REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Herramientas biotecnológicas en el diagnóstico, prevención y tratamiento frente a pandemias Biotechnological tools in the diagnosis, prevention, and treatment of pandemics

Pamela Molina¹ and Marbel Torres Arias²

DOI. 10.21931/RB/2021.06.03.33

2091

Resumen: Las pandemias son consideradas como un problema emergente de salud pública a nivel mundial, las cuales además de caracterizarse por tasas altas de morbilidad y mortalidad, ocasionan conflictos en los aspectos sociales, económicos y políticos. Las herramientas biotecnológicas, por su parte, han ido evolucionando conforme al avance tecnológico-científico, lo que ha permitido optimizar métodos de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, además de mejorar el desarrollo de productos biológicos para la prevención y terapia de enfermedades. El objetivo de esta revisión es identificar la actualización de las herramientas biotecnológicas en el diagnóstico, tratamiento terapéutico y profiláctico frente a los patógenos causantes de las enfermedades pandémicas a lo largo de la historia, mediante la recopilación de información científica. Con este estudio se logró establecer que las herramientas y productos de origen biotecnológico han constituido un papel fundamental en el control de pandemias a través de la innovación constante que ha permitido alcanzar resultados eficientes tanto en diagnóstico como en el tratamiento.

Palabras clave: Diagnóstico, herramientas biotecnológicas, pandemias, productos biológicos, vacunas.

Abstract: Pandemics are considered as an emerging public health problem worldwide, which in addition to being characterized by high rates of morbidity and mortality cause conflicts in social, economic and political aspects. Biotechnological tools, for their part, have evolved according to technological-scientific advance, which has allowed optimizing diagnostic methods with high sensitivity and specificity; in addition to improving the development of biological products for the prevention and therapy of diseases. The objective of this review is to identify the performance of biotechnological tools in the diagnosis, therapeutic and prophylactic treatment against pathogens that cause pandemic diseases throughout history, through the collection of scientific information. Finally, with this study it was possible to establish that tools and products of biotechnological origin have constituted an fundamental role in the control of pandemics through constant innovation that has allowed achieving efficient results in both diagnosis and treatment.

Key words: Diagnostics, biotechnological tools, pandemics, biological products, vaccines.

Introducción

La manifestación de enfermedades infecciosas a lo largo de la historia de la humanidad además de ser una de las principales causas de mortalidad y morbilidad^{1,2}, han dejado secuelas letales y duraderas en el ámbito social, económico y político, siendo las de mayor proporción las enfermedades que han sido capaces de provocar pandemias³⁻⁵. Es así que una de las catástrofes más devastadoras que ha golpeado al mundo es la peste negra, en el siglo XIV, ocasionando el fallecimiento del 30-50% de la población europea de la época, en un corto periodo de tiempo (1347-1351)⁶.

El desarrollo de enfermedades infecciosas emergentes puede ocurrir por tres eventos claves: 1) el cruce de barreras geográficas debido a la invasión de espacios silvestres, 2) el cruce de barreras por compatibilidad gracias a la evolución y 3) el levantamiento de barreras por el cambio de condiciones ambientales que favorecen la formación del nicho ecológico adecuado, siendo la primera la que define la situación⁷. Jones *et al.*⁸ concluyeron en su investigación que el 60,3% de enfermedades infecciosas son originadas por patógenos zoonóticos y el 71,8% de estas son de origen silvestre, lo que indica que estos microorganismos figuran una amenaza potencial para la salud mundial, con perspectiva a la manifestación de epide-

mias y posibles pandemias, en caso de no tomar las medidas precautelares.

Durante el origen de una epidemia y/o pandemia, el diagnóstico temprano, el tratamiento, el seguimiento epidemiológico y la prevención de futuras infecciones han sido procesos fundamentales para el manejo clínico, control y mitigación de la enfermedad^{9,10}. Aquí la biotecnología juega un papel fundamental, por lo que en este estudio se consideran las herramientas biotecnológicas modernas empleadas en el desarrollo de pruebas de diagnóstico, producción de moléculas biotecnológicas para el tratamiento y en el diseño de vacunas. Con el objetivo de identificar la evolución y optimización a través del tiempo de las herramientas biotecnológicas cuando nos enfrentamos a infecciones a nivel pandémico, mediante la comparación de sensibilidad y especificidad de los diferentes enfoques establecidos para el diagnóstico, y la recopilación de los resultados de los principales productos biotecnológicos llevados a ensayos clínicos en cada enfermedad.

Para la redacción del artículo se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva en revistas de alto impacto, en las que se tomó en cuenta: artículos originales, revisiones, resúmenes de conferencias y demás. Obteniéndose datos actualizados de

¹ Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador.

² Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador y Laboratorio de Inmunología y Virología, CENCINAT, GISAH, Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, Ecuador.

nueva tecnología desarrollada para diagnóstico, tratamientos biológicos, desarrollo de vacunas y su influencia en el manejo de epidemias y pandemias para apoyar al control de la Salud Pública.

Epidemias y pandemias importantes a partir de 1950

El término epidemia se refiere a "un brote de una enfermedad (especialmente una enfermedad infecciosa) que afecta a un gran número de personas dentro de una población al mismo tiempo"¹¹. Por otro lado, pandemia se define como "una epidemia que ocurre en un área muy amplia, cruza fronteras internacionales y generalmente afecta a un gran número de personas"¹².

Existen condiciones imprescindibles para la aparición de una epidemia, entre las características se hallan: transmisión eficiente entre humanos, un índice significativo de letalidad, falta de un tratamiento médico efectivo, una población inmunológicamente deprimida y una forma de diseminación rápida¹³.

Es así que, una pandemia se entiende como una enfermedad que ha alcanzado los cinco continentes, mientras que una epidemia es una enfermedad se esparce localmente^{11,12}.

A continuación, se abordarán el diagnóstico (Tabla 1), tratamientos biológicos (Tabla 2) y vacunas (Tabla 3) de las pandemias y epidemias más importantes en época cronológica, a partir del inicio de la biotecnología moderna (Figura 1).

H1N1 (1918-1919)

La pandemia de influenza más grave de la historia fue la gripe española H1N1 en 1918¹⁴, cubrió el mundo en cuatro meses cobrando aproximadamente de 50 a 100 millones de

vidas¹⁵. La falta de recursos limitó la identificación del origen de la gripe con lo que se hizo imposible el hallazgo de vacunas, además, no se logró controlar las infecciones secundarias con neumonía bacteriana debido a que la penicilina no se descubrió hasta 1928. A pesar del esfuerzo de las compañías farmacéuticas el virus desapareció antes de conseguir aislarlo¹⁴.

H2N2 (1957-1960)

Segunda gran pandemia de influenza registrada, la gripe asiática surgió en Singapur a finales de febrero de 1957 y duró hasta 1960, fue provocada por un subtipo de virus de la influenza A, denominado H2N2^{16,17}. A nivel mundial se registraron 1,1 millones de fallecimientos¹⁸.

El diagnóstico de la enfermedad se ejecutó mediante pruebas serológicas de laboratorio. La identificación de anticuerpos contra el antígeno viral del subtipo H2N2 a partir de suero de personas afectadas se realizó con la técnica de fijación del complemento (FC) y la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HAI) con el uso de tripsina y periodato de potasio para la inactivación de inhibidores específicos^{19,20}. Los estudios y la experiencia de campo demostraron que la FC presentó mayor sensibilidad, sin embargo, existieron casos en los que se requirieron de las dos técnicas para un diagnóstico confirmatorio²⁰.

Tratamiento terapéutico y profiláctico

La mortalidad de la pandemia de gripe asiática se redujo aproximadamente un 97% en comparación con la pandemia de gripe española¹⁵. Una de las aportaciones fundamentales en el control de la propagación de la influenza asiática fue el rápido proceso de preparación y distribución de la vacuna frente

Las principales pandemias a partir de 1950

Origen y número de muertes

Figura 1. Las principales pandemias a partir de 1950. Origen y número de muertes a nivel mundial.

Pandemia	Año	Ensayo biotecnológico	Tipos	Sensibilidad / Especificidad	Referencias
H2N2 (Gripe asiática)	1957-1960	Inmunoensayos	Fijación del complemento	Sensibilidad: 76.4%	20
			HAI	Sensibilidad: 61.8%	
H3N2 (Gripe de Hong Kong)	1968-1970	Inmunoensayos	Fijación del complemento	Sensibilidad: 78%	29
			HAI	Sensibilidad: 92%	
SARS-CoV-1 (SARS)	2002-2003	Cultivo viral	Virus detectado por la aparición de efecto citopático e IFD	Sensibilidad: 15.4% Especificidad: 98%	39,41,42,44
		Inmunoensayos	ELISA	Sensibilidad: 68.4-98.4% Especificidad: 99.89%	
			IFI	Sensibilidad: 92% Especificidad: 92%	
		Técnicas moleculares	RT-PCR	Sensibilidad: 44-60% Especificidad: 96%	
			qRT-PCR	Sensibilidad: 80% Especificidad: 100%	
				Especificidad: >95%	
H1N1 (Influenza H1N1)	2009-2010	Cultivo viral	Virus detectado por la aparición de efecto citopático, ensayo de HA o tinción por IFD		62
		Inmunoensayos	Prueba rápida de antígenos	Sensibilidad: 10-70% Especificidad: >95%	
			IFD para la detección de antígenos	Sensibilidad: 47-93% Especificidad: >96%	
		Técnicas moleculares	-RT-PCR	Sensibilidad: 86-100%	
MERS-CoV (MERS)	2012-2021	Técnicas moleculares	-qRT-PCR	Especificidad: >99%	80,81,219
			qRT-PCR	Sensibilidad: 92-100% Especificidad: 100%	
EBOV (EVE)	2013-2016	Inmunoensayos	Pruebas rápidas de detección de antígenos	Sensibilidad: 84-97% Especificidad: 98-100%	103,105
		Técnicas moleculares	Basadas en qRT-PCR	Sensibilidad: 82-100% Especificidad: 89-100%	
SARS-CoV-2 (COVID-19)	2019-2021	Técnicas moleculares	qRT-PCR estándar	Sensibilidad: 85-97% Especificidad: 90-100%	141,220
			Pruebas moleculares rápidas	Sensibilidad: 68-100% Especificidad: 86.7-98.3%	
		Inmunoensayos	Pruebas rápidas de detección de antígenos	Sensibilidad: 0-94% Especificidad: 98.1-99.9%	

Tabla 1. Especificidad y sensibilidad de las herramientas biotecnológicas frente al diagnóstico de pandemias.

al virus H2N2, se estima que en julio de 1957 inició el primer estudio clínico^{21,22}.

Existieron varias vacunas inactivadas de influenza en ensayos en humanos, desarrolladas a partir de líquido alantoideo de embriones de pollo infectados con diferentes cepas de influenza^{23,24}. Entre las que se encontraron vacunas monovalentes^{21-23,25} y polivalentes, en el caso de las polivalentes en algunas se incluyó el virus H2N2²⁵. Para la inactivación del virus se manejaron técnicas como irradiación ultravioleta²¹ y el empleo de formalina^{22,23,25}.

Las vacunas fueron probadas con diversas concentraciones de unidades de aglutinación de células de pollo (CCA) por mililitro, oscilando entre 200 CCA a 750 CCA²⁴, los resultados evidenciaron un porcentaje de eficacia estimado de 42% a 77%²⁴. Asimismo, se observó que la protección inducida era directamente proporcional a la dosis administrada de vacuna ante la presencia de una cepa de H2N2, estos datos se evaluaron mediante FC e HAI, en los que se determinaron el aumento de los niveles de anticuerpos contra el virus de la influenza asiática posterior a la vacunación en pacientes participantes^{21,23,25}.

Debido a que Centro América y Sudamérica no contaban con los recursos ni la tecnología para el desarrollo de una vacuna, y sumando los problemas serios en la salud pública, los sistemas de control no fueron efectivos como en Norteamérica. Por lo que, solo grupos selectos de personas en Chile, Brasil y Argentina accedieron al medicamento²⁶.

H3N2 (1968-1970)

La siguiente pandemia provocada por un virus de la influenza A surgió en julio de 1968 al sureste de China, con el subtipo H3N2, extendiéndose hasta 1970. La enfermedad se denominó gripe de Hong Kong, la cual provocó entre 1 y 4 millones de muertes a nivel mundial^{27,28}. El diagnóstico se basó en la identificación de síntomas combinado con ensayos serológicos. Para la detección de anticuerpos contra el virus H3N2 se empleó HAI y FC, con el uso de antígenos obtenidos del líquido alantoideo de huevo de las variantes aisladas de las diferentes propagaciones. Dando mejores resultados la HAI, sin embargo, fue recomendable realizar los dos métodos para obtener una máxima eficiencia en el serodiagnóstico²⁹.

Tratamiento terapéutico y profiláctico

Posterior al aislamiento viral y la confirmación de la aparición de H3N2, una variante antigénica del virus de la influenza con potencial epidémico, la cepa aislada fue distribuida a los laboratorios para la investigación y producción de vacunas^{27,30}. En EE. UU., en noviembre del mismo año estuvo disponible el primer lote de producción con 110 000 dosis, se trató de una vacuna inactivada monovalente de 400 CCA, desarrollada en huevos fértiles de gallina con la cepa Aichi de la influenza H3N2. A diferencia de la anterior pandemia, en esta ocasión existió un mayor número de vacunados, principalmente personas pertenecientes al grupo prioritario. Las semanas siguientes al lanzamiento del primer lote se produjeron y comerciali-

Pandemia	Tratamiento	Descripción	Fase de desarrollo/ Identificación	Referencias
SARS-CoV-1 (SARS)	Plasma convaleciente	Administración de 200-400 ml (4-5 ml / kg) de plasma convaleciente compatible para supresión de la viremia	No existe	46
	Pentaglobulina	Inmunoglobulina intravenosa comercial enriquecida con IgM. Una dosis de 5 ml / kg / día durante 6 h por 3 días consecutivos	No existe	47
H1N1 (Influenza H1N1)	Inmunoglobulina intravenosa	H-IVIG obtenida de plasma convaleciente	No aplicable NCT01617317	65
	Plasma convaleciente	Plasma de convalecencia con un título de anticuerpos neutralizantes de $\geq 1:160$	No existe	66
MERS-CoV (MERS)	Plasma convaleciente	Actividad neutralizante eficaz con PRNT $\geq 1:80$	Fase 2 NCT02190799	90
	REGN3048B-REGN3051	mAb neutralizantes completamente humanos contra MERS-CoV dirigido al RBD de la proteína S	Fase 1 NCT03301090	91
	SAB-301	Anticuerpo IgG policlonal completamente humano dirigido a la proteína S	Fase 1 NCT02788188	93
	Interferón β -1b recombinante más lopinavir-ritonavir	Interferón presenta efectos inhibidores sobre el MERS-COV y lopinavir-ritonavir son antirretrovirales inhibidores de la proteasa	Fase 2/3 NCT02845843	87
	ZMapp	Cóctel de tres mAb anti-EBOV-GP	Fase 1/2 NCT02363322	109
	Plasma convaleciente	Intervención terapéutica contra la EVE	Fase 2/3 NCT02342171	108
	TKM-100802	ARNip que inhiben la expresión de VP35 y L-polimerasa.	Fase 2 PACTR201501000997429	111
EVE EBOV (EVE)	Interferón (IFN β -1a)	IFN- β 1a posee actividad antiviral de amplio espectro	Fase 1/2 ISRCTN17414946	110
	Inmazeb (REGN-EB3)	Cóctel de tres anticuerpos dirigidos a la GP del EBOV. Aprobado con una dosis intravenosa de 150mg/kg.	Aprobado PALM: NCT03719586	112-114
	Ebanga (mAb114)	mAb anti-EBOV-GP, derivado de un sobreviviente del brote de Kikwit de 1995. Con una única dosis intravenosa de 50 mg/kg	Aprobado PALM: NCT03719586	112,115,116
SARS-CoV-2 (COVID-19)	Bamlanivimab (LY-CoV555 o LY3819253)	mAb neutralizante, dirigido al RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Aprobado con dosis única de 700 mg	Fase 2 NCT04427501 EUA por la FDA	150-152

Tabla 2. Principales ensayos clínicos de herramientas biotecnológicas usadas como tratamiento terapéutico y profiláctico de pandemias.

	Bamlanivimab (LY3819253 o LY-CoV555) y etesevimab (LY3832479 o LY-CoV016)	mAb IgG1 neutralizantes que se unen a epítopos distintos pero superpuestos del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Aprobado con dosis única intravenosa de 700mg (bamlanivimab 350mg e etesevimab 350 mg)	Fase 2/3 NCT04427501 EUA la FDA	150,153
	REGN-COV2 (casirivimab y imdevimab)	Cóctel de mAb humanos recombinantes que se unen a epítopos no superpuestos de la proteína del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Aprobado con dosis única intravenosa de 2400 mg (casirivimab 1200 mg e imdevimab 1200 mg)	Fase 2/3 NCT04425629 EUA por la FDA	150,154
	Plasma convaleciente	Plasma humano extraído de individuos recuperados con anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Se emplean 1 o más transfusiones según la respuesta del paciente	Varias etapas y estados ChiCTR2000029757 NCT04547660 NCT04338360 NCT04479163 NCT04712344 EUA por la FDA	155,157-159,221

Tabla 2. Principales ensayos clínicos de herramientas biotecnológicas usadas como tratamiento terapéutico y profiláctico de pandemias.

zaron alrededor de 123 millones de dosis³⁰.

Maassab *et al.*³¹ diseñaron y probaron una vacuna de influenza viva atenuada desarrollada en huevos de gallina. La atenuación de una línea del virus de Hong Kong se llevó a cabo mediante cambios abruptos en la temperatura de incubación de la cepa viral, esta técnica acortó el proceso a 3 meses, en comparación con métodos anteriores que empleaban cambios decrecientes de temperatura de forma gradual, las cuales duraban de 6 a 8 meses. Los ensayos clínicos de esta vacuna demostraron aceptabilidad e inmunogenicidad de la cepa atenuada, por lo que este proceso se consideró prometedor para el desarrollo futuro de vacunas contra la influenza. Por otro lado, se aprobó la aplicación de vacunas de virus fraccionados, mediante éter³² o desoxicolato de sodio³³, que se conformaron de fragmentos específicos del virus capaces activar la inmunidad de forma más segura. Las respuestas inmunológicas inducidas por dichas vacunas fueron tan eficientes como las desarrolladas por las vacunas convencionales, constituidas por el virus completo, además se observó menos efectos secundarios después de la vacunación^{32,33}.

Otra de las investigaciones que marcó el control de futuras epidemias y pandemias, fue el uso de recombinación genética para la fabricación de una vacuna^{34,35}. Este avance mostró que la producción de variantes genéticas adecuadas para la construcción de una vacuna, fue posible desarrollarlas de forma deliberada³⁴, sustituyendo a métodos de selección tradicionales³⁰. La construcción del virus recombinante de alto rendimiento (X-31) se realizó mediante el reordenamiento genético de una cepa estándar de laboratorio de alto rendimiento (AO / PR / 8), la cual proporcionó los genes de adaptación y crecimiento; con la cepa Aichi del virus de Hong Kong, considerada como una cepa de bajo rendimiento, la cual aportó los genes que codificarían el nuevo antígeno de interés³⁴. Los ensayos clínicos de una vacuna inactivada recombinante con el

virus X-31 mostraron ausencia de toxicidad, alta antigenicidad y protección frente a la influenza³⁵.

SARS-CoV-1 (epidemia 2002-2003)

El síndrome respiratorio agudo severo (SARS), provocado por el coronavirus del SARS (SARS-CoV) fue la primera gran epidemia del siglo XXI, apareció en Guangdong-China en noviembre de 2002 y finalizó en julio de 2003, hasta donde se registraron 8437 infectados y 813 muertes a nivel mundial^{36,37}.

Para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció tres ensayos de laboratorio, entre los que se encontraron: pruebas moleculares, pruebas de anticuerpos y cultivo celular³⁸, a partir de diferentes muestras clínicas como esputo, aspirado o lavado nasofaríngeo, hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos, lavado bronquio alveolar, heces, orina y suero o plasma³⁹⁻⁴¹.

Una de las técnicas modernas fue la detección de ARN del coronavirus mediante RT-PCR dirigida al gen de la nucleocápside (N) o al marco abierto de lectura (ORF) 1b, con la que se consiguió alta especificidad; sin embargo, la sensibilidad fue inferior a la necesaria en los primeros días del desarrollo de la infección. Esta prueba se optimizó con el análisis de más de una muestra originaria del mismo paciente, o con la doble ejecución del ensayo, logrando el aumento de la sensibilidad del diagnóstico^{39,40}. Otra forma de mejorar la sensibilidad y precisión del examen molecular fue el perfeccionamiento de los métodos de extracción de ARN previo a la qRT-PCR, facilitando la cuantificación de la carga viral y el reconocimiento precoz del SARS, por lo que se convirtió en el ensayo pilar para el diagnóstico prematuro de la enfermedad⁴¹.

En el aislamiento viral a partir de cultivo celular se emplearon muestras clínicas para infectar células como células de riñón fetal de mono rhesus (FRhK-4) o células Vero E6, en las que se analizó el efecto citopático y se realizó tinción por

Pandemia	Tipo de vacuna	Vacuna candidata	Desarrollada por	Fase/Identificación	Dosis	Resultados Previos o Eficacia	Referencias
H2N2 (Gripe asiática)	Virus inactivado	Vacuna monovalente	-	Ensayos clínicos	1 o 2	42% - 77%	24
		Vacuna polivalente	-	Ensayos clínicos	1	21% -46%	21
H3N2 (Gripe de Hong Kong)	Virus inactivado	Vacunas desarrolladas por varios productores	Varios fabricantes en EE.UU.	Aprobado	1	Vacuna segura y altamente antigénica	30
		Vacuna recombinante	Evans Medical, Ltd.; Eli Lilly and Company	Ensayos clínicos	1 o 2 Al día 0 y 30	No presentó toxicidad. Se observó aumento de anticuerpos neutralizantes en suero y fue mayor a partir de la segunda vacunación	34,35
	Viva atenuada	Vacuna de influenza viva atenuada	Michigan State Department of Health Laboratories	Ensayos clínicos	1	Se demostró aceptabilidad e inmunogenicidad	31
	Virus fraccionado	Vacuna antigénica de subunidad dividida	Fluogen, Parke, Davis & Company	Ensayos clínicos	1	Vacuna segura con menos efectos secundarios en comparación con la vacuna tradicional de virus completo	32,33
SARS-CoV-1 (SARS)	Virus inactivado	Vacuna inactivada contra el SARS-CoV	Sinovac	Fase 1	2	Vacuna segura y bien tolerada. Seroconversión del 100% en todos los participantes al día 42 mientras que al día 56 disminuye (100-91.1%)	232
	Vacuna de ADN	VRC-SRSDNA015-00-VP	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Fase 1/ NCT00099463	3 A los días 0, 28 y 56	Segura y bien tolerada. Produjo anticuerpos neutralizantes en el 80% de los participantes, respuesta de células T CD4 en el 100% y respuestas de T CD8 en el 20%	224
H1N1 (Influenza H1N1)	Virus inactivado dividido sin adyuvante	Vacuna inactivada contra la influenza pandémica H1N1	CSL Limited	Aprobado por la FDA	1	-	71
		Vacuna inactivada contra la influenza pandémica H1N1	Sanofi Pasteur	Aprobado por la FDA	1 o 2 *	-	70
		Vacuna inactivada contra la influenza pandémica H1N1	Novartis Vaccines and Diagnostics Limited	Aprobado por la FDA	1 o 2 *	-	68
	Viva atenuada	Vacuna atenuada contra la influenza pandémica H1N1	MedImmune LLC	Aprobado por la FDA	1 o 2*	-	72
	Virus inactivado dividido con adyuvante AS03	Vacuna inactivada con adyuvante contra la influenza pandémica H1N1	GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals	Aprobado por la EMA	1	Eficacia del 72%	74
	Subunidad proteica con adyuvante MF59	Vacuna inactivada con adyuvante contra la influenza pandémica H1N1	Novartis Vaccines	Aprobado por la EMA	1	-	73
MERS-CoV (MERS)	Vacuna de ADN	GLS-5300 (INO-4700)	GeneOne Life Science, Inc.; Inovio Pharmaceuticals; International Vaccine Institute	Fase 1/2 NCT03721718 NCT02670187	2 o 3 A las 0 y 8 semanas; o a las 0, 4 y 12 semanas	En un ensayo de fase 1 se determinó que la vacuna fue bien tolerada sin efectos adversos con inmunogenicidad sólida	94
	Vector viral de replicación incompetente	MVA-MERS-S	CTC North GmbH & Co. KG; Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	Fase 1 NCT04119440 NCT03615911	2 A los 0 y 28 días	Perfil de seguridad tolerable sin efectos adversos	86
		ChAdOx1 MERS	King Abdullah International Medical Research Center; University of Oxford	Fase 1 NCT03399578 NCT04170829	1	La vacuna fue segura y activó eficazmente las respuestas humoral y celular	95
		BVRS-GamVac	Gamaleya Research Institute of	Fase 1/2 NCT04130594	1	-	233

Tabla 3. Desarrollo de vacunas frente a pandemias.

			Epidemiology and Microbiology; Health Ministry of the Russian Federation				
		BVRS-GamVac-Combi	Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Health Ministry of the Russian Federation	Fase 1/2 NCT04128059	2 A los 0 y 21 días	-	233
EBOV (EVE)	Vector viral recombinante de replicación competente	Ervebo (rVSV-ZEBOV)	Merck Inc	Aprobado por la EMA y FDA	1	Eficacia del 95,7%	121-123
		GamEvac-Combi (VSV-EBOV + Ad5-EBOV)	CREMS	Fase 4 NCT03072030 EUA: Federación de Rusia	2 Primera: VSV-EBOV Segunda, 21 días después: Ad5-EBOV	La vacuna fue segura. Indujo una fuerte respuesta inmunitaria humoral y celular en el 100% de los voluntarios adultos sanos	118,234
	Vector viral de replicación incompetente	Zabeno (Ad26.ZEBOV) Mvabea (MVA-BN®-Filo)	Johnson & Johnson	Fase 3 NCT02661464, NCT03820739 Autorizada para su comercialización en circunstancias excepcionales por la EMA	2 Primera: Zabeno Segunda, ocho semanas después: Mvabea	Los datos de eficacia en humanos se han extrapolado de estudios con primates no humanos	99,124-126
		Ad5-EBOV	Instituto de Biotecnología de Beijing y Tianjin Cansino Biotechnology Inc	Fase 3 NCT02575456 EUA: China	1	Vacuna segura y altamente inmunogénica en adultos con una dosis óptima de $8 \cdot 0 \times 10^{10}$ partículas virales	118,235
		ChAd3-EBO-Z	GlaxoSmithKline	Fase 2 NCT02548078 NCT02485301	1	ChAd3-EBO-Z fue inmunogénica y bien tolerada en adultos y niños, con respuestas humorales y específicas de la GP del EBOV, 30 días después de la vacunación	236,237
	Vacuna de ADN	INO-4212 (INO-4201 + INO-4202)	Inovio Pharmaceuticals	Fase 1 NCT02464670	2	La administración intradérmica mostró el mejor resultado, fue bien tolerada y con un 100% de seroconversión. Provocó respuestas de células T de interferón- γ en más del 70% de los sujetos en estudio	118,223
SARS-CoV-2 (COVID-19)	Virus inactivado	CoronaVac	Sinovac Research and Development Co., Ltd	Fase 4 NCT04756830 EAU: China, Brasil, Chile, Colombia, Uruguay, Turquía, Indonesia y Azerbaijan	2 A los 0 y 14 días	50,38 % de eficacia en Brasil 65% en Indonesia y 91,25% en Turquía	150,238
		Vacuna inactivada contra el SARS-CoV-2 (célula Vero)	Sinopharm, China National Biotech Group Co y Wuhan Institute of Biological Products	Fase 3 ChiCTR2000034780 EAU: China y Emiratos Árabes Unidos	2 A los 0 y 21 días	Los resultados de los ensayos fase 1 y fase 2 demostraron una baja tasa de reacciones adversas y alta inmunogenicidad	150,239
		BBIBP-CorV	Sinopharm, China National Biotech Group Co y Beijing Institute of Biological Products	Fase 3 NCT04560881 EAU: China, Emiratos Árabes Unidos, Argentina, Perú, Serbia, Bahrain y Zimbabwe	2 A los 0 y 21 días	79,34% y 86% de eficacia	150,240
		Covaxin (BBV152)	Bharat Biotech International Limited	Fase 3 NCT04641481; CTIR/2020/11/028976 EAU: India	2 A los 0 y 14 días	Un estudio fase 1 mostró seguridad tolerable y seroconversión del 82,8% al 91,9%	150,241
		Vacuna inactivada contra el SARS-CoV-2 (célula Vero)	Institute of Medical Biology; Chinese	Fase 3 NCT04659239	2 A los 0 y 28 días	Los resultados de un estudio fase 1 indicaron seguridad e inmunogenicidad con un porcentaje de seroconversión del 80%-96%	150,242
			Academy of Medical Sciences			seroconversión del 80%-96%	
		QazCovid-in®-vaccine	Research Institute for Biological Safety Problems; Rep of Kazakhstan	Fase 3 NCT04691908	2 A los 0 y 21 días	-	150
	Vector viral de replicación incompetente	ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222)	AstraZeneca y Universidad de Oxford	Fase 4 NCT04760132 EUA: Reino Unido, México, Unión Europea, Ecuador, India y México.	1-2 A los 0 y 28 días	70,4% de eficacia	150,171
		Spunik V (Gam-COVID-Vac)	Gamaleya Research Institute; Health Ministry of the Russian Federation	Fase 3 NCT04530396 EUA: Rusia, Argentina, Bolivia, Serbia, Belarus, Algeria, Emiratos Árabes Unidos, Palestina y Egipto	2 A los 0 y 21 días	91,1% de eficacia	150,243
		Ad5-nCoV	CanSino Biological Inc.; Beijing Institute of Biotechnology	Fase 3 NCT04526990 EUA: China, México y Pakistan	1	65,7% de eficacia	150,244
		Ad26.COV2.S	Janssen Pharmaceutical	Fase 3 NCT04505722 EUA: EE.UU. y Bahrein	1 o 2 A los 0 y 56 días	72% de eficacia en EE.UU., 66% en América Latina y 57% en Sudáfrica	150,164,165
	Subunidades proteicas	NVX-CoV2373	Novavax	Fase 3 NCT04611802	2 A los 0 y 21 días	89,3% de eficiencia en Reino Unido y 60% en Sudáfrica	150,221,245

Vacuna de ARN	Cominaty (BNT162b2)	Pfizer-BioNTech	Fase 4 NCT04760132 EUA: EE.UU., Unión Europea, Reino Unido, Brasil, Nueva Zelanda, Argentina, Colombia y Ecuador	2 A los 0 y 21 días	94.6% de eficacia	150,169
	mRNA-1273	Moderna y National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Fase 4 NCT04760132 EUA: EE.UU., Unión Europea, Reino Unido y Suiza	2 A los 0 y 28 días	94.1% de eficacia	150,163
	CVnCoV Vaccine	CureVac AG	Fase 3 NCT04674189	2 A los 0 y 28 días	Los resultados de un estudio fase 1 se destacaron es segura y bien tolerada	150,246
Vacuna de ADN	nCov Vaccine	Zyudus Cadila	Fase 3 CTRI/2020/07/02635	2 A los 0, 28 y 56 días	-	150

[Nota: *Se recomiendan dos dosis administradas con aproximadamente 4 semanas de diferencia (≥ 21 días aceptables) para niños de 6 meses a 9 años.

†FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos; EMA: Agencia Europea de Medicamentos; EUA: Autorización de Uso de Emergencia]

2098

Tabla 3. Desarrollo de vacunas frente a pandemias.

inmunofluorescencia. Los resultados indicaron un rendimiento menor en comparación con los ensayos moleculares, debido a que únicamente muestran la presencia del virus vivo^{39,42}. Finalmente, la detección de seroconversión fue la prueba estándar para la confirmación virológica retrospectiva de la infección por SARS-CoV, se manejó ELISA e IFI para la identificación de anticuerpos IgG, los cuales se reconocieron después de la primera semana de infección^{39,43,44}.

Tratamiento terapéutico y profiláctico

Debido a que no existió un tratamiento específico para el SARS, se probaron varios agentes inmunomoduladores y compuestos con potencial antivírico^{45,46}. La terapia con plasma convaleciente fue una de las alternativas de tratamiento y prevención. La administración antes de los 14 días desde el inicio de la infección o durante la fase virémica y seronegativa, presentó una tasa de alta médica más temprana y una tasa de mortalidad menor en comparación con los pacientes que recibieron el plasma posterior a los 14 días. Además, no se evidenció efectos secundarios inmediatos después de la aplicación del plasma⁴⁶. Por otro lado, la pentaglobulina se administró como una solución enriquecida en IgM a 12 pacientes en etapa grave de SARS. Diez personas tuvieron una recuperación favorable sin eventos adversos, posterior al tratamiento. Como evidencia se estableció el progreso relevante en las puntuaciones radiográficas y en el requerimiento de oxígeno⁴⁷.

En el caso del tratamiento profiláctico, se produjeron varias vacunas candidatas contra el SARS-CoV. Zhou *et al.*⁴⁸ llevaron a cabo estudios preclínicos de una vacuna inactivada con formaldehído, en monos Rhesus. Los resultados expusieron que a una dosis de 50 µg, la vacuna fue capaz de inducir inmunidad humoral específica 7 días después de la primera inmunización y el título de anticuerpos IgG se elevó posterior a la segunda inmunización; mientras que con la administración de dosis de 0.5 y 5 µg se observó inmunidad parcial. Además, no se presenciaron efectos adversos significativos en los animales inmunizados hasta con una dosis de 5000 µg y en el 41.7% de los monos que recibieron la vacuna se determinó anticuerpos IgA anti-SARS-V en las mucosas nasofaríngeas.

Yang *et al.*⁴⁹ experimentaron una vacuna de ADN que tradujo la glicoproteína Spike (S) del SARS-CoV, en modelos animales, la cual estimuló respuestas de células T, producción de anticuerpos neutralizantes e inmunidad protectora. La replicación viral se redujo seis veces en los pulmones de los ratones inmunizados después de la infección por el coronavirus. Las vacunas de vectores virales fueron otra opción, Gao *et al.*⁵⁰, desarrollaron tres vectores basados en adenovirus, los que expresaron proteínas antigénicas de estructura del SARS-CoV con codones optimizados, entre las que se encontraron el

fragmento S1 de la proteína S, la proteína de membrana (M) y la proteína N. La inmunización se realizó con una combinación de los tres vectores en macacos Rhesus al día 0, y una vacuna de refuerzo con el mismo régimen a los 28 días. En todos los animales tratados se encontró anticuerpos neutralizantes específicos contra el fragmento S1 y respuesta de células T contra la proteína N, al mismo tiempo, todas las muestras de suero de los animales vacunados mostraron una gran capacidad neutralizante contra el virus SARS-CoV.

A pesar de que no se logró llegar a ensayos clínicos durante esta pandemia, en años posteriores dos vacunas lograron desarrollar estudios clínicos fase 1 (Tabla 3).

H1N1 (2009-2010)

El virus de la influenza A H1N1 de origen porcino apareció por primera vez en abril de 2009 en los Estados Unidos y en México⁵¹, la pandemia finalizó en agosto de 2010, sin embargo, el virus continúa circulando y provocando la gripe estacional⁵². Se estima que la pandemia dejó 151 700 - 575 500 muertes a nivel mundial⁵³.

La OMS⁵⁴ estableció varias pruebas de laboratorio para la confirmación de la infección causada por el virus de influenza de origen porcino (S-OIV) H1N1. Entre las que se encontraron: diagnóstico molecular con ensayos de RT-PCR y qRT-PCR; aislamiento y la tipificación viral, detección de antígenos para lo que se recomendaron pruebas rápidas de flujo lateral e IFD, y finalmente ensayos serológicos como HAI y micro-neutralización para la evaluación de títulos de anticuerpos contra S-OIV. Las muestras de vías respiratorias superiores fueron las más recomendadas, como aspirados e hisopos nasofaríngeos, hisopos nasales o de garganta; además se empleó muestras de suero en pacientes convalecientes para el reconocimiento de títulos de anticuerpos⁵⁵.

La qRT-PCR fue la prueba de referencia para el diagnóstico de la influenza A (H1N1), la identificación de diferentes genes diana fue apropiado para el diagnóstico preciso^{54,56}. La primera prueba de este tipo aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) con una autorización de uso de emergencia (EAU), fue realizada por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y fue dirigida al gen de la proteína M, la cual mostró una sensibilidad 99.3% y una especificidad del 92.3%, se trató de un ensayo singleplex para la tipificación y subtipificación viral⁵⁷⁻⁵⁹. Para el diagnóstico mediante cultivo viral, la OMS recomendó aislar el virus en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en presencia de tripsina o en huevos embrionados⁵⁴. Entre las desventajas de esta técnica se establecieron el tiempo tardío para la obtención de resultados (3-14 días) y la baja sensibilidad⁵⁸.

Las pruebas rápidas de diagnóstico de influenza (RIDTS)

mostraron una sensibilidad variable y menor que las pruebas moleculares y el cultivo viral, por lo que un resultado negativo no descartó la infección por el virus de la influenza A (H1N1)^{57,60}. Vasoo *et al.*⁶¹ evaluaron tres RIDTS para el virus de la influenza pandémica A/H1N1 en muestras positivas confirmadas con RT-PCR. Las sensibilidades halladas estuvieron en un nivel de bajo a moderado (46.7%, 38.3% y 53.3%) y presentaron una excelente especificidad, sin reactividad cruzada con otros virus estacionales. El ensayo de IFD, otra de las pruebas para la detección de antígenos mostró amplia disponibilidad y un tiempo de procesamiento promedio de 2-4 horas, sin embargo, al igual que las RIDTS no fueron capaces de distinguir la influenza H1N1 2009 de otros virus de la influenza A⁶².

Tratamiento terapéutico y profiláctico

Un porcentaje de la población mayor a los 65 años poseían anticuerpos contra el nuevo virus de esta influenza pandémica, esto pudo ser posible por la exposición anterior al virus H1N1 en 1918⁶². Debido a la aparición del S-OIV H1N1 en humanos con una composición genética previamente no conocida, diferente al virus de la influenza A estacional⁶³; además de la fácil transmisibilidad entre humanos⁶⁴, el sistema de salud mundial inició rápidamente el desarrollo de antivirales y de una nueva vacuna para el tratamiento y prevención de la infección.

La terapia con inmunoglobulina intravenosa hiperinmune (H-IVIG) obtenida a partir de plasma convaleciente de personas recuperadas fue probado como una alternativa antiviral en pacientes con infección por la influenza pandémica, los resultados mostraron que la administración de H-IVIG dentro de los 5 días posteriores al inicio de los síntomas se asoció a una disminución de la carga viral y reducción de mortalidad⁶⁵. De igual manera, la administración de plasma convaleciente con un título de anticuerpos neutralizantes $\geq 1:160$ en pacientes afectados, disminuyó la carga viral, las respuestas de citocinas séricas y la mortalidad⁶⁶.

Para el control de esta pandemia se autorizaron dos tipos de vacunas monovalentes, un grupo de vacunas inactivadas divididas de administración intramuscular y otro grupo de vacunas atenuadas en aerosol de administración intranasal⁶⁷.

En septiembre de 2009, la FDA aprobó las primeras vacunas para el tratamiento contra la gripe porcina con la cepa A / California / 7/2009 (H1N1)^{68,69}, entre las que se encontraron tres vacunas monovalentes, inactivadas y sin adyuvante, fabricadas por Sanofi Pasteur⁷⁰, Novartis Vaccines and Diagnostics Limited⁶⁸ y CSL Limited⁷¹, con 15 μ g de hemaglutinina (HA), y la cuarta fue una vacuna, monovalente, viva atenuada y sin adyuvante elaborada por MedImmune LLC⁷². En Europa la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobó vacunas con adyuvantes en una emulsión aceite-agua, una de ellas con MF59 y 7.5 μ g de HA desarrollada por Novartis Vaccines⁷³, y otra con AS03 y 3.75 μ g de HA fabricada por GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals⁷⁴. Una revisión sistemática identificó que las vacunas inactivadas monovalentes A (H1N1) pdm09 fueron efectivas para prevenir la influenza pandémica. En los niños, las vacunas con adyuvante fueron más efectivas en comparación con las vacunas sin adyuvante⁷⁵. Por otro lado, otro estudio que analizó la efectividad de una vacuna inactivada con adyuvante y una atenuada, mostró que las vacunas fueron eficaces para prevenir la infección confirmada por la influenza pandémica A (H1N1) 2009 a a partir de una semana después de la vacunación⁷⁴.

MERS-CoV (epidemia 2012-2021)

La epidemia Síndrome Respiratorio de Medio Oriente

(MERS) fue causada por el coronavirus del MERS (MERS-CoV), descrito por primera vez en Arabia Saudita en junio de 2012⁷⁶, continúa vigente hasta la fecha. La mayoría de casos aparecen en el Medio Oriente debido a la exposición directa de sus habitantes a fuentes zoonóticas. Hasta la actualidad se han notificado 2566 casos confirmados y 882 muertes⁷⁷.

Entre las pruebas de laboratorio empleadas para la detección de MERS se encuentran las moleculares y las serológicas. Los ensayos moleculares se utilizan para el diagnóstico de la infección viral activa en personas con síntomas clínicos o que han estado en contacto con casos confirmados con MERS-CoV. Por otra parte, los estudios serológicos llevados a cabo por la detección de anticuerpos, se aplican con fines de vigilancia e investigación, y no de diagnóstico⁷⁸.

El ensayo de qRT-PCR a partir de muestras respiratorias inferiores, superiores, suero y heces, ha sido la técnica tradicional en el diagnóstico de MERS-CoV. Para la confirmación de la infección se requiere un resultado positivo de qRT-PCR para dos regiones genómicas únicas y específicas del virus, o un resultado positivo para una sola diana y la secuenciación de otra^{78,79}. Entre las dianas genéticas recomendadas para la detección primaria del MERS se encuentran las regiones aguas arriba del gen de la proteína E (UpE) y el gen N^{79,80}, mientras que las pruebas confirmatorias se orientaron al ORF1a, ORF1b o al gen N^{79,81}.

Se han investigado otras posibles técnicas moleculares apropiadas para el diagnóstico. Por ejemplo, la RT-RPA mostró una especificidad comparable a la de la RT-PCR, con beneficios adicionales como el corto tiempo de determinación (3-7 minutos) y la facilidad de movilidad⁸². La RT-LAMP fue posible llevarla a cabo en menos de una hora, con una alta especificidad y sin reacciones cruzadas⁸³. Huang *et al.*⁸⁴ optimizaron dicha técnica, y establecieron un ensayo de visualización de ácidos nucleicos con la combinación del ensayo RT-LAMP y una tira de visualización de flujo vertical (RT-LAMP-VF), con el fin de detectar el gen N del MERS-CoV, con alta especificidad, en un tiempo estimado de 35 minutos y sin el empleo de equipos de alto costo.

Tratamiento terapéutico y profiláctico

La atención de apoyo y la prevención de complicaciones, como el síndrome de dificultad respiratoria y las infecciones nosocomiales son las principales estrategias para prevenir la epidemia del MERS. Hasta el momento, se han registrado vacunas y antivirales en fase de desarrollo⁸⁵⁻⁸⁷.

Varias de las opciones de tratamiento, se han basado en anticuerpos neutralizantes^{88,89}. En el brote de Corea en el 2015, se evaluó la infusión de plasma convaleciente en 3 de 13 pacientes con insuficiencia respiratoria producto del MERS. El empleo de plasma con un título en la prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT) de 1:80 reveló una respuesta serológica significativa en comparación con el de un título PRNT de 1:40. Los autores recomendaron el uso de plasma convaleciente de donantes con una actividad neutralizante PRNT $\geq 1:80$ para conseguir resultados eficaces⁹⁰. Por otro lado, de Wit *et al.*⁹¹ evaluaron la eficacia terapéutica y profiláctica de dos anticuerpos monoclonales (mAb) neutralizantes completamente humanos (REGN3048 y REGN3051) que se dirigen al dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del MERS-CoV en primates no humano, los resultados mostraron niveles altos de actividad neutralizante y reducción de la carga viral en los pulmones de los animales, sin embargo, se observó una mejor respuesta como régimen profiláctico. Además, se llevó a cabo un ensayo de seguridad, tolerabilidad, farmaco-

cinética e inmunogenicidad de la combinación de REGN3048 y REGN3051, administrado por vía intravenosa en voluntarios sanos, este estudio ha completado su fase 1 (NCT03301090).

Los anticuerpos policlonales son otra opción terapéutica, Luke *et al.*⁹² produjeron inmunoglobulina G (IgG) policlonal completamente humana contra la proteína de pico del MERS-CoV, a partir de la inmunización de ganado transgénico. En modelos murinos, estos anticuerpos (SAB-301) tuvieron la capacidad de reducir los títulos virales con la aplicación de una única dosis a las 24 o 48 horas, después de la exposición del coronavirus. Un estudio clínico de fase 1, en el que se evaluó la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de SAB-301 en adultos sanos, interpretó que las infusiones únicas de SAB-301 con una concentración de hasta 50 mg / kg parecen ser seguras y bien toleradas⁹³.

La combinación de antivirales e interferones ha sido la base de varios tratamientos ensayados. Un estudio clínico fase 2/3 en el que se probó la combinación de interferón β -1b recombinante más lopinavir-ritonavir, durante 14 días, concluyó que el tratamiento produjo menor mortalidad en comparación con el placebo en pacientes confirmados con MERS y produjo efectos adversos graves en el 9% de la población. Existieron mejores resultados cuando este se aplicó entre los 7 días posteriores a la aparición de síntomas⁸⁷.

Desde el inicio de la epidemia provocada por el MERS-CoV, se planteó el objetivo de desarrollar una vacuna contra el virus, por lo que diferentes grupos de investigadores alrededor del mundo se han unido al proceso. La vacuna GLS-5300 basada en plásmido de ADN que expresa la proteína S del MERS-CoV⁹⁴, en el ensayo fase 1 reveló que las respuestas inmunitarias fueron independientes de la concentración de la dosis, además se observó seroconversión en 86% de los participantes y respuestas de células T en el 71% después de dos dosis, mientras que en el grupo que se administró tres dosis se presenció seroconversión en el 94% de los participantes y respuestas de células T en el 76%, asimismo se observaron anticuerpos neutralizantes en el 50% de la población estudiada⁹⁴. Además, se están llevando a cabo dos ensayos clínicos fase 1/2 en los que se está evaluando la inmunogenicidad y la seguridad de las vacunas de vectores virales BVRs-GamVac-Combi (NCT04128059) y BVRs-GamVac (NCT04130594).

Las otras dos vacunas que publicaron sus ensayos fase 1 se basaron en vectores virales de replicación incompetente, en las que se evaluó la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad. La vacuna MVA-MERS-S, basada en la Vacuna Modificada de Ankara (MVA) que expresa la glicoproteína S⁹⁵; y la vacuna ChAdOx1 MERS vectorizada de adenovirus de chimpancé (ChAdOx1) que de igual forma expresa la proteína S de longitud completa⁹⁵. En los resultados, los dos ensayos mostraron seguridad con ausencia de efectos secundarios graves, además de respuestas humorales y celulares contra el MERS-CoV^{96,95}. En el caso de la vacuna MVA-MERS-S en el 75% de los participantes se observó seroconversión después de la segunda inmunización con dosis baja y en el 100% con la dosis alta. Se detectaron respuestas de células T en el 83% y en el 91% de la población dependiendo del tipo de dosis administrada⁹⁶.

ÉBOV (epidemia 2013-2016)

La enfermedad del virus del ébola (EVE), es una infección grave y letal provocada por el virus del ébola de Zaire (EBOV), que apareció por primera vez en República Democrática del Congo en 1976⁹⁶. Sin embargo, el brote más grande reportado en la historia surgió en diciembre de 2013 en África Occidental y duró hasta 2016, periodo en el que se registraron 18 616

casos y 11 310 muertes⁹⁷. Los brotes de EBOV del 2013-2016 y los últimos brotes registrados en República Democrática del Congo⁹⁸, han permitido mejorar la comprensión de la enfermedad y optimizar las estrategias para la prevención, el diagnóstico, la atención clínica y el tratamiento de EVE, debido a la aplicación de técnicas moleculares modernas en la caracterización del virus^{99,100}.

Las pruebas de diagnóstico para el EVE recomendadas por la OMS son las pruebas de ácido nucleico automatizadas o semiautomatizadas para la detección de ARN viral y las pruebas rápidas de detección de antígenos como test de vigilancia¹⁰¹. En general, la sangre es la muestra de preferencia para el diagnóstico en pacientes y los hisopos orofaríngeos son de utilidad para el diagnóstico post mortem^{101,102}.

La qRT-PCR es la prueba estándar para el diagnóstico, capaz de detectar el virus de 3-6 días después del inicio de los síntomas^{102,103}. Uno de los ensayos importantes desarrollados y con EUA por la FDA y la OMS, en el brote del 2013-2016, fue la prueba molecular automatizada Gene Xpert Ebola (Cepheid) basada en qRT-PCR con señal fluorescente de sondas para control de calidad, que amplifica dos genes del EBOV, el gen N y el de la glicoproteína (GP), el doble objetivo de esta prueba permitió disminuir falsos negativos cuando se analizaron muestras con nuevas variantes de virus, los resultados mostraron una alta sensibilidad analítica (100%) y especificidad (99.5-100%), con un tiempo corto de respuestas, en comparación con la RT-PCR común¹⁰⁴; este ensayo fue empleado en su mayoría en el último brote de República del Congo (2018-2020)⁹⁹.

Además, se han diseñado varias pruebas portátiles de flujo lateral para la detección rápida de antígenos¹⁰⁵. La primera prueba de este tipo aprobada por la FDA en el 2019 fue OraQuick Ebola Rapid Antigen Test de OraSure Technologies, un ensayo inmunocromatográfico dirigido a la proteína viral 40 (VP40) o de la matriz proteica con una sensibilidad de 97.1-100% y una especificidad del 98-100%^{106,107}.

Tratamiento terapéutico y profiláctico

Durante el gran brote de EVE del 2013-2016 varios fármacos biotecnológicos con actividad antiviral o como inmunoterapia contra EBOV fueron llevados a ensayos clínicos, entre los que estuvieron: administración de plasma convaleciente¹⁰⁸; un cóctel de tres anticuerpos monoclonales neutralizantes (Zmapp) dirigidos hacia la GP de superficie del EBOV¹⁰⁹; interferón IFN β -1a¹¹⁰; y un producto de nanopartículas lipídicas de ARNip que inhibe la producción de dos proteínas virales fundamentales, la L-polimerasa, la cual interviene en la transcripción y replicación del EVE, y la proteína viral 35 (VP35), comprometida con la destrucción de la respuesta inmune del huésped¹¹¹. Sin embargo, estas terapias no cumplieron con los criterios establecidos para ser aprobadas para su uso masivo^{99,103}.

Durante el brote de República del Congo de 2018 inició el ensayo Pamoja Tulinde Maisha (PALM) que significa "Juntos salvamos vidas", un ensayo controlado, aleatorio, abierto y multicéntrico, en el que se estudió las terapias experimentales más prometedoras. Esta investigación comparó a Zmapp contra tres nuevos agentes: remdesivir, mAb114 y REGN-EB3 (NCT03719586)¹¹². Inmazeb (REGN-EB3) fue el primer fármaco aprobado por la FDA para tratar el EVE (14 de octubre de 2020) con una única perfusión intravenosa de 150 mg por kg¹¹³. Se trata de un cóctel de tres anticuerpos IgG1 humanizados en una proporción 1:1:1 dirigidos a la tres epitopes no superpuestos de la GP del EBOV, los tres anticuerpos pueden unirse simultáneamente bloqueando la unión y entrada del virus a

la célula huésped¹¹⁴. El segundo tratamiento aprobado por la FDA, en diciembre de 2020, fue Ebanga (mAb114), un único anticuerpo monoclonal IgG1 dirigido a un epítipo altamente conservado del dominio de unión al receptor de la GP del EBOV, este es administrado por vía intravenosa con una sola dosis de 50 mg/kg¹¹⁵. Ebanga previene la interacción de GP del EBOV con el receptor NPC1, bloqueando la infección del virus a la célula huésped¹¹⁶.

Debido a que la GP del EBOV es el inmunógeno más importante detectado¹¹⁷, la mayoría de las vacunas en desarrollo durante el brote de ébola 2013-2016 fueron diseñadas para activar la respuesta inmune del huésped frente a este antígeno¹¹⁸. Entre las vacunas candidatas llevadas a ensayos clínicos se encontró rVSV-ZEBOV, una vacuna de vector viral competente para la replicación basada en el virus de estomatitis vesicular recombinante que expresa la GP de superficie del EBOV del Zaire¹¹⁹. El ensayo *Ebola ça Suffit* ("Ébola esto es suficiente") de fase 3 llevado a cabo en Guinea en el 2015, evaluó la eficacia y efectividad de una sola dosis intramuscular de la vacuna rVSV-ZEBOV con una estrategia de vacunación en anillo abierta y aleatorizada por grupos, mediante la cual se administra la vacuna a individuos con conexión social o geográfica a un caso confirmado¹¹⁹. La eficacia de la vacuna fue del 100%, con alta tolerancia en los seres humanos, una activación rápida de la respuesta inmune después de una única dosis y sin casos confirmados entre las personas vacunadas después de los 10 días de inmunización¹²⁰. En 2019 esta vacuna denominada Ervebo desarrollada por Merck Inc., fue la primera vacuna aprobada por la EMA y por la FDA para su uso médico^{121,122}, con una eficacia estimada de 95.7% evaluada por la OMS en 90 000 personas asociadas al brote del 2018 de República Democrática del Congo¹²³.

Otra de las vacunas empleadas para la prevención del EVE es la vacuna fabricada por Johnson & Johnson, autorizada para su comercialización en circunstancias excepcionales por la EMA en julio de 2020¹²⁴. Esta vacuna fue desarrollada en el brote de 2013- 2016 y ha alcanzado ensayos clínicos de fase 1, los que demostraron seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad¹²⁵. El régimen de vacunación consta de dos dosis conformado por vacunas diferentes: Zabeno (Ad26.ZEBOV), una vacuna de adenovirus humano serotipo 26 no replicante que codifica la GP del EBOV de Zaire, y una vacuna de refuerzo administrada ocho semanas después, denominada Mvabea® (MVA-BN-Filo), constituida por MVA de replicación incompetente que expresa tres GP y una nucleoproteína de diferentes variantes del virus del Ébola^{125,126}.

SARS-CoV-2 (2019-2021)

La pandemia en curso de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), provocada por el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), inició en diciembre de 2019 en un mercado de animales en Wuhan, provincia de Hubei, China¹²⁷. Hasta inicios de marzo de 2021, la OMS ha reportado 113.6 millones de casos confirmados, 2.5 millones de muertes en todo el mundo y 223 países afectados¹²⁸.

En el caso de esta pandemia, la FDA recomendó tres tipos de pruebas: las pruebas de diagnóstico que identifican una infección activa por presencia del virus, las pruebas serológicas o de anticuerpos y las pruebas de manejo de pacientes con COVID-19 para detectar biomarcadores relacionados con la inflamación^{129,130}.

La prueba estándar para el diagnóstico de COVID-19 es la qRT-PCR¹³¹, esta técnica molecular va dirigida a regiones altamente conservadas o que se expresan con abundancia como el

gen E, N, S y el gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del ORF1ab^{132,133}. Sin embargo, a pesar de la alta especificidad de la prueba ha demostrado sensibilidad inestable, comparada con otras técnicas como la tomografía computarizada (TC) de tórax, esto puede depender varios factores como: la carga viral del paciente, la forma de muestreo, el procesamiento y el transporte de la muestra, la tasa de detección de los diferentes fabricantes, entre otras^{133,134}.

Con los antecedentes antes mencionados el objetivo de varios grupos de investigación se han centrado en diseñar pruebas de diagnóstico alternativas, entre ellas se halla la RT-LAMP, una tecnología de amplificación de ADN, que se emplea para detectar ARN del SARS-CoV-2, los resultados se logran obtener en aproximadamente 45 minutos en muestras con una baja concentración viral, sin el empleo de equipamiento costoso debido a que la reacción final se puede observar a simple vista por un cambio colorimétrico; además el diseño de los cebadores ha sido dirigido a regiones conservadas con baja frecuencia de mutación como el gen S, gen ORF1ab y el gen N, lo que garantiza la especificidad^{135,136}. Huang *et al.*¹³⁷ probaron el ensayo RT-LAMP en un solo paso, es decir sin la extracción de ARN, el resultado fue la amplificación de ARN directamente de una muestra; por lo que aseguraron que la meta final es desarrollar un dispositivo capaz de extraer, purificar, retro transcribir ARN, y llevar a cabo la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de SARS-CoV-2.

La tecnología Crispr-Cas es una nueva herramienta biotecnológica que ha revolucionado el diagnóstico molecular de rápida detección, alta precisión y sensibilidad, gran versatilidad y portabilidad sin la intervención de equipos sofisticados de laboratorio¹³⁸. En mayo de 2020 la FDA otorgó una EUA a la primera prueba de CRISPR combinada con RT-LAMP para el diagnóstico de la infección activa por SARS-CoV-2 en el punto de atención, denominada SHERLOCK, desarrollada por Sherlock BioSciences¹³⁹. Este protocolo se basa en la enzima Cas13a guiada por el ARN Crispr (ARNcr) para reconocer un ARN de cadena simple o un ARN mensajero viral, cuando el complejo Crispr -Cas se une a su diana, la actividad nucleasa colateral de la enzima conduce a la escisión inespecífica de una molécula marcada con fluorescencia, tras este proceso la señal será detectada mediante fluorescencia o tiras de flujo lateral¹⁴⁰. Según Joung *et al.*¹⁴¹ SHERLOCK proporciona una sensibilidad comparable con la qRT-PCR y posee un límite de detección de 100 copias del genoma viral; en muestras de hisopados de nariz, boca o garganta, además de fluido pulmonar¹⁴¹.

Otro de los kits de diagnóstico frente a COVID-19 disponible comercialmente y basado en los mismos principios es DETECTR, diseñado por Mammoth Biosciences¹³⁸. Este sistema por su parte usa la enzima Cas12a para dirigirse a una secuencia de ADN de doble cadena (dsADN) del SARS-CoV-2, una vez hallada la diana genética la enzima escinde indiscriminadamente moléculas indicadoras de ADN de cadena simple (ssADN) marcadas con el fluoróforo y ocurre el mismo proceso antes mencionado^{140,142}. DETECTR muestra una alternativa visual y más rápida que la técnica estándar para la tipificación de secuencias moleculares del SARS-CoV-2, con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100%¹⁴².

Las pruebas rápidas de detección de antígenos son otra opción para el diagnóstico de COVID-19, estos inmunoensayos están esquematizados para localizar partículas virales en muestras nasofaríngeas o de frotis nasal. Las ventajas de las pruebas de antígenos es la rapidez de detección, aproximadamente 15 minutos, a un bajo costo y alta especificidad^{143,144}. Hasta la fecha la FDA ha otorgado la EUA a quince test comerciales con este principio¹²⁹.

La pandemia por COVID-19 sigue vigente y cada día que pasa continúa la I + D en pruebas de diagnóstico más rápidas, simples, baratas, escalables y precisas en comparación con las existentes¹⁴⁵. Como el desarrollo de biosensores fototérmicos plasmónicos de doble función con una alta precisión¹⁴⁶, o un ensayo de CRISPR potencializado y ultrasensible con la posibilidad de ser integrado en un chip de microfluidos que pueda ser leído por un teléfono celular inteligente^{147,148}.

Tratamiento terapéutico y profiláctico

Existe una gran variedad de tratamientos en investigación para el COVID-19 por ejemplo antivirales, terapias celulares y genéticas, inmunomoduladores, anticuerpos neutralizantes y tratamientos combinados; de los cuales, varios se encuentran en ensayos en etapa temprana donde se evalúan la seguridad y dosificación, mientras que otros se hallan en etapa tardía en los que se prueba la seguridad y la efectividad¹⁴⁹. Por otro lado, se han empleado múltiples plataformas biotecnológicas tanto tradicionales como modernas para el desarrollo de vacunas contra el COVID-19^{150,151} (Figura 3).

Las terapias basadas en anticuerpos neutralizantes se han mostrado efectivas en las primeras etapas de la infección por SARS-CoV-2, cuando el virus empieza su proceso de replicación y el huésped aún no reacciona con una respuesta inmune eficaz¹⁵². La FDA ha concedido la EUA a ciertos anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-SARS-CoV-2 dirigidos al RBD de la proteína S como tratamiento para pacientes ambulatorios con COVID-19 de leve a moderado, la función de estos anticuerpos es bloquear la unión del RBD a la célula huésped y neutralizar el virus^{153,154}.

Bamlanivimab, ha alcanzado estudios clínicos fase 2, los resultados obtenidos en un análisis intermedio sugirieron que una única infusión intravenosa de este mAAb con una dosis de 2800 mg aceleró la disminución de la carga viral, además los pacientes no hospitalizados que recibieron el tratamiento mostraron síntomas más leves y una tasa de hospitalización menor que el grupo placebo. Sin embargo, no es posible sacar conclusiones finales, por lo que se necesitan datos de ensayos clínicos más amplios¹⁵⁵. Al mismo tiempo se está llevando a cabo un ensayo fase 2/3 para determinar el efecto de la monoterapia de bamlanivimab y la terapia combinada de bamlanivimab con etesevimab. El estudio concluyó que el tratamiento combinado se asoció con una reducción de la carga viral estadísticamente significativa al día 11, en contraste con la monoterapia y el grupo placebo¹⁵⁶.

Finalmente, el análisis intermedio del estudio clínico fase 1/3 del cóctel de anticuerpos humanos neutralizantes REGN-COV2 (casirivimab y imdevimab), informó que una sola dosis de REGN-COV2 de 2,4 g o 8,0 g fue capaz de reducir la carga viral al día 7 con un efecto mayor en pacientes con anticuerpos séricos negativos (anticuerpos endógenos) contra el SARS-CoV-2. Asimismo, el porcentaje de participantes con visitas médicas fue menor en el grupo que recibió el cóctel de anticuerpos que en el grupo placebo¹⁵⁷.

Una tecnología tradicional, el plasma convaleciente de título alto, es decir con la relación señal/corte (s/c) de ≥ 12.0 a ≥ 9.5 en la prueba Ortho VITROS Anti-SARS-CoV-2 IgG, es otro de los productos biológicos aprobados como EUA por la FDA¹⁵³. Los resultados de los diferentes estudios varían, en pacientes con COVID-19 grave o potencialmente mortal no presenta una mejora clínica estadísticamente significativa^{158,159}, mientras que otros proporcionan datos sólidos de que la transfusión de plasma convaleciente en pacientes hospitalizados es segura con una administración temprana dentro del curso

clínico¹⁶⁰⁻¹⁶².

Actualmente, existen 182 vacunas en desarrollo preclínico y 74 en desarrollo clínico de las cuales 3 han obtenido la EUA por parte de la FDA, pertenecientes a Moderna Therapeutics, Pfizer-BioNTech y Johnson & Johnson¹⁵⁰.

Moderna Therapeutics junto con Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID) produjeron la primera vacuna en ser llevada a ensayos clínicos, se trata de mRNA-1273, una vacuna de ARN encapsulada en nanopartículas lipídicas que contiene la información de la proteína de S de longitud completa estabilizada previa a la fusión, un ensayo fase 3 determinó una eficacia del 94.1% con dos dosis de 100 μ g de esta vacuna¹⁶³. La vacuna producida por Johnson & Johnson, Ad26.COV2.S, es una vacuna de dosis única (5×10^{10} partículas virales) basada en un adenovirus serotipo 26 incompetente para la replicación que expresa la proteína S del SARS-CoV-2, los ensayos clínicos muestran diferentes eficacias de la vacuna frente al virus; 72% en EE.UU., 66% en Latino América y 57% en Sudáfrica^{150,164,165}.

Por otro lado, la primera vacuna para la prevención de COVID-19 que recibió un EUA fue BNT162b2 de Pfizer-BioNTech, el 2 de diciembre por la Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios (MHRA) del Reino Unido¹⁶⁶ y el 11 de diciembre de 2020 por la FDA¹⁶⁷.

En Ecuador esta vacuna desarrollada por Pfizer-BioNTech, fue la primera en ser aprobada para uso de emergencia por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA)¹⁶⁸. BNT162b2 es una vacuna de ARNm modificado con nucleósidos y formulada con partículas lipídicas que codifica la proteína S transmembrana de longitud completa. Un ensayo global fase 2/3 manifestó que la administración de dos dosis (30 μ g de vacuna por dosis) de BNT162b2 con 21 días de diferencia alcanza 95% de eficacia en la prevención de COVID-19 y un perfil de seguridad caracterizado por dolor leve en el lugar de la inyección, dolor de cabeza y fatiga, con una baja incidencia de efectos secundarios graves¹⁶⁹.

La segunda vacuna aprobada por el ARCSA es ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222)¹⁷⁰, una vacuna de vector no replicante ChAdOx1 que contiene el gen de la proteína S del virus, diseñada por AstraZeneca y la Universidad de Oxford. Un análisis de cuatro ensayos con una administración de dos dosis (dosis estándar 5×10^{10} partículas virales) demostró que en aquellos participantes que recibieron dos dosis estándar la eficacia de la vacuna fue del 62%, mientras que en el grupo que adoptó media dosis estándar seguida de una dosis completa la eficacia fue de 90%, obteniendo una eficacia global de la vacuna del 70,4% contra el COVID-19 sintomático con un perfil de seguridad aceptable¹⁷¹.

A continuación se describirán las herramientas de la biotecnología y sus múltiples aplicaciones, además se mencionarán sus características más importantes empleadas en el control, manejo y prevención de las diferentes pandemias.

Herramientas biotecnológicas

En 1919, el ministro de alimentos húngaro, Kark Ereky, mencionó por primera vez la palabra biotecnología refiriéndose a todas las áreas de trabajo en las cuales los productos son obtenidos a partir de materia prima orgánica mediante la intervención de organismos vivos¹⁷². Sobre esta base la biotecnología ha ido evolucionando y ha sido dividida en tres periodos en función del tiempo: la biotecnología antigua, la biotecnología clásica y la biotecnología moderna^{173,174}. El último periodo inició con la revelación del modelo de doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953, desde este evento, la bio-

Herramientas biotecnológicas para el diagnóstico de enfermedades pandémicas

2103

Figura 2. Herramientas biotecnológicas para el diagnóstico de enfermedades pandémicas - Ventajas y desventajas.

tecnología fue considerada como una ciencia moderna capaz de desarrollar sus propias aplicaciones¹⁷⁵, basadas en técnicas modernas como las técnicas de ADN recombinante¹⁷⁶ o la técnica de la hibridoma¹⁷⁷.

En la actualidad se puede definir a la biotecnología como una ciencia multidisciplinaria e interdisciplinaria que emplea organismos vivos, células o sus derivados para el desarrollo de productos y procesos orientados al bienestar humano empleando diversos tipos de herramientas y tecnologías^{173,178}. Otra de las clasificaciones de esta ciencia se basa en un código de colores que diferencia las principales áreas¹⁷⁹. Un área de la biotecnología de interés en esta revisión es la biotecnología roja, médica o farmacéutica, que se relaciona con la producción y desarrollo de métodos de diagnóstico y productos biofarmacéuticos como biofármacos recombinantes, productos de ingeniería de tejidos, productos de ingeniería de proteínas, anticuerpos monoclonales, vacunas, medicamentos regenerativos (terapia de células madre y génica), nanopartículas y biosensores^{173,178,179}. Las herramientas biotecnológicas han permitido la obtención de estos productos a escala industrial, incluyendo agentes novedosos y tradicionales los cuales eran producidos en minoría, para lo que se emplean bioprocesamientos conocidos como biotecnología blanca o industrial^{178,179}.

Era de las "OMICAS" para el desarrollo de herramientas biotecnológicas

Las tecnologías "ómicas" inspiradas en el proceso natural de producción de biomoléculas en las células, han aportado significativamente en el avance del diagnóstico, manejo y pronóstico de varias enfermedades, siendo elementales para el perfeccionamiento de la medicina personalizada de próxima generación^{180,181}, debido a que permiten una mejor comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que interfieren en la progresión de una enfermedad en humanos¹⁸⁰. Entre

las "ómicas" con mayor avance están la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica¹⁸¹, siendo la genómica y proteómica las "ómicas", con un protagonismo superior en la investigación de diagnóstico y tratamiento en enfermedades infecciosas¹⁸². La genómica trata de la estructura, función, evolución y mapeo de genomas, con el objetivo de cuantificar y caracterizar genes¹⁸⁰. La obtención y análisis de secuencias completas de los genomas de patógenos causantes de enfermedades emergentes ha sido valioso para el análisis filogenético de estos microorganismos, conocer su origen, caracterizar los patrones de transmisión, el desarrollo acelerado de pruebas de diagnóstico eficientes, además, ha sido la base para el diseño de nuevas tecnologías terapéuticas, incluidos biotecnológicos y ha permitido la identificación de epítopes claves para la construcción de vacunas. Asimismo, ha influido en el seguimiento epidemiológico de las pandemias y en la detección de nuevas variantes virales^{76,183-186}.

La proteómica, por otro lado, estudia todas las proteínas presentes en una célula, tejido u organismo, centrándose en las propiedades bioquímicas, roles funcionales y sus cambios frente al crecimiento o a estímulos internos y externos^{182,187,188}. La proteómica a través de espectrometría de masas facilita los análisis de precisión, sensibles y de alto rendimiento de proteínas a gran escala¹⁸⁷. Además, es posible comprender y descubrir interacciones claves proteína-proteína, redes de señalización, interacciones complejas huésped-patógeno, respuestas del huésped al invasor y los mecanismos de aprovechamiento del microorganismo, lo que ha proporcionado información sobre la patogénesis de una enfermedad, caracterización de biomarcadores para métodos de diagnóstico y fármacos antivirales durante una epidemia^{182,188}. Al mismo tiempo el prototipado por espectrometría de masas puede ser un método de diagnóstico alternativo¹⁸⁸.

PRODUCTOS BIOLÓGICOS USADOS EN EL CONTROL DE PANDEMIAS

TERAPÉUTICOS

Anticuerpos monoclonales (terapéuticos y profilácticos)

Plasma convaleciente

Interferones

ARN de interferencia

Liposomas como nanotransportadores de fármacos

PROFILÁCTICOS

Vacunas Tradicionales

Vacunas de Nueva Generación

Figura 3. Productos biológicos usados en el control de pandemias (Creado en BioRender).

Herramientas biotecnológicas en el diagnóstico

Las herramientas biotecnológicas modernas aplicadas para el diagnóstico se han optimizado a lo largo de la aparición de las diferentes pandemias, gracias a la investigación y el avance tecnológico, con el fin de producir pruebas sencillas, de bajo costo, que requieran menor tiempo de detección, con sensibilidad y especificidad alta^{58,148,189}. Los métodos para la identificación de patógenos se han basado principalmente en cultivo viral⁵⁸, detección de antígenos^{61,105}, identificación indirecta de anticuerpos^{20,29} y detección de ácidos nucleicos^{42,130,132} (Figura 2). Debido a la necesidad de pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT) se están efectuando estudios trascendentales para convertir las técnicas conocidas en herramientas POCT rápidas, eficientes y ultrasensibles, sin la necesidad de mano de obra experimentada y laboratorios sofisticados^{84,130,189,190}.

Técnicas de diagnóstico molecular

Los test moleculares son las pruebas de diagnóstico con mayor demanda en los últimos años, debido a su elevada sensibilidad y precisión^{133,189}. Estas tecnologías mecanizadas detectan y amplifican secuencias específicas y conservadas del genoma del patógeno en muestras de pacientes infectados^{41,133}. Las cuales se describen a continuación:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica que se emplea para amplificar exponencialmente pequeños fragmentos de ADN diana. El principio de la PCR se fundamenta en el ciclo repetitivo de tres reacciones: desnaturación, alineación y extensión, el proceso se repite de 30 a 40

veces, con el doble de la cantidad de material genético objetivo en cada ciclo. Al final se producen millones de fragmentos de la secuencia de ADN diana, en un período corto de tiempo¹⁹¹.

Existen algunas variaciones de la PCR. PCR de transcripción inversa (RT-PCR) inicia con la obtención de ADNc a partir de ARN mediante transcripción inversa, seguido por la amplificación del ADNc. Esta técnica se usa para la detección de virus de ARN⁸⁰. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se basa en el empleo de sondas marcadas con fluorescencia que permiten cuantificar los productos de PCR a medida que se generan, en esta técnica el ciclo de temperatura ocurre más rápido que en los ensayos de PCR estándar, la hibridación de sondas se produce continuamente durante la reacción de amplificación y el tinte fluorescente acoplado a la sonda emite una señal solo cuando tiene lugar la hibridación¹⁹². Por otro lado, PCR múltiple es utilizada para la identificación simultánea de varias secuencias de genes que pertenecen al mismo patógeno o a una mezcla de diferentes patógenos. Esta técnica permite ahorrar tiempo y reactivos al dirigirse a múltiples dianas a la vez¹⁹³. Otro tipo de PCR es la PCR anidada, este ensayo implica dos reacciones de amplificación secuenciales con un par de cebadores diferentes en cada una, el segundo conjunto de cebadores amplifica un objetivo secundario dentro del producto de la primera reacción. Esto proporciona ejecutar un mayor número de ciclos mientras se reducen los productos no específicos, aumentando la especificidad y sensibilidad de detección^{194,195}.

Técnicas de diagnóstico molecular en desarrollo

A lo largo del tiempo se han ido desarrollando técnicas moleculares modernas para el diagnóstico (Figura 2).

La amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) amplifica secuencias específicas de ADN empleando un conjunto de cuatro o seis cebadores únicos, la mezcla de reacción se incuba en una sola temperatura y el producto de amplificación puede detectarse por la presencia de precipitado de pirofosfato de magnesio como subproducto del proceso de amplificación o por fluorescencia bajo luz UV, además es posible monitorear la reacción en tiempo real midiendo la turbidez del pirofostato. Este ensayo se caracteriza por su simplicidad y alta sensibilidad^{183,135,196}. La técnica LAMP se combina con una transcripción inversa para la identificación de ARN (RT-LAMP)^{83,137}.

Por otro lado, las Repeticiones Palindrómicas Cortas agrupadas y Regularmente Espaciadas (CRISPR), secuencias asociadas con las nucleasas Cas son la base de la tecnología CRISPR/Cas. CRISPR son una familia de secuencias de ADN propias de organismos procariota y Cas son un grupo de endonucleasas que precisan de un ARN guía para reconocer y cortar una secuencia complementaria de ADN. Estas enzimas pueden ser programadas para ser dirigidas a ARN viral^{142,197}. La amplificación mediada por transcripción (TMA) es un ensayo de amplificación isotérmica de un único tubo que emplea una transcriptasa inversa y una polimerasa de ARN para amplificar segmentos específicos de ADN o ARN con mayor eficiencia que la RT-PCR¹⁹⁸. Mientras que una alternativa isotérmica de la PCR, es la amplificación isotérmica de recombinasa y polimerasa (RPA), un ensayo rápido, portátil y de detección múltiple¹⁸⁹.

Inmunoensayos en el diagnóstico

Las pruebas de anticuerpos identifican el aumento de estas proteínas en el suero de pacientes, los anticuerpos son producto de la activación de una respuesta inmune humoral pos infección de microorganismos patógenos⁴⁴. Estos ensayos suelen estar diseñados para detectar anticuerpos humanos IgA, IgM o/y IgG, usualmente, los anticuerpos IgM son hallados pocos días después de la infección, y los anticuerpos IgG aparecen más tarde¹⁹⁹. Los estudios de cuantificación de anticuerpos permiten determinar infecciones recientes o pasadas^{200,201}, sin embargo, estas pruebas no se las utiliza para diagnosticar pacientes infectados debido a problemas de mutaciones de células B²⁰² y deficiencia en la producción de anticuerpos²⁰³, por lo que son aprovechadas como una herramienta de estudios serológicos para conocer el estado de la respuesta inmune²⁰⁴ y para evaluar la dinámica de las respuestas humorales activadas por vacunas^{70,95,125} (Figura 2).

Otro tipo de inmunoensayo son las pruebas de detección de antígenos (Figura 2), que se encargan de identificar directamente partículas de patógenos en muestras biológicas, es decir son capaces de detectar la infección activa en personas afectadas. Las más comunes son las pruebas rápidas de detección de antígenos (RAP) que se basan en inmunoensayos de flujo lateral (LFIA)⁶¹, estas realizan una determinación cualitativa del antígeno mediante un anticuerpo específico inmovilizado en el dispositivo²⁰⁵. Las RAP son ideales en pacientes que se encuentran en la etapa inicial de la enfermedad, cuando la carga viral es comúnmente elevada; además en sujetos con exposición a casos confirmados. La sensibilidad de las RAP es menor en comparación con las pruebas moleculares y el cultivo viral^{206,207}. En consecuencia, los resultados negativos de las pruebas basadas en este método no son capaces de descartar infecciones.

Productos biotecnológicos

Los productos de origen biológico son moléculas grandes y complejas, compuestos de azúcares, proteínas o ácidos nu-

cleicos o combinaciones de estas sustancias, también pueden ser entidades vivas como células y tejidos que se emplean para diagnosticar, prevenir, tratar o curar enfermedades. Estos productos se obtienen de fuentes naturales (humanos, animales, microorganismos, células animales o vegetales), y se producen mediante métodos biotecnológicos y otras tecnologías de vanguardia como la nanotecnología^{208,209}.

Los productos biológicos constituyen un producto creciente en el mercado farmacéutico, a nivel mundial los gastos en productos biológicos sumaron \$277 mil millones durante el 2017 y se predice que en el 2022 aumenten a \$452 mil millones²¹⁰. Estos biofármacos se encuentran protegidos por una mayor cantidad de patentes que los fármacos de origen químico puesto que la fabricación biológica posee mayor complejidad, por lo que es necesario conservar la propiedad intelectual no sólo sobre las composiciones de materia, sino también sobre los procesos de fabricación^{211,212}. El gran número de patentes existentes representan un desafío al momento de identificar los procesos que deben ser eludidos para evitar litigios, por lo que el proyecto de Ley de Transparencia de Patentes Biológicas propuesto en el Congreso de los EE. UU. en 2019, busca solucionar este conflicto estableciendo una lista de búsqueda imperativa de patentes que resguarda los productos biológicos, la cual se incorporará en el Libro Púrpura de la FDA^{211,213}.

Por otro lado, a diferencia de los fármacos de molécula pequeña la mayoría de biológicos son composiciones complejas y heterogéneas que requieren principios asepticos en todo el proceso de fabricación²⁰⁸. Es así que la licencia de comercialización de un producto biológico es otorgada por organismos reguladores como la FDA y la EMA, que cumplen con los requisitos que garantizan seguridad, pureza y potencia continua del producto²¹⁴.

Los principales productos biotecnológicos dirigidos a enfermedades causantes de pandemias se observan en la Figura 3.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) neutralizantes se aíslan de personas recuperadas de la infección o de modelos animales inmunizados y se pueden administrar en pacientes antes o después de una infección viral para aplicaciones terapéuticas o profilácticas, los cuales van dirigidos a una diana específica del patógeno evitando la infección de este a la célula huésped^{93,114,155}. Por otro lado, los interferones (IFN) son proteínas señalizadoras de origen natural producidas por células del sistema inmunológico, que poseen propiedades antivirales e inmunomoduladoras no específicas^{87,110}. Son estimulados por infecciones virales, estos se secretan y se unen a la célula afectada o a sus células vecinas y activa la expresión de genes con función antiviral²¹⁵. Existen tres clases principales de interferones empleados en farmacoterapia los alfa (IFN- α), los beta (IFN- β) y los gamma (INF- γ)²¹⁶. Comúnmente los interferones son estudiados en combinación con otros agentes antivirales, ribavirina o lopinavir / ritonavir^{87,217}. Otro de los tratamientos valorados en la aparición de pandemias es el empleo de ARN de interferencia, como ARN de interferencia pequeños (siRNA) y micro ARN (miARN), la función de estas moléculas es la supresión de la expresión de genes claves de los patógenos mediante interferencia por ARN^{111,218,219}.

Vacunas

Las plataformas empleadas para el diseño de vacunas han evolucionado conforme las necesidades de la humanidad y la disponibilidad de tecnología (Figura 3).

Vacunas de virus (inactivadas y atenuadas)

En las vacunas inactivadas se aplican enfoques químicos

o físicos para eliminar las propiedades infecciosas del patógeno^{21,23}. Las ventajas de estas vacunas son la facilidad de producción, además de su seguridad y eficacia en el reconocimiento inmunológico, sin embargo, el rendimiento podría ser limitado debido a la baja producción del virus y a la necesidad de instalaciones de altos niveles de bioseguridad^{48,71}.

Las vacunas vivas atenuadas constan de una versión debilitada del patógeno que se replica limitadamente con el fin de no causar la enfermedad y al mismo tiempo activar las respuestas inmunes de manera similar a una infección natural. Algunas de las desventajas son los problemas de seguridad y el desafío en el proceso de atenuación^{31,72}.

Vacunas basadas en proteínas (subunidad proteica y partículas similares a virus)

En el caso de las vacunas de subunidades se administran proteínas altamente antigénicas del patógeno en el individuo, debido a su baja complejidad antigénica su eficacia protectora puede ser limitada, además de provocar respuestas inmunes no regulares^{220,221}. Las vacunas de partículas similares al virus constan de proteínas de la cápside viral, que generan una alta activación del sistema inmune debido a la repetición de sus estructuras, además confieren seguridad debido a la ausencia de material genético del patógeno, sin embargo, existen complicaciones en el proceso de diseño de la plataforma²²².

Vacunas de vectores virales (replicantes y no replicantes)

Las vacunas de vectores virales se basan en un virus modificado con un gen que exprese una proteína de interés del patógeno en cuestión. Los vectores virales de replicación incompetente son virus inhabilitados para la replicación mediante la eliminación de partes de su genoma, entre las ventajas de esta plataforma es que no es necesario manipular el patógeno *in vivo*, estos vectores son capaces de activar respuestas inmunitarias celulares y humorales, y existe gran experiencia en la producción de este tipo de vacunas^{95,125}. Por otro lado, para el empleo de vectores de replicación competente se considera a virus que no se replican de manera eficiente o virus de animales que no causan enfermedades en humanos, la ventaja de esta plataforma es que tiene la capacidad de promover una inmunidad robusta debido a que existe una infección real¹¹⁹.

Vacunas génicas (ADN o ARN)

En este tipo de vacunas la información genética del patógeno, ADN o ARN, es administrada para luego dirigirse a las células del individuo vacunado y expresar una proteína de interés capaz de activar efectivamente el sistema inmunitario y lograr defender al huésped en caso de una futura infección. La tecnología de ADN se puede producir a gran escala, sin embargo, muestran baja inmunogenicidad y necesitan de dispositivos eficientes para su administración^{94,223,224}. Mientras que, las vacunas de ARNm poseen capacidad de desarrollo breve, elevada potencia y fabricación rentable, pero requiere almacenamiento a bajas temperaturas para su estabilidad, sin embargo, con los últimos desarrollos referentes a ARNm encapsulado en nanopartículas se podría almacenar este tipo de vacunas a temperaturas de 4 °C^{169,225}.

Discusión y conclusiones

En cuanto a las herramientas de diagnóstico, se debe tener en cuenta que ninguna prueba biológica puede alcanzar una especificidad del 100% y una sensibilidad del 100%¹³⁰. Por

su parte, la sensibilidad se define como la capacidad de una prueba de arrojar un resultado positivo en una persona enferma, mientras que la especificidad es la capacidad de la prueba de obtener un resultado negativo en un sujeto libre de la enfermedad^{226,227}. Como se muestra en la comparación de resultados de la Tabla 1, la sensibilidad y especificidad de cada una de las técnicas no son 100%, sin embargo, las herramientas moleculares presentan la mejor alternativa para el diagnóstico de enfermedades pandémicas, reduciendo en gran medida los falsos positivos y falsos negativos, elevando así la eficiencia de las pruebas. Según Yuan *et al.*¹⁴⁸ los resultados del diagnóstico dependen de varias condiciones como las características del kit de detección, sus controles, su especificidad, sensibilidad y calidad de la muestra, como se demuestra en la Figura 2, nuevamente las técnicas moleculares alcanzan un porcentaje superior en comparación con el cultivo celular que presenta dificultades en el tiempo de ejecución, baja sensibilidad; y los inmunoensayos para la detección de antígenos, los cuales no se recomiendan como un diagnóstico confirmatorio debido al alto índice de falsos negativos. No obstante, las pruebas de antígenos debido a que permiten la obtención de resultados acelerados a un menor costo, se pueden aplicar masivamente teniendo un mayor impacto en la salud pública.

La qRT-PCR ha sido la técnica más empleada como estándar de oro para el diagnóstico de pandemias, sin embargo, a pesar de los altos índices de especificidad y sensibilidad, han surgido algunos problemas como costos elevados, tiempo de procesamiento, requerimiento de personal capacitado y altos estándares de bioseguridad, por lo que se están desarrollando varias alternativas con resultados prometedores como LAMP, CRISPR-Cas y biosensores con el fin de minimizar las desventajas y optimizar el diagnóstico de enfermedades pandémicas^{148,189}.

Por otro lado, el gran avance en el desarrollo de los productos biotecnológicos se debe a varias ventajas como su alta eficiencia, efectos secundarios más seguros y reducidos en contraste con los fármacos de moléculas pequeñas, además de los costos relativamente bajos que presentan en comparación con sus beneficios y terapias completamente innovadoras. En el caso de la fabricación de vacunas fue posible observar una diferencia significativa en esta pandemia del SARS-CoV-2 en contraposición con brotes anteriores, gracias al nivel científico actual, debido que a pesar de la capacidad de investigación, de los avances biomédicos y biotecnológicos, y del desarrollo de la tecnología, las vacunas podrían tardar años, hasta décadas en ser llevadas al mercado para el beneficio de la humanidad, como es el caso de la primera vacuna contra el EBOV aprobada en el 2019 por la FDA y la EMA¹²². En la actualidad, la situación ha sido diferente frente a la pandemia de COVID-19, a un año y tres meses del inicio del brote del SARS-CoV-2 existen 3 vacunas aprobadas por la FDA, 4 vacunas candidatas en fase 4 y 12 vacunas en estudios clínicos fase 3¹⁵⁰, los expertos afirman que todo el proceso de fabricación y experimentación se han dado en un tiempo récord gracias a la gran inversión tanto pública como privada que se ha llevado a cabo y al solapamiento de las fases preclínicas y clínicas en los diferentes estudios.

Las perspectivas futuras sobre las herramientas y productos biotecnológicos son prometedoras, con técnicas de diagnóstico eficientes con características ultrasensibles con requerimientos de concentraciones a escala nano y tecnología basadas en inteligencia artificial o biología sintética^{148,228}, las cuales permitirán brindar un apoyo intensivo en el diagnóstico y seguimiento en la propagación de la enfermedad y transmisión del patógeno. Los biofármacos, por su parte, constitu-

yen la vanguardia de la investigación biomédica, por lo que se aspira que en el futuro representen una opción más eficiente en el control de enfermedades infecciosas que en la actualidad carecen de tratamiento o poseen muy pocas alternativas²⁰⁸, además de terapias personalizadas optimizando drásticamente la seguridad y eficacia de los medicamentos¹⁷⁸.

Finalmente, podemos concluir que el desarrollo y uso de las herramientas biotecnológicas actuales han revolucionado el campo de la medicina en este caso el control de enfermedades emergentes con potencial pandémico. Con todos los conocimientos y lecciones adquiridas a lo largo de las diferentes pandemias y epidemias ocurridas a través de la historia, en posteriores brotes se poseerá la capacidad de un mejor manejo y contención de las enfermedades.

Referencias bibliográficas

- Dobson AP, Carper ER. Infectious diseases and human population history. *Bioscience* 1996; 46: 115–126.
- World Health Organization. Disease burden and mortality estimates: Cause-specific mortality, 2000–2016. 2017.http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/ (accessed 27 Feb2021).
- Smith KM, Machalaba CC, Seifman R, Feferholtz Y, Karesh WB. Infectious disease and economics: The case for considering multi-sectoral impacts. *One Heal* 2019; 7: 100080.
- Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg* 2020; 78: 185–193.
- Koplan JP, McPheeters M. Plagues, public health, and politics. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2039–2043.
- DeWitte SN. Mortality risk and survival in the aftermath of the medieval Black Death. *PLoS One* 2014; 9: e96513.
- Ogden NH, Wilson JR, Richardson M, Hui C, Davies SJ, Kumschick S et al. Emerging infectious diseases and biological invasions: a call for a One Health collaboration in science and management. *R Soc Open Sci* 2019; 6. doi:<https://doi.org/10.1098/rsos.181577>.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990–994.
- Sun Q, Qiu H, Huang M, Yang Y. Lower mortality of COVID-19 by early recognition and intervention: experience from Jiangsu Province. *Ann Intensive Care* 2020; 10. doi:10.1186/s13613-020-00650-2.
- Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B. New vaccine technologies to combat outbreak situations. *Front Immunol* 2018; 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01963.
- Hine R. A Dictionary of Biology. 2019 doi:10.1093/acref/9780198821489.001.0001.
- Porta M. A Dictionary of Epidemiology. 2016 doi:10.1093/acref/9780199976720.001.0001.
- Adalja AA, Watson M, Toner ES, Cicero A, Inglesby T V. The characteristics of pandemic pathogens. 2018https://www.centerforhealthsecurity.org/our-work/pubs_archive/pubs-pdfs/2018/180510-pandemic-pathogens-report.pdf.
- Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12: 15–22.
- Johnson N, Muelle J. Updating the accounts: global mortality of the 1918 – 1920 ‘spanish’ influenza pandemic. *Bull Hist Med* 2002; 76: 105–115.
- Dunn FL. Pandemic influenza in 1957: Review of international spread of new asian strain. *J Am Med Assoc* 1958; 166: 1140–1148.
- Glezen WP. Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev* 1996; 18: 64–76.
- Viboud C, Simonsen L, Fuentes R, Flores J, Miller MA, Chowell G. Global mortality impact of the 1957 – 1959 influenza pandemic. *J Infect Dis* 2016; 213: 738–745.
- Blumenfeld H, Kilbourne E, Louria D, Rogers D. Studies on influenza in the pandemic of 1957–1958. I. An epidemiologic, clinical and serologic investigation of an intrahospital epidemic, with a note on vaccination efficacy. *J Clin Invest* 1958; 38: 199–212.
- Jensen KE, Hogan RB. Laboratory diagnosis of asian influenza. *Public Health Rep* 1958; 73: 140–144.
- Gundelfinger BF, Stille WT, Bell JA. Effectiveness of influenza vaccines during an epidemic of asian influenza. *N Engl J Med* 1958; 259: 1005–1009.
- Culver JO, Nitz RE, Lennette EH. The protective effect of monovalent asian-strain vaccine against asian influenza. *J Am Med Assoc* 1957; 165: 2174–2177.
- Dull BH, Jensen KE, Rakich JH, Cohen A, Henderson DA, Pirkle CI. Monovalent asian influenza vaccine: evaluation of its use during two waves of epidemic asian influenza in partly immunized penitentiary population. *J Am Med Assoc* 1960; 172: 87–93.
- Davenport FM. Role of the commission on influenza. *Public Health Rep* 1958; 73: 133–139.
- Meiklejohn G, Morris AJ. Influenza vaccination. *Ann Intern Med* 1958; 49: 529–535.
- Langmuir A. Epidemiology of Asian influenza. With special emphasis on the United States. *Am Rev Respir Dis* 1961; 83: 2–14.
- Cockburn WC, Delon PJ, Ferreira W. Origin and progress of the 1968–69 Hong Kong influenza epidemic. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 345–348.
- Rogers K. 1968 Flu pandemic. *Encycl. Br.* 2020.<https://www.britannica.com/event/1968-flu-pandemic> (accessed 21 Sep2020).
- Coleman MT, Dowdle WR. Properties of the Hong Kong influenza virus. I. General characteristics of the Hong Kong virus. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 415–418.
- Murray R. Production and testing in the USA of influenza virus vaccine made from the Hong Kong variant in 1968–69. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 495–496.
- Maassab HF, Francis T, Davenport FM, Hennessy A V, Minuse E, Anderson G. Laboratory and clinical characteristics of attenuated strains of influenza virus. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 589–594.
- Brandon FB, Cox F, Quinn E, Timm EA, Mclean IW. Influenza immunization: clinical studies with ether-split subunit vaccines. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 629–637.
- Warburton MF. Desoxycholate-split influenza vaccines. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 639–641.
- Kilbourne ED. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 643–645.
- Couch RB, Douglas RG, Fedson DS, Kasel JA. Correlated studies of a recombinant influenza-virus vaccine. III. Protection against experimental influenza in man. *J Infect Dis* 1971; 124: 473–480.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953–1966.
- World Health Organization. Cumulative number of reported probable cases of SARS. 2015.https://www.who.int/csr/sars/country/2003_07_11/en/ (accessed 25 Jan2021).
- World Health Organization. Alert, verification and public health management of SARS in the post-outbreak period. 2003.<https://www.who.int/csr/sars/postoutbreak/en/> (accessed 30 Dec2020).
- Chan KH, Poon LLLM, Cheng VCC, Guan Y, Hung IFN, Kong J et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 294–299.
- Yam WC, Chan KH, Poon LLM, Guan Y, Yuen KY, Seto WH et al. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4521–4524.
- Poon LLM, Chan KH, Wong OK, Yam WC, Yuen KY, Guan Y et al. Early diagnosis of SARS Coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003; 28: 233–238.
- Chan PKS, To WK, Ng KC, Lam RKY, Ng TK, Chan RCW et al. Laboratory diagnosis of SARS. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 825–831.
- Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yam LYC, Lim W et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361: 1319–1325.

44. Shi Y, Yi Y, Li P, Kuang T, Li L, Dong M et al. Diagnosis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) by Detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5781–5782.
45. Lu A, Zhang H, Zhang X, Wang H, Hu Q, Shen L et al. Attenuation of SARS coronavirus by a short hairpin RNA expression plasmid targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 2004; 324: 84–89.
46. Cheng Y, Wong R, Soo YOY, Wong WS, Lee CK, Ng MHL et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 44–46.
47. Ho JC, Wu AY, Lam B, Ooi GC, Khong P-L, Ho PL et al. Pentaglobin in steroid-resistant severe acute respiratory syndrome. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1173–1179.
48. Zhou J, Wang W, Zhong Q, Hou W, Yang Z, Xiao SY et al. Immunogenicity, safety, and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine* 2005; 23: 3202–3209.
49. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004; 428: 561–564.
50. Gao W, Tamin A, Soloff A, D'Aiuto L, Nwanegbo E, Robbins PD et al. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 2003; 362: 1895–1896.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Update: novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 453–458.
52. Centers for Disease Control and Prevention. 2009 H1N1 Pandemic (H1N1pdm09 virus). 2019. <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/2009-h1n1-pandemic.html> (accessed 25 Jan 2021).
53. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 687–695.
54. World Health Organization. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans revised. 2009 https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf.
55. Peiris JM, Poon LLM, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol* 2009; 45: 169–173.
56. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance on specimen collection, processing, and testing for patients with suspected novel influenza A (H1N1) virus infection. 2009. <https://www.cdc.gov/h1n1flu/specimencollection.htm> (accessed 20 Jan 2021).
57. Balish A, Warnes C, Wu K, Barnes N, Emery S, Berman L et al. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus - United States, 2009. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 826–829.
58. Kumar S, Henrickson KJ. Update on influenza diagnostics: lessons from the novel H1N1 influenza A pandemic. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 344–361.
59. World Health Organization. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). Atlanta, 2009.
60. Kim D, Poudel B. Tools to Detect Influenza Virus. *Yosei Med J* 2013; 54: 560–566.
61. Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1090–1093.
62. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Recommendations for Clinical Use of Influenza Diagnostic Tests During the 2009-10 Influenza Season. 2009. https://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/diagnostic_tests.htm#_ftn1 (accessed 4 Feb 2021).
63. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A et al. Antigenic and Genetic Characteristics of the Early Isolates of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science* 2009; 325: 197–201.
64. Yang Y, Sugimoto JD, Halloran ME, Basta NE, Chao DL, Matrajt L et al. The transmissibility and control of pandemic influenza A (H1N1) virus. *Science* 2009; 326: 729–733.
65. Hung IFN, To KKW, Lee CK, Lee KL, Yan WW, Chan K et al. Hyperimmune IV immunoglobulin treatment: A multicenter double-blind randomized controlled trial for patients with severe 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest* 2013; 144: 464–473.
66. Hung IFN, To KKW, Lee CK, Lee KL, Chan K, Yan WW et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 447–456.
67. Prevention C for DC and. Key Facts About 2009 H1N1 Flu Vaccine. 2010. https://www.cdc.gov/h1n1flu/vaccination/vaccine_keyfacts.htm (accessed 5 Feb 2021).
68. Centers for Disease Control and Prevention. Update on Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccines. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 1100–1101.
69. Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza Other Respi Viruses* 2011; 5: 157–166.
70. Plennevaux E, Sheldon E, Blatter M, Reeves-Hoché MK, Denis M. Immune response after a single vaccination against 2009 influenza A H1N1 in USA: a preliminary report of two randomised controlled phase 2 trials. *Lancet* 2010; 375: 41–48.
71. Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, Wichems CH, Gittleman C, Bennett J et al. Response to a monovalent 2009 influenza A (H1N1) vaccine. *New Engl J Med* 2009; 361: 2405–2413.
72. Mallory RM, Malkin E, Ambrose CS, Bellamy T, Shi L, Yi T et al. Safety and immunogenicity following administration of a live, attenuated monovalent 2009 H1N1 influenza vaccine to children and adults in two randomized controlled trials. *PLoS One* 2010; 5: e13755.
73. Clark TW, Pareek M, Hoschler K, Dillon H, Nicholson KG, Groth N et al. Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *N Engl J Med* 2009; 361: 2424–2435.
74. Hardelid P, Fleming DM, Mcmenamin J, Andrews N, Robertson C, Sebastian Pillai P et al. Effectiveness of pandemic and seasonal influenza vaccine in preventing pandemic influenza A(H1N1)2009 infection in England and Scotland 2009–2010. *Eurosurveillance* 2011; 16: 19763.
75. Lansbury LE, Smith S, Beyer W, Karamelic E, Pasic-Juhás E, Sikira H et al. Effectiveness of 2009 pandemic influenza A(H1N1) vaccines: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2017; 35: 1996–2006.
76. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012; 367: 1814–1820.
77. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – The Kingdom of Saudi Arabia. 2021. <http://www.who.int/csr/don/01-february-2021-mers-saudi-arabia/en/> (accessed 16 Feb 2021).
78. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Testing for MERS-CoV. 2019. <https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/lab/lab-testing.html#molecular> (accessed 21 Dec 2020).
79. World Health Organization. Laboratory testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus- Interim guidance (revised). 2018 https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/mers-laboratory-testing/en/ (accessed 18 Dec 2020).
80. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance* 2012; 17. doi:10.2807/ese.17.39.20285-en.
81. Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Eurosurveillance* 2012; 17: 20334.
82. Abd El Wahed A, Patel P, Heidenreich D, Hufert FT, Weidmann M. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle east respiratory syndrome coronavirus. *PLoS Curr* 2013; 5. doi:10.1371/currents.outbreaks.62df1c7c75ffc96cd59034531e2e8364.
83. Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T et al. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virol J* 2014; 11. doi:https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-139.

84. Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, Chi H, Zhao J et al. A rapid and specific assay for the detection of MERS-CoV. *Front Microbiol* 2018; 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01101.
85. Memish ZA, Perlman S, Van Kerkhove MD, Zumla A. Middle East respiratory syndrome. *Lancet* 2020; 395: 1063–1077.
86. Koch T, Dahlke C, Fathi A, Kupke A, Krähling V, Okba NMA et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 827–838.
87. Arabi YM, Asiri AY, Assiri AM, Balkhy HH, Al Bshabshe A, Al Jerai-sy M et al. Interferon beta-1b and lopinavir–ritonavir for middle east respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2020; 383: 1645–1656.
88. Widjaja I, Wang C, van Haperen R, Gutiérrez-Álvarez J, van Die-ren B, Okba NMA et al. Towards a solution to MERS: protective human monoclonal antibodies targeting different domains and functions of the MERS-coronavirus spike glycoprotein. *Emerg Mi-crobes Infect* 2019; 8: 516–530.
89. Raj VS, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, Drabek D, van Dieren B, Widagdo W et al. Chimeric camel / human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci Adv* 2018; 4: eaas9667.
90. Ko JH, Seok H, Cho SY, Ha YE, Baek JY, Kim SH et al. Challenges of convalescent plasma infusion therapy in Middle East respira-tory coronavirus infection: A single centre experience. *Antivir Ther* 2018; 23: 617–622.
91. de Wit E, Feldmann F, Okumura A, Horne E, Haddock E, Saturday G et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of mAb treatment against MERS-CoV in common marmosets. *Antiviral Res* 2018; 156: 64–71.
92. Luke T, Wu H, Zhao J, Channappanavar R, Coleman CM, Jiao J-A et al. Human polyclonal immunoglobulin G from transchromo-somic bovines inhibits MERS-CoV in vivo. *Sci Transl Med* 2016; 8: 326ra21.
93. Beigel JH, Voell J, Kumar P, Raviprakash K, Wu H, Jiao JA et al. Safety and tolerability of a novel, polyclonal human anti-MERS coronavirus antibody produced from transchromosomal cattle: a phase 1 randomised, double-blind, single-dose-escalation study. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 410–418.
94. Modjarrad K, Roberts CC, Mills KT, Castellano AR, Paolino K, Muthumani K et al. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet* 2019; 19: 1013–1022.
95. Folegatti PM, Bittaye M, Flaxman A, Lopez FR, Bellamy D, Kup-ke A et al. Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 816–826.
96. Pattyn S, van der Groen G, Jacob W, Piot P, Courteille G. Isolation of Marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1977; 309: 573–574.
97. World Health Organization. Ebola outbreak 2014–2016. 2016. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/> (accessed 23 Oct2020).
98. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 Democratic Republic of the Congo, Equateur Province. 2020. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/drc/2020-june.html> (accessed 6 Feb2021).
99. Jacob ST, Crozier I, Fischer WA, Hewlett A, Kraft CS, Vega MA de La et al. Ebola virus disease. *Nat Rev Dis Prim* 2020; 6. doi:https://doi.org/10.1038/s41572-020-0147-3.
100. Dudas G, Carvalho LM, Bedford T, Tatem AJ, Baele G, Faria NR et al. Virus genomes reveal factors that spread and sustained the Ebola epidemic. *Nature* 2017; 544: 309–315.
101. World Health Organization. Ebola virus disease. 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease> (accessed 6 Feb2021).
102. Erickson BR, Sealy TK, Flietstra T, Morgan L, Kargbo B, Matt-Lebby VE et al. Ebola virus disease diagnostics, Sierra Le-one: analysis of real time RT-PCR values in clinical blood and oral swab specimens. *J Infect Dis* 2016; 214: S258–S262.
103. Malvy D, McElroy AK, de Clerck H, Günther S, van Griensven J. Ebola virus disease. *Lancet* 2019; 393: 936–948.
104. Pinsky BA, Sahoo MK, Sandlund J, Kleman M, Kulkarni M, Grufman P et al. Analytical performance characteristics of the cepheid GeneXpert Ebola Assay for the detection of Ebola virus. *PLoS One* 2015; 10: e0142216.
105. Cnops L, De Smet B, Mbala-Kingebeni P, van Griensven J, Ahuka-Mundeke S, Ariën KK. Where are the Ebola diagnostics from last time? *Nature* 2019; 565: 419–421.
106. OraSure Technologies I. OraQuick® Ebola rapid antigen test customer letter. Bethlehem, 2019. https://www.oraensure.com/documents/products/ebola/Ebola_Instruction_PI-ENG.pdf (ac-cessed 6 Feb2021).
107. U.S. Food and Drug Administration. FDA allows marketing of first rapid diagnostic test for detecting Ebola virus antigens. 2019. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-allows-marketing-first-rapid-diagnostic-test-detecting-ebola-virus-antigens> (accessed 6 Feb2021).
108. van Griensven J, De Weigheleire A, Delamou A, Smith PG, Edwards T, Vandekerckhove P et al. The use of ebola convales-cent plasma to treat ebola virus disease in resource-constrained settings: a perspective from the field. *Clin Infect Dis* 2016; 62: 69–74.
109. The PREVAIL II Writing Group for the Multi-National PRE-VAIL II Study Team. A randomized, controlled trial of ZMapp for ebola virus infection. *N Engl J Med* 2016; 375: 1448–1456.
110. Konde MK, Baker DP, Traore FA, Sow MS, Camara A, Barry AA et al. Interferon -1a for the treatment of Ebola virus disease: A historically controlled, single-arm proof-of-concept trial. *PLoS One* 2017; 12: e0169255.
111. Dunning J, Sahr F, Rojek A, Gannon F, Carson G, Idriss B et al. Experimental treatment of Ebola virus disease with TKM-130803: A single-arm phase 2 clinical trial. *PLoS Med* 2016; 13: e1001997.
112. Mulangu S, Dodd LE, Davey RT, Tshiani Mbaya O, Proschan M, Mukadi D et al. A randomized, controlled trial of ebola virus disease therapeutics. *N Engl J Med* 2019; 381: 2293–2303.
113. U.S. Food and Drug Administration. FDA Approves First Treatment for Ebola Virus. 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-eb-ola-virus> (accessed 9 Feb2021).
114. Sivapalasingam S, Kamal M, Slim R, Hosain R, Shao W, Stoltz R et al. Safety, pharmacokinetics, and immunogenicity of a co-formulated cocktail of three human monoclonal antibod-ies targeting Ebola virus glycoprotein in healthy adults: a ran-domised, first-in-human phase 1 study. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 884–893.
115. U.S. Food and Drug Administration. FDA Approves Treatment for Ebola Virus. 2020. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-approves-treatment-ebola-vi-rus> (accessed 9 Feb2021).
116. Gaudinski MR, Coates EE, Novik L, Widge A, Houser K V., Burch E et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and immu-nogenicity of the therapeutic monoclonal antibody mAb114 tar-geting Ebola virus glycoprotein (VRC 608): an open-label phase 1 study. *Lancet* 2019; 393: 889–898.
117. Park DJ, Dudas G, Wohl S, Goba A, Whitmer SLM, Andersen KG et al. Ebola virus epidemiology, transmission, and evolution during seven months in Sierra Leone. *Cell* 2015; 161: 1516–1526.
118. Henao Restrepo AM. Update on candidate Ebola vac-cines: available data on immunogenicity, efficacy and safety. 2018. https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2018/october/SAGE_october_2018_ebola_Henaorestrepo.pdf (ac-cessed 9 Feb2021).
119. Henao-Restrepo AM, Longini IM, Egger M, Dean NE, Ed-munds WJ, Camacho A et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-ran-domised trial. *Lancet* 2015; 386: 857–866.
120. Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-ran-domised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet* 2017; 389: 505–518.

121. European Commission. Vaccine against Ebola: Commission grants market authorisation. 2019.https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_19_6246 (accessed 21 Dec2020).
122. US Food and Drug Administration. First FDA-approved vaccine for the prevention of Ebola virus disease, marking a critical milestone in public health preparedness and response. 2019.<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-ebola-virus-disease-marking-critical-milestone-public-health> (accessed 21 Aug2020).
123. World Health Organization. Preliminary results on the efficacy of rVSV-ZEBOV-GP Ebola vaccine using the ring vaccination strategy in the control of an Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo: an example of integration of research into epidemic response. 2019<https://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ebola-ring-vaccination-results-12-april-2019.pdf> (accessed 10 Feb2021).
124. Johnson & Johnson. Johnson & Johnson Announces European Commission Approval for Janssen's Preventive Ebola Vaccine . 2020.https://www.jnj.com/johnson-johnson-announces-european-commission-approval-for-janssens-preventive-ebola-vaccine#_ednref6 (accessed 10 Feb2021).
125. Milligan ID, Gibani MM, Sewell R, Clutterbuck EA, Campbell D, Plested E et al. Safety and immunogenicity of novel adenovirus type 26-and modified vaccinia Ankara-vectored Ebola vaccines: A randomized clinical trial. *JAMA* 2016; 315: 1610–1623.
126. Winslow RL, Milligan ID, Voysey M, Luhn K, Shukarev G, Douoguih M et al. Immune responses to novel adenovirus type 26 and modified vaccinia virus Ankara-vectored ebola vaccines at 1 year. *JAMA* 2017; 317: 1075–1077.
127. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382: 727–733.
128. World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2021.<https://covid19.who.int/> (accessed 1 Mar2021).
129. U.S. Food & Drug Administration. In vitro diagnostics EUAs. 2021.<https://n9.cl/wxx8> (accessed 1 Mar2021).
130. Vandenberg O, Martiny D, Rochas O, van Belkum A, Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nat Rev Microbiol* 2020; 19: 171–183.
131. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta* 2020; 505: 172–175.
132. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem* 2020; 66: 549–555.
133. Touma M. COVID-19: molecular diagnostics overview. *J Mol Med* 2020; 98: 947–954.
134. Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P et al. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology* 2020; 296: E115–E117.
135. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26: 773–779.
136. Park G, Ku K, Baek S, Kim S, Kim S Il, Kim B et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Mol Diagnostics* 2020; 22: 729–735.
137. Huang WE, Lim B, Hsu C-C, Xiong D, Wu W, Yu Y et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 2020; 13: 950–961.
138. Rahimi H, Salehiabar M, Barsbay M, Ghaffarlou M, Kavetsky T, Sharafi A et al. CRISPR Systems for COVID-19 Diagnosis. *ACS Sensors* 2021; 6: 1430–1445.
139. U.S. Food and Drug Administration. Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 Kit. Cambridge, 2020<https://www.fda.gov/media/137747/download>.
140. Jolany Vangah S, Katalani C, Boone HA, Hajizade A, Sijercic A, Ahmadian G. CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. *Biol Proced Online* 2020; 22. doi:10.1186/s12575-020-00135-3.
141. Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang MLW et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv* 2020. doi:10.1101/2020.05.04.20091231.
142. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J et al. CRISPR – Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 2020; 38: 870–874.
143. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. 2020.<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html> (accessed 1 Mar2021).
144. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Ditttrich S et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 8: CD013705.
145. Sheridan C. COVID-19 spurs wave of innovative diagnostics. *Nat Biotechnol* 2020; 38: 769–772.
146. Qiu G, Gai Z, Tao Y, Schmitt J, Kullak-Ublick GA, Wang J. Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS Nano* 2020; 14: 5268–5277.
147. Huang Z, Tian D, Liu Y, Lin Z, Lyon CJ, Lai W et al. Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis. *Biosens Bioelectron* 2020; 164: 112316.
148. Yuan X, Yang C, He Q, Chen J, Yu D, Li J et al. Current and perspective diagnostic techniques for COVID-19. *ACS Infect Dis* 2020; 6: 1998–2016.
149. U.S Food & Drug Administration. Coronavirus Treatment Acceleration Program (CTAP). 2021.<https://www.fda.gov/drugs/coronavirus-covid-19-drugs/coronavirus-treatment-acceleration-program-ctap> (accessed 26 Feb2020).
150. World Health Organization. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. 2021.<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed 1 Mar2021).
151. Kyriakidis NC, López-Cortés A, González EV, Grimaldos AB, Prado EO. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *NPJ Vaccines* 2021; 6. doi:10.1038/s41541-021-00292-w.
152. Jiang S, Zhang X, Yang Y, Hotez PJ, Du L. Neutralizing antibodies for the treatment of COVID-19. *Nat Biomed Eng* 2020; 4: 1134–1139.
153. U.S. Food and Drug Administration. Emergency Use Authorization. 2021.<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization#coviddrugs> (accessed 13 Feb2021).
154. National Institutes of Health. Anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies. 2021.<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/anti-sars-cov-2-antibody-products/anti-sars-cov-2-monoclonal-antibodies/> (accessed 13 Feb2021).
155. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021; 384: 229–237.
156. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19. *JAMA* 2021; 325: 632–644.
157. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021; 384: 238–251.
158. Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, Zheng S, Yang J et al. Effect of convalescent plasma therapy on time to clinical improvement in patients with severe and Life-threatening COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA* 2020; 324: 460–470.
159. Agarwal A, Mukherjee A, Kumar G, Chatterjee P, Bhatnagar T, Malhotra P. Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: Open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial). *BMJ* 2020; 371: m3939.

160. Joyner MJ, Bruno KA, Klassen SA, Kunze KL, Johnson PW, Lesser ER et al. Safety update: COVID-19 convalescent plasma in 20,000 hospitalized patients. *Mayo Clin Proc* 2020; 95: 1888–1897.
161. Libster R, Pérez Marc G, Wappner D, Coviello S, Bianchi A, Braem V et al. Early high-titer plasma therapy to prevent severe Covid-19 in older adults. *N Engl J Med* 2021; 384: 610–618.
162. Liu STH, Lin HM, Baine I, Wajnberg A, Gumprecht JP, Rahman F et al. Convalescent plasma treatment of severe COVID-19: a propensity score-matched control study. *Nat Med* 2020; 26: 1708–1713.
163. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* 2021; 384: 403–416.
164. Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truysers C, de Groot AM et al. Interim results of a phase 1–2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2021. doi:10.1056/NEJMoa2034201.
165. Johnson & Johnson. Johnson & Johnson announces single-shot Janssen COVID-19 vaccines candidate met primary endpoints in interim analysis of its phase 3 ENSEMBLE trial. 2021. <https://www.jnj.com/johnson-johnson-announces-single-shot-janssen-covid-19-vaccine-candidate-met-primary-endpoints-in-interim-analysis-of-its-phase-3-ensemble-trial> (accessed 15 Feb2021).
166. Ledford H, Cyranoski D, Van Noorden R. The UK has approved a COVID vaccine - here's what scientists now want to know. *Nature* 2020; 588: 205–206.
167. U.S. Food & Drug Administration. Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. 2020. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccine> (accessed 1 Mar2021).
168. Ministerio de Salud Pública. Inició la vacunación contra la COVID-19 en Ecuador. 2021. <https://www.salud.gob.ec/en-ecuador-inicio-la-vacunacion-contra-la-covid-19/> (accessed 14 Feb2021).
169. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383: 2603–2615.
170. Ministerio de Salud Pública. Vacuna de AstraZeneca contra la COVID-19 se aplicará en Ecuador. 2021. <https://www.salud.gob.ec/vacuna-de-astrazeneca-contra-la-covid-19-se-aplicara-en-ecuador/> (accessed 14 Feb2021).
171. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021; 397: 99–111.
172. Bud R. History of ' biotechnology '. *Nature* 1989; 337: 10.
173. Amarakoon II, Hamilton C, Mitchell SA, Tennant PF, Roye ME. Biotechnology. In: *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. Elsevier Inc., 2017, pp 549–563.
174. Verma A, Agrahari S, Rastogi S, Singh A. Biotechnology in the realm of history. *J Pharm Bioallied Sci* 2011; 3: 321–324.
175. Bud R. Biotechnology in the twentieth century. *Soc Stud Sci* 1991; 21: 415–457.
176. Wright S. Recombinant DNA technology and its social transformation, 1972–1982. *Osiris* 1986; 2: 303–360.
177. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495–497.
178. Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC. An Introduction to Biotechnology. In: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Springer Singapore: Singapore, 2017, pp 1–21.
179. DaSilva EJ. The colours of biotechnology: science, development and humankind. *Electron J Biotechnol* 2004; 7. <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/1114> (accessed 15 Dec2020).
180. Olivier M, Asmis R, Hawkins GA, Howard TD, Cox LA. The need for multi-omics biomarker signatures in precision medicine. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4781.
181. Eckhardt M, Hultquist JF, Kaake RM, Hüttenhain R, Krogan NJ. A systems approach to infectious disease. *Nat Rev Genet* 2020; 21: 339–354.
182. Sperk M, Van Domselaar R, Rodriguez JE, Mikaeloff F, Sá Vinhas B, Saccon E et al. Utility of proteomics in emerging and re-emerging infectious diseases caused by RNA viruses. *J Proteome Res* 2020; 19: 4259–4274.
183. Cherry JD, Krogstad P. SARS: The first pandemic of the 21st century. *Pediatr Res* 2004; 56. doi:10.1203/01.PDR.0000129184.87042.FC.
184. Zumla A, Chan JFW, Azhar EI, Hui DSC, Yuen KY. Coronaviruses-drug discovery and therapeutic options. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15: 327–347.
185. Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RSG, Park DJ, Kanneh L et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* (80-) 2014; 345: 1369–1372.
186. Rahimi A, Mirzazadeh A, Tavakolpour S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics* 2021; 113: 1221–1232.
187. Schubert OT, Röst HL, Collins BC, Rosenberger G, Aebersold R. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc* 2017; 12: 1289–1294.
188. Grenga L, Armengaud J. Proteomics in the COVID-19 battlefield: first semester check-up. *Proteomics* 2020; 21: e2000198.
189. Srivastava S, Upadhyay DJ, Srivastava A. Next-Generation molecular diagnostics development by CRISPR/Cas tool: rapid detection and surveillance of viral disease outbreaks. *Front Mol Biosci* 2020; 7. doi:10.3389/fmolb.2020.582499.
190. World Health Organization. Urgently needed: rapid, sensitive, safe and simple Ebola diagnostic tests. 2014. <https://www.who.int/mediacentre/news/ebola/18-november-2014-diagnostics/en/> (accessed 19 Nov2020).
191. National Human Genome Research Institute. Polymerase Chain Reaction (PCR) fact sheet. 2020. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet> (accessed 27 Jan2021).
192. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44: 619–626.
193. Poritz MA, Lingenfelter B. Multiplex PCR for detection and identification of microbial pathogens. In: Springer C (ed). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer, Cham, 2018, pp 475–493.
194. Zhang Y, Dai C, Wang H, Gao Y, Li T, Fang Y et al. Analysis and validation of a highly sensitive one-step nested quantitative real-time polymerase chain reaction assay for specific detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Virol J* 2020; 17. doi:10.1186/s12985-020-01467-y.
195. Green MR, Sambrook J. Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2019; 2019. doi:10.1101/pdb.prot095182.
196. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 150–154.
197. The McGovern Institute for Brain Research. What is CRISPR? Ask the Brain. Massachusetts Inst. Technol. 2019. <https://mcgovern.mit.edu/2019/01/01/crispr-in-a-nutshell/> (accessed 27 Jan2021).
198. Carter LJ, Garner L V., Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent Sci* 2020; 6: 591–605.
199. Racine R, Winslow GM. IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunol Lett* 2009; 125: 79–85.
200. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39: 1629–1635.
201. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020; 92: 1518–1524.

202. Davis CW, Jackson KJL, McElroy AK, Halfmann P, Huang J, Chennareddy C et al. Longitudinal analysis of the human B cell response to ebola virus infection. *Cell* 2019; 177: 1566-1582.e17.
203. Okba NMA, Stalin Raj V, Widjaja I, GeurtsvanKessel CH, De Bruin E, Chandler FD et al. Sensitive and specific detection of low-level antibody responses in mild Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *Emerg Infect Dis* 2019; 25: 1868-1877.
204. Augustine R, Das S, Hasan A, S A, Abdul Salam S, Augustine P et al. Rapid antibody-based COVID-19 mass surveillance: relevance, challenges, and prospects in a pandemic and post-pandemic world. *J Clin Med* 2020; 9: 3372.
205. Broadhurst MJ, Kelly JD, Miller A, Semper A, Bailey D, Gropelli E et al. ReBOV Antigen Rapid Test kit for point-of-care and laboratory-based testing for Ebola virus disease: a field validation study. *Lancet* 2015; 386: 867-874.
206. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidance for Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. 2020.<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#table2> (accessed 24 Nov2020).
207. Chen Y, Chan KH, Kang Y, Chen H, Luk HKH, Poon RWS et al. A sensitive and specific antigen detection assay for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerg Microbes Infect* 2015; 4: e26.
208. U.S. Food & Drug Administration. What Are 'Biologics' Questions and Answers. 2018.<https://www.fda.gov/about-fda/center-biologics-evaluation-and-research-cber/what-are-biologics-questions-and-answers> (accessed 28 Jan2021).
209. U.S. Food & Drug Administration. Licensed Biological Products with Supporting Documents. 2021.<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/licensed-biological-products-supporting-documents> (accessed 1 Mar2021).
210. Instituto IQVIA. Advancing Biosimilar Sustainability in Europe. 2018.<https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/advancing-biosimilar-sustainability-in-europe> (accessed 25 Apr2021).
211. Druedahl LC, Almarsdóttir AB, Källemark Sporrang S, De Bruin ML, Hoogland H, Minssen T et al. A qualitative study of biosimilar manufacturer and regulator perceptions on intellectual property and abbreviated approval pathways. *Nat Biotechnol* 2020; 38: 1253-1256.
212. Price WN, Rai AK. How logically impossible patents block biosimilars. *Nat Biotechnol* 2019; 37: 862-863.
213. Collins S. Biologic Patent Transparency Act (S. 659). In: 116th Congress (2019-2020). 2019<https://www.congress.gov/bill/116th-congress/senate-bill/659/text> (accessed 25 Apr2021).
214. U.S. Food and Drug Administration. Frequently Asked Questions About Therapeutic Biological Products. 2015.<https://www.fda.gov/drugs/therapeutic-biologics-applications-bla/frequently-asked-questions-about-therapeutic-biological-products> (accessed 25 Apr2021).
215. Steel J, Staeheli P, Mubareka S, García-sastre A, Palese P, Lowen AC. Transmission of pandemic H1N1 influenza virus and impact of prior exposure to seasonal strains or interferon treatment. *J Virol* 2010; 84: 21-26.
216. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 778-809.
217. Falzarano D, de Wit E, Rasmussen AL, Feldmann F, Okumura A, Scott DP et al. Treatment with interferon- β and ribavirin improves outcome in MERS-CoV-infected rhesus macaques. *Nat Med* 2013; 19: 1313-1317.
218. Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 2005; 11: 944-951.
219. Gallicano GI, Casey JL, Fu J, Mahapatra S. Molecular targeting of vulnerable RNA sequences in SARS CoV-2: identifying clinical feasibility. *Gene Ther* 2020. doi:10.1038/s41434-020-00210-0.
220. Tang J, Zhang N, Tao X, Zhao G, Guo Y, Tseng C-TK et al. Optimization of antigen dose for a receptor-binding domain-based subunit vaccine against MERS coronavirus. *Hum Vaccin Immunother* 2015; 11: 1244-1250.
221. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S et al. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383: 2320-2332.
222. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *N Biotechnol* 2017; 39: 174-180.
223. Tebas P, Kraynyak KA, Patel A, Maslow JN, Morrow MP, Sylvester AJ et al. Intradermal SynCon® Ebola GP DNA vaccine is temperature stable and safely demonstrates cellular and humoral immunogenicity advantages in healthy volunteers. *J Infect Dis* 2019; 220: 400-410.
224. Martin JE, Louder MK, Holman LSA, Gordon IJ, Enama ME, Larkin BD et al. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 2008; 26: 6338-6343.
225. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17: 261-279.
226. Glaros AG, Kline RB. Understanding the accuracy of tests with cutting scores: The sensitivity, specificity, and predictive value model. *J Clin Psychol* 1988; 44: 1013-1023.
227. Shreffler J, Huecker MR. Diagnostic Testing Accuracy: Sensitivity, Specificity, Predictive Values and Likelihood Ratios. StatPearls. 2021.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491423> (accessed 25 Apr2021).
228. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and computational tools for next-generation sequencing analysis in clinical genetics. *J Clin Med* 2020; 9: 132.
229. Pas SD, Patel P, Reusken C, Domingo C, Corman VM, Drosten C et al. First international external quality assessment of molecular diagnostics for Mers-CoV. *J Clin Virol* 2015; 69: 81-85.
230. Böger B, Fachi MM, Vilhena RO, Cobre AF, Tonin FS, Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control* 2021; 49: 21-29.
231. Joyner MJ, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, Theel ES et al. Effect of convalescent plasma on mortality among hospitalized patients with COVID-19: Initial three-month experience. *medRxiv* 2020. doi:10.1101/2020.08.12.20169359.
232. Lin JT, Zhang JS, Su N, Xu JG, Wang N, Chen JT et al. Safety and immunogenicity from a Phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antivir Ther* 2007; 12: 1107-1113.
233. Li Y, Der, Chi WY, Su JH, Ferrall L, Hung CF, Wu TC. Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19. *J. Biomed. Sci.* 2020; 27. doi:10.1186/s12929-020-00695-2.
234. Dolzhikova I V., Zubkova O V., Tukhvatulin AI, Dzharullayeva AS, Tukhvatulina NM, Shcheblyakov D V. et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum Vaccines Immunother* 2017; 13: 613-620.
235. Zhu FC, Wurie AH, Hou LH, Liang Q, Li YH, Russell JBW et al. Safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in Sierra Leone: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2017; 389: 621-628.
236. Tapia MD, Sow SO, Mbaye KD, Thiongane A, Ndiaye BP, Ndour CT et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in children in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 719-730.
237. Tapia MD, Sow SO, Ndiaye BP, Mbaye KD, Thiongane A, Ndour CT et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus vectored Ebola vaccine in adults in Africa: a randomised, observer-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 2020; 20: 707-718.
238. Mallapaty S. China COVID vaccine reports mixed results — what does that mean for the pandemic? *Nature* 2021. doi:10.1038/d41586-021-00094-z.
239. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z et al. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials. *JAMA* 2020; 324: 951-960.

240. Xia S, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao GF et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: 39–51.
241. Ella R, Vadrevu KM, Jogdand H, Prasad S, Reddy S, Sarangi V et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* 2021. doi:10.1016/s1473-3099(20)30942-7.
242. Pu J, Yu Q, Yin Z, Zhang Y, Li X, Li D et al. An in-depth investigation of the safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *medRxiv* 2020. doi:10.1101/2020.09.27.20189548.
243. Logunov DY, Dolzhikova I V, Shcheblyakov D V, Tukhvatulin AI, Zubkova O V, Dzharullaeva AS et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021. doi:10.1016/s0140-6736(21)00234-8.
244. Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2020; 396: 479–488.
245. Novavax. Novavax COVID-19 vaccine demonstrates 89.3% efficacy in UK phase 3 trial . 2021. <https://ir.novavax.com/news-releases/news-release-details/novavax-covid-19-vaccine-demonstrates-893-efficacy-uk-phase-3> (accessed 15 Feb2021).
246. Kremsner P, Mann P, Bosch J, Fendel R, Gabor JJ, Kreidenweiss A et al. Phase 1 assessment of the safety and immunogenicity of an mRNA- lipid nanoparticle vaccine candidate against SARS-CoV-2 in human volunteers. *medRxiv* 2020. doi:10.1101/2020.11.09.20228551.

Received: 10 Marzo 2021

Accepted: 20 Julio 2021