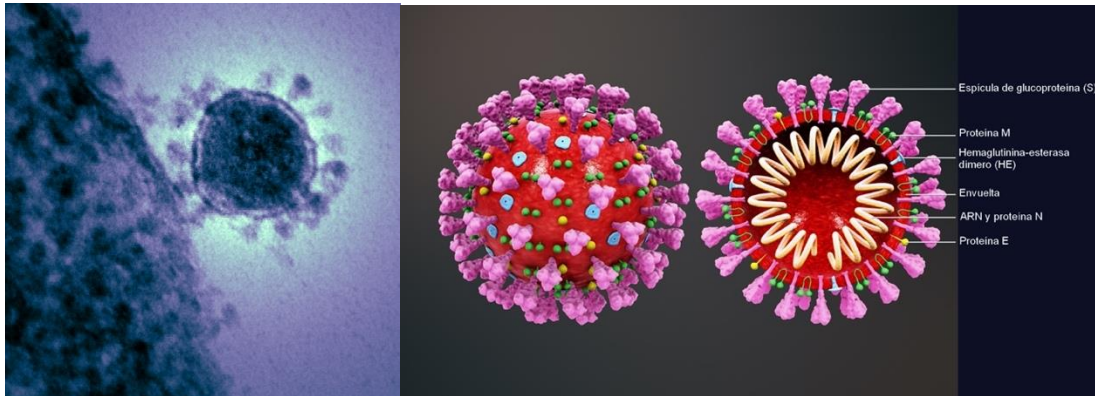


# Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19

*Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas (NanoB2A) Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2), CSIC, CIBER-BBN y BIST Bellaterra, Barcelona (España), editado por el Ministerio de Ciencia e Innovación*

## Qué es un coronavirus

Es un tipo de virus común. Se conocen infinidad de especies variadas, casi todas relacionadas con especies animales: de hecho, se puede decir que cada uno afecta a una especie de animal específica. De la misma familia (Beta-coronavirus) que el que nos afecta ahora se conocen unos trescientos diferentes, cuatro de los cuales causan enfermedades leves en los humanos, muy parecidas, y que todos consideramos el “resfriado común”.



*Ilustración 1: Fotografía y estructura de un coronavirus (wikimedia Commons)*

El virus que ahora nos afecta es muy parecido a los que causaron las epidemias (más limitadas, afortunadamente) que llamamos SARS en 2003 y MERS en 2012. Los tres descienden de virus de murciélago, que evolucionaron hasta adquirir la capacidad de causar enfermedad a los humanos. De hecho, es tan parecido al SARS que se considera un “pariente” y se le ha dado el nombre “SARS-CoV-2”.

Vistos al microscopio, aparecen como círculos con un halo irregular, lo que llevó a darles ese nombre, por su forma de corona. La estructura de un virus es simple, como muestra la Ilustración 1.

El virus consiste de tres partes, sin entrar en términos técnicos:

1. Núcleo, donde están los genes en forma de una cadena simple.
2. Envoltura, formada por ácidos grasos como en nuestras células
3. Espigas, que proporcionan la capacidad de adherirse y “abrir” las células del cuerpo que invaden.

La infección por parte del virus funciona, a grandes rasgos, de esta manera:

1. El virus entra en el organismo. Parece que este solo puede acceder por las mucosas, aunque se está investigando. Por tanto, entra en el cuerpo por los ojos, el interior de la nariz, o por la boca, quizá por los oídos también.

2. Cuando las espigas del virus tocan una célula humana apropiada (en este caso, células de la piel interna de las mucosas), se adhieren a un componente muy específico de la membrana de las células y abren así un hueco en el envoltorio (membrana) de la célula víctima. Tengamos en cuenta que un virus es cientos de veces más pequeño que una célula humana.
3. Por ese hueco, el virus introduce su cadena de genes dentro de la célula.
4. Estos genes, en el interior de la célula, producen efectos igual que si fueran genes propios. En concreto, producen copias de sí mismos a gran velocidad y crean virus completos con su envoltorio.
5. Cuando hay un gran número (miles) de nuevos virus dentro de la célula, el virus hace disolverse su envoltorio y los virus nuevos se mueven hasta encontrar cada uno una célula nueva que infectar.
6. El sistema inmunitario de la persona comienza a reaccionar de varias maneras. Algo importante que ocurre en el cuerpo es la generación de sustancias que son nocivas para el virus – los “anticuerpos”. En concreto, unas muy importantes son las que “tapan” las espigas del virus para evitar que siga atacando. Esta reacción del cuerpo causa en general fiebre e inflamación.
7. La velocidad de reacción del cuerpo, la intensidad de la inflamación de la parte interna de nariz, garganta y pulmones al reaccionar, y otras características de cada persona determinan la gravedad de la enfermedad y su duración.

## **Cómo se puede detectar una infección**

Teniendo en cuenta la estructura simple del virus, podemos distinguir tres diferentes formas de saber si una persona está infectada, detectando:

1. La cubierta del virus, incluidas las espigas
2. La presencia de los genes del virus
3. Los anticuerpos producidos al luchar el cuerpo contra el virus.

Para poder hacer estas mediciones, se necesita distinguir entre sustancias en sí muy parecidas. Por ejemplo, la cubierta del virus es como la de otros virus y en parte como la de las células del cuerpo humano. Hay que poner a punto métodos que puedan ser muy específicos.

En general, estos métodos de análisis exigen varios pasos con diferentes productos químicos muy especiales (los “reactivos”) y cambios de temperatura que han de ser bastante exactos, de manera que se pueda forzar una reacción química que deja al descubierto precisamente lo que queremos medir. En muchos casos hay que usar productos químicos fluorescentes que solo reaccionan de una forma muy específica, y después pasar el resultado por una lámpara especial y un detector de esa luz. En ciertos casos se puede conseguir encontrar un “reactivo” tan específico que solo cambia de color exactamente con la sustancia que buscamos. Es el caso, por ejemplo, de los tests de embarazo modernos. Sin embargo, para encontrar estos productos tan sofisticados y que funcionen de forma fiable es necesario mucha experimentación y, en consecuencia, tiempo.

Últimamente se están introduciendo técnicas sofisticadas en las cuáles las sustancias químicas van embebidas en una pieza electrónica que se puede introducir en un circuito, el cual se puede leer directamente en un ordenador con números muy precisos. Estas técnicas también necesitan de una fuerte inversión en investigación para perfeccionar la detección y que reaccionen exactamente a la sustancia requerida con mucha sensibilidad.

## Detección de los genes del virus

Esta es la detección más compleja, pero paradójicamente es la que se desarrolla más rápido gracias a las ingentes inversiones en investigación de genómica que se hicieron para obtener el genoma humano en los años anteriores. Si se hace correctamente es infalible, ya que el virus, como todo ser vivo, está completamente definido por sus genes. Si están los genes de este virus en concreto, está el virus y habrá infección.

Uno de sus pasos es la “Reacción en Cadena de la Polimerasa”, técnica de diagnóstico que se abrevia por sus siglas en inglés (PCR). Esta es una técnica por la que se induce a los genes a replicarse tal como hacen en la naturaleza, pero de forma muy acelerada. Requiere de tiempo, de temperatura precisa y controlada y de “alimento” para los genes, los reactivos adecuados. Además, solo existen métodos operativos y comerciales de replicar genes parecidos a los humanos (ADN), por lo que se necesita “convertir” los genes de virus (ARN) en ADN antes de poder utilizarla.

Los pasos son:

1. Obtención de muestra. Como el virus afecta a las mucosas internas de nariz, boca y pulmones, y ahí estará en gran cantidad si hay infección, ha de ser de esas partes del cuerpo. Lo común es usar un bastoncillo de palo largo con un algodón al extremo y tomar líquido (y alguna célula viva) de dentro de la nariz. El bastoncillo luego se introduce en un tubo con un líquido especial de conservación y se sella si hay que transportar la muestra.
2. Extracción de los genes del interior de los virus. Esto requiere de unos productos químicos específicos que rompan la envuelta del virus sin afectar al gen interior.
3. Replicación de esos genes para obtener una alta cantidad de ellos. Solo se replican ciertas partes “únicas” de los genes, para lo cual se usan reactivos especiales (“sondas de reconocimiento”) desarrollados especialmente para el virus concreto. Estas “sondas” son fluorescentes. El proceso de replicación requiere de temperaturas precisas a intervalos también precisos, y dura entre 2 y 5 horas dependiendo de los reactivos utilizados.
4. Detección por medio de la intensidad de la fluorescencia (medida mediante luz apropiada y fotografía digital) de las cantidades que han resultado de cada una de las sondas. Si existe el virus, se producirá una fluorescencia grande en todas las sondas, por encima de un valor umbral.

La técnica PCR tiene una serie de ventajas:

- Está establecida y comercializada por multitud de compañías.
- Se adapta a nuevos virus de forma muy rápida, en días, dado el nivel tecnológico existente y la gran cantidad de diferentes reactivos ya existentes.
- Las sustancias requeridas se pueden producir en grandes cantidades.
- Se puede hacer y se hace muy específica – puede detectar por separado diferentes virus muy precisamente.
- Detecta incluso cantidades muy pequeñas de virus.

Como dificultades o inconvenientes se pueden citar:

- Al ser tan sensible es muy vulnerable a la contaminación, incluso la más pequeña. Por eso es necesario ser muy estricto en todo el proceso y necesita personal altamente especializado.
- Requiere instrumentos complejos, precisos y caros, por lo que deben centralizarse las muestras en laboratorios con personal especializado, también para saber manejarlos de forma fiable. Un termociclador de altas prestaciones puede costar hasta 90.000€.

- Tarda mucho en obtener resultados (horas), a lo que se añade el tiempo de transportar las muestras al laboratorio y devolver los resultados.
- Tiene un coste relativamente elevado (aunque el test solo cueste unos 10-15 € por muestra, hay que contar los gastos de personal, mantenimiento y coste de los equipos, transporte y manejo de las muestras, etc).

Existen varias técnicas alternativas que permiten detectar los genes del virus de otras formas. Sin embargo, ninguna de ellas está suficientemente desarrollada como para desplegarla ahora mismo en hospitales y poder usarla para tomar decisiones. Además, muchas de estas nuevas técnicas solo pueden utilizarse con instrumentos que no se fabrican en serie de momento. Por lo tanto, para detectar de forma fiable y operativa los genes del virus en estos momentos solo existe la técnica PCR.

### **Detección del virus entero por su cubierta (“de antígenos”)**

Como vimos en la Ilustración 1, la cubierta del virus contiene unas pocas moléculas (los “antígenos”, de la familia de las proteínas) que son bastante específicas y en principio se pueden detectar. Sin embargo, no son tan específicas como los genes: varios virus pueden compartir, por ejemplo, las espigas, ya que estas sirven para “atacar” las células del cuerpo humano y podrían todos usar el mismo método.

Es una labor ardua de investigación encontrar reactivos (que en realidad son análogos a los “anticuerpos” que generaría el enfermo) que actúen frente a las proteínas específicas de un virus y no frente a otras presentes en la saliva, en las células humanas, en otras bacterias normales o en otros virus que no nos interesan en este momento. En este caso, al ser el coronavirus actual tan parecido al virus que llamamos el SARS, hay algunos reactivos ya desarrollados para esa ocasión que se consideran fiables y pueden ser utilizados en el momento actual. Ya se están desarrollando y comercializando en las últimas semanas reactivos para este nuevo virus, aunque habrá que comprobar su fiabilidad.

Estos métodos se basan en el cambio de color de los reactivos al encontrar virus, por la reacción que se produce con sus proteínas de la cubierta. Por tanto, es necesario que haya una cantidad importante de virus en la muestra para ser efectivos. Al no haber una fase de amplificación de varias horas, estos tests son “rápidos”, y producen resultados en minutos.

El proceso es muy sencillo:

1. Obtención de muestra – igual que en los PCR.
2. Mezcla con reactivos de anticuerpos (normalmente es un líquido en un pequeño bote).
3. Se ponen unas gotas de la mezcla en la tira reactiva (similar a los test de embarazo) impregnada con un segundo juego de reactivos. Al cabo de unos minutos, esta tira de papel presentará unas zonas coloreadas dependiendo del resultado.

Este tipo de tests presenta innegables ventajas a priori:

- Muy rápido, unos minutos (5-15)
- Bajo coste y producción masiva
- Técnica establecida para otros tipos de uso o para otros virus
- Portátil, se obtiene el resultado en el lugar de la muestra y no requiere de personal especializado (aunque sí cuidado en el manejo de la muestra)

- En principio, detecta la enfermedad desde el primer día siempre que haya cantidad suficiente de virus.

Sin embargo, se encuentra con importantes dificultades:

- Necesita cantidad suficiente de virus en la muestra. Por tanto, tiene el potencial de dar negativo aun cuando exista la enfermedad (“falso negativo”)
- Los reactivos deben ser muy específicos y se debe controlar su calidad, ya que están empezando a producirse. Es necesario por tanto tener unos controles de calidad exhaustivos para asegurar la misma calidad (fiabilidad) de lote a lote de fabricación

En este momento existen varias ofertas de este tipo de tests, pero las comprobaciones que se están haciendo en condiciones reales y con pacientes reales dan un nivel de acierto bajo. Unas pruebas recientes mostraron un 40% o más de negativos falsos – es decir, 40% de las personas que se sometían al test y daban negativo, daban positivo en tests más fiables como el de PCR. Es seguro que la fiabilidad irá mejorando según se vaya avanzando en la investigación y en la puesta a punto de cadenas de producción de los reactivos más estables. Aun así, el número de falsos positivos teórico puede llegar a ser muy pequeño, por lo que se pueden usar para hacer una primera discriminación de las personas – si da positivo está infectado, si da negativo hacemos un PCR para estar seguros.

## **Detección de los Anticuerpos (test “serológicos”)**

Una vez la infección está en marcha, se generan suficientes cantidades de anticuerpos como para poder detectarlos. De hecho, por regla general se conservan los anticuerpos por un tiempo (o para toda la vida) después de superar la infección – eso confiere inmunidad y es precisamente ese efecto el que pretende alcanzar la vacuna sin pasar la enfermedad.

Existen varios tipos de anticuerpos que se producen en las diferentes fases de la enfermedad, por lo que también pueden indicar si la infección está comenzando o si ya pasó la fase más aguda.

Por otro lado, muy al comienzo, justo después de la infección, hay una fase en la que el cuerpo aún no ha reaccionado totalmente, y las defensas aún no han empezado a generarse, con lo que sería un breve período donde la enfermedad no podría detectarse de esta forma. Los anticuerpos están en la sangre, concretamente en el suero, y por eso se llaman tests “serológicos”.

Para detectar los anticuerpos se utilizan reactivos que contienen partes semejantes a los antígenos, es decir, contrario a los otros test anteriores.

La realización de estas pruebas es muy sencilla:

1. Obtención de muestra: una pequeña muestra de sangre, que se usa o bien directamente o tras la separación del suero.
2. La gota de sangre va directamente a los reactivos, embebidos en una tira de papel o en otro formato. Al cabo de unos minutos se obtiene el resultado por cambios de color.

Tiene una serie de grandes ventajas:

- Muy rápido, entre 5 y 15 minutos.

- Muestra de sangre muy pequeña, fácil de obtener (punción de un dedo por ejemplo). No es peligrosa, pues en general la sangre no contiene virus.
- Bajo coste y producción masiva
- Técnica establecida para otros tipos de uso o para otros virus
- Portátil, se obtiene el resultado en el lugar de la muestra y no requiere de personal especializado.

Las desventajas son:

- Necesita cantidad suficiente de anticuerpos en la muestra. Por tanto, tiene el potencial de dar negativo aun cuando exista la enfermedad (“falso negativo”)
- No detecta la enfermedad si acaba de iniciarse, ya que los anticuerpos tardan varios días en generarse según la persona y su estado de salud.