

Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19: clasificación, características, ventajas y limitaciones

*Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas (NanoB2A)
Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2), CSIC, CIBER-BBN y BIST
Bellaterra, Barcelona (España)*

El objetivo principal de este informe es hacer una revisión y breve descripción de los diferentes sistemas y métodos de diagnóstico disponibles actualmente para la infección COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2. Nuestra intención es proporcionar una visión general tanto de las técnicas usadas de forma convencional en laboratorios clínicos como de nuevos sistemas en fases de desarrollo y comercialización que pueden ser útiles para una monitorización eficaz de la población y la detección rápida del virus y la infección.

Introducción al Coronavirus SARS-CoV-2

El nuevo virus SARS-CoV-2 pertenece a la subfamilia de coronavirus (CoV), de la familia *Coronaviridae*, y en concreto, al género beta (beta-coronavirus) al igual que el SARS-CoV causante del brote surgido en China en 2003 y el MERS-CoV, causante del brote aparecido en la península arábiga en 2012, siendo todos ellos de origen zoonótico (el huésped originario es el murciélago), que en un momento dado han evolucionado y han cruzado la barrera entre especies hasta causar el brote infeccioso en humanos. Cabe resaltar que hay otros coronavirus que afectan a los humanos de forma cotidiana, causando enfermedades leves del aparato respiratorio, como por ejemplo los resfriados comunes (229E, NL63, OC43, o HKU1) siendo todos ellos del subgrupo de alfa-coronavirus).

Reciben este nombre por la estructura que poseen, que, vista al microscopio, les confiere de una especie de halo o corona en su superficie exterior. Los virus están compuestos esencialmente por material genético y proteínas estructurales que lo encapsulan. La Figura 1 muestra una imagen esquematizada de la forma y estructura de los coronavirus. Constan de la **nucleocápside**, donde está estrictamente contenido el material genético (exclusivamente una secuencia sencilla de ARN de alrededor de 32,000 bases), y empaquetado gracias a la **proteína N**, y de la **envoltura**, compuesta por varias proteínas estructurales como la glucoproteína de membrana o **proteína M**, implicada en el ensamblaje del virus y en contacto con la nucleocápside, la **proteína S**, que forma las espigas responsable de la adhesión a la célula huésped, y la **proteína E**, que interacciona con la proteína M para la formación de la envoltura. Estas representan las proteínas estructurales más relevantes, aunque hay otras que son necesarias en el proceso replicativo del virus y de infección y entrada en las células.

Cabe destacar que la secuencia genómica del SARS-CoV-2 es relativamente parecida a la del SARS-CoV (79% de la secuencia es idéntica) y algo más diferente del MERS-CoV (un 50%) y que ya se ha encontrado algunas proteínas comunes a SARS-CoV y SARS-CoV-2. Los coronavirus se caracterizan por tener una capacidad de mutación relativamente alta comparada con otros virus, lo que dificulta en cierta medida tanto el desarrollo de métodos de diagnóstico específicos como de terapias y vacunas.

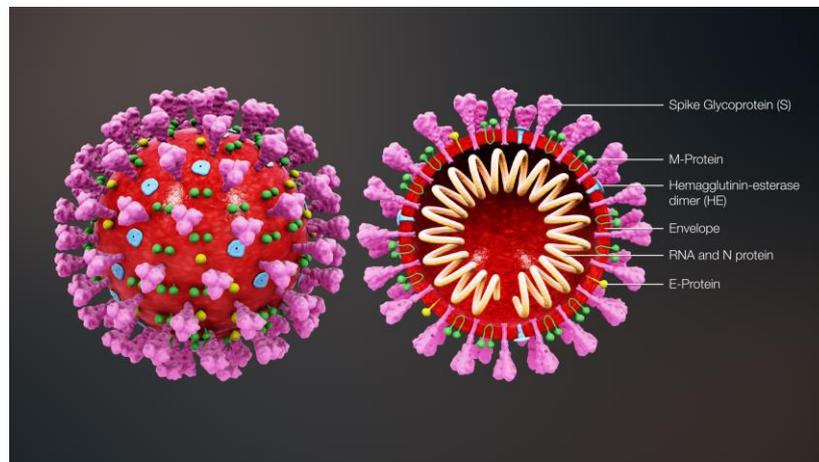


Figura 1. Estructura genérica de los coronavirus (figura extraída de Wikipedia Commons)

Diagnóstico de COVID-19 SARS-CoV-2

En términos generales, los métodos de detección de virus respiratorios podrían clasificarse en tres estrategias diferenciadas, cada una de ellas con sus ventajas y limitaciones:

- 1) Detección del material genético del virus (ARN contenido en la nucleocápside)
- 2) Detección del virus como entidad individual, mediante la detección de antígenos virales.
- 3) Detección de los anticuerpos generados en el organismo huésped infectado (test serológico).

1.- DETECCION DEL MATERIAL GENÉTICO

Esta estrategia es la que usa la técnica de **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción de la polimerasa en cadena). Es una técnica muy establecida, utilizada de manera rutinaria en todos los laboratorios clínicos y que está basada en la amplificación de fragmentos de ADN mediante ciclos consecutivos de incrementos y bajadas de temperatura, lo que permite, a partir de pocas secuencias iniciales de ADN (pocas copias de material genético) ampliar a grandes cantidades que pueden ser detectadas mediante fluorescencia.

La técnica amplifica ADN, por lo que en el caso de del ARN vírico es necesario primero convertirlo a ADN (por transcripción inversa, RT, *reverse transcription*) para a partir de entonces iniciar el proceso de PCR (lo que se llama RT-PCR). Una vez el genoma

de interés es secuenciado (como en el caso del SARS-CoV-2, cuya secuencia fue dilucidada a las pocas semanas de su aparición), es necesario encontrar aquellas **regiones únicas** que lo diferencian de otros virus de la misma familia (que serán las que se amplificarán, previo diseño de sondas de detección), para otorgar a la técnica de la especificidad necesaria.

Hoy en día, la síntesis de las sondas de detección se puede realizar a gran escala, por lo que esta técnica fue la primera en ponerse a punto ya a principios de enero, con multitud de empresas sintetizando los kits de reactivos (sondas de detección) necesarios para la detección de SARS-CoV-2.

Los pasos necesarios para llevar a cabo la detección mediante test PCR son:

A) Colección de muestra de paciente (tratándose de un virus respiratorio, aquellas muestras con mayor cantidad de virus serán las de origen respiratorio, muestra nasofaríngea o esputo) mediante un bastoncillo.

B) Extracción de ARN vírico y purificación.

C) La muestra purificada se somete a transcripción reversa para obtener ADN.

D) Realización de la PCR. El cóctel de reactivos donde se añade la muestra tratada contiene las sondas de reconocimiento con marcadores fluorescentes. La reacción de PCR se realiza en termocicladores con distintas prestaciones, habiendo multitud hoy en día, pudiendo en algunos casos ser compactos y permitir la detección simultánea de varias muestras. En términos generales, se identifica como resultados positivos a la presencia de ARN vírico aquellos muestras que resulten en una señal fluorescente por encima de un umbral determinado previamente y negativos aquellos con una fluorescencia menor.

Ventajas de la técnica PCR

- Técnica bien establecida, comercializada por multitud de compañías.
- Fácilmente adaptable a tantas secuencias diana como sea necesario en un tiempo relativamente corto, una vez se conoce la secuencia genómica a detectar.
- Producción fácilmente escalable a millares de kits de detección (cócteles de reactivos conteniendo las ondas de reconocimiento).
- Elevada especificidad, debido a la elección precisa de zonas del genoma exclusivas de la diana a detectar.
- Elevada sensibilidad debido al proceso inherente de amplificación exponencial.

Limitaciones de la técnica PCR

- Requiere de personal altamente especializado para minimizar uno de sus principales problemas: la contaminación inherente. Una purificación y

aislamiento no adecuado del material genómico puede conducir a resultados erróneos (tanto falso positivos como negativos) debido a amplificaciones de secuencias ajenas que alteran la interpretación de resultados. También requiere de instrumentación especializada por lo que limita su uso a laboratorios especializados.

- La técnica conlleva problemas de reproducibilidad y fiabilidad, lo que dificulta su estandarización para llevar a cabo por personal no especializado.
 - Tiempo de resultado (*time-to-result*) relativamente largo (requiere de 2 a 5 h para la obtención de resultados). Esto se convierte en un factor limitante cuando hay que procesar y analizar un gran número de muestras como en la situación actual.
 - Técnica relativamente costosa (coste de test, entre 10-15€ /unidad) sin considerar la instrumentación necesaria (termociclador PCR con costes variables según prestaciones, entre aproximadamente 3.000-90.000 €).
-

Tecnologías alternativas para la detección del material genómico

Hay tecnologías actualmente en distintos estados de desarrollo y de capacidad de llegar al mercado que pueden aportar **mejoras** en los puntos débiles que ofrece la técnica PCR para el análisis genómico.

Destacan por su gran potencial los **dispositivos biosensores**. Conceptualmente análogos al sensor de glucosa mundialmente usado hoy en día, hay multitud de configuraciones en distintos estadios de desarrollo (a nivel de laboratorio, o prototipos más avanzados ya comerciales) que pueden contribuir al diagnóstico de enfermedades y en emergencias sanitarias como la actual.

Los biosensores son dispositivos integrados y autónomos constituidos por un chip sensor en contacto con moléculas biológicas selectivas (en la superficie del sensor se colocan por ejemplo antígenos, anticuerpos o sondas de ADN, específicos para aquella sustancia, molécula o patógeno a detectar). La captura de la molécula diana produce cambios fisicoquímicos que son detectados por el transductor e inmediatamente procesados en un valor numérico cuantificable. Las principales ventajas de los dispositivos biosensores son su uso descentralizado (fuera de los laboratorios de análisis) ya sea en centros de atención primaria, o terciaria, en urgencias de un hospital), su potencial para ser manejado por personal no especializado, su **elevada sensibilidad**, tiempo de análisis relativamente corto (pocos minutos), y su capacidad para ofrecer valores cuantitativos si es necesario. Además, según el tipo de biosensor puede ofrecer medidas en tiempo real, sin necesidad de amplificar señales o de usar marcajes (ya sean por ejemplo fluorescente o colorimétricos). Finalmente es importante destacar su elevada **versatilidad** en cuanto a la variedad de análisis que puede realizar. Es posible tener chips sensores con distintos receptores inmovilizados, ya sea sondas de ADN, proteínas, anticuerpos, etc.

En el caso de detección genómica, es posible usar **biosensores ópticos** (basados en tecnología microelectrónica) para la detección directa de los fragmentos del ARN del virus, sin necesidad de llevar a cabo ciclos de amplificación que retrasan el resultado. Esta tecnología ofrece niveles de sensibilidad extremadamente altos, lo que permite

evitar la amplificación, reduciendo tiempo de análisis a pocos minutos, minimizando la influencia de la contaminación (al eludir también la amplificación, aumentando la reproducibilidad), y ofreciendo valores cuantitativos, por tanto, correlacionando el resultado con una mayor o menor cantidad de material genómico, y por tanto, de carga viral. Esta opción no está todavía en el mercado, pero se encuentra actualmente bajo intenso desarrollo.

Alternativas como el uso de *microarrays* fluorescentes pueden resultar también útiles, por su capacidad de detectar multitud de secuencias de manera simultánea, o, alternativamente, para detectar gran número de muestras de manera simultánea. Esta tecnología, bien establecida, requiere sin embargo de instrumentación centralizada en laboratorio y de personal especializado para su interpretación, su sensibilidad puede estar limitada y no ofrecería información cuantitativa, por lo que en comparación con PCR, no es una opción más favorable.

2.- DETECCIÓN DEL VIRUS COMO ENTIDAD INDIVIDUAL

En este caso, la detección no es del material genérico contenido en la cápside sino del **virus entero** a partir de la detección de los llamados **antígenos virales** (es decir las proteínas que lo conforman). Generalmente esta estrategia se basa en la detección de las proteínas estructurales como sería la **proteína S**, en caso de detección completa del virus, o la **proteína N**, para detección de partes o fragmentos del virus, mediante el uso de anticuerpos específicos, que las detectan cuando capturan al virus.

Una forma de detectarlo es usar los llamados **Tests Rápidos de Detección de Antígenos** (RADTs, *rapid antigen detection tests*). Esta aproximación es sencilla, aunque muy dependiente de la disponibilidad de **anticuerpos específicos** de cuya calidad dependerá una mayor **especificidad** y **sensibilidad** del análisis. Hay actualmente varias casas comerciales que distribuyen anticuerpos para distintas proteínas estructurales del SARS-CoV (principalmente la S y la N) que también reconocen el nuevo virus SARS-CoV-2, con los que se están poniendo a punto distintos tests de detección. De igual manera ya hay actualmente en el mercado distintos tests rápidos para la detección de SARS-CoV-2. Los más habituales se basan en ensayos de flujo lateral o tiras reactivas (salvando algunas diferencias, parecidos a los tests de embarazo disponibles en farmacias). Suelen estar fabricados en materiales adsorbentes (como derivados de celulosa) y contienen ya adsorbidos distintos reactivos (como por ejemplo anticuerpos) que cuando entran en contacto con la sustancia diana a detectar, conducen a un cambio generalmente visual y detectable directamente a ojo (cambio de color en la zona de detección).

Los pasos necesarios para realizar el test de detección de virus son:

- A) Colección de la muestra del paciente (también en este caso muestra nasofaríngea por contener mayor cantidad de virus)
- B) Mezcla con solución reactiva (generalmente anticuerpos específicos contra algún antígeno viral)

C) Transferencia directa de unas gotas de la mezcla en la tira reactiva y lectura de la respuesta (visual generalmente) al cabo de pocos minutos en la zona de captura o detección.

Hay varias empresas biotecnológicas centradas en el desarrollo de tests rápidos basados en este principio de detección.

Ventajas de los ensayos de tira reactiva para la detección del virus entero

- Rapidez en la obtención de resultados (entre 5-15 minutos entre la toma de muestra y la lectura de resultados)
- Bajo coste y producción masiva
- Es una técnica bien establecida, que comercializan multitud de compañías para otras aplicaciones. Si se dispone de los reactivos (anticuerpos) la técnica es fácilmente adaptable, por ejemplo, si se ha desarrollado previamente para virus similares.
- Puede ser utilizada directamente en el sitio de toma de muestra, no requiere de instrumentación compleja externa, y no requiere de personal especializado para su análisis ni para la lectura de resultados
- Con **una sensibilidad adecuada**, la técnica puede teóricamente diagnosticar la enfermedad desde el primer día en el que el virus está presente en el organismo.

Limitaciones de los ensayos de tira reactiva para la detección del virus entero

- **Limitada sensibilidad.** Posibilidad **elevada** de falsos negativos (ausencia de detección cuando la carga viral es baja).
- **Problemas de reproducibilidad** (de lote a lote). Problemas de falsos positivos y/o negativos.
- Respuesta esencialmente **cualitativa** (tipo SÍ/NO). No aporta información de la cantidad de virus presente.

Tecnologías alternativas para la detección del virus entero

Es importante destacar que algunos tests rápidos usan versiones avanzadas que contienen reactivos que amplifican la señal (como nanopartículas), sin añadir complejidad al test de detección, lo que en teoría permitiría mejorar la sensibilidad total. Por otro lado, aunque no parece que estén disponibles todavía para SARS-CoV-2, hay empresas que desarrollan tests rápidos que combinan la tira reactiva con una lectura más precisa que la que puede obtenerse a ojo, mediante un scanner de lectura (o dispositivo óptico) y que conduce a una mejor sensibilidad, y puede ofrecer valores cuantitativos.

Las técnicas inmunoquímicas pueden ser también llevadas a cabo en laboratorios centralizados, como por ejemplo los inmunoensayos enzimáticos o luminiscentes convencionales tipo **ELISA**, que en general ofrecen resultados más fiables, reproducibles y sensibles y pueden ser automatizados.

Por otro lado, de manera análoga a la detección de material genómico, los **dispositivos biosensores** también se pueden emplear para la detección del virus, inmovilizando anticuerpos específicos a los antígenos del virus en la superficie del sensor. Adaptando esta tecnología, se pueden solventar problemas relacionados con la **sensibilidad** limitada (y en consecuencia la presencia de falsos negativos), así como proporcionar **valores cuantitativos**, es decir determinar la carga viral en la muestra (especialmente útil para seguir la evolución de la enfermedad), todo ello sin prolongar el tiempo de análisis.

3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS GENERADOS EN EL ORGANISMO HUÉSPED INFECTADO (TEST SEROLÓGICO)

Los tests serológicos se basan en la detección indirecta del virus, a través de la medida específica de los anticuerpos generados por el propio organismo de la persona infectada. Ante el ataque de, o exposición a organismos ajenos (como los agentes infecciosos víricos) el sistema inmune humano responde desencadenando la producción de anticuerpos que conferirán cierta inmunidad ante posteriores reinfecciones (en un mecanismo análogo al que desencadenan las vacunas).

Ésta es una aproximación especialmente atractiva porque no es necesario que la infección esté activa, es decir, que el virus este todavía presente en el organismo infectado, por lo que es útil no solo como método de diagnóstico, sino también en estudios epidemiológicos, pues permite medir los niveles de anticuerpos con el tiempo. Además, se puede diferenciar entre distintos tipos de anticuerpos que se producen en las distintas etapas de la infección: por ejemplo, inmunoglobulinas M (IgM) que se generan al principio, y representan un proceso de infección aguda, y las inmunoglobulinas G (IgG), más abundantes, indicativos de infección primaria o que aparecen como respuesta a la fase aguda de infecciones secundarias. En definitiva, los tests serológicos pueden proporcionar información valiosa respecto a una infección activa o a un contagio previo. Puede ser por tanto una herramienta de diagnóstico masivo, especialmente importante en SARS-CoV-2, donde hay un número muy elevado de pacientes asintomáticos y el periodo de incubación parece indicar que puede alargarse hasta aproximadamente 14 días antes de la aparición de síntomas.

Los anticuerpos generados por el organismo suelen tener como diana, determinantes antigénicos clave en el agente patógeno, por ejemplo, las proteínas estructurales del virus. En estos tests, se pone en contacto el suero del paciente con los antígenos del virus de manera que la presencia de anticuerpos en el suero es detectada. La aproximación más sencilla es llevar a cabo tests análogos a los de detección rápida del virus, en formato tira reactiva, comentados en el apartado anterior.

Los pasos necesarios a llevar a cabo en los tests serológicos son:

A) Colección de muestra de paciente. En este caso, extracción de sangre (y separación del suero, en algunos casos).

B) Transferencia directa al test (que contiene antígenos del virus) y lectura de la respuesta (visual generalmente) al cabo de pocos minutos en la zona de captura o detección.

Ventajas de los tests serológicos en tira reactiva

- Rapidez (entre 5-15 min entre extracción de muestras y resultados).
- Muestra de sangre capilar, lo que implica extracción sencilla mínimamente invasiva. Muestras con baja o nula carga viral y por tanto no infecciosas (no se espera presencia del virus en estas muestras).
- Es una técnica bien establecida y adaptable a diferentes formatos de diagnóstico una vez se dispone de los antígenos más adecuados para preparar los tests.
- Producción masiva y posiblemente de bajo coste (alrededor de 10-20€ por test).
- Puede ser utilizada directamente en el sitio de toma de muestra, no requiere de instrumentación compleja externa, y no requiere de personal especializado para su análisis ni para la lectura de los resultados.

Limitaciones de los tests serológicos en tira reactiva

- Limitada sensibilidad. Posibilidad elevada de falsos negativos.
- Problemas de reproducibilidad (de lote a lote). Problemas de falsos positivos y/o negativos.
- Respuesta esencialmente cualitativa (tipo SÍ/NO).
- El sistema inmunológico requiere un tiempo para activarse y generar los anticuerpos (entre 2-3 días, o incluso más dependiendo del estado de salud de cada persona).
- Variabilidad inherente la respuesta inmune de cada individuo.

Tecnologías alternativas para la detección de anticuerpos serológicos

De manera análoga a la expuesta en la estrategia 2, las limitaciones de los tests rápidos pueden solventarse mediante técnicas ya establecidas como ensayos inmunoquímicos con instrumentación robusta, en laboratorios especializados, aumentando la fiabilidad de los resultados, y mejorando sensibilidad.

También puede llevarse a cabo fácilmente con tecnologías más novedosas como los dispositivos biosensores aportando una mayor **sensibilidad**, **reproducibilidad** y, de manera especialmente interesante en el caso de los tests serológicos, una **respuesta cuantitativa**, lo que permitiría el seguimiento de los niveles de anticuerpos y así la evolución de la enfermedad. Adicionalmente, pueden proporcionar información valiosa

para establecer o estimar el tiempo de inmunidad adquirida en caso de haber sufrido la enfermedad, parámetro actualmente desconocido.

Proyecto CoNVat

El proyecto CoNVat, financiado por la Unión Europea, liderado por el ICN2 y en colaboración con la Universidad de Barcelona (UB), la Universidad Aix-Marsella (AMU) en Francia y el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INMI) en Italia, pondrá a punto una **nueva plataforma biosensora** basada en nanotecnología óptica para proporcionar un diagnóstico de COVID-19 preciso, de forma rápida y sin necesidad de instrumentación compleja y laboratorios clínicos centralizados.

La tecnología sensora desarrollada por el ICN2 consiste en un microchip con guías de onda interferométricas, que actualmente ofrecen la más **alta sensibilidad**, pudiendo fabricarse a gran escala mediante técnicas de microelectrónica convencional. Estos microchips permiten la **detección y cuantificación** de moléculas o virus en un solo paso, sin necesidad de amplificación previa o posterior, por lo que el análisis completo puede realizarse en menos de 30 minutos.

En el proyecto se abordarán dos estrategias principales para el diagnóstico de COVID-19:

(1) Detección directa del virus entero: mediante anticuerpos específicos unidos a la superficie sensora, se capturan entidades enteras del SARS-CoV-2 (por interacción con la proteína S) (Figura 2). La unión del virus al sensor se monitoriza en tiempo real (10-20 min), proporcionando una respuesta directamente proporcional a la cantidad de virus presente en la muestra, que puede ser fluido nasofaríngeo, saliva, o cualquier otro fluido de interés. Este ensayo permitirá no solo dar una **respuesta diagnóstica rápida** a la infección, sino también la **cuantificación** de la carga viral.

(2) Identificación del ARN viral: mediante sondas de ADN complementarias a secuencias específicas del ARN viral, se detecta e identifica la presencia de SARS-CoV-2, por hibridación selectiva con el material genómico del virus. Este ensayo genómico **no** necesita de procesos de amplificación por PCR, gracias a la elevada sensibilidad del biosensor, pudiendo dar resultados en 20-30 minutos. Además, se puede extender el ensayo a la realización de varios tests simultáneos en el mismo chip (multiplexado) para poder distinguir en un mismo análisis qué tipo de virus contiene la muestra (diferencias entre varios tipos de coronavirus, virus de la gripe, etc.).

En paralelo a los objetivos del proyecto CoNVat, desde el ICN2 hemos empezado a estudiar las posibilidades de adaptar nuestra tecnología sensora para el **análisis serológico** (detección de anticuerpos en suero). Para esto, contamos con la colaboración del Hospital Vall d'Hebrón en Barcelona además de la Universidad de Aix-Marsella en Francia.

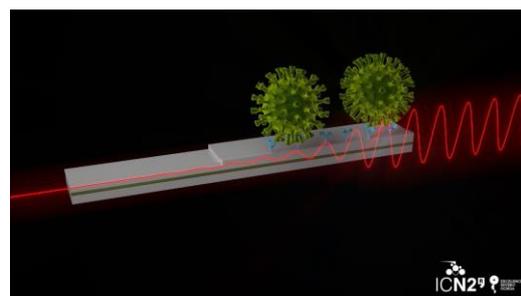


Figura 2. Ilustración del biosensor nanofotónico para la detección de SARS-CoV-2