación De Biosensores Enzimáticos E Inmunosensores Basados En Electrodo Modificados Con Nanopartículas De Oro. 2009. 265 p.
 23. Martino MJ. Diseño de un sistema rápido de detección de *Legionella pneumophila* mediante biosensores electroquímicos Departamento de Química Analítica. 2013.
 24. Zuo B, Li S, Guo Z, Zhang J, Chen C. Piezoelectric immunosensor for SARS-associated coronavirus in sputum. *Anal Chem*. 2004;76(13):3536–40.
 25. de la Escosura-Muñiz A, González-García MB, Costa-García A. DNA hybridization sensor based on aurothiomalate electroactive label on glassy carbon electrodes. *Biosens Bioelectron*. 2007;22(6):1048–54.
 26. Vargas E, Torrente-Rodríguez RM, Montiel VRV, Povedano E, Pedrero M, Montoya JJ, et al. Magnetic beads-based sensor with tailored sensitivity for rapid and single-step amperometric determination of miRNAs. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):1–15.
 27. <https://quimicosonador.wordpress.com/tag/electroquimica/>.