

Sobre el Uso de las Distintas Pruebas para SARS-CoV-2

Q.F.B. Sergio Antonio Salazar Lozano M. En C.

El virus SARS-CoV-2 hace su aparición a finales del año 2019 en la provincia de Wuhan en China y en pocos meses se propaga prácticamente por todo el globo, de manera que el 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) caracteriza oficialmente el brote mundial de COVID-19 (la enfermedad provocada por el virus SARS-CoV-2) como una pandemia.

El SARS-CoV-2 utiliza como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). **La proteína de la espícula (S) del virus es quien se une a ACE2 y se divide en dos subunidades: S1 y S2. La subunidad S1 del SARS-CoV-2 se divide además en dos dominios funcionales, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal. Se encuentra ya bien caracterizada una región de 211 aminoácidos (aminoácidos 319–529) en el dominio C-terminal de S1 del SARS-CoV-2 como el Dominio de Unión al Receptor (RBD), que tiene un papel clave en la entrada del virus y es la región blanco de los anticuerpos neutralizantes** (precisamente porque al unirse a esta región bloquean efectivamente el sitio e impiden físicamente que el RBD en S1 interactúe con la ACE2).

Al unirse a las células epiteliales del tracto respiratorio, el SARS-CoV-2 comienza a replicarse y a migrar hacia las vías respiratorias inferiores, finalmente entrando a las células epiteliales alveolares de los pulmones. Esta rápida replicación del SARS-CoV-2 en los pulmones puede desencadenar una fuerte respuesta inmunitaria. Posteriormente, el SARS-CoV-2 se puede diseminar por todo el organismo viajando por la sangre e infectando así a otros órganos que expresan a ACE2 en sus membranas.

Una vez que un individuo se expone al SARS-CoV-2, **el período de incubación va de 1 a 14 días**; no obstante, habitualmente la incubación será de 3 a 7 días (comúnmente alrededor del día 5 comienzan los síntomas, cuando los hay). **El virus se replica rápidamente en los primeros días, alcanzando un pico antes de terminar la primera semana de síntomas y luego disminuye la carga viral en la etapa de recuperación. El tiempo promedio de eliminación del virus es de aproximadamente 20 días, aunque existen casos en los que la eliminación se puede prolongar hasta por un poco más de un par de meses.** Por tanto, la carga viral al inicio de la infección es significativamente mayor que en la etapa de recuperación (lo que se traduce en resultados de RT-PCR de SARS-CoV-2 consistentemente positivos al inicio del proceso infeccioso, pero alrededor del límite de detección de la prueba en la etapa de recuperación, arrojando en ocasiones resultados positivos y en ocasiones negativos en esta etapa). **Al menos el 40% de las personas que se infectan con SARS-CoV-2 son asintomáticas** y este dato preocupa por el alto riesgo de propagación en la comunidad de forma inadvertida y resalta la importancia de poder identificar tempranamente cualquier infección asintomática.

Ya que la carga viral del SARS-CoV-2 en las muestras del tracto respiratorio superior es alta durante la primera semana de síntomas, el riesgo de diseminación del virus faríngeo es muy alto al comienzo de la infección (incluso en el periodo presintomático). Se piensa que las infecciones indocumentadas (es decir, aquellas para las cuales no es posible realizar un rastreo de casos hacia atrás) podrían representar el 79% de los casos documentados debido a la alta transmisibilidad del virus durante la enfermedad leve o el período asintomático. Un paciente con COVID-19 transmite virus en gotitas de líquido mientras habla. No solo eso, las partículas de aerosol pueden permanecer en el aire durante mucho tiempo y, al ser respirados por otros, penetrar a los pulmones por inhalación.

El desarrollo de estudios confiables ha sido uno de los asuntos más importantes para ejecutar intervenciones clínicas y de salud pública eficientes. **Los estudios de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real con transcripción reversa (RT-PCR) son el enfoque principal para diagnosticar infecciones, por lo que son, en pocas palabras, el estándar de oro.** Organizaciones como la OMS o los CDC en los Estados Unidos recomiendan realizar pruebas de RT-PCR de SARS-CoV-2 en personas que presenten síntomas de COVID-19, así como en contactos cercanos de personas con infecciones identificadas positivamente. Además, ambos recomiendan realizar pruebas para una amplia gama de patógenos respiratorios en muestras de pacientes sospechosos de COVID-19, para minimizar el riesgo de coinfección no tratada. Según estos organismos, los pacientes asintomáticos o levemente sintomáticos solo se consideran para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) si han estado en contacto con un paciente COVID-19 positivo.

El objetivo principal de la recolección de muestras de las vías respiratorias superiores es recolectar directamente el virus del SARS-CoV-2 y las células infectadas. **Muestras positivas a la RT-PCR de SARS-CoV-2 en vías respiratorias superiores tienden a correlacionar con estados diseminadores al inicio de la infección. Sobre la segunda o tercer semana, se recomienda que los proveedores de atención médica también tomen muestras de las vías respiratorias inferiores, que pueden ser muestras valiosas para diagnosticar COVID-19 en casos graves.** Los tres tipos principales de muestras de las vías respiratorias inferiores son: esputo, aspirado traqueal y líquido de lavado broncoalveolar. Se deben recolectar muestras de esputo de pacientes con tos profundamente productiva, pero nunca se deben inducir. Se ha demostrado que cuando se produce naturalmente, el esputo es una muestra más robusta para el diagnóstico en comparación con los hisopados orofaríngeos.

La RT-PCR de SARS-CoV-2 es la mejor herramienta diagnóstica que directamente detecta al agente patógeno, pero no es perfecta. En el diagnóstico de casos sospechosos por RT-PCR, pueden ocurrir varias condiciones indeseables: (1) falso positivo: una muestra que no contiene SARS-CoV-2 da positivo para el virus (un escenario generado por contaminación que es altamente improbable); (2) falso negativo: una muestra que contiene una cantidad suficiente de SARS-CoV-2 resulta negativa para el virus (un escenario poco probable normalmente provocado por una toma de

muestra insuficiente); o (3) una muestra bien tomada que no contiene suficiente SARS-CoV-2 (e.g., después de más de ocho días tras el inicio de síntomas, que es cuando la carga viral comienza a bajar en vías respiratorias superiores) resulta negativa para el virus, un resultado que puede no ser consistente con los resultados altamente sospechosos de la radiografía o tomografía (que, a su vez hay que recordar que pueden arrojar algunos resultados falsos positivos).

La RT-PCR utilizada por Laboratorios Lister detecta tres blancos moleculares (los genes E y S y la región RdRp/S) y según evaluación del InDRE posee un límite de detección de 50 copias por reacción y una especificidad analítica del 100% (es decir, no presenta reacción cruzada con otros blancos moleculares). Este estudio posee una autorización de uso de emergencia provisional que caducará al término de la pandemia, para continuar utilizando este estudio se requiere evaluar de forma tradicional el mismo.

Recientemente el gobierno mexicano ha admitido también provisionalmente el uso de emergencia de la determinación de antígeno de SARS-CoV-2 como herramienta complementaria (este permiso provisional caducará al término oficial de la pandemia y para que pueda seguir usándose este estudio será necesario que se someta a la evaluación completa tradicional). En el Comunicado emergente sobre el uso de pruebas para la detección de antígeno SARS-CoV-2 en México de la Secretaría de Salud con fecha del 11 de noviembre de 2020 se destacan las siguientes restricciones:

1. Que **“la prueba de antígeno se debe realizar por personal calificado y que ha recibido capacitación en materia de bioseguridad, para la toma, manejo y procesamiento de muestras”**. Esto quiere decir que no la deben realizar personas ajenas al laboratorio. También se destaca en este sentido que **“Las pruebas de detección de antígeno del virus SARS-CoV-2, no son para uso en casa o auto-aplicación por la persona enferma”**.
2. Debido a la menor sensibilidad de **las pruebas de antígeno de SARS-CoV-2** con respecto a la RT-PCR, éstas **“no deberán aplicarse como tamizaje en aquellas personas sin síntomas de enfermedad respiratoria”**. Así, solo **“se indican en personas con síntomas que corresponden a un caso con sospecha de COVID-19 y con menos de una semana de evolución de iniciados los síntomas”**, que es cuando la carga viral se espera sea mayor y donde el estudio presenta menos falsos negativos (que siempre es una posibilidad a contemplar). Por lo que,
3. **“una muestra con resultado negativo deberá seguir el algoritmo diagnóstico establecido en los lineamientos de vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio”**, es decir, hay que realizar la RT-PCR de SARS-CoV-2 para efectuar el diagnóstico. Lo anterior el gobierno lo confirma agregando que **“La prueba antigénica no sustituye la utilidad y uso de las pruebas moleculares (RT-PCR)”**.

El Valor Predictivo Positivo de la prueba de detección de antígeno en Laboratorios Lister según evaluación del InDRE es del 97%, es decir, **aproximadamente 1 de cada 33 resultados positivos**

será un falso positivo. El Valor Predictivo Negativo de este mismo estudio es del 93%, es decir, **aproximadamente 1 de cada 14 resultados negativos será un falso negativo.**

Las pruebas serológicas existen de muchos guisos y podemos, antes que nada, clasificarlas en pruebas rápidas (inmunoensayo de flujo lateral o inmunocromatografía), pruebas de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) e inmunoensayo quimioluminiscente. De estos tres, las pruebas por quimioluminiscencia son las mejores (la diferencia es abismal si se comparan contra las pruebas rápidas que son las peores). Según un estudio, en personas con COVID-19 que se someten a la prueba tres semanas después del inicio de los síntomas, la IgG por quimioluminiscencia clasificará erróneamente al 2%, el ELISA clasificará erróneamente el 18% como no infectado y la IgG de pruebas rápidas clasificará erróneamente el 30%. Por lo anterior se concluye que **la evidencia actual no respalda el uso continuo de las pruebas rápidas en el lugar de atención.**

La dinámica de aparición y desaparición de los distintos anticuerpos ante la infección por SARS-CoV-2 informa sobre los momentos en que estos estudios pueden ser ordenados. Así, podemos esperar encontrar a las inmunoglobulinas IgA e IgM más o menos alrededor de 1 a máximo 2 semanas después del inicio de los síntomas, mientras que las IgG aparecen alrededor de las 2 a 3 semanas también tras el inicio de los síntomas. Estos datos son importantes porque **queda descartado el uso de pruebas de anticuerpos para identificar pacientes en su estado de mayor replicación viral y riesgo de contagio a terceros, es decir, al inicio de la infección.** Posteriormente, los niveles de anticuerpos aumentan rápidamente; el nivel de IgA ya no aumenta después del día 21; el nivel de IgM ya no aumenta significativamente después de aproximadamente el día 15 y se mantiene presente desde más o menos el día 10 al día 30; y el nivel de IgG alcanza una meseta más o menos para el día 21 y a partir de ahí persiste unos pocos meses. La respuesta inmunitaria protectora de los pacientes infectados con SARS-CoV-2, específicamente los niveles de IgG y de anticuerpos neutralizantes, comienzan a disminuir lentamente tras 3 meses después de la infección persistiendo a niveles moderadamente menores a los 5 meses en la mayoría de los casos. Así, existen ventanas de prueba específicas para la detección de anticuerpos serológicos, por lo que el muestreo en etapas inadecuadas puede dar lugar a falsos negativos (e.g., cuando se piden antes de tiempo). Las diferencias en la respuesta inmune individual y la producción de anticuerpos también pueden dar lugar a resultados falsos negativos. Adicionalmente, **es importante considerar que los estudios de laboratorio que detectan anticuerpos pueden no ser lo suficientemente sensibles para detectar algunas de las infecciones pasadas de COVID-19** (e.g., en un estudio publicado basado en IgG's no se detectaron el 26% de infecciones pasadas confirmadas por PCR). Los resultados falsos positivos en estudios de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 son también una realidad, principalmente por reacción cruzada con anticuerpos preexistentes dirigidos a otros blancos similares.

La determinación de anticuerpos IgG utilizada por Laboratorios Lister se encuentra dirigida a la proteína N del SARS-CoV-2. Según el fabricante (no un evaluador independiente), el estudio posee

un Valor Predictivo Positivo de 96.77%, es decir, **aproximadamente 1 de cada 33 resultados positivos será un falso positivo**. El Valor Predictivo Negativo reportado por el fabricante es de 99.63%, es decir, **aproximadamente 1 de cada 250 resultados negativos será un falso negativo**. Es importante enfatizar que utilizar este estudio antes de tiempo, es decir, antes de que se formen y se encuentren en concentraciones medibles los anticuerpos IgG, aumenta las probabilidades de obtener resultados falsos negativos. **Laboratorios Lister recomienda esperar 21 días tras el inicio de síntomas para solicitar este estudio con el mejor desempeño** (el fabricante reporta estos rendimientos a 14 días tras el inicio de síntomas, pero sabemos que la variabilidad interindividual en algunos pacientes lleva al desarrollo de IgG's durante la tercer semana). Este estudio posee una autorización de uso de emergencia provisional que caducará al término de la pandemia, para continuar utilizando este estudio se requiere evaluar de forma tradicional el mismo.

La solicitud de inmunoglobulinas IgG contra SARS-CoV-2 brinda información sobre pacientes infectados y ya recuperados y es especialmente útil en pacientes asintomáticos que nunca fueron diagnosticados.

Sería de esperar por lo que sabemos sobre la viabilidad viral en cultivos *in vitro*, que **para cuando el paciente desarrolla anticuerpos IgG en concentraciones medibles, la probabilidad de que éste permanezca siendo infeccioso, a pesar de resultados de RT-PCR positivos, es nimia**. Para lograr el alta anteriormente existían recomendaciones basadas en la RT-PCR, que debía arrojar resultados negativos en dos ocasiones con al menos 24 horas entre ambas tomas de muestra, para este propósito. Actualmente la Organización Mundial de la Salud ha cambiado sus recomendaciones precisamente porque la evidencia científica acumulada a la fecha ha dejado claro que el periodo infeccioso en estos pacientes es muy breve comparado contra el tiempo en el que la RT-PCR puede seguir arrojando resultados positivos. La explicación de este fenómeno es, en pocas palabras, que el sistema inmune repele al virus y es exitoso aproximadamente dos semanas tras la infección inicial. Sin embargo, el virus no desaparece mágicamente del organismo, sino que es descamado, poco a poco, a través del recambio celular de las mucosas infectadas, en las que partículas virales atrapadas en estas células muertas pierden su capacidad infecciosa y comienzan, junto con el resto de los componentes celulares, un lento proceso de descomposición. La RT-PCR no posee capacidad para discriminar entre partículas virales infecciosas o no infecciosas, lo que detecta es segmentos del genoma viral que mientras se encuentren intactos producirán resultados positivos. Así, si el proceso de descamación de mucosas alguna vez infectadas en un individuo dura varias semanas, serán precisamente estas semanas las que dure la RT-PCR arrojando resultados positivos, sin importar que las partículas virales detectadas ya no posean capacidad de generar una infección productiva. Cualquier paciente con un resultado de IgG contra SARS-CoV-2 por encima del punto de corte del estudio podemos asumir tanto que posee inmunidad como que ya no es infeccioso para la gente a su alrededor. De cualquier modo, sugerimos que primero se cumplan los criterios de la OMS y que el estudio de IgG contra SARS-CoV-2 sea solicitado, si así lo desea, para reforzar dichos criterios y jamás como un sustituto para éstos.

En algunos niños y adultos se ha observado un síndrome inflamatorio multisistémico tras una infección por SARS-CoV-2, a veces asintomática (sobre todo en los niños); la determinación de inmunoglobulinas IgG contra SARS-CoV-2 ayuda a identificar la etiología, a saber, una infección pasada por este virus.

Además, a través de estudios de seroprevalencia basados en la determinación de IgG contra SARS-CoV-2, podemos examinar el crecimiento y la frecuencia de la infección en una comunidad, al menos en el corto plazo.

Finalmente, en Laboratorios Lister contamos también con un estudio que detecta los **Anticuerpos Totales contra el SARS-CoV-2, a saber, IgA, IgM, IgG y otros isotipos**. Según el fabricante (no un evaluador independiente), el estudio posee una **especificidad del 100%**. Este estudio no discrimina entre ellos, el reporte solo incluye una magnitud que es comparada contra una referencia que en este caso es un punto de corte (i.e., el estudio es cualitativo). Este estudio posee una autorización de uso de emergencia provisional que caducará al término de la pandemia, para continuar utilizando este estudio se requiere evaluar de forma tradicional el mismo.

Es notable que **la totalidad de estos anticuerpos detectados se encuentran dirigidos a la proteína S**, lo que se traduce en que **una proporción de éstos pueden ir dirigidos específicamente al RBD, es decir, son anticuerpos neutralizantes** (que son los más interesantes de probar se encuentran presentes por obvias razones funcionales). Debido a que detecta anticuerpos totales, en cuanto éstos (cualesquiera de ellos) empiezan a aparecer en cantidades medibles, el estudio se torna positivo; según el fabricante, **el estudio es altamente certero tras ocho días después del inicio de síntomas**. De este modo puede utilizarse como una herramienta de apoyo en aquellos casos en los que exista un cuadro fuertemente sugerente de COVID-19 (y tal vez evidencia imagenológica), pero un resultado de RT-PCR de SARS-CoV-2 negativo (cuya probabilidad aumenta después del día ocho desde el inicio de síntomas).

También con el estudio de Anticuerpos Totales contra el SARS-CoV-2 identificamos a los pacientes recuperados que respondieron fuertemente a la infección y que podrían conferir inmunidad a aquellos que se encuentran respondiendo con más debilidad a través de la aplicación experimental de sueros convalecientes y terapia pasiva de anticuerpos. Por supuesto, para poder hacer esto es necesario que la institución en la que se lleve a cabo esta labor cuente con un protocolo de investigación autorizado por el Centro Nacional para la Transfusión Sanguínea, de otro modo, no es posible transfundir plasma convaleciente (este sigue siendo un tratamiento experimental).