

El artículo que mostramos a continuación es uno de los más didácticos que han aparecido acerca de lo que desde el conocimiento científico sabemos del coronavirus que está provocando la epidemia mundial covid-19. Pensamos puede interesar a las y los docentes, así como a estudiantes de secundaria y de educación. (Ana Jesús Hernández, Asesora Ciencias del Centro Cultural Poveda)

Acerca de los test de diagnóstico para el coronavirus

Alumni - Universidad de Salamanca > Blog > Acerca de los test de diagnóstico para el coronavirus
20 octubre, 2020

Fco. Javier Burquillo Muñoz

Químico. Antigo alumno de la Universidad de Salamanca 20 octubre, 2020



Estos días todas nuestras conversaciones giran en torno a la epidemia de COVID-19, provocada por un coronavirus que se ha denominado SARS-CoV-2, debido a que su genoma es semejante (un 80%) al coronavirus SARS, que en 2003 originó también una epidemia parecida en China. Al ser un virus nuevo, todo son preguntas: ¿cómo es el virus?, ¿cómo entra en las células?, ¿cuáles son sus proteínas antigénicas?, ¿qué dinámica sigue la infección en un paciente a medida que va transcurriendo el tiempo?, ¿cuándo aparecen los anticuerpos?, ¿qué son los test de antígeno y anticuerpo? Trataremos de dar

una respuesta sencilla a estas preguntas en base a lo que se ha ido publicando sobre estas cuestiones.

¿Cuál es la estructura del virus SARS-CoV-2?

Este virus se ha clasificado dentro de la familia de los coronavirus, a la que pertenecen también virus tan conocidos como el de la gripe o del catarro común. Es de forma esférica, pequeñísimo, con un diámetro en torno a 0.1 micra (algo así como la milésima parte de la anchura de un pelo). En su interior se encuentra la parte más importante del virus, que es una cadena de ácido ribonucleico (ARN) compuesta por unos 30.000 nucleótidos, donde residen todos los genes que usa el virus para expresarse en la célula huésped, y generar así todo lo necesario para multiplicarse en miles de nuevos virus que alcanzarán otras células. El exterior del virus está formado por una bicapa lipídica en la que se insertan algunas proteínas esenciales para unirse a las células y penetrar en su interior. Un esquema del SARS-CoV-2 sería el de la Fig. 1.

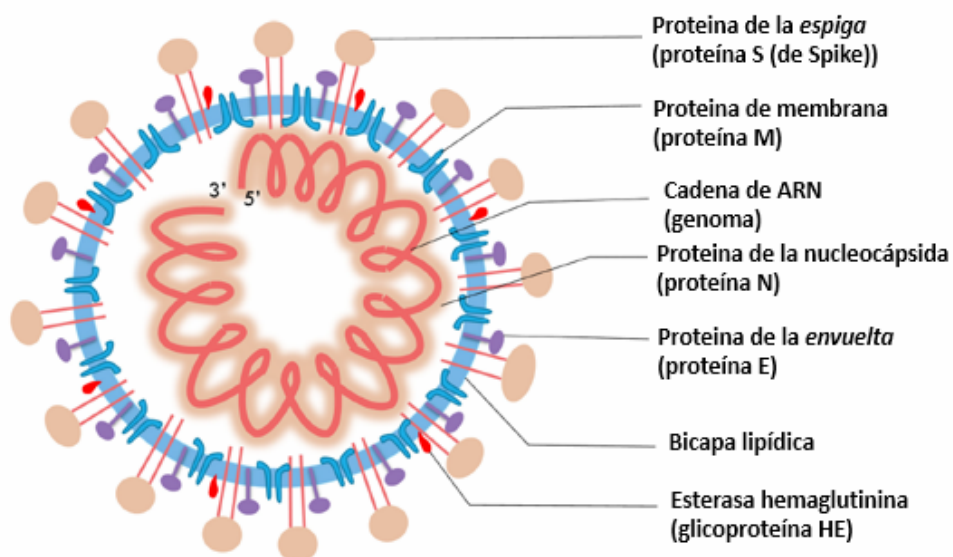


Fig. 1. Esquema del virus SARS-CoV-2 (Adaptado de R. Jalandra et al. (Biomedicine & Pharmacotherapy 129 (2020))

¿Qué son los antígenos y los anticuerpos?

Las proteínas externas del virus que acabamos de ver, tienen carácter antigénico y van a dar lugar a que, con el tiempo, los linfocitos B del organismo creen anticuerpos que se unan a esas proteínas y neutralicen los virus.

En la figura 2 se representa un esquema de un anticuerpo típico, como es la inmunoglobulina G (IgG). Se muestran sus dos **cadena pesadas** en azul, unidas por puentes disulfuro a las dos **cadena ligeras** en marrón; ambas tienen una porción constante (tono oscuro) y una variable (tono claro). Las regiones variables están *diseñadas* por los linfocitos B para unirse específicamente a cada antígeno en concreto. Los polipéptidos de las dos regiones variables de cada *brazo* de la IgG forman un sitio llamado **paratopo**, el cual se une al sitio complementario del antígeno denominado **epitopo** (algo así como la unión de una llave a su cerradura). En el caso de nuestro virus SARS-CoV-2, los antígenos más importantes son la proteína de la espiga (S) y la de la nucleocápsida (N). Estos antígenos son los que se utilizarán como *sondas* en los test de diagnóstico de la COVID-19. Además de la IgG, otro anticuerpo importante es la inmunoglobulina M (IgM), que en este caso es un pentámero cuyo diagrama sería el de abajo.

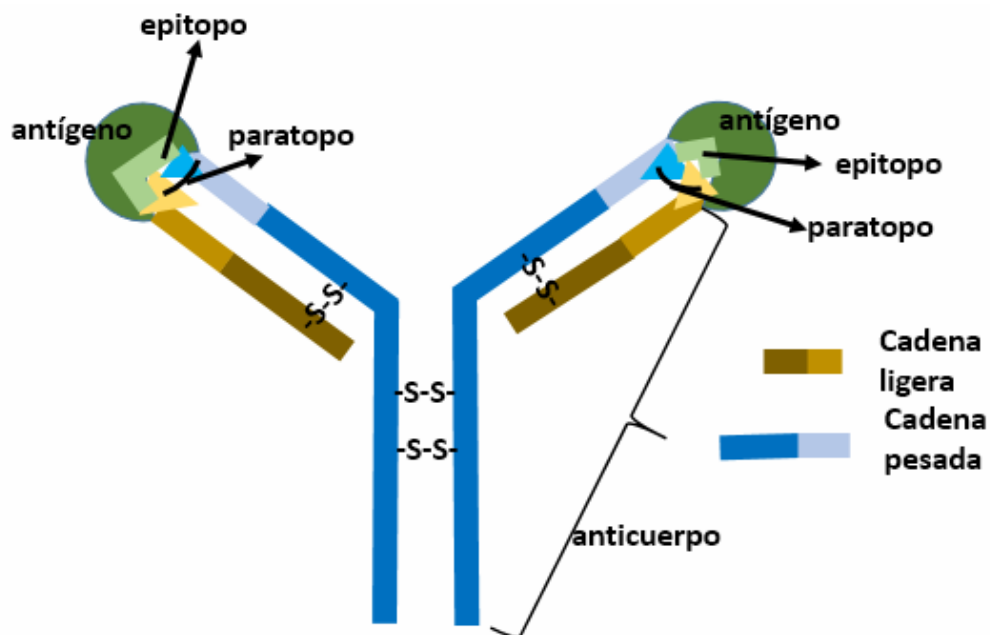
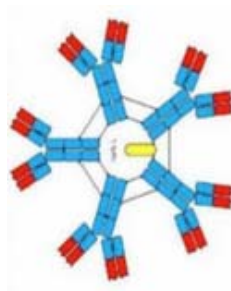
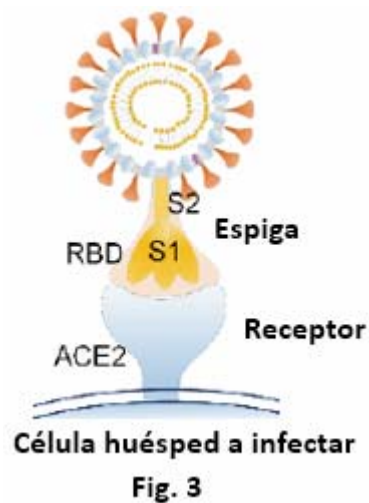


Fig. 2. Esquema de una inmunoglobulina G

¿Cómo entra el virus en la célula a infectar?

El responsable es un fragmento de la proteína en **espiga**, que se conoce con el nombre de **dominio de unión al receptor** (RBD en inglés), que es un polipéptido encargado de unirse a un receptor que se encuentra en la superficie de la célula a infectar, llamado receptor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA2 en inglés). S1 y S2 son unas subunidades de la proteína espiga cercanas a la membrana del virus. Una vez adherido el virus, éste se fusiona con la membrana celular y penetra en el citoplasma de la célula huésped (Fig. 3). El virus no se puede reproducir por sí mismo, por lo que ha de utilizar la maquinaria biológica de la célula que parasita. Este virus ataca principalmente los alveolos pulmonares, produciendo una infección severa en los pulmones del tipo de las neumonías.



¿Cómo evoluciona un paciente infectado?

Como se ha representado en la gráfica de la Fig. 4, al inicio de la infección hay un periodo de incubación en torno a 5 días. A continuación, aparecen ya los síntomas de la enfermedad y se entra en la fase de viremia propiamente dicha (5-20 días), en la que el virus se replica masivamente y los síntomas se acentúan. Si la carga vírica ha sido moderada y el organismo ha neutralizado la infección, el paciente alcanza la recuperación alrededor del día 20; en caso contrario, entra en una fase grave que requiere hospitalización. Si esta clínica severa es controlada, comienza la mejoría y se procede al alta del paciente en torno a los 30 días, o en el peor de los casos la persona fallece. El día de aparición de los síntomas y el periodo de viremia marcan los puntos clave en los que el virus está más activo y es diagnosticable por los conocidos test PCR que luego veremos.

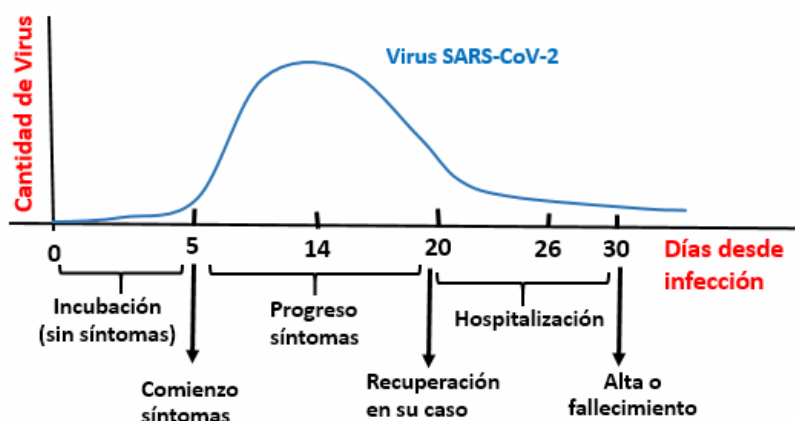


Fig. 4. Esquema de la evolución la Covid-19 con el tiempo. Las horquillas son aproximadas, pues dependen de la severidad de la infección y de la respuesta individual de cada paciente

¿Cómo van apareciendo los anticuerpos?

Los linfocitos B de un paciente infectado van a generar anticuerpos, principalmente de tipo IgM e IgG, que van entrando en escena a medida que va transcurriendo la enfermedad. Como se muestra en la Fig.5, se ha observado que primero aparecen las inmunoglobulinas IgM, en torno a los 10 días, para finalmente ir desapareciendo alrededor de los 20 días, mientras que las IgG tardan un poco más en aparecer, pero se mantienen más en el tiempo y

confieren a la persona una inmunidad más prolongada, si bien no se sabe con certeza cuánto duran estos anticuerpos; algunos estudios apuntan a que se han detectado anticuerpos IgG pasados 3-4 meses de la infección, aunque podría quedar una inmunidad remanente en los linfocitos T de memoria.

¿Qué tipos de test de diagnóstico existen para la COVID-19?

Hay dos grandes tipos, directos e indirectos. Los **directos** van encaminados a detectar la existencia o no del virus en una persona en un momento determinado y saber si está infectada o no; hay dos métodos: las **pruebas de PCR**, que consisten en ampliar y medir ciertas regiones del genoma del virus, y los **test de antígeno**, que miden la presencia o no de proteínas antigénicas del virus mediante la unión a sus anticuerpos cultivados aparte. Los **indirectos** son los **test de anticuerpos**, de modo que si se detectan anticuerpos (IgM, IgG) contra el virus, significa que la persona ya fue contagiada y ha desarrollado cierto grado de inmunidad. El problema de todos los test de diagnóstico es que no son infalibles (no aciertan al 100 %), sino que pueden dar lugar a errores.

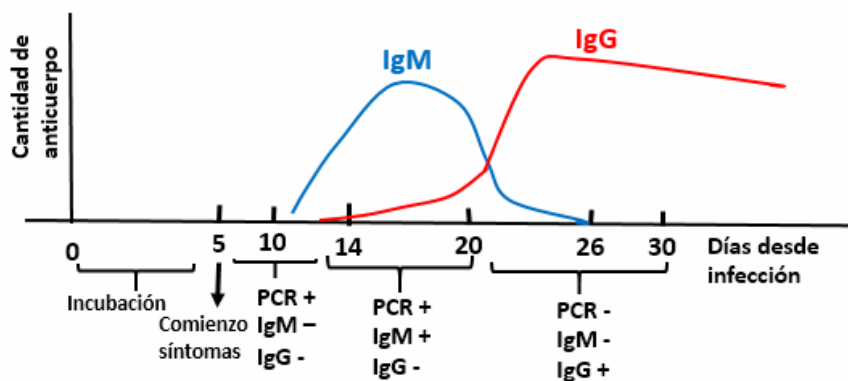


Fig. 5. Esquema de la aparición de las inmunoglobulinas IgM e IgG con el tiempo en Covid-19 (las horquillas son aproximadas). En el eje de abscisas se muestran también los márgenes de tiempo en que el test PCR y los test de IgM e IgG resultarían positivos o negativos.

En este sentido, se define el parámetro **sensibilidad de un test** al **porcentaje de verdaderos positivos diagnosticados del total de infectados** (por ejemplo, un 80-90 %, lo que supondría que un 20-10 % de infectados no se habrían detectados por error y serían considerados como sanos, no siendo sometidos a tratamiento y pudiendo contagiar). Se llama **especificidad del test** al tanto por ciento de **verdaderos negativos diagnosticados del total**

de sanos (digamos un 90 %, lo que dejaría un 10 % de sanos clasificados como enfermos). Estos porcentajes se calculan en base a un calibrado del test en cuestión, usando un número de verdaderos infectados y sanos confirmados por otros métodos. Veamos a continuación cómo funciona alguno de estos test, ya que se han desarrollado cientos de ellos con diferentes variantes en cuanto al procedimiento experimental.

¿En qué consiste el test PCR?

Es una prueba directa dirigida específicamente a medir la presencia del virus en un momento determinado. Consiste en amplificar y cuantificar regiones concretas del genoma del virus. Su fundamento se basa en que se conoce la secuencia de bases en su ARN (que se determinó e hizo pública el 12 de enero, a las pocas semanas de ser declarada la epidemia) y que esquemáticamente se muestra en la Fig. 6-(A). En dicha secuencia se localizaron los genes de la espiga (S) y de la nucleocápsida (S), que son los que se empezaron a usar como dianas en el test PCR.

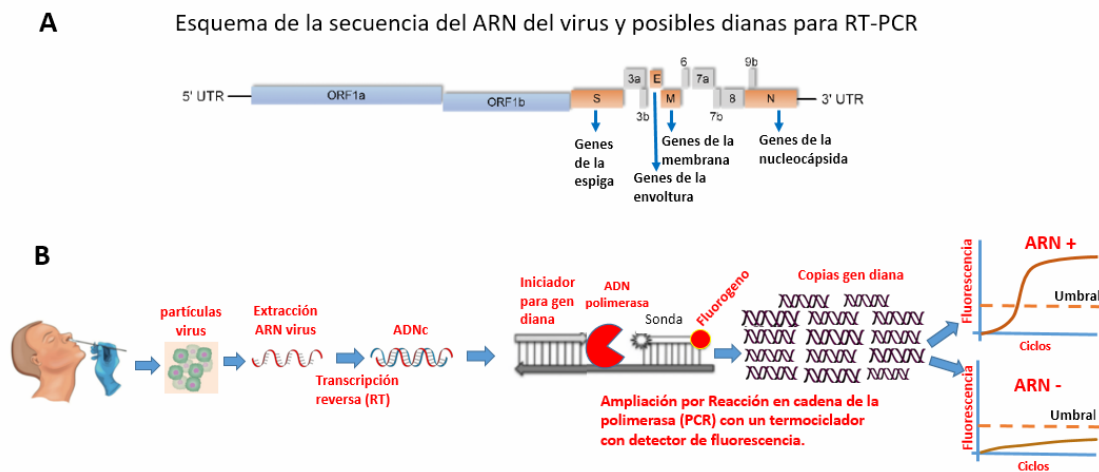


Fig. 6. Fundamento de un test RT-PCR. (A) Esquema de la secuencia genómica del ARN de SARS-CoV-2 mostrando los diferentes genes dianas que se utilizan en los test PCR. (B) Diferentes etapas del test.

En la Fig.6-(B) se representa un diagrama con las distintas etapas del procedimiento analítico de este test. Normalmente, se toma una muestra con un bastoncillo (hisopo) introduciéndolo por el orificio nasal hasta alcanzar la faringe, donde la cantidad del virus es elevada. A continuación, se extrae de la muestra el ARN del virus y se convierte en su cadena complementaria de ADN

(ADNc), mediante una enzima llamada **retro-transcriptasa** (RT), de ahí que a esta técnica se la llame propiamente RT-PCR. Seguidamente, una región de este ADN se ceba con un iniciador y se amplifica mediante la enzima de **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR en inglés), con el fin de medir el número de copias que hay del virus a partir de la fluorescencia de un fluorógeno que está fijado a una sonda que se une también a la cadena. Si la reacción es positiva, se concluye que existe ARN del virus y que la persona está infectada. Este método posee una **buena sensibilidad y especificidad**, incluso permite detectar un positivo 1 ó 2 días antes de aparecer los síntomas. El test se suele repetir a lo largo de la enfermedad, dando resultados positivos hasta que la enfermedad remite (20-26 días). Conviene hacer hincapié en que a veces el test PCR puede dar positivo y el virus ya no estar activo, ni con capacidad para contagiar, debido a que la PCR puede haber detectado restos moleculares del virus (basura génica). El inconveniente es que un test PCR requiere un laboratorio especializado y se tarda varias horas en conocer el resultado, aparte de su coste elevado (100 euros); es por eso que se han desarrollado test más rápidos y económicos que veremos a continuación.

¿Cómo funcionan los test rápidos de antígenos?

Son un tipo de test que detectan la presencia del virus en una persona midiendo ciertas proteínas del virus (antígenos), como son las proteínas *de la espiga (S)* o *de la nucleocápsida(N)*. La muestra es también naseo-faríngea, al igual que en el test PCR, pero ahora el test es más rápido (unos 15 minutos), no se necesita equipo especial de laboratorio y son baratos (5 euros), pudiéndose llevar a cabo en los centros de salud. La contrapartida es que cuando aparecieron, al principio de la pandemia, tenían una sensibilidad bastante menor que el test PCR, pero en los últimos meses se han desarrollado unos test de antígeno de segunda generación con mayor sensibilidad, con resultados bastante fiables (90%) si se usan en la primera semana desde la aparición de los síntomas. Se han puesto de moda por su sencillez, y muchas administraciones y hospitales españoles los están comprando masivamente. Se basan en el siguiente procedimiento: sobre una tira de papel se fijan anticuerpos cultivados del virus que sean específicos de

un antígeno determinado, actuando estos anticuerpos como sondas que se unen a los antígenos para formar un complejo anticuerpo-antígeno.

Hay distintas variantes analíticas para detectar este complejo. Normalmente se usa la técnica de flujo lateral a modo de una cromatografía, que consiste en una tira de nitrocelulosa (en el interior de una carcasa de plástico) en la que las moléculas migran por capilaridad. En la Fig. 7 se representa de forma esquemática lo que ocurre en las regiones de la tira a medida que líquido fluye y va arrastrando la muestra. El punto clave es que se han tenido que obtener previamente anticuerpos IgG específicos para un antígeno determinado, que normalmente se han conjugado con nanopartículas de oro que actuarán como indicador. Estos anticuerpos marcados con oro se unirán a los antígenos al fluir a su altura, formando los complejos anticuerpo-antígeno. Finalmente, un anticuerpo secundario fijado en la línea de test (T) adsorberá dichos complejos a modo de sándwich, apareciendo un color rojo en la línea debido a los átomos de oro, en el caso de que existan virus en la muestra. Además, al final de la tira aparece una línea de control coloreada sin antígenos (C), que sirve para verificar que el funcionamiento del test ha sido correcto.

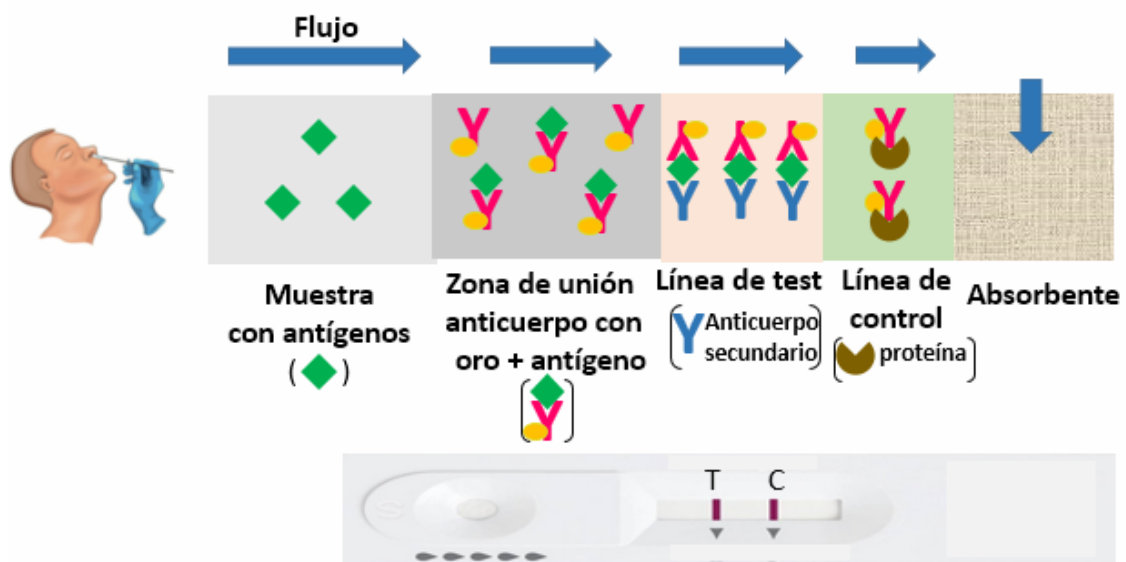


Fig. 7. Esquema de un test de antígenos

¿En qué consisten los test rápidos de anticuerpos?

Sirven para detectar de forma cualitativa, si es que existen, anticuerpos IgM e IgG en una persona. Si ésta ha sido infectada, y han transcurrido unos días desde la aparición de los síntomas, aparecerán primero las IgM y a continuación las IgG, que serán las más duraderas y conferirán al paciente recuperado una cierta inmunidad; en este caso el test será positivo. Si por el contrario se trata de una persona que no ha sido infectada, el test será negativo ya que no se habrán desarrollado los anticuerpos contra el virus. El test no determina, por tanto, si en un momento determinado existe o no virus activo en un organismo, como sí hacen los test PCR y de antígenos, sino la existencia o no de anticuerpos (inmunidad) en una persona. Su funcionamiento es semejante a los ya descritos de antígeno, pero a la inversa. La muestra ahora es una gota de sangre de un dedo, en lugar del frotis naseo-faríngeo, siendo más sencilla de obtener, el test proporciona el resultado a los 15 minutos y tiene un coste muy bajo (5 euros). Lo habitual es que se midan a la vez la IgM y la IgG en dos líneas diferentes de test (líneas M y G), usando también la técnica de cromatografía de flujo lateral sobre una tira de nitrocelulosa. Asimismo, habrá una línea de control como comprobación del procedimiento. El esquema de la Fig. 8 ilustra claramente el procedimiento y la interpretación de los resultados.

En lugar de en tiras de celulosa, estos test de anticuerpos también se pueden realizar de forma automática, analizando varias muestras a la vez (100-200 por hora), mediante el uso de ciertos aparatos y técnicas de laboratorio. Este es el caso de la máquina "ARCHITECT" de la empresa Abbot, que utiliza un "inmunoensayo por quimioluminiscencia con micropartículas" (CMIA en inglés), que puede determinar aisladamente IgM e IgG. El procedimiento aparece esquematizado a la izquierda. La muestra aquí es el suero de la persona, en lugar de una gota de sangre, por lo que hay que hacer una extracción venosa. El soporte son micropartículas paramagnéticas impregnadas de un antígeno del virus sintetizado previamente, el anticuerpo primario a detectar se unirá a dicho antígeno; a continuación, un anticuerpo secundario antihumano, marcado con acridina quimioluminiscente se unirá al anticuerpo primario (formándose un

sándwich en su conjunto). Finalmente, la acridina se activa con un reactivo y se mide la luz emitida.

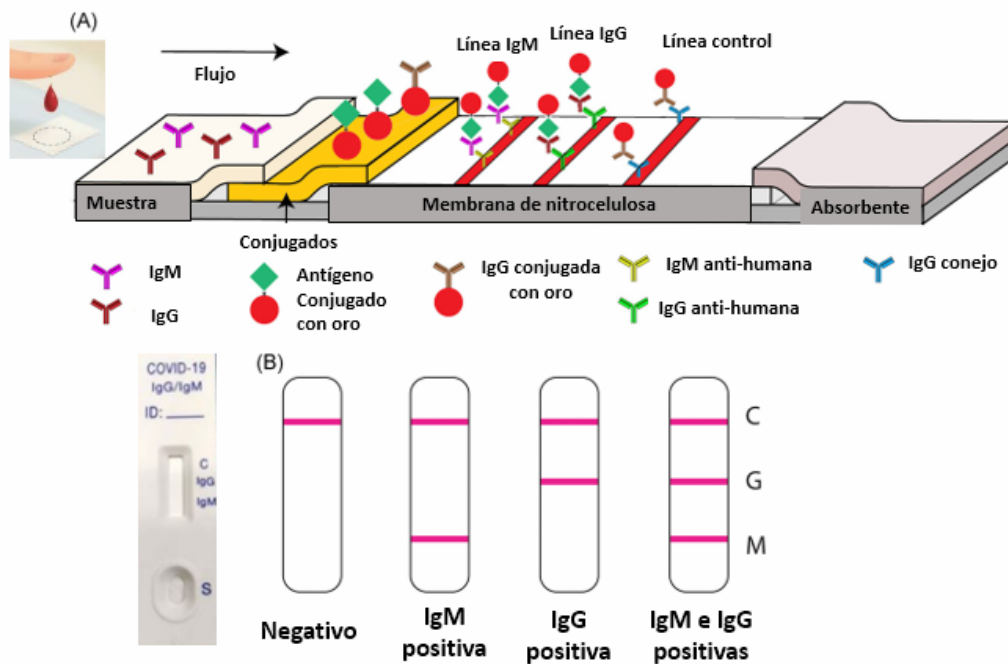


Fig. 8. Adaptada de: Li et al. *Journal of Medical Virology* 2020, Volume: 92, Issue: 9, Pages: 1518-1524. Open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Esta técnica es la que está utilizando el proyecto DIANCUSAL de la Universidad de Salamanca, cuyo objetivo es analizar los anticuerpos IgM e IgG en todos sus alumnos, profesores y personal de servicios. A partir de los resultados que se obtengan, se sabrá el porcentaje de positivos que hay entre sus miembros, los cuales presentarían ya una inmunidad adquirida. En resumen, aparte de su uso individual, los test de anticuerpos sirven principalmente para hacer cribados masivos que determinen el grado de inmunidad de colectivos y poblaciones (seroprevalencia), buscando de alguna manera si ya se ha alcanzado la llamada inmunidad de grupo (rebaño), que suele estar en torno al 60 % del colectivo. A partir de este punto la probabilidad de contagios es mínima. Para terminar, cabe citar que en España se ha realizado un estudio nacional de seroprevalencia, denominado ENE-COVID, que por el momento ha detectado un 5 % de inmunidad en la población española en la fecha del estudio, que estaría todavía lejos de la inmunidad de grupo. Esta inmunidad tan alta se alcanzará cuando esté disponible la vacuna,

mientras tanto debemos seguir guardando las medidas de prevención recomendadas.

