

## TODO LO QUE QUERÍA SABER SOBRE EL DIAGNÓSTICO DE COVID-19 Y NUNCA SE ANIMÓ A PREGUNTAR

POR **CAROLINA CARRILLO**

### EL CASO NEOKIT COVID-19

En el marco de la pandemia mundial COVID-19, Argentina anunció la emergencia sanitaria a través de su Boletín Oficial del 17 de Marzo de 2020.<sup>1</sup>

El CONICET en conjunto con el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, y la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i), crearon la “Unidad Coronavirus COVID-19” destinada a brindar respuesta a las demandas y necesidades inmediatas del Poder Ejecutivo Nacional y el Ministerio de Salud de la Nación. Uno de los ejes de la Unidad se centró en el desarrollo de nuevos kits de diagnóstico.<sup>2</sup>

### LA IMPORTANCIA DE LOS NUEVOS KITS DE DIAGNÓSTICO

¿Por qué desarrollar nuevos kits de diagnósticos nacionales? La respuesta es multidimensional, incluyendo aspectos políticos, económicos, ideológicos, sanitarios y técnicos.

Centrándonos en cuestiones técnicas, la mayoría de los métodos de detección del SARS-CoV-2 disponibles al inicio de la pandemia, pueden clasificarse en dos grandes grupos: los métodos serológicos y los métodos moleculares. Un tercer grupo de detección de antígenos virales no son -al menos hasta ahora- de uso masivo en el diagnóstico.<sup>3</sup>

Respecto de los métodos serológicos, estos detectan anticuerpos en el suero del paciente producidos por su sistema inmune como respuesta frente a la presencia del SARS-CoV-2. El tipo de muestra utilizada es sangre. Requieren de baja complejidad de infraestructura y equipamiento, y pueden tomar entre 20 minutos y 4 horas, dependiendo del tipo de kit del que se dispone. Otra ventaja de estos métodos es que, en la mayoría de los casos, son económicos o asequibles. Dentro de esta categoría se encuentran los test rápidos, muy visibilizados -y discutidos- por haber sido realizados en estaciones de trenes de la Ciudad de Buenos Aires.<sup>4</sup>

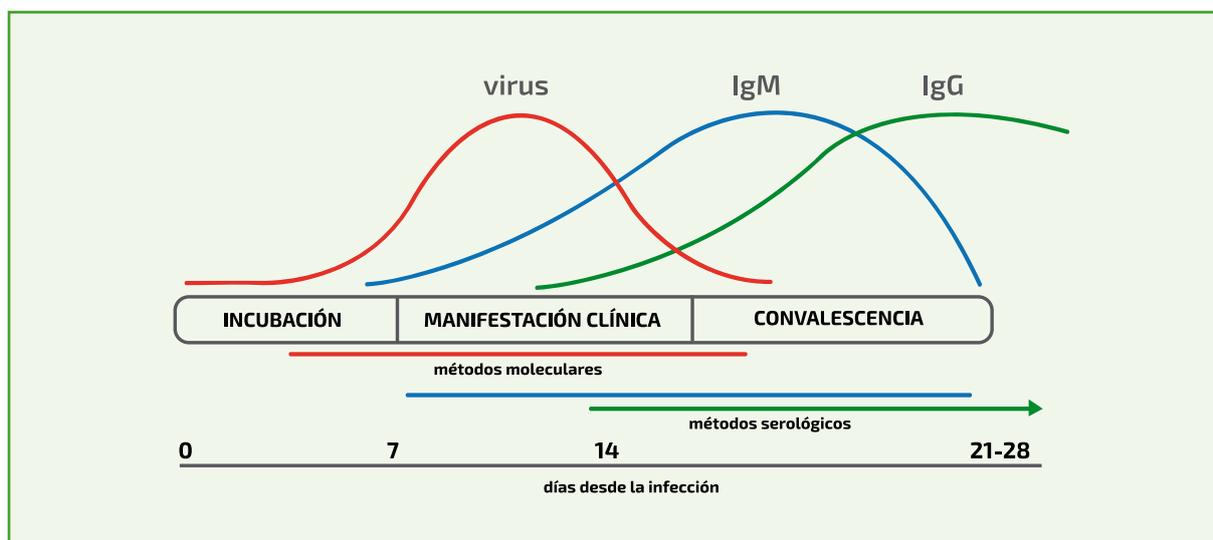
El uso de test serológicos permite detectar inmunoglobulinas M (IgM), A (IgA) y/o G (IgG). Dado que existe un período ventana entre el inicio de la infección viral y la aparición de la respuesta inmune, los métodos serológicos para IgM (y para IgA) comienzan a presentar resultados positivos alrededor del séptimo día, mientras la IgG indica aparece luego de 12-14 días de iniciada la infección (Figura 1).<sup>5</sup>

Los métodos serológico presentan especificidad y sensibilidad muy variables entre los diversos kits, usándose en nuestro país aquellos que tienen valores mayores al 85%. Sin embargo, dadas

sus características intrínsecas, tienen un gran valor epidemiológico, pero no deberían utilizarse como indicador único para la toma de decisiones clínicas.<sup>6</sup>

*Figura 1*

### Esquema de la carga viral y la aparición de anticuerpos en función del curso de la infección



Fuente: Adaptado de Preckel et al., 2020.

Los métodos de amplificación molecular detectan el genoma viral, una molécula de ARN en el caso del SARS-CoV-2. El tipo de muestra validado inicialmente fue el ácido nucleico extraído a partir del hisopado nasofaríngeo, aunque también pueden usarse otras muestras del tracto respiratorio, incluyendo hisopados de garganta y, más recientemente, se ha validado el uso de saliva.<sup>7</sup> Los métodos de diagnóstico molecular pueden detectar la presencia del SARS-CoV-2 tempranamente, a partir del 2.º - 3.º día desde el inicio de la infección (Figura 1).

El método molecular tradicional para la detección de virus de ARN es la Retrotranscripción (RT) seguida de PCR (acrónimo de “Polymerase Chain Reaction”) en tiempo real (“rt”). Ambas reacciones, RT y PCR, ocurren consecutivamente en un solo paso operativo. Es decir, que en un tubo de reacción, con los correspondientes reactivos, la molécula de ARN es *retrotranscripta* a una molécula de “ADN copia”. Este ADN copia, a su vez, servirá de molde para la síntesis de nuevas cadenas de ADN, por acción de la enzima “ADN-polimerasa”. De este modo, partiendo de un número pequeño –ergo indetectable– de moléculas de ARN viral obtenemos cientos de miles de moléculas, que por su cantidad se vuelven detectables.

La amplificación molecular por PCR se da por la repetición de un ciclo de tres pasos, determinados por la temperatura: 1) desnaturalización: se produce el des-apareamiento de dos cadenas complementarias de ADN; 2) apareamiento entre la secuencia génica que se quiere amplificar y los iniciadores o *primers* (que dan la especificidad a la reacción); 3) polimerización, o elongación a partir de los primers, de las nuevas cadenas de ADN. Dado que en cada ciclo cada molécula se duplica, la cantidad de moléculas en un ciclo determinado puede definirse como:  $X \times 2^n$ , donde ‘X’

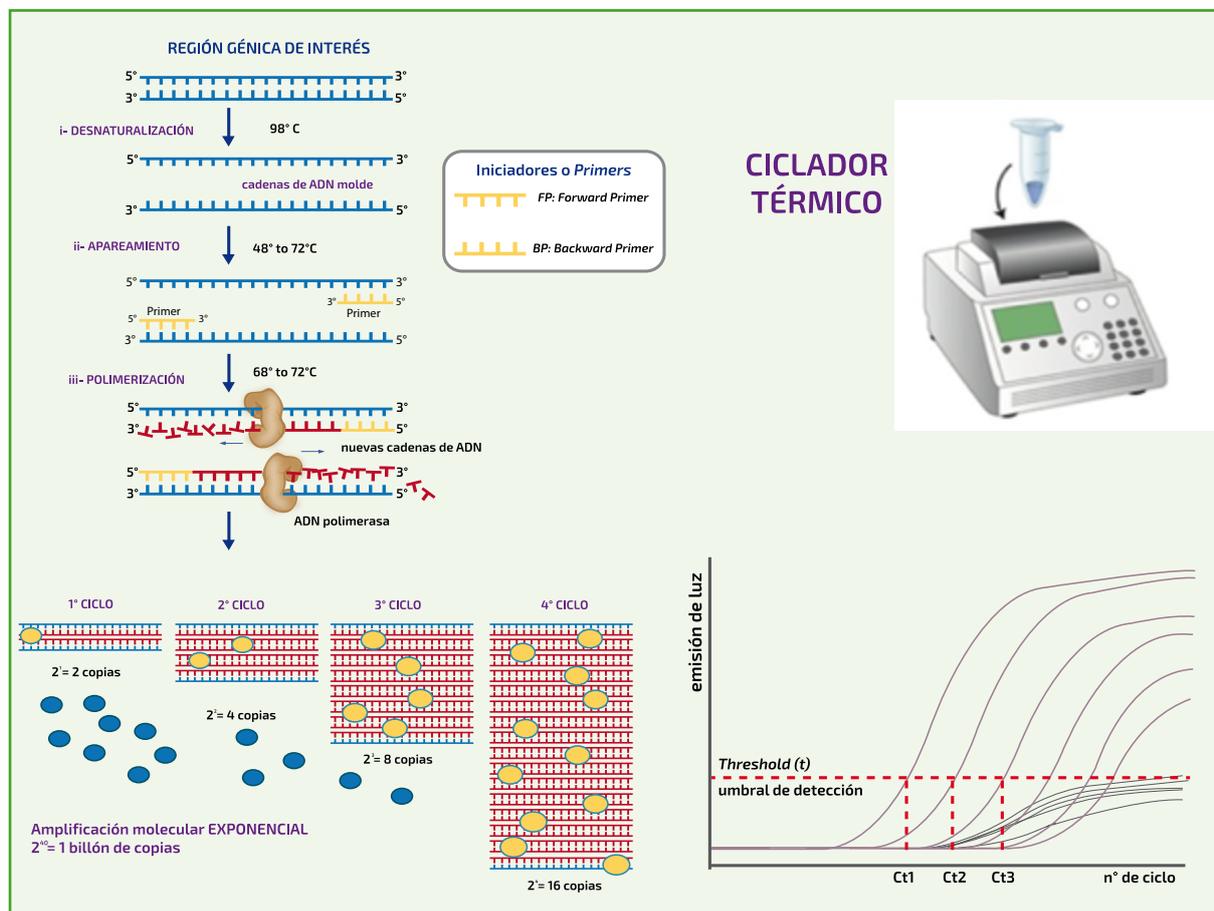
es la cantidad de moléculas iniciales y 'n' es el número de ciclo (Figura 2). La amplificación es monitoreada en tiempo real, pues en la reacción hay componentes fluorescentes que, al ser excitados a cierta longitud de onda, emiten luz de modo proporcional a la cantidad de moléculas sintetizadas, que es cuantificada por un detector (Figura 2).

La rt-PCR presenta una especificidad analítica de  $\sim 100\%$ , definida por la secuencia de los iniciadores; en el laboratorio de diagnóstico pueden presentarse ocasionales falsos positivos debido a errores técnicos o contaminación de reactivos, definiéndose una especificidad clínica de  $\geq 94\%$ . También la sensibilidad es alta ( $\geq 89-96\%$ ), variando según el kit utilizado.<sup>6</sup> En contrapartida, la rt-PCR requiere de alta complejidad, incluyendo el termociclador de tiempo real que en nuestro país cuesta al menos USD 80.000; y cada reacción de RT-PCR le cuesta al estado argentino USD 15-25. Teniendo en cuenta los tiempos de extracción de nucleicos y de preparado, reacción de amplificación e interpretación de resultados, la RT-PCR puede llevar unas 4-6 horas de trabajo; sumando, además, el tiempo de toma de muestra y traslado hasta el laboratorio, se han registrado demoras de hasta 10-12 días.

Figura 2

### Representación de la reacción de amplificación por PCR y del gráfico obtenido a partir de la detección en tiempo real

Fluoróforo no excitado ●; fluoróforo excitado ●. A partir del gráfico obtenido en tiempo real, se define el umbral de detección "t" (por "threshold") y el ciclo al cual cada muestra supera dicho umbral ("Ct").



## KIT SIMPLIFICADO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DEL SARS-CoV-2: NEOKIT COVID-19

Frente a la necesidad de tener mayor capacidad diagnóstica y contar con nuevos test complementarios a los serológicos y de RT-PCR, se ha buscado aplicar nuevas tecnologías para la detección del SARS-CoV-2 que, además de ser sensible, específica y asequible pueda realizarse en las condiciones reales de nuestro sistema de salud.<sup>2</sup>

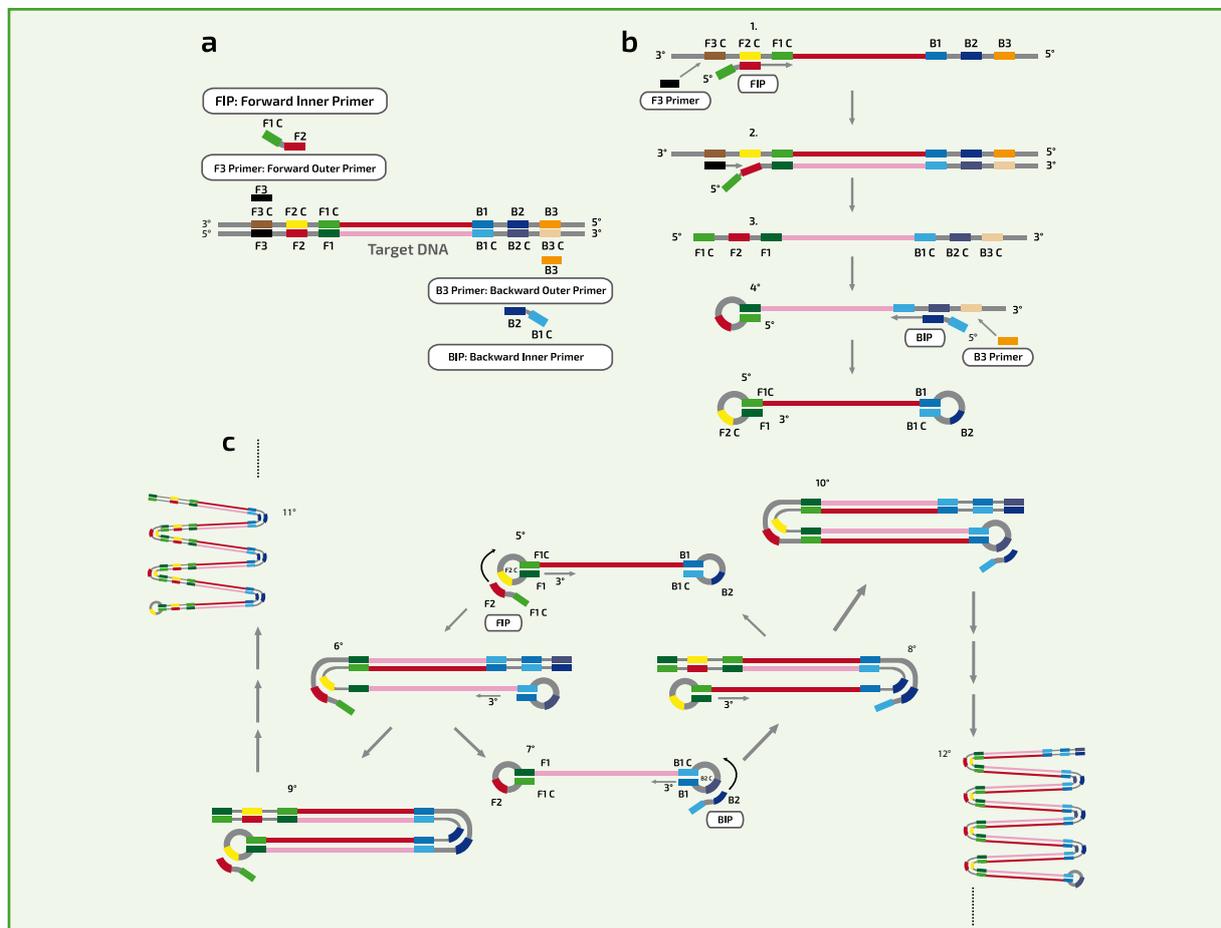
NEOKIT COVID-19, aprobado por ANMAT en mayo del 2020, es un test de detección molecular desarrollado mediante la Plataforma de Amplificación Molecular Isotérmica (AMI). Esta plataforma se basa en el desarrollo coordinado entre la reacción de amplificación, el tipo de muestra y su procesamiento y un método de lectura simplificada y oportuna según el patógeno.

El test NEOKIT COVID-19 es de amplificación molecular porque detecta el genoma del SARS-CoV-2 por retrotranscripción y amplificación, como la RT-PCR. La diferencia entre ambas reacciones es que la amplificación molecular de NEOKIT ocurre en base a la reacción LAMP (Loop-mediated isothermal amplification).<sup>8</sup> Esta reacción, en lugar de usar un par de iniciadores, utiliza 2 o 3 pares de iniciadores, uno de los cuales hibridiza en 2 regiones de la secuencia elegida, formando en los productos de amplificación un bucle o “loop” que mejora la eficiencia de la reacción. (Figura 3)

Figura 3

### Representación de la reacción de amplificación LAMP, con 2 pares de iniciadores

Se observan las múltiples estructuras de amplificación obtenidas por la formación de loops.<sup>8</sup>



Otra diferencia sustancial entre ambas técnicas es que en la amplificación LAMP la enzima, además de polimerasa, es helicasa. Es decir, que tiene la facultad de desaparecer las cadenas de ADN para comenzar a sintetizar cadenas nuevas. Esta característica hace que no se necesite del efecto térmico para que la reacción progrese (como en el caso de la PCR), por lo que toda la reacción es “isotérmica” (ocurre a una única temperatura = 63-64°C). Esto implica que el ensayo puede realizarse en un dispositivo térmico simple (baño seco o termobloque) cuyos costos son menores a USD 800 y, en muchos casos, los laboratorios ya disponen de este tipo de calentadores.

El NEOKIT COVID-19 se realiza, igual que la RT-PCR, con muestras de ARN extraídas de hisopado o saliva. Para realizarlo, deben seguirse los siguientes pasos (Figura 4):

- 1) Se disponen “tubos de determinación” para las muestras a evaluar. Además, se preparan un tubo de “control positivo” y un tubo “blanco de reacción” (que vienen en el kit).
- 2) Se dispensa una gota de mix de reactivos en cada tubo. La mix viene en un envase de auto-dispensado (tipo gotero), que facilita su manipulación.
- 3) Se coloca 5 microlitros de la muestra a evaluar en un tubo de determinación (los tubos de control positivo y blanco no requieren de otros agregados). Antes de iniciar la reacción, el contenido del tubo se ve de color violeta.
- 4) Se incuba a 64 °C por 60 minutos.
- 5) Se evalúa el resultado por visualización directa del color. Si la reacción sigue de color violeta (como el “blanco de reacción”): la reacción es negativa. Es decir: no se detecta al virus. Si la reacción presenta una coloración azul (como el control positivo): la reacción es positiva.

Figura 4

### Pasos para realizar el NEOKIT COVID-19

El proceso es sencillo, toma poco tiempo y la lectura es visual



Una vez desarrollado, el kit prototipo fue sometido a la validación analítica, presentando excelente sensibilidad (confirmada por la repetitividad del límite de detección) y especificidad (definida *in silico* y en ensayos de inclusividad, exclusividad y selectividad). En la validación clínica, el NEOKIT COVID-19 fue desafiado contra la RT-PCR (tomada como Gold Standard). Se obtuvo una sensibilidad del 94,7 %, una especificidad del 97,9 % y una exactitud diagnóstica del 96,3 % en un estudio interlaboratorio, con 11 centros de salud de CABA y provincia de Buenos Aires.<sup>9</sup>

El NEOKIT presenta sensibilidad y especificidad analíticas y clínicas similares a la RT-PCR, pero puede realizarse con un equipamiento simple y económico: un dispositivo calentador. El almacenamiento no requiere de freezer, pues los tubos son estables a temperatura ambiente y el envase gotero a 4-8°C. Cada determinación, además, tiene un costo entre 2 y 4 veces menor a la RT-PCR. Esto lo convierte en una herramienta de gran exactitud, simple, rápida y económica, pudiendo aplicarse de modo descentralizado en centros de baja complejidad con las medidas de bioseguridad correspondientes.

El NEOKIT COVID-19 fue desarrollado en el marco de la Unidad COVID-19, con fondos otorgados por el MinCyT (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación). NEOKIT es una empresa de base tecnológica, conformada a partir de un Consorcio de Asociación Público-Privado entre el CONICET y el Laboratorio Pablo Cassará. El equipo de investigadores y desarrolladores está conformado por Santiago Werbahj, Luciana Larocca, Fabiana Stolowicz, Adrián Vojnov (quien dirigió la investigación para el desarrollo del kit COVID-19) y Carolina Carrillo.

### Notas:

1. Boletín Oficial de la República Argentina. (17 de Marzo de 2020). Emergencia sanitaria. Decreto 287/2020. Disponible en <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/226914/20200318>
2. Red de Investigaciones Socioeconómicas Públicas de la Argentina (Red ISPA). (Junio 2020). La Argentina frente al COVID-19: desde las respuestas inmediatas hacia una estrategia de desarrollo de capacidades. Disponible en [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe\\_red\\_ispa\\_v12.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_red_ispa_v12.pdf)
3. Reactivos COVID-19. Kits disponibles en Argentina, aprobados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/noticias/reactivos-covid-19>
4. Infobae. (29 de abril de 2020). Realizan test rápidos de coronavirus a los pasajeros en las estaciones de Retiro y Once. Disponible en <https://www.infobae.com/sociedad/2020/04/29/realizan-test-rapidos-de-coronavirus-a-los-pasajeros-en-las-estaciones-de-retiro-y-once/>
5. Preckel, B., Schultz, M., et al. (2020). Update for Anaesthetists on Clinical Features of COVID-19 Patients and Relevant Management. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5):1495. DOI: 10.3390/jcm9051495.
6. WHO. (8 de abril de 2020). Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. Disponible en [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331713/WHO-2019-nCoV-Sci\\_Brief-POC\\_immunodiagnosics-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331713/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief-POC_immunodiagnosics-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
7. Yang, Y., Yang, M., Shen, C., et al. (2020). Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. DOI: 10.1101/2020.02.11
8. Notomi, T., Okayama, H., et al. (15 de junio de 2020) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63. Animación disponible en: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html>
9. ICT Milstein. CONICET. Fundación Cassará. (24 de Julio de 2020). Información relacionada a NEOKIT COVID-19. Disponible en <https://milstein.conicet.gov.ar/covid-19/>

\* Un agradecimiento especial a Ruth Oño (rono@forder.me) que realizó las figuras de esta bitácora.