Respuesta inmune específica frente a SARS-CoV-2

Cómo es la respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2

Para generar una respuesta antiviral, las células de la inmunidad innata reconocen -a través de sus receptores de reconocimiento de patrón (PRR)- patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), en este caso, a SARS-CoV-2. Esta interacción induce la activación de la vía de los IFN tipo I. Éstos limitan la replicación viral, promoviendo la fagocitosis por macrófagos y facilitando la protección de células no infectadas. Los coronavirus están particularmente adaptados para evadir la detección inmune. Cuando la inmunidad innata no puede contener la infección se pone en marcha la inmunidad adaptativa que genera dos tipos de respuesta: respuesta inmunitaria humoral, mediada por anticuerpos (Acs), y la respuesta inmunitaria celular, mediada por linfocitos [1].

¿Qué tipos de respuesta inmunitaria específica hay frente al SARS-CoV-2?

Respuesta inmune humoral

La respuesta de Acs frente a SARS-CoV-2 es una herramienta fundamental para los estudios de seroprevalencia [2] y de respuesta vacunal. Se pueden diferenciar diversos isotipos de anticuerpos que se producen en las distintas etapas de la infección: Las inmunoglobulinas M (IgM) se generan en la respuesta primaria e indican infección aguda en todas las infecciones, mientras que las inmunoglobulinas G (IgG), más abundantes, son las predominantes en la respuesta secundaria. La combinación de ambas, junto a la PCR, es de gran utilidad para entender el momento de la infección (tabla 1) [3]. Durante algún tiempo los test rápidos de anticuerpos mostraban IgM persistentemente positivas, siendo un fallo de la técnica en sí; con los nuevos test serológicos esto no es lo habitual y, como en cualquier otra infección, una IgM positiva muestra que la respuesta inmune es primaria. Aunque no se analizan habitualmente las IgA, éstas se secretan en las mucosas y constituyen la primera barrera para la entrada del patógeno al organismo.

En definitiva, la determinación de Acs puede proporcionar información valiosa respecto a un contagio previo.

Respuesta inmune celular

La respuesta inmune específica celular consiste en la activación de linfocitos T específicos frente a SARS-CoV-2. Intervienen tanto los linfocitos T CD4 como CD8 [4].

Cómo detectar la respuesta inmunitaria específica frente a SARS-CoV-2?

Respuesta inmunitaria humoral. Detección de anticuerpos frente al virus

Los anticuerpos generados frente al virus se pueden detectar en muestras de sangre (sangre total, suero, plasma). Los antígenos virales reconocidos por los anticuerpos son la proteína Spike (o sus subunidades: S1 y el fragmento que incluye el "receptor binding domain", RBD) y la proteína de la nucleocápside (N). Habitualmente, las pruebas detectan bien anticuerpos totales o los diferentes isotipos IgM, IgG e IgA. Conceptualmente, las IgMs suelen aparecer entre los días 5-7 tras la infección, mientras que los de tipo IgG son detectables a las dos semanas tras la infección, con un valor máximo a día 21. Los de tipo IgA tienen una cinética de aparición similar a la IgM, pero puede detectarse durante más tiempo. Sin embargo, una de las características de la infección por el SARS-CoV-2 es que los anticuerpos IgM, IgA e IgG pueden ser detectados tanto de forma secuencial como simultánea. En cuanto al momento y duración de la seroconversión (cambio de IgM a IgG), depende sobre todo del tiempo transcurrido tras la infección, de su gravedad y del antígeno utilizado para la determinación, pudiendo detectarse la presencia de IgM en ocasiones hasta dos meses tras el comienzo de los síntomas [5].

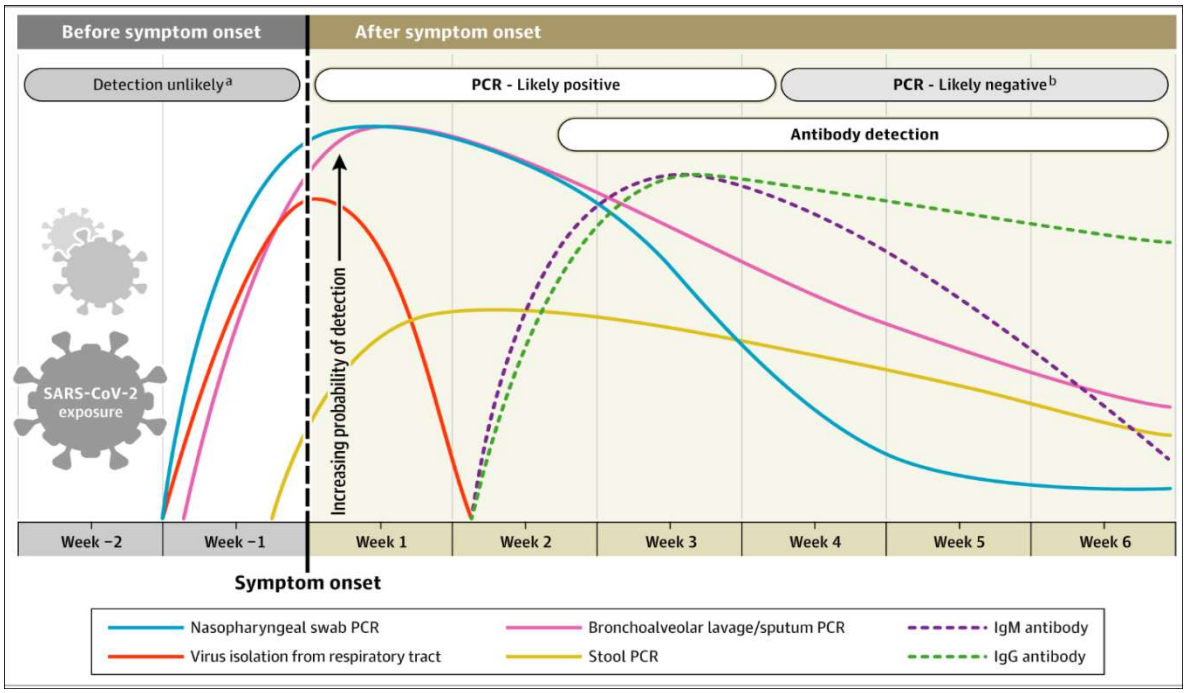


Figura 1. Cinética de la detección del virus mediante cultivo, el RNA viral mediante PCR, y los anticuerpos [6].

¿Qué técnicas diagnósticas se utilizan para detección de anticuerpos?

Las principales pruebas que se emplean para la detección de anticuerpos anti-SARS-Cov-2 incluyen:

Test rápido. Inmunocromatografía lateral (lateral flow)

Es muy rápido (minutos) y requiere tan solo una gota de sangre. Es cualitativo, detecta sólo presencia o ausencia de anticuerpos. Es útil para estudios de seroprevalencia masivos. Sin embargo, suele mostrar una baja sensibilidad en los primeros días tras la aparición de los síntomas, por lo que se debe de tener cautela con los resultados negativos. No debe utilizarse antes de 7-10 días del inicio de los síntomas. La sensibilidad se incrementa con el tiempo tras la infección. La detección aislada de IgM positiva, sin cambio de isotipo a IgG en los días posteriores, puede deberse a falsos positivos, asociados a esta técnica. Tienen la ventaja de que pueden hacerse con muestra de sangre total y no requiere personal especializado, por lo que se han utilizado como "point of care".

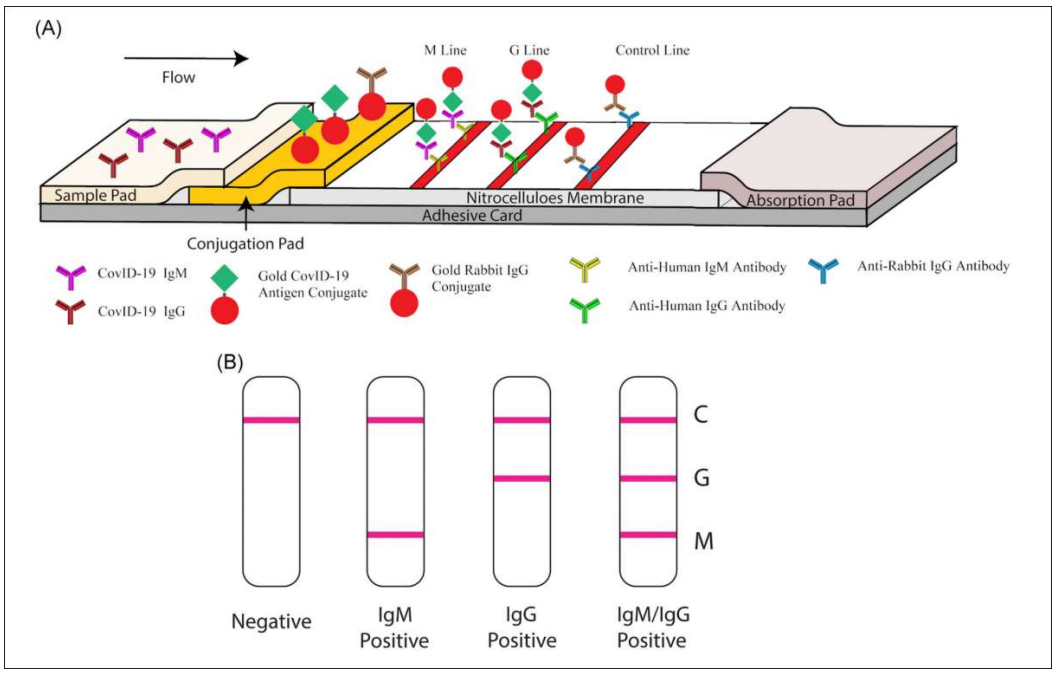


Figura 2. Inmunocromatografía [7]

Técnica de ELISA

Es una técnica muy sensible y permite identificar los isotipos de anticuerpos y cuantificar (con estándares internacionales) sus títulos. Requiere del uso de equipos especializados con instrumental específico. El tiempo de análisis es de aproximadamente 2-3 horas. Puede usarse para la detección de anticuerpos en cualquier fluido corporal, pero en su uso más habitual se emplea suero o plasma. Existe un amplio abanico de reactivos comerciales con sello CE –IVD- (in vitro diagnosis), para su utilización en laboratorios diagnósticos. Para la detección se utiliza un anticuerpo secundario unido a una enzima, que cuando se une a su sustrato (cromogénico, como TMB o ABTS) da lugar a una reacción colorimétrica.

La positividad del test indica que existen anticuerpos contra el virus y que se ha estado en contacto y reaccionado frente a él, haya tenido o no síntomas, o bien que se ha vacunado y se ha generado respuesta.

Técnica de inmunoquimioluminiscencia y variantes (con micropartículas, electroquimioluminiscencia).

Emplea suero o plasma. Mismo fundamento que los ELISA, pero la enzima acoplada al anticuerpo secundario (anticuerpo de detección) cataliza una reacción quimioluminiscente que resulta de la emisión de fotones produciendo luz. Al igual que el ELISA es una técnica muy sensible, pero requiere de personal cualificado, equipos especializados y es de larga duración.

¿Cómo se interpreta la respuesta inmune humoral (Ac)?

La interpretación de los resultados se hace en función de los isotipos de Ac y/o PCR (tabla 1).

Para interpretar los resultados, es importante considerar varios aspectos:

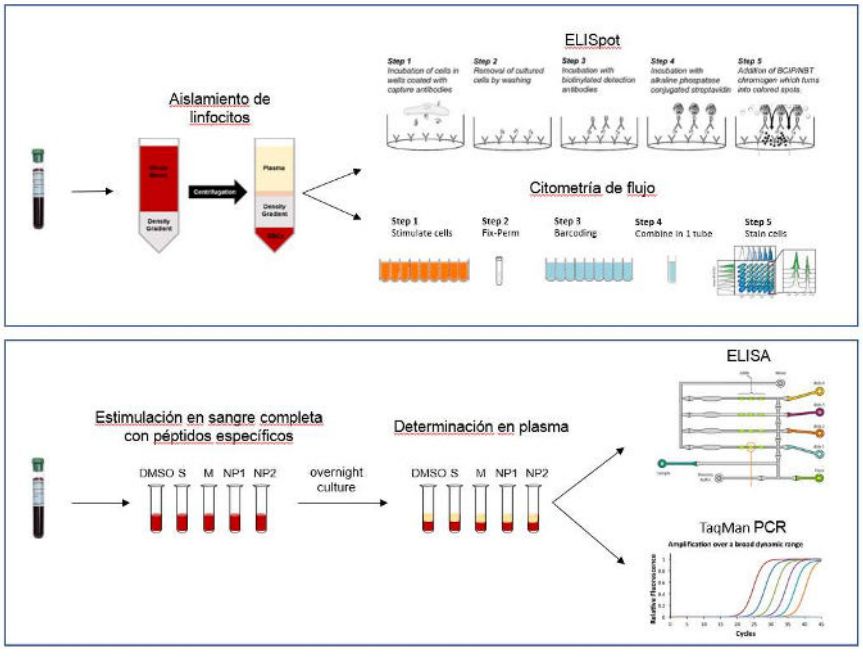
1) Reactivos: Tipo de antígeno a detectar, isotipo de anticuerpo.
2) Momento en que se toma la muestra (días desde el contagio y/o inicio de síntomas) y calidad de dicha muestra.
3) Características del sujeto (edad, patología de base, tratamientos.).
4) Severidad clínica del paciente (los pacientes más graves tienen, por lo general, títulos más elevados de anticuerpos).
5) Técnica de detección: Hay que tener en cuenta la sensibilidad y especificidad de las mismas.

Respuesta inmunitaria celular

Las pruebas para evaluar la inmunidad celular son complejas y costosas y solo pueden realizarse en laboratorios de inmunología especializados. El resultado de la interpretación conjunta de los resultados para las clases de inmunoglobulinas y el nivel de activación específico de los linfocitos es indicativo del estado de inmunización de cada individuo. No todos los casos requerirán un análisis de todos los anticuerpos ni de las respuestas celulares.

¿Qué técnicas se utilizan para detección de respuesta celular?

Para evaluar la respuesta de células T específicas de Ag contra el SARS-CoV-2, es necesario realizar una incubación de las células T del paciente frente a péptidos del virus y comprobar posteriormente si ha habido activación de las células T. Existen diferentes métodos para la medición de esta estimulación: detección de marcadores de activación por citometría de flujo, pruebas de producción de citocinas por los linfocitos, como el ELISPOT o estudios de proliferación celular frente a péptidos del virus.



ELISPOT

Precisa de aislamiento previo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para realizar posteriormente una individualización de células secretoras de citocinas. Tiene una alta sensibilidad y especificidad.

Citometría de flujo

Precisa de aislamiento previo de PBMC y cultivo durante tiempos diferentes en función del tipo de marcaje utilizado para medir activación:

- Entre 4 y 48 horas si se utiliza un marcaje de marcadores de activación en superficie (AIM) en función del antígeno a estudiar (CD25, CD134, CD137, CD154…).
- Entre 4 y 24 horas para estudio de producción de citocinas intracelulares (IFN gamma, IL2…).
- Entre 3 y 7 días para revelado con colorantes vitales de proliferación linfocitaria (CFSE, V450 …).

Producción de IFN-gamma por linfocitos T

La ventaja fundamental de esta técnica es que permite trabajar con sangre completa y precisa de incubaciones más cortas con los péptidos, resultando por lo tanto más rápida.

Tras la recogida del plasma, se realiza una medición de citocinas (habitualmente IFN gamma) bien por técnicas de ELISA convencional, quimioluminiscencia o tecnologías multiplex. Con las multiplex se pueden medir un panel de múltiples citocinas en un pequeño volumen de muestra, existiendo diferentes métodos para su realización (ELLA, Luminex, CBA…).

Esta aproximación permite también el procesamiento de los pellets celulares para la realización de PCR tanto de citocinas como quimiocinas. Este abordaje podría permitir abordar estudios poblacionales más masivos de inmunidad celular.

¿Cuándo realizar las pruebas de inmunidad celular?

Se debe evaluar la respuesta celular:

- En aquellos pacientes que a pesar de haber tenido PCR positiva, no se detectan Acs específicos.
- Pacientes con PCR negativa o en los que no se haya hecho PCR, tengan o hayan tenido clínica compatible, pero no hayan generado respuesta inmunitaria humoral.
- Pacientes en los que tras la vacunación no se detectan anticuerpos.
- Pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia primaria o secundaria que afecte especialmente a la producción de Ac:
    - Pacientes con hipo/agammaglobulinemias primarias.
    - Pacientes tratados con fármacos que deplecionen a las células B (por ejemplo, fármacos anti-CD20 como rituximab, obinutuzumab, ocrelizumab, ibritumumab, tositumomab).
    - Pacientes tratados con fármacos que inducen linfocitopenia y en los que la respuesta de Ac sea negativa.
    - Pacientes trasplantados.
- Cuando se quiere analizar la respuesta inmunitaria específica de forma general (celular y humoral): estatus inmunológico frente al SARS –CoV-2.

¿Dónde realizar las pruebas de inmunidad celular?

Los estudios de respuesta inmunitaria celular se tienen que realizar en Servicios de Inmunología especializados de hospitales de referencia de tercer nivel. En los casos en que se considere oportuno, se insta a las autoridades Sanitarias para establecer los circuitos de derivación pertinentes.

BIBLIOGRAFIA:

[1] Vabret N, Britton GJ, Gruber C, et al; Sinai Immunology Review Project. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. Immunity. 2020 16; 52:910-941.

[2] Barallat J, Fernández-Rivas G, Quirant-Sánchez B, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 IgG specific antibodies among healthcare workers in the Northern Metropolitan Area of Barcelona, Spain, after the first pandemic wave. PLoS One 2020; 15: e0244348.

[3] Indicaciones y procedimientos de utilización de test diagnósticos de infección COVID19. Protocolo Gerencia Regional de Salud. Dirección General de Planificación y Asistencia Sanitaria. Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León. Versión 4 Abril 2020.

[4] Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. Nature. 2020; 584: 457-462.

[5] Guo L, Ren L, Yang S et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). Clin Infect Dis. 2020; 71: 778-785.

[6] Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020; 323: 2249-2251.

[7] Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. J Med Virol. 2020; 92: 1518-1524.

La Federación de Asociaciones Científico Médicas Españolas (FACME) ha adquirido el compromiso de generar recomendaciones relacionadas con el diagnóstico de SARS-CoV-2, con el fin de que los facultativos dispongan de información protocolizada y apoyada en la mayor evidencia científica a la hora interpretar biomarcadores en el contexto de la COVID-19. Este trabajo se ha desarrollado en el seno del Grupo de Diagnóstico del Consejo Asesor de FACME contando en cada caso con las sociedades miembro con mayor conocimiento en el tema.