

INFORME DEL GRUPO DE ANÁLISIS CIENTÍFICO DE CORONAVIRUS DEL ISCIII (GACC-ISCIII)

LA TECNOLOGÍA CRISPR EN LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2

** Este informe está realizado con la evidencia científica disponible en la fecha de su elaboración y podrá ser actualizado si surgen nuevas evidencias.*

RESUMEN DIVULGATIVO

Las posibilidades que supone la aplicación de las [herramientas CRISPR](#) han supuesto una de las mayores revoluciones biomédicas en lo que va de siglo. Estas herramientas permiten editar el genoma de cualquier especie, añadiendo, eliminando o modificando genes, lo que abre un gran abanico de posibilidades diagnósticas y terapéuticas en las que ya trabajan muchos laboratorios de todo el mundo.

[El coronavirus SARS-CoV-2 no escapa a la influencia de CRISPR](#) y ya hay abiertas varias líneas de investigación, sobre todo enfocadas al diagnóstico pero también a posibles terapias, para mejorar el manejo de la COVID-19 utilizando estas ‘tijeras moleculares’ de edición genética.

El diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 es una de las bases fundamentales para el manejo de la enfermedad COVID-19. La prueba denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR), que permite amplificar el material genético del virus para su estudio, es la más fiable para realizar este diagnóstico. Pese a ser la referencia diagnóstica, la RT-PCR tiene algunas limitaciones; se trata de una prueba que exige equipamiento y personal especializados, que debe realizarse en laboratorios acreditados y que puede tardar más de un día en dar los resultados.

Por ello, la comunidad científica está buscando nuevas alternativas diagnósticas. Entre ellas hay evoluciones más rápidas de la propia RT-PCR, pero también [técnicas que utilizan CRISPR para localizar al virus y diagnosticar la enfermedad](#). Las más conocidas y utilizadas hasta el momento para detectar mediante la edición genética el SARS-CoV-2 se denominan SHERLOCK, CARMEN, DETECTR y CONAN, y utilizan diferentes abordajes biotecnológicos y diferentes variantes CRISPR para optimizar y acelerar el diagnóstico.

Como toda herramienta, CRISPR tiene ventajas y limitaciones para el diagnóstico. La principal barrera actualmente es que todavía no se ha confirmado la sensibilidad y fiabilidad de CRISPR como herramienta diagnóstica en COVID-19, por lo que hay que validarla en grandes grupos de pacientes. Entre las ventajas estarían las siguientes:

- Facilidad para conseguir los reactivos necesarios para llevar a cabo la prueba.
- Posibilidad de hacer la prueba en el mismo sitio donde se toma la muestra, sin necesidad de trasladarse a laboratorios especializados.
- Desarrollo de kits diagnósticos más sencillos y accesibles.
- Reducción en el tiempo de entrega de los resultados, que podrían obtenerse en menos de una hora.
- Menor precio por prueba que la RT-PCR.

Las posibilidades de CRISPR en la búsqueda de tratamientos para la COVID-19 aún están menos desarrolladas que las aplicaciones diagnósticas. Las ‘tijeras moleculares’ podrían utilizarse para eliminar, degradar o modificar el material genético del propio coronavirus y así ‘desactivar’ o minimizar su actividad infecciosa, o para actuar sobre células ya infectadas y tratar de ‘curarlas’.

Ya hay [algunas investigaciones publicadas](#) y en marcha, algunas de las cuales se basan en técnicas de modificación genética muy difíciles de trasladar a la práctica clínica. Otras técnicas proponen utilizar virus seguros modificados en el laboratorio como vehículos de herramientas CRISPR. Estos virus modificados serían capaces de detectar células infectadas por el SARS-CoV-2, con el objetivo de eliminar los virus que contienen, un acercamiento que parece tener más posibilidades siempre que demuestre seguridad y fiabilidad.

En definitiva, el ‘corta y pega’ genético que permiten las herramientas CRISPR abre diversas opciones diagnósticas y terapéuticas -las primeras están más desarrolladas-, pero aún hay que estudiar y confirmar las expectativas que la edición genética ha abierto en el manejo de la COVID-19.

INFORME COMPLETO

El 11 de Marzo del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la COVID-19 como pandemia tras los más de 118.000 casos positivos en 114 países y 4.291 fallecidos [1]. Debido a su rápida diseminación por todo el mundo, el diagnóstico de la enfermedad es por tanto crítico para trazar el virus, entender su epidemiología, informar sobre el manejo de los casos positivos y en última instancia para suprimir la transmisión [2]. Este método diagnóstico debe ser rápido, sensible y fiable para identificar a las personas infectadas con SARS-CoV-2 dentro de la población y así poder instaurar lo antes posible las medidas terapéuticas y preventivas más adecuadas.

Actualmente se comercializan [552 kits para el diagnóstico de COVID-19 y otros 90 se encuentran en fase de desarrollo](#) [3]. Estas pruebas diagnósticas están basadas en la detección de la presencia del virus (su material genético o sus proteínas) o de los anticuerpos que el organismo ha generado contra ellos. La detección positiva del ARN o de los antígenos del virus indicaría la presencia del virus en el organismo, mientras que la negativización en estas pruebas se considera un marcador de curación.

Estas pruebas se realizan principalmente mediante una prueba denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) en tiempo real para detectar el ARN del virus, una tecnología que permite amplificar el material genético para su estudio. Existen otros métodos, denominados test rápidos de detección de antígenos, que están basados en inmunocromatografía y que son capaces de dar un resultado en 15 minutos. Sin embargo, estos últimos hasta el momento han mostrado baja sensibilidad –la RT-PCR es la prueba diagnóstica más fiable- y [la OMS no recomienda su uso para el diagnóstico](#) [4].

Por su parte, la detección de anticuerpos indica que el paciente ha estado en contacto con el virus, aunque la presencia de anticuerpos no excluye que el virus persista en el organismo. Estas pruebas están principalmente basadas en inmunocromatografía, en lo que se conoce como tests rápidos de detección de anticuerpos, aunque existen otras técnicas basadas en la tecnología ELISA o en quimioluminiscencia que son más sensibles y específicas.

Sin embargo, la OMS únicamente recomienda el uso de las pruebas de detección de anticuerpos para fines de investigación en vigilancia epidemiológica [4]. Por lo tanto, la RT-PCR en tiempo real se considera actualmente la técnica de diagnóstico más sólida y la OMS ha recomendado que se utilice esta técnica de manera preferente por su fiabilidad para la detección del material genético del virus.

Desde que se conociera la secuencia del genoma de SARS-CoV-2 han surgido diferentes estrategias innovadoras para el diagnóstico de COVID-19 basadas en la detección del ácido nucleico del virus. Un ejemplo de este tipo de estrategias son las técnicas de amplificación isotérmica, como la amplificación por recombinasa-polimerasa, la amplificación dependiente de helicasas o la amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP), que tienen la ventaja de no necesitar un equipamiento especializado y que alcanzan niveles de sensibilidad equivalentes a la RT-PCR [5].

Sin embargo, las estrategias más prometedoras parecen ser las basadas en sistemas CRISPR-Cas, herramientas de edición genética que permiten agregar, eliminar o reordenar secuencias genéticas y que ya han demostrado su gran versatilidad en muchos ámbitos de la biología, la biotecnología y la biomedicina. El aislamiento y la caracterización de nuevos sistemas CRISPR-Cas de diversas bacterias, con propiedades singulares, ha aumentado considerablemente la capacidad de aplicar estas poderosas herramientas en nuevos campos, tales como el diagnóstico y la terapia de la COVID-19. Su desarrollo puede suponer un claro avance para poder diagnosticar la infección por SARS-CoV-2 de manera masiva, rápida, sencilla y fiable.

Dos importantes grupos de investigación [ya tienen en fase desarrollo](#) estrategias de diagnóstico basadas en CRISPR. Se trata del BROAD Institute-MIT (Boston, EEUU) y de la Universidad de California en Berkeley (EEUU), inventores de las tecnologías SHERLOCK y DETECTR, respectivamente [6]. El objetivo de este informe es el de explorar las posibilidades de las nuevas estrategias basadas en CRISPR como nueva herramienta de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.

CRISPR EN EL DIAGNÓSTICO DE COVID-19

1. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real

El diagnóstico de los casos de COVID-19 se basa en la detección de secuencias únicas del virus SARS-CoV-2 mediante amplificación de su ácido nucleico, que es una molécula de cadena sencilla de ARN+ de unos 30.000 ribonucleótidos. El proceso comienza con la recogida de muestras del virus del tracto respiratorio alto (hisopo nasofaríngeo/orofaríngeo) y/o del tracto respiratorio bajo (esputo y/o aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedad respiratoria severa) [2]. Este método requiere la inactivación de la muestra y la extracción del material genético del virus en una cabina de seguridad biológica en laboratorios BSL-2 o equivalente.

Posteriormente se realiza una transcripción reversa de ese material genético (ARN), seguida de una PCR en tiempo real (*Figura 1*). A finales de enero de 2020, la OMS publicó una guía de los protocolos disponibles para el diagnóstico de COVID-19 mediante ensayos moleculares, que incluían los desarrollados por centros de todo el mundo. Algunos ejemplos, entre otros, son los siguientes:

- El del Instituto Pasteur de Francia, diseñado para la detección de dos dianas dentro del gen que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus (RdRP).

- El de los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de EEUU, para la amplificación y detección de tres dianas en el gen N.
- El de los Centros de Prevención y Control de Enfermedades de China, para la detección de fragmentos de los genes virales ORF1ab y N.
- El del Hospital Universitario Charité de Alemania, para la detección de dianas en los genes RdRP, E y N.
- El Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón, para la detección de múltiples dianas virales, incluyendo el gen de la espícula [7].

Según un estudio reciente, el límite técnico de detección del gen RdRP en la región ORF1ab es de 3.6 copias por reacción, el del gen E de la envoltura del virus es de 3.9 copias por reacción y el del gen N de la nucleocápside es de 8.3 copias por reacción [5].

La OMS recomienda la utilización de la RT-PCR cuantitativa de manera preferente por su fiabilidad para la detección de al menos dos genes específicos del virus: la detección de uno de estos genes permite el cribado de los pacientes y la detección de un segundo gen adicional permite confirmar la infección. De esta manera, es más fiable descartar posibles falsos negativos o falsos positivos. Entre los genes virales que la OMS recomienda para la detección de la infección por SARS-CoV2 están los genes N, E, S y RdRP.

Según la [Estrategia de diagnóstico, vigilancia y control en la fase de transición de la pandemia](#) publicada por el Ministerio de Sanidad de España sobre el manejo de pacientes infectados por SARS-CoV-2, un caso confirmado de COVID-19 se define como aquel paciente con o sin clínica y RT-PCR positiva o pacientes que cumplen criterio clínico con RT-PCR negativa y resultado positivo a IgM por serología (no por test rápidos) [8].

El problema principal de la RT-PCR en tiempo real es que se requiere el equipamiento necesario para realizarla y personal cualificado para el manejo de los equipos, por lo que es necesario que la muestra sea transportada a laboratorios acreditados con estas capacidades para realizar el diagnóstico. Esto puede suponer un retraso de 1-2 días en la emisión del informe con los resultados al hospital donde se encuentra el paciente afectado.

Por ello, se está trabajando en todo el mundo para desarrollar estrategias diagnósticas alternativas entre las que tecnología CRISPR puede tener un papel en el futuro.

2. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 mediante CRISPR: SHERLOCK

La primera aplicación CRISPR para la detección del material genético de SARS-CoV-2 procede del Broad Institute-Massachusetts Institute of Technology (MIT) de Boston (EEUU). En concreto del laboratorio de Feng Zhang, inventor de la técnica de diagnóstico mediante CRISPR llamada SHERLOCK (acrónimo de *Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*).

Uno de los componentes fundamentales de las herramientas CRISPR son las proteínas Cas, nucleasas que se aíslan de diferentes bacterias y cuya actividad es degradar el ADN/ARN. En 2017, el grupo de Feng Zhang describió una nueva nucleasa Cas, denominada Cas13a (anteriormente descrita como C2c2), capaz de degradar ARN, derivada de la bacteria *Leptotrichia wadei* (LwaCas13a).

En contraste con la actividad DNAsa de la nucleasa de referencia Cas9, que corta el ADN guiada por una molécula de ARN, la Cas13a era capaz de cortar ARN. La degradación del ARN complementario a la guía (también de ARN) activaba a Cas13a, que pasaba entonces a digerir

todo ARN presente en la mezcla de reacción, de forma inespecífica. La inclusión en la reacción de pequeñas moléculas de ARN con un fluoróforo en un extremo y un inhibidor de la fluorescencia en el otro permitía detectar mediante fluorescencia la presencia de un ARN que fuera complementario a la guía ARN utilizada, dando lugar a la primera aplicación de diagnóstico basada en CRISPR [que bautizaron como SHERLOCK](#) [9].

La técnica permitía detectar tanto ARN (de forma directa) como ADN (previa conversión del ADN en ARN mediante transcripción). Los autores pudieron detectar la presencia del genoma del virus Zika o del Dengue en la sangre de pacientes infectados con una sensibilidad atómolar (10^{-18} M) [10].

El 5 de mayo de 2020, el laboratorio de Feng Zhang hizo publicó en la web de su instituto un método SHERLOCK optimizado y simplificado para detectar SARS-CoV-2 al que llamaron STOP (SHERLOCK Testing in One Pot) COVID (Figura 2). La diferencia esencial con el método anterior es que toda la reacción ocurre en un mismo tubo, y la respuesta se obtiene a los 40 minutos (si la lectura es por fluorescencia) o en unos 70 minutos (si la lectura es a través de una tira reactiva). La sensibilidad es de hasta 100 copias del genoma del coronavirus por muestra de saliva o nasofaríngea. No requiere extracción de ARN pero sí una lisis inicial de las muestras con virus. En este caso, utilizan la nucleasa Cas12b de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AacCas12b).

Este método se validó con éxito con varias muestras clínicas de pacientes con COVID-19, utilizando hisopos nasofaríngeos de pacientes y logrando un diagnóstico correcto de 12 casos positivos y 5 negativos en tres réplicas [11]. Debido a que no requiere equipamiento de laboratorio específico, los autores defienden que su método podría fácilmente implementarse en los hospitales y podría suponer un gran avance para la estrategia testar-trazar-aislar. Esta estrategia persigue testar individuos con síntomas compatibles con COVID-19, trazar los posibles contactos de los casos positivos a los que hayan podido transmitir el virus y aislarlos con el objetivo de disminuir los riesgos de contagio. El 8 de mayo de 2020, la FDA aprobó mediante un procedimiento de emergencia el uso clínico de la técnica SHERLOCK para diagnosticar la presencia del coronavirus SARS-CoV-2 en muestras clínicas humanas [12].

La técnica CARMEN

A finales del mes de abril del 2020, dos equipos del BROAD Institute de Massachusetts, en EEUU, han publicado un nuevo método basado en la nucleasa Cas13 con microfluídica para permitir la detección simultánea de centenares de virus distintos en un número limitado de muestras clínicas o la detección de un único virus, como el SARS-CoV-2, en más de mil muestras clínicas.

Esta nueva técnica se denomina CARMEN (acrónimo de *Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids*) [13]. Combina la estrategia SHERLOCK mencionada anteriormente con la microfluídica, que utiliza nanogotas que portan la muestra clínica y por otro lado nanogotas que portan la Cas13, las guías de ARN específicas para cada virus y el resto de reactivos del sistema de detección. Las nanogotas de los dos tipos se mezclan y se depositan, en pares, en todas las combinaciones posibles, al azar, en un chip de silicona (PDMS) que tiene impresos decenas de miles de estos compartimientos en los que solamente caben dos de estas nanogotas.

Las muestras están codificadas con múltiples combinaciones de colores fluorescentes (los autores han conseguido crear 1050 colores fluorescentes distintos combinando cuatro fluoróforos en diferentes cantidades). Las dos nanogotas de cada nanopocillo pueden

fusionarse mediante un estímulo eléctrico y esto permite (cuando se han fusionado dos nanogotas, una de cada uno de los dos tipos) que se inicien miles de reacciones simultáneas que generan resultados fluorescentes con múltiples colores, que es lo que finalmente se lee e interpreta, usando un microscopio de fluorescencia.

Aunque de momento no hay ninguna aplicación directa del uso de CARMEN para el diagnóstico de la infección de SARS-CoV-2, sus posibilidades son evidentes. [En este primer estudio](#) los autores demuestran que CARMEN es capaz de diagnosticar la presencia del coronavirus SARS-CoV-2 en más de 1,000 pacientes, simultáneamente [13].

3. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas12a: DETECTR

En 2018, el laboratorio de la investigadora Jennifer Doudna -una de las 'madres' del desarrollo de CRISPR- reportó un sistema de diagnóstico análogo, basado en otro sistema CRISPR-Cas, en la nucleasa Cas12a (anteriormente llamada Cpf1), con actividad DNAsa guiada por ARN, pero con la capacidad de cortar cualquier molécula de ADN de cadena sencilla (ssDNA) que hubiera en la mezcla. Es decir, si la guía se une al ADN complementario presente en la muestra, la Cas12a empieza a actuar degradando todo el ADN de cadena sencilla que encuentre, pero si no se produce esa unión, el ADN de la muestra no es degradado y no se produce fluorescencia.

Para este método utilizaron la proteína Cas12 de *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (LbCas12a). Al método le llamaron DETECTR (*DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*) con el que también consiguieron llegar a detectar moléculas específicas de ADN/ARN con sensibilidad atómica. [El protocolo de DETECTR](#) es similar al SHERLOCK [14].

Otros laboratorios han aplicado la técnica DETECTR con éxito, con variantes metodológicas publicadas durante estos primeros meses de 2020. El 2 de marzo de 2020 un equipo argentino de la Universidad de Buenos Aires fueron los primeros en aplicar la técnica DETECTR para diagnosticar la presencia del coronavirus SARS-CoV-2 [18]. La sensibilidad del método era de hasta 10 copias del genoma del coronavirus por microlitro. Este experimento no se realizó con muestras clínicas, sino con muestras de saliva a las que se le añadieron cantidades de RNA sintético del SARS-CoV-2. Sus autores consideran que el coste final sería muy reducido, 1-2 USD/paciente, adecuado para su uso en países de Latinoamérica, sin requerir equipos sofisticados [15].

Los inventores de la tecnología DETECTR han publicado el 16 de abril del 2020 un primer trabajo en el que usan su técnica para detectar y diagnosticar la presencia del genoma del coronavirus SARS-CoV-2 [16]. En particular usan secuencias de los genes E y N del coronavirus (Figura 2). La sensibilidad de este método es de hasta 10 copias del genoma de coronavirus por microlitro, el ensayo típicamente dura unos 45 minutos, pero todavía no ha recibido la aprobación de la FDA. En este trabajo, los autores comparan su método con la RT-PCR en tiempo real propuesta por el CDC americano basada en la amplificación y detección de tres amplicones del gen N del virus.

Como principales resultados se observa una menor sensibilidad del sistema DETECTR (límite de detección de 10 copias por microlitro versus 1 copia por microlitro usando la RT-PCR), pero se consigue un resultado de manera mucho más rápida (45 minutos frente a las 4h de procesamiento requerido para la RT-PCR en tiempo real, incluyendo la extracción de ARN). Este método fue validado mediante la utilización de muestras clínicas de pacientes de EEUU, incluyendo 36 pacientes con COVID-19 y 42 pacientes con otras infecciones virales

respiratorias, mostrando un valor predictivo positivo del 95% y un valor predictivo negativo del 100% en comparación con el método de la RT-PCR en tiempo real de los Centros para la Prevención y el Control de las Enfermedades de EEUU [16].

4. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas3: CONAN

A principios de junio de 2020 un equipo de investigadores japoneses, asociados a la empresa C4U Corp., ha descrito una aplicación diagnóstica vinculada al uso de la proteína Cas3 del sistema CRISPR de *Escherichia coli* [17]. Se trata de la primera proteína Cas de un sistema CRISPR de clase I (todas las demás Cas anteriormente utilizadas son de clase II) y de tipo I-E, una variante mucho más compleja que requiere varias proteínas Cas distintas para completar el proceso.

De forma similar a los resultados obtenidos con Cas12a con la técnica DETECTR, el uso de la Cas3 también utiliza la actividad de corte inespecífico sobre moléculas de cadena simple de ADN, una vez localizada la secuencia complementaria a la guía ARN utilizada. Los investigadores han bautizado esta nueva técnica con el nombre de CONAN, acrónimo de *Cas3-Operated Nucleic Acid detection*.

Los autores de este trabajo validaron su método confirmando resultados en 9/10 casos de pacientes RT-PCR positivos (90% fiabilidad) con una sensibilidad de alrededor de 100 copias del coronavirus SARS-CoV-2. Y detectaron un positivo entre 21 muestras negativas a RT-PCR.

5. Diagnóstico COVID-19: ventajas e inconvenientes de las herramientas CRISPR

La implantación de los sistemas CRISPR para el diagnóstico de la COVID-19 puede suponer un punto de inflexión para controlar la epidemia. Sin embargo, existen diferentes consideraciones que deberían tenerse en cuenta (Figura 3) y que aparecen resumidas en la Tabla 1:

- Sensibilidad, fiabilidad

La reacción estándar de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 se considera un método cuantitativo con un límite de detección de 1 copia por microlitro. Por su parte, los sistemas de detección basados en CRISPR son cualitativos (nos indican presencia o ausencia del virus), detectan la presencia del genoma del coronavirus SARS-CoV-2 hasta en concentraciones de 10 copias por microlitro, en algunos casos (Cas12a/DETECTR y Cas13a/SHERLOCK), aunque en el resto de estrategias CRISPR su límite de detección está alrededor de las 100 copias del coronavirus..

Al margen de esta menor sensibilidad, otro punto a tener en cuenta en este apartado es la validación de las tecnologías basadas en CRISPR. Hasta el momento, la validación de estas herramientas se ha realizado con muy pocas muestras clínicas de pacientes COVID-19. En el caso de la tecnología SHERLOCK su validación se hizo con 12 pacientes [13], mientras que la tecnología DETECTR se hizo con 36 pacientes y mostrando un valor predictivo positivo del 95%. Además, no se aporta más información acerca de los pacientes utilizados para la validación de estos métodos, más allá de su diagnóstico, dejando fuera otras variables de suma importancia para la validación del método como la gravedad de su enfermedad, la carga viral o variables clínico-epidemiológicas.

- Tiempo de entrega de diagnóstico

Uno de los inconvenientes que tiene la RT-PCR en tiempo real es la necesidad de un equipamiento específico en el laboratorio así como personal entrenado en cuestiones técnicas y de bioseguridad. Esto hecho hace que el diagnóstico se tenga que hacer en laboratorios debidamente acreditados que no siempre están integrados en los propios hospitales, por lo que requiere también que se produzca un almacenamiento de los especímenes recogidos en los hospitales, el envío a los laboratorios de forma segura sin alterar la muestra y la recepción/almacenamiento en los laboratorios de análisis.

El procedimiento de la técnica en el laboratorio de diagnóstico se realiza en al menos 4 horas, ya que requiere la inactivación de la muestra, una extracción de ARN, la preparación de los reactivos para la reacción, la reacción *per se* y el análisis de los resultados. Todo ello puede suponer un tiempo de entrega del diagnóstico de hasta 2-3 días desde que se toma la muestra. Por su parte, los autores de STOPCovid, aprovechando la tecnología SHERLOCK, proponen un kit de diagnóstico actualmente en desarrollo con el que podría entregarse un diagnóstico con niveles similares de fiabilidad en unos 45 minutos si se consigue implantar este método en el punto donde se recoge la muestra.

- Necesidades de equipos más o menos sofisticados y/o personal cualificado

Como se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 debe actualmente realizarse en laboratorios especializados y debidamente autorizados. Estos laboratorios deben tener ciertas características especiales como contar con cabinas de seguridad biológica en instalaciones con nivel de bioseguridad BSL-2 mínimo, capacidad para automatizar las reacciones de extracción de ARN y equipamiento para realizar la RT-PCR en tiempo real. Además, requieren personal cualificado y entrenado tanto en las técnicas mencionadas anteriormente como en bioseguridad. Los creadores de las herramientas CRISPR señalan como una de sus principales ventajas el hecho de que el diagnóstico podría realizarse en el mismo punto donde se toma la muestra, ya que no requiere equipamiento especial ni personal especialmente entrenado.

- Reactivos necesarios (disponibilidad en tiempos de crisis)

Actualmente, no existe ningún kit de diagnóstico de COVID-19 basado en herramientas CRISPR que esté disponible comercialmente. Sin embargo, STOPCovid, basado en la tecnología SHERLOCK y actualmente en desarrollo, obtuvo el día 8 de mayo del 2020 la autorización de la FDA de EEUU por un procedimiento de emergencia para su uso clínico en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en muestras clínicas humanas [12]. Por lo tanto, es probable que se encuentre disponible comercialmente en un futuro próximo. Sin embargo, para que el uso de su kit prototipo pueda implantarse en hospitales necesitaría una segunda autorización de la FDA que no fuera de emergencia. Por su parte, hay una gran variedad y disponibilidad de métodos comerciales e *in-house* basados en RT-PCR en tiempo real para realizar el diagnóstico de la COVID-19.

- Propiedad intelectual y accesibilidad de los kits

Las dos grandes estrategias CRISPR con aplicación en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, SHERLOCK y DETECTR, tienen detrás a importantes y respetadas instituciones dedicadas a la investigación como son el BROAD Institute en colaboración con el Massachusetts Institute of Technology (MIT) de Boston (EEUU) y la University of California en Berkeley (EEUU),

respectivamente, que ha presentado sendas solicitudes de patentes para las dos tecnologías. De momento solo el kit basado en la tecnología SHERLOCK ha recibido la aprobación de la FDA de EEUU por un procedimiento de emergencia para realizar diagnóstico de COVID-19 [12]. Las otras Cas propuestas, como Cas3 [17] pueden tener otras patentes asociadas también, a tener en cuenta.

- Costes por reacción

Debido a la gran variedad de kits comerciales y protocolos *in-house* desarrollados para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 es relativamente complicado estimar el coste por reacción de la RT-PCR en tiempo real. A pesar de ello, generalmente se asume que tiene un coste aproximado de 10-15 euros por reacción [18, 19]. Aunque actualmente no existen precios sobre los métodos basados en CRISPR, los autores de un trabajo que utiliza la tecnología DETECTR estiman que el coste por reacción de su estrategia sería menor de 2 euros [15].

- Posibilidad en caso de emergencia de alternativa ‘home made’

Aunque ninguno de los kits basados en CRISPR están disponibles actualmente, los reactivos necesarios para seguir una estrategia SHERLOCK o DETECTR se pueden obtener fácilmente de varias casas comerciales.

En concreto, las polimerasas para la amplificación isotérmica y las endonucleasas Cas12a y Cas13a, empleadas en las estrategias DETECTR Y SHERLOCK, respectivamente, pueden obtenerse a través de diferentes empresas biotecnológicas. En el caso de la endonucleasa Cas12b empleada en la estrategia SHERLOCK, parece ser que es producida exclusivamente en el laboratorio de Feng Zhang (BROAD-MIT), por lo que su obtención podría verse limitada en un escenario de emergencia, aunque bien es cierto que su producción no supondría un gran reto tecnológico en este tipo de situaciones. La proteína Cas3, necesaria para CONAN, no está disponible comercialmente en estos momentos y es producida por los autores de la técnica.

Por otro lado, los procedimientos que se siguen para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 con estas estrategias tienen mucha menos dificultad que los protocolos actuales de RT-PCR en tiempo real y el equipamiento requerido para poder realizar el test se limitaría prácticamente a un termobloque. Todo esto facilita enormemente la posibilidad de desarrollar métodos *in-house* para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 utilizando estrategias basadas en tecnologías CRISPR, así como su implantación en hospitales y centros de atención primaria.

Tabla 1. Resumen sobre las posibles ventajas e inconvenientes de los sistemas CRISPR para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

	RT-qPCR	CRISPR
Sensibilidad	1 copia/ μ l	10 copias/ μ l
Método cuantitativo	Sí	No
Fiabilidad	<i>Gold standard</i> (OMS)	validación con pocos pacientes
Tiempo de la técnica	4 h	< 1h
Tiempo de diagnóstico*	1-2 días	potencialmente 1h
Laboratorios especializados	Sí	No
Personal cualificación especial	Sí	No

Autorización FDA/EMA**	Sí	Sí (SHERLOCK)
Coste por reacción	10-15 euros [21-22]	<2 euros (DETECTR) [18]
Alternativas in-house	Sí	Sí

* tiempo desde que se toma la muestra del paciente

** Food and Drug Administration (EEUU) o European Medicines Agency (Europa)

CRISPR PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2

No todas las variantes CRISPR-Cas con actividad RNAsa tienen esta actividad colateral de corte de todos los ARNs de la mezcla. Existen algunas variantes Cas que cortan específicamente ARN seleccionados guiados por pequeñas moléculas de ARN sin adquirir propiedades adicionales de corte inespecífico al activarse. Es el caso de la nucleasa Cas13d (también llamada CasRx), descrita en 2018 [20].

El 18 de febrero de 2020 unos investigadores propusieron una estrategia experimental (sin llevarla a cabo) que utilizaría un virus adeno-asociado (AAV) para llevar un cassette de expresión con el gen de la nucleasa Cas13d y varias guías ARN contra el coronavirus SARS-CoV-2 para infectar células previamente infectadas por el coronavirus y cortarlo, promoviendo su degradación y desaparición. Los AAV podrían administrarse por vía respiratoria para llegar a las células epiteliales de los pulmones donde parece proliferar el SARS-CoV-2 [21].

El 14 de marzo de 2020 un equipo multidisciplinar de la Universidad de Stanford (CA, EEUU) liderado por Lei S. Qi, depositó un manuscrito en bioRxiv que describía una estrategia terapéutica de uso de CRISPR (mediante Cas13d) para combatir la COVID-19, promoviendo la degradación del genoma RNA del coronavirus SARS-CoV-2. El artículo fue finalmente aceptado el 29 de abril de 2020 en la revista Cell [22]. En este estudio, realizado exclusivamente en células en cultivo, los autores previamente prepararon unas células transfectadas establemente con Cas13d, que se expresaba de forma permanente. Y, posteriormente, transfectaban las guías RNA contra el SARS-CoV-2 o contra el virus de la gripe (IAV) y los virus correspondientes, para evaluar si interfería la replicación del mismo.

A este método los autores le han llamado PAC-MAN (*Prophylactic Antiviral CRISPR in huMAN cells*). Mediante un estudio bioinformático seleccionaron seis guías RNA dirigidas contra partes conservadas de todos los coronavirus conocidos que podrían servir para eliminar cualquiera de ellos. El problema del trabajo de Abbot *et al.* (2020) [22] es que parte de células modificadas genéticamente, algo impensable en la clínica actual, por muchas razones. La propuesta anterior, Nguyen *et al.* (2020), si se llevara a la práctica, sería capaz de llevar la Cas13d a las células infectadas por SARS-CoV-2, lo que parece clínicamente más interesante.

La especificidad de corte de las moléculas RNA seleccionadas por la Cas13d ha podido ser demostrada tanto en embriones de distintas especies de peces como de ratón [23], como también en ratones adultos [24], aunque no así en experimentos realizados en la mosca de la fruta *Drosophila* [25]. Por ello, las aplicaciones terapéuticas encaminadas a utilizar Cas13d para promover la degradación del genoma RNA del coronavirus SARS-CoV-2 deberán confirmar ante todo la especificidad de corte del RNA genómico viral, dejando intactos el resto de RNAs celulares.

CONCLUSIONES

En definitiva, es evidente que hay muchas esperanzas depositadas en las estrategias CRISPR debido a sus infinitas aplicaciones, ya no sólo en el diagnóstico, sino también en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2. Su capacidad de implementación en el entorno hospitalario o centro de salud sin necesidad de equipamiento o personal especializado, la posibilidad de dar un diagnóstico en menos de una hora y a un coste mucho menor suponen grandes argumentos como para al menos explorar su posible aplicación.

Sin embargo, hay que tomar con mucha cautela los niveles de sensibilidad y fiabilidad. Se hace necesaria una validación de los métodos propuestos en grandes cohortes de pacientes COVID-19 bien diseñadas que recojan la complejidad diagnóstica que requiere la enfermedad, comparando los resultados con el *gold standard* actual (la RT-PCR en tiempo real) e incluyendo pacientes de edades y sexo diferentes, tanto con diferentes grados de enfermedad (desde individuos asintomáticos hasta pacientes que requieran hospitalización y cuidados intensivos), así como pacientes con diferentes cargas virales.

Si se confirman sus niveles de fiabilidad, las herramientas de diagnóstico de COVID-19 basadas en CRISPR pueden suponer un espaldarazo a la estrategia 'testar-trazar-aislar', tan necesaria para frenar la transmisión del virus.

Madrid, 27 de julio de 2020

Informe realizado por Lluís Montoliu (CNB-CSIC y CIBERER-ISCI), Francisco Díez-Fuertes (Hospital Clinic, Barcelona) e Ignacio Pérez de Castro Insua (ISCI), con la colaboración de Elena Primo y Cristina Bojo (Biblioteca Nacional de Ciencias de la Salud BNCS-ISCI). Resumen divulgativo y revisión: José A. Plaza, revisado por Pampa Molina.

Grupo de Análisis Científico de Coronavirus del Instituto de Salud Carlos III.

Integran este grupo los Drs Mayte Coiras, Francisco Díez, Elena Primo, Cristina Bojo, Beatriz Pérez-Gómez, Francisco David Rodríguez, Esther García-Carpintero, Luis María Sánchez, José A. Plaza y Débora Álvarez. Está coordinado por el Dr José Alcamí.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
2. WHO interim guidance for laboratory testing. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. WHO/COVID-19/laboratory/2020.5. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
3. Reflexiones de SEIMC sobre el uso de la detección de antígenos y anticuerpos para diagnóstico de COVID-19. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 30 Marzo 2020. [https://seimc.org/contenidos/noticias/2020/seimc-nt-2020-Reflexiones deteccion Ag y AC COVID-19.pdf](https://seimc.org/contenidos/noticias/2020/seimc-nt-2020-Reflexiones%20deteccion%20Ag%20y%20AC%20COVID-19.pdf)
4. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. WHO Scientific Brief. 8 April 2020.

5. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WCW. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020;14(4):3822-3835.
6. SARS-CoV-2 Diagnostic pipeline. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab
7. Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. WHO COVID-19: Laboratory and diagnosis. January 2020. <https://www.who.int/who-documents-detail/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>.
8. Estrategia de diagnóstico, vigilancia y control en la fase de transición de la pandemia. Ministerio de Sanidad 12 Mayo del 2020. <https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos.htm>
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017; 356(6336):438-442.
10. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, and Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature Protocols*. 2019;14(10):2986-3012.
11. Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang MW, Kim NG, Yu X, Li J, Walker JD, Greninger AL, Jerome KR, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. medRxiv 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>
12. Guglielmi G. First CRISPR test for the coronavirus approved in the United States. *Nature*, 8 May 2020.
13. Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, Ye SH, Boehm CK, Kosoko-Thoroddsen TF, Kehe J, Nguyen TG, Carter A, Kulesa A, Barnes JR, Dugan VG, Hung DT, Blainey PC, Sabeti PC. Massively Multiplexed Nucleic Acid Detection Using Cas13. *Nature* 2020.
14. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018; 360(6387):436-439.
15. Curti Lucia, Pereyra-Bonnet Federico, Gimenez Carla Alejandra. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12. bioRxiv, 2 de marzo de 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971127>.
16. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, Miao X, Streithorst JA, Granados A, Sotomayor-Gonzalez A, Zorn K, Gopez A, Hsu E, Gu W, Miller S, Pan CY, Guevara H, Wadford DA, Chen JS, Chiu CY. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020.
17. Yoshimi K., Kohei Takeshita, Seiya Yamayoshi, Satomi Shibusawa, Yuko Yamauchi, Masaki Yamamoto, Hiroshi Yotsuyanagi, Yoshihiro Kawaoka, Tomoji Mashimo. Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3. medRxiv, 2 June 2020.
18. Técnicas y sistemas de diagnóstico para COVID-19: clasificación, características, ventajas y limitaciones. Informe del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología. <https://www.ciencia.gob.es/stfls/MICINN/Ministerio/FICHEROS/TecnicasDiagnosticoCOVID19-ICN2.pdf>
19. Won J, Lee S, Park M, Kim TY, Park MG, Choi BY, Kim D, Chang H, Kim VN, Lee CJ. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol*. 2020; 29(2):107-119.
20. Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell*. 2018; 173(3):665-676.

21. Nguyen TM, Yang Zhang & Pier Paolo Pandolfi. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses Cell Research volume 30, pages 189–90 (2020).
22. Abbott TR, Girija Dhamdhere, Yanxia Liu, Xueqiu Lin, Laine Goudy, Leiping Zeng, Augustine Chemparathy, Stephen Chmura, Nicholas S. Heaton, Robert Debs, Tara Pande, Drew Endy, Marie F. La Russa, David B. Lewis, Lei S. Qi. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. Cell 2020; 181,4:865-876.
23. Kushawah G., Joaquin Abugattas-Nuñez del Prado, Juan R. Martinez-Morales, Michelle DeVore, Javier R. Guelfo, Emry O. Brannan, Wei Wang, Timothy J. Corbin, Andrea M. Moran, Alejandro Sánchez Alvarado, Edward Málaga-Trillo, Carter M. Takacs, Ariel A. Bazzini, Miguel A. Moreno-Mateos. CRISPR-Cas13d induces efficient mRNA knock-down in animal embryos. Developmental Cell (2020).
24. Zhou H, Su J, Hu X, Zhou C, Li H, Chen Z, Xiao Q, Wang B, Wu W, Sun Y, Zhou Y, Tang C, Liu F, Wang L, Feng C, Liu M, Li S, Zhang Y, Xu H, Yao H, Shi L, Yang H. Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice. Cell. 2020 Apr 30;181(3):590-603.e16.
25. Buchman AB, Brogan DJ, Sun R, Yang T, Hsu PD, Akbari OS. Programmable RNA Targeting Using CasRx in Flies. CRISPR J. 2020 Jun;3(3):164-176.

Otras referencias

- El editor genético CRISPR explicado para principiantes. En Agencia SINC: <https://www.agenciasinc.es/Reportajes/El-editor-genetico-CRISPR-explicado-para-principiantes>
- Aplicaciones de CRISPR en tiempos de COVID-19. En Genotipia: https://genotipia.com/genetica_medica_news/crispr-covid-19-coronavirus/
- Una técnica experimental diagnostica la COVID-19 en 40 minutos. En Materia Ciencia-El País: <https://elpais.com/ciencia/2020-04-21/una-tecnica-experimental-diagnostica-la-covid-en-40-minutos.html>
- CRISPR y coronavirus. En Gen-Ética, Naukas: <https://montoliu.naukas.com/2020/04/03/crispr-y-coronavirus/>

IMÁGENES

Figura 1. Protocolo de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

COVID-19 Diagnostic Test through RT-PCR

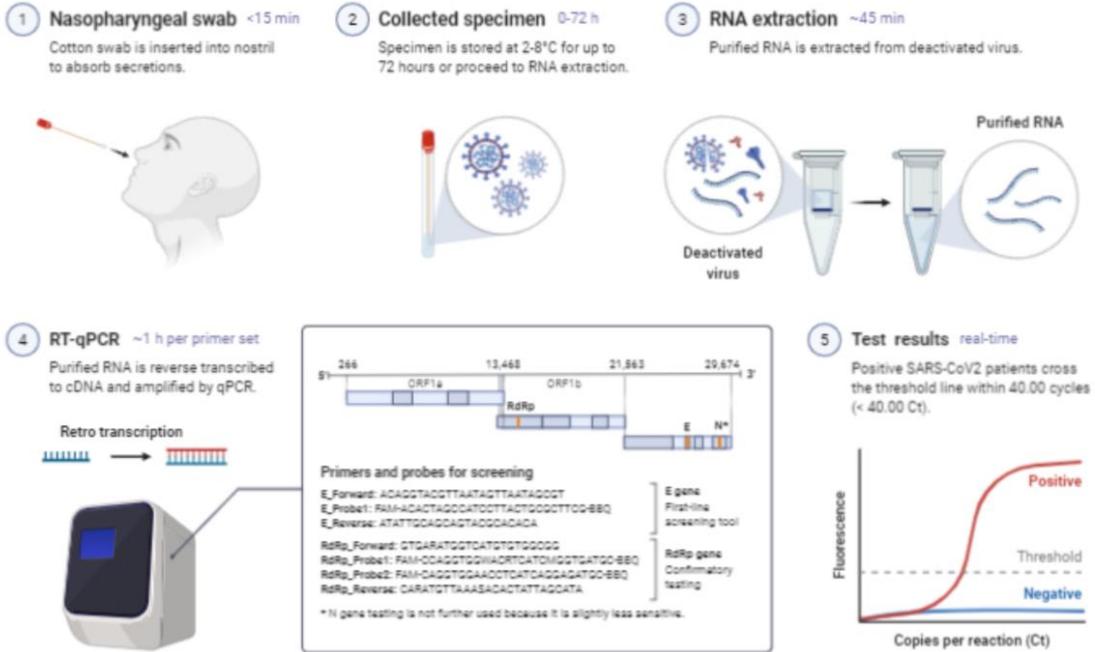


Figura 2. Estrategias CRISPR con aplicación en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.

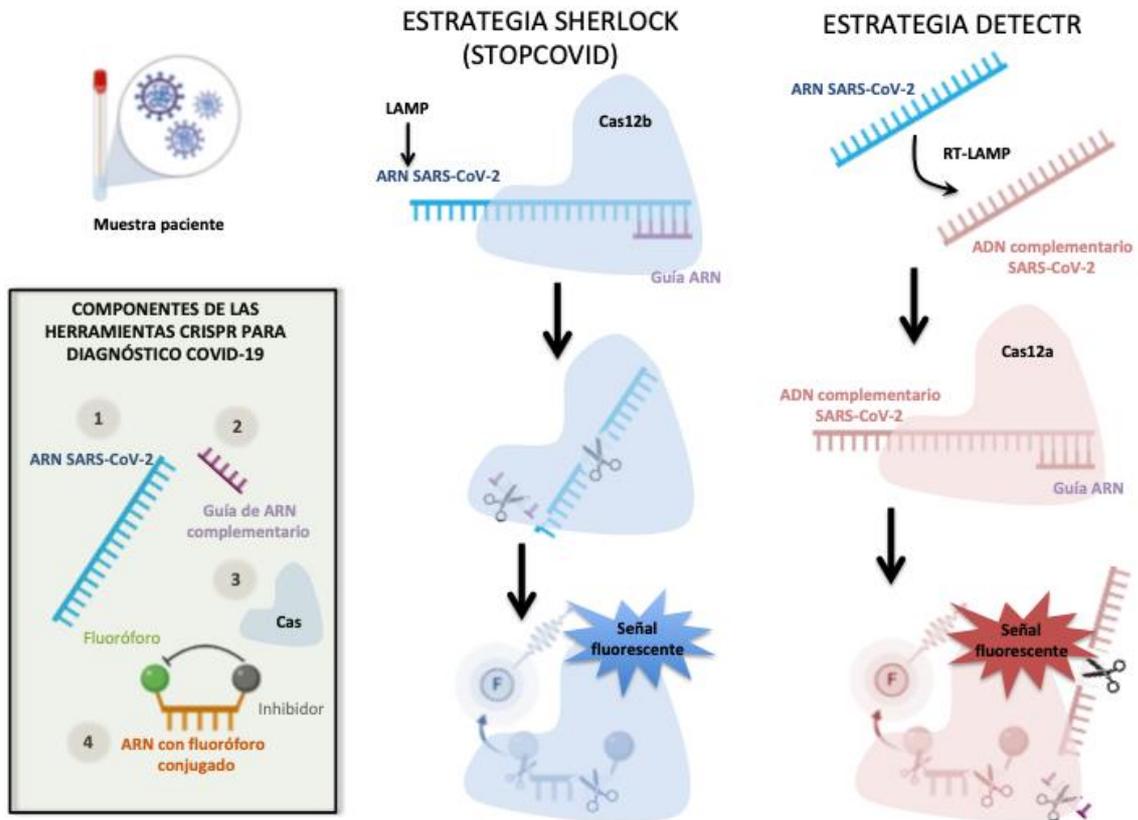


Figura 3. Comparativa de la RT-PCR en tiempo real y las herramientas CRISPR para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

