

Manuscrito en evaluación.

Este manuscrito no ha completado el proceso de revisión por pares, por lo tanto, no se considera un artículo científico final.
Se publica con propósitos de discusión y divulgación de resultados, dada la emergencia generada por la COVID-19.
Fecha de publicación: 08-06-2020

Nota técnica

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL SARS-CoV-2 MEDIANTE
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

**MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SARS-CoV-2 THROUGH
ELECTRONIC MICROSCOPY**

Robison Buitrago-Sierra^{1*}, Alvaro Guzman² Juan Felipe Santa³

¹ Químico, Doctor en Ciencia de Materiales

Facultad de Ingenierías

Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín-Colombia

robinsonbuitrago@itm.edu.co

<http://orcid.org/0000-0002-5995-4031>

Contribución:

Escritura del documento, selección y análisis de imágenes

² Ingeniero, Doctor en Ingeniería con Área de Énfasis en Materiales

Facultad de Ingenierías

Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín-Colombia

alvaroguzman6044@correo.itm.edu.co

<https://orcid.org/0000-0001-9226-4852>

Escritura del documento

³ Ingeniero, Doctor en Ingeniería – Ciencia y Tecnología de Materiales

Facultad de Ingenierías

Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín-Colombia

jfsanta@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-5781-672X>

Contribución:

Escritura del documento, selección y análisis de imágenes

* Autor de correspondencia

Manuscrito en evaluación.

Este manuscrito no ha completado el proceso de revisión por pares, por lo tanto, no se considera un artículo científico final.

Se publica con propósitos de discusión y divulgación de resultados, dada la emergencia generada por la COVID-19.

Fecha de publicación: 08-06-2020

Abstract

In this work, the morphological characterization of SARS-COV-2 virus by electron microscopy was reviewed. The most relevant technical aspects for the preparation of samples used by various authors in the literature is presented. The details related to the preparation of samples are decisive to obtain the images. In addition, details related to biosecurity are presented. Finally, a description of the main morphological characteristics of the virus was done from the images available in the literature. The morphology of the virus is characterized by the crown-like shape on its surface. The corona is made up of spikes and other proteins forming a layer of proteins on the surface that are used to bind and penetrate the host cells through the cell membrane.

Keywords

Electron microscopy, COVID-19, virus, morphological characterization.

Resumen

En este trabajo se realizó una revisión sobre la caracterización morfológica del virus SARS-COV-2 mediante microscopía electrónica. Se presenta una revisión sobre los aspectos técnicos más relevantes para la preparación de las muestras usadas por varios autores en la literatura. En los detalles finos de la preparación radica el éxito en la obtención de las imágenes. Además, se presentan los detalles relacionados con la bioseguridad. Finalmente se realiza una descripción de las principales características morfológicas del virus a partir de las imágenes disponibles en la literatura. La morfología del virus se caracteriza por la forma tipo corona en su superficie. La corona está formada por espigas y otras proteínas que forman una capa de proteínas en la superficie que se utilizan para unir y penetrar sus células huésped a través de la membrana celular.

Palabras clave

Microscopía electrónica, virus, COVID-19, caracterización morfológica.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad se han vivido una gran cantidad de pandemias ocasionadas por diferentes virus. Sin embargo, la pandemia reciente generada por el COVID-19 ha sido una de las pandemias más importantes de los últimos tiempos, porque se generó en medio de la era de las comunicaciones lo que permitió una rápida diseminación de la información gracias a la interconexión global.

Una vez evidenciada una nueva especie de virus, además de su caracterización bioquímica, la determinación de su morfología y estructura mediante la caracterización fisicoquímica es de vital importancia en el entendimiento del mecanismo de reacción, diseminación y especialmente en la búsqueda de alternativas para combatirlo.

Las técnicas de microscopía electrónica se han utilizado desde hace muchos años para la identificación de virus desconocidos. En 1948 se pudo diferenciar entre viruela y varicela gracias a la microscopía electrónica [1]. De igual manera ocurrió con el poliovirus en 1952 [2], en donde la microscopía electrónica permitió observar partículas de diferente antigenicidad. La estructura de la fiebre de Zaire, ahora conocida como ébola virus, también ha sido identificada mediante microscopía electrónica [3]. Entre los años 60s-y 90s, contribuyó al descubrimiento de diferentes virus como el norovirus y confirmó la infección en el control de calidad de las técnicas moleculares [4], dilucidó el agente viral del primer brote de virus Ébola en Zaire [5], [6], la identificación de la infección Ébola Reston; así como los adeno, entero, paramixo y reovirus. Las diferencias en el tamaño del virus y la estructura fina se utilizaron como criterios para una clasificación más precisa.

En los últimos 25 años la microscopía electrónica ha demostrado ser útil en resolver problemas de diagnóstico en virología médica, entre los cuales se destacan la identificación de los virus Hendra (1995) y Nipah (1999), miembros de la familia Paramyxoviridae [7], [8], así como la identificación de virus casuales como el calicivirus, picornavirus y adenovirus, no reconocidos por técnicas moleculares [9].

La microscopía electrónica es un pilar principal en la detección de brotes nuevos e inusuales o grupos de transmisión [4], ya que permite capturar toda la información y brinda una vista abierta para circunstancias en las cuales se investiga un patógeno nuevo o emergente, sin previo conocimiento del agente presente [10], [11]; y en un diagnóstico de rutina, es útil para confirmar o incluso, en algunos casos, guiar el diagnóstico de una infección viral [9]. Nuevos métodos de microscopía electrónica, por ejemplo, la criomicroscopía, están cercanos a la resolución atómica; la combinación con la microscopía confocal de barrido láser permite imágenes de células en vivo y tejidos con alta resolución de análisis; la combinación con la bioinformática permite la transición de imágenes en 2D a 3D (análisis estructural y funcional) lo que conlleva al incremento del conocimiento de la diversidad en la estructura del virus y el estilo de vida [12].

El virus actual del COVID-19 no ha sido ajeno a las bondades de la técnica de microscopía electrónica, que ha permitido obtener imágenes para su caracterización. Si bien la primera descripción de este tipo de coronavirus fue realizada por la Dra June D. Almeida y colaboradores en 1965 [13], no fue hasta dos años después que se dieron a conocer las primeras imágenes mediante el uso de microscopía electrónica de este tipo de virus, en su trabajo publicado en 1967 [14]. Sin embargo, desde esa fecha y hasta ahora, el desarrollo de la técnica ha permitido obtener imágenes de

un virus aislado como la que se puede ver en la Fig. 1. En este caso la muestra proviene de un paciente infectado en EE. UU. y la imagen fue publicada por el laboratorio Rocky Mountain (RML por sus siglas en inglés) del instituto nacional de alergias y enfermedades infecciosas (NIAID por sus siglas en inglés).

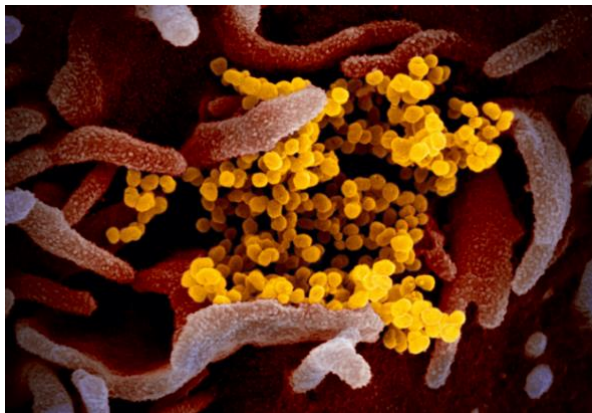


Fig 1. Micrografía electrónica de barrido (SEM) de SARS-CoV-2 (en Amarillo) extraído de un paciente contagiado en EEUU, emergiendo de la superficie de las células (en lila) cultivadas en el laboratorio. Imagen del Rocky Mountain Laboratories (RML) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

De igual manera, otras técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) ha permitido de manera entender la estructura interna del virus, con su característica de corona que le ha valido el nombre, como se puede ver en la Fig. 2, publicada por el mismo instituto de investigación.

Si bien el desarrollo de las tecnologías ha sido fundamental en el tipo y la calidad de las imágenes que se pueden obtener de los virus, los métodos de preparación juegan un papel fundamental en la adquisición de las imágenes y se podría decir que en la preparación radica el 90 % del éxito de la obtención de imágenes.

Esta nota técnica presenta los aspectos más relevantes de la preparación de las muestras y el acondicionamiento de estas

para la adquisición de imágenes de células infectadas con virus mediante técnicas de microscopía electrónica. Adicionalmente realiza una descripción morfológica detallada del virus basada en imágenes.

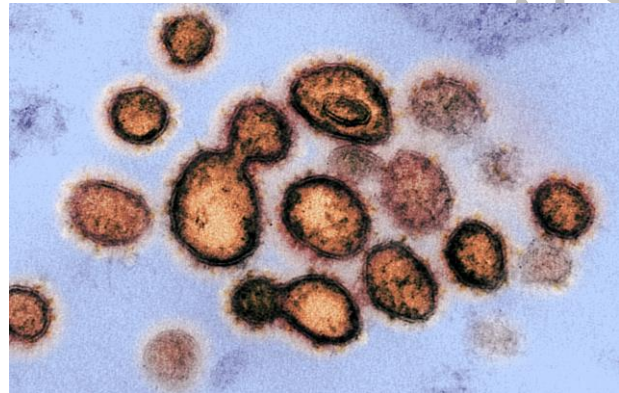


Fig 2. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de SARS-CoV-2 extraído de un paciente contagiado en EE. UU. Imagen del Rocky Mountain Laboratories (RML) del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de muestras para observación en microscopía electrónica depende del tipo de técnica a utilizar. Para el caso de la microscopía electrónica de transmisión la tinción negativa ha sido el estándar de oro. Para el caso de la microscopía electrónica de barrido se requiere iniciar con la concentración de la muestra de células infectadas con el virus hasta obtener alrededor de 5000 células infectadas por muestra [11]. Posteriormente, la muestra debe ser filtrada (típicamente con filtros de policarbonato) de tamaños que varían entre 0.08 μm y 10 μm lo cual ya supone un reto tecnológico. La función del filtro es la de retener una gran cantidad de muestras concentradas y servir como sustrato para la manipulación segura de las muestras.

En este punto existen dos técnicas alternativas para la observación. La primera

consiste en continuar el proceso con los filtros sin remover el agua. La segunda consiste en deshidratar las muestras. Para el primer caso, los filtros son lavados repetidamente con soluciones con etanol y agua y posteriormente son secados al aire. Para el segundo caso, las muestras deben ser deshidratadas dado que, si se coloca una muestra húmeda en el microscopio, la operación en condiciones de alto vacío tiende a secar la muestra rápidamente y por lo tanto se puede generar un colapso del material, contracción y distorsión de la muestra, incluso después de la preservación por fijación química. Los métodos clásicos de deshidratación incluyen el uso de solventes, algunas veces usados en conjunto con las técnicas de secado de punto crítico o liofilización.

Los filtros con la muestra son seccionados y fijados por medio de una cinta conductora de carbono o tinta de plata en un cilindro metálico conductor. Posteriormente, como la muestra será impactada con electrones, se requiere generar una superficie conductora. Esta superficie se genera por medio de la pulverización (*sputtering*) de un material conductor sobre la superficie de la muestra. Típicamente se usa la pulverización de carbono u oro para obtener una capa homogénea de unos pocos nanómetros sobre la muestra.

Esta preparación aplica para las técnicas convencionales de microscopía electrónica de barrido y transmisión. Sin embargo, se usan preparaciones alternativas para el uso de microscopía electrónica criogénica. En este último caso se realiza la congelación o la congelación a alta presión. Antes de la observación en el microscopio las muestras congeladas pueden ser seccionadas criogénicamente o montadas enteras en una cámara criogénica del microscopio. En todos los casos las muestras deben mantenerse a temperaturas inferiores a -150°C [11]. Una vez en el microscopio, el fresado por haz de iones (*ion milling*)

también puede utilizarse para investigar la estructura interna de la muestra. Un esquema del proceso de preparación se muestra en la Fig. 3.

3. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

La protección del personal que trabaja en los laboratorios es una de las principales preocupaciones a la hora de trabajar con material infeccioso. Todo el estudio de material biológico infeccioso, se deberá realizar bajo las normativas internacionales [15].

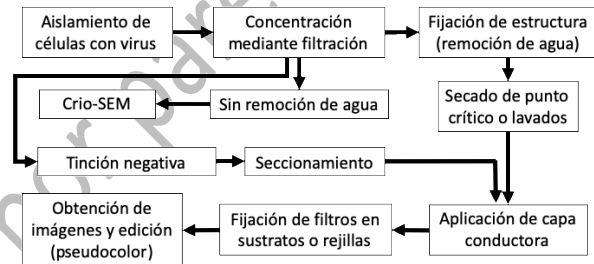


Fig 3. Esquema de preparación de muestras para uso en microscopía electrónica de barrido y transmisión. Fuente: elaboración propia.

Básicamente la manipulación y estudio de muestras virales, requiere el uso de una cabina de bioseguridad (BSC) mínimo de nivel 2 e implementos básicos como guantes, máscaras y batas adecuadas. Se recomienda además la desinfección de las rejillas de fijación antes de su uso en el microscopio. En caso de requerir el almacenamiento de las rejillas, estas deberán ser inactivadas con un fijador o mediante el uso de los UV (254 nm) durante al menos 10 min antes de proceder con el almacenamiento [16]. Otros autores proponen un requerimiento superior al punto de proponer el trabajo con este tipo de organismos solo en laboratorios de nivel de bioseguridad (BSL) 3 [4]; así mismo, proponen la inactivación de los agentes contaminantes con suspensiones de formaldehído o gluta-

raldehído en concentraciones del 2 % o el 0,5 %, siendo estos últimos menos perjudiciales con las estructuras de los virus a analizar y más efectivos que el UV en la inactivación de los agentes.

De igual manera, todo el material utilizado en el proceso debe ser tratado como infeccioso entre ellos, rejillas, pinzas y demás, y deberán ser sometidos a tratamiento de inactivación con glutaraldehído (5 %) durante 20 min, ya que incluso algunos virus han mostrado su actividad, aun al ser sometidos a las condiciones de vacío y radiación presente en el microscopio electrónico [4].

4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL VIRUS

Las imágenes disponibles del COVID-19 han sido obtenidas mediante las dos técnicas clásicas de microscopía electrónica: barrido (ver figura 1) y transmisión (ver Fig. 2 y 4). En la figura 4 se observa el virus por medio de microscopía electrónica de transmisión. Se debe anotar que las imágenes de esta técnica son obtenidas en escala de grises y los colores que se observan en las imágenes publicadas son añadidos de forma artificial, para resaltar características morfológicas de las muestras analizadas. El virus se caracteriza por su forma de corona con un tamaño de partícula que está entre 60 y 140 nm, se encuentra principalmente compuesto por material genético (ARN) en su interior, proteínas externas y una bicapa lipídica. Entre las proteínas se encuentra la proteína tipo S (*spike*) o espiga, que es utilizada para unir y penetrar las células huésped a través de la membrana celular la cual es fácilmente distinguible por su forma de clavo o espiga. También se encuentran las denominadas proteínas tipo HE (*hemagglutinin-esterase*), tipo M (*membrane*) y tipo E (*en-*

velope) estas dos últimas se suelen ver como estructuras más amorfas en la superficie. Posteriormente, se observa una bicapa lipídica que se identifica en la imagen de microscopía de transmisión por un anillo. Al interior del virus se encuentran la proteína N (*nucleocapsid*) encargada de camuflar el ARN, y el material genético del virus, el cual es replicado en las células infectadas incrementando la infección [17].

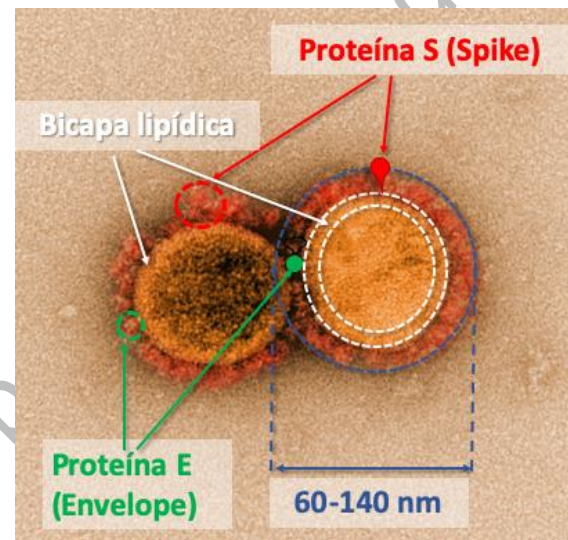


Fig 4. Imagen del virus obtenida por medio de microscopía electrónica de transmisión. Tomado de (<https://www.flickr.com/>).

5. CONCLUSIONES

La microscopía electrónica es una de las técnicas más versátiles en caracterización de agentes virales y ha jugado un papel fundamental en la historia de la humanidad.

Los métodos de preparación de muestras son claves en la adquisición de imágenes de virus. Los métodos más comunes reportados en la literatura incluyen la concentración inicial de muestra, filtración, tinción negativa, deshidratación y aplicación de recubrimientos conductores.

La manipulación y estudio de muestras virales, requiere el uso de una cabina de bioseguridad (BSC) mínimo de nivel 2 e

implementos básicos de bioseguridad. Se recomienda además la desinfección de las rejillas de fijación antes de su uso en el microscopio. En algunos casos se requiere la inactivación con fijador o mediante el uso de radiación UV. En algunos casos los agentes contaminantes deben ser inactivados con suspensiones de formaldehído o glutaraldehído.

La morfología del virus SARS-CoV 2, de acuerdo con lo que se a podido observar mediante microscopía electrónica, se caracteriza por la forma tipo corona en su superficie, compuesta por espigas que se utilizan para unir y penetrar células huésped a través de la membrana celular.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Materiales Avanzados y Energía MATyER de la Institución Universitaria ITM de Medellín y específicamente al laboratorio de polímeros y de microscopía avanzada. A.G.A agradece al Centro Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación- COLCIENCIAS y su programa de investigación posdoctoral convocatoria No. 811.

7. REFERENCIAS

- [1] F. P. Nagler and G. Rake, "The use of the electron microscope in diagnosis of variola, vaccinia," *J. Bacteriol.*, vol. 55, no. 1, pp. 45–51, 1948.
- [2] K. Hummeler, T. F. Anderson, and R. A. Brown, "Identification of poliovirus particles of different antigenicity by specific agglutination as seen in the electron microscope," *Virology*, vol. 16, no. 1, pp. 84–90, 1962.
- [3] Z. Su *et al.*, "Electron Cryo-microscopy Structure of Ebola Virus Nucleoprotein Reveals a Mechanism for Nucleocapsid-like Assembly," *Cell*, vol. 172, no. 5, pp. 966–978.e12, Feb. 2018.
- [4] P. R. Hazelton and H. R. Gelderblom, "Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 3, pp. 294–303, 2003.
- [5] E. T. W. Bowen, G. Lloyd, W. J. Harris, G. S. Platt, A. Baskerville, and E. E. Vella, "Viral Hæmorrhagic Fever in Southern Sudan and Northern Zaire," *Lancet*, vol. 309, no. 8011, pp. 571–573, 1977.
- [6] S. Pattyn, G. vander Groen, W. Jacob, P. Piot, and G. Courteille, "Isolation of Marburg-Like Virus From a Case of Hæmorrhagic Fever in Zaire," *Lancet*, vol. 309, no. 8011, pp. 573–574, 1977.
- [7] K. Murray *et al.*, "A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans," *Science (80-.)*, vol. 268, no. 5207, pp. 94–97, 1995.
- [8] K. B. Chua, E. M. H. Wong, B. C. Cropp, and A. D. Hyatt, "Role of electron microscopy in Nipah virus outbreak investigation and control," *Med. J. Malaysia*, vol. 62, no. 2, pp. 139–142, 2007.
- [9] P. Roingard, P. I. Raynal, S. Eymieux, and E. Blanchard, "Virus detection by transmission electron microscopy: Still useful for diagnosis and a plus for biosafety," *Rev. Med. Virol.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- [10] S. S. Biel and H. R. Gelderblom, "Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method," *J. Clin. Virol.*, vol. 13, no. 1–2, pp. 105–119, 1999.
- [11] C. G. Golding, L. L. Lamboo, D. R. Beniac, and T. F. Booth, "The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 26516, Sep. 2016.
- [12] K. R. Richert-Pöggeler, K. Franzke, K. Hipp, and R. G. Kleespies, "Electron microscopy methods for virus diagnosis and high resolution analysis of viruses," *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. JAN, 2019.
- [13] D. A. J. Tyrrell and M. L. Bynoe, "Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures," *BMJ*, vol. 1, no. 5448, pp. 1467–1470, Jun. 1965.
- [14] J. D. Almeida and D. A. Tyrrell, "The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture.," *J. Gen. Virol.*, vol. 1, no. 2, pp. 175–178, 1967.
- [15] World Health Organization (WHO), "World Health Organization. Biorisk management: Laboratory biosecurity guidance," *Geneva*, no. September, pp. 1–41, 2006.
- [16] C. S. Goldsmith and S. E. Miller, "Modern

Manuscrito en evaluación.

Este manuscrito no ha completado el proceso de revisión por pares, por lo tanto, no se considera un artículo científico final.
Se publica con propósitos de discusión y divulgación de resultados, dada la emergencia generada por la COVID-19.

Fecha de publicación: 08-06-2020

uses of electron microscopy for detection of viruses,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 4, pp. 552–563, 2009.

- [17] M. A. Shereen, S. Khan, A. Kazmi, N. Bashir, and R. Siddique, “COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses,” *J. Adv. Res.*, vol. 24, pp. 91–98, 2020.

documento en revisión por pares académicos