¿Cuáles son las técnicas de diagnóstico microbiológico de infección por SARS-CoV-2 disponibles?

Las técnicas empleadas pueden ser de diagnóstico directo o indirecto. Entre las primeras se encuentran las que detectan virus en la muestra biológica de que se trate. Son las denominadas PDIA (pruebas diagnósticas de infección aguda), que comprenden por un lado las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos y por otro las de detección de antígenos. La serología formaría parte de las herramientas de diagnóstico indirecto, al detectar la respuesta de anticuerpos generada frente al virus.

Pruebas de amplificación del ácido nucléico viral. Son test que detectan la presencia del genoma viral basándose en la amplificación del ácido nucléico del virus (TAAN o NAAT en inglés). Entre ellas se encuentra la **RT-PCR** (Reverse Transcription Polymerasa Chain Reaction). En esta técnica se amplifican fragmentos (genes) del genoma viral, previo paso de ARN a ADN. Actualmente es considerada el "gold estándar", con una sensibilidad del 85-90%, dependiendo de la calidad de la muestra y del tiempo desde el contacto, y una especificidad superior al 95%, pero no permite diferenciar, con seguridad, entre infección aguda y resuelta, pues puede persistir largo tiempo positiva. Se han puesto en marcha otras pruebas diagnósticas que emplean diferentes tecnologías como RT-LAMP (Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification o amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa)), CRISPR (Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats, o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas) o ensayos de micromatrices moleculares.

Existen sistemas de RT-PCR integrados automáticos y rápidos, pero, en general, sólo permiten el procesamiento de 1 a 4 muestras a la vez, por lo que están indicadas para situaciones de urgencia.

Test rápidos de detección de antígenos (TRA), son ensayos que detectan proteínas del virus. La técnica más empleada es la inmunocromatografía de flujo lateral (lateral flow), aunque existen otras técnicas como el enzimoinmunoensayo. Tienen una menor sensibilidad y una especificidad cercana a las técnicas de detección molecular en pacientes sintomáticos con 5 o menos días de evolución y en entornos de prevalencia elevada. No se conocen con exactitud los datos en pacientes asintomáticos. En esta población el rendimiento diagnóstico depende de la prevalencia de la infección. La principal ventaja de esta técnica es la facilidad y rapidez de su realización (15 minutos), lo que la hace una buena herramienta como prueba rápida "a la cabecera del paciente" o "*point-of-care*" (POC).

El **diagnóstico serológico** pone de manifiesto la respuesta inmune del paciente frente a la infección mediada por anticuerpos, pero no es útil para el diagnóstico de la infección aguda.

¿Cuáles son las muestras más adecuadas?

Los exudados nasofaríngeos (ENF) son los más utilizados. Los lavados broncoalveolares son una buena muestra, aunque de más difícil obtención. En pacientes ingresados, con alta sospecha diagnóstica y PCR en ENF reiteradamente negativa, serían las muestras más útiles. También pueden emplear exudados orofaríngeos, frotis nasal (ambos con menor sensibilidad que los ENF) esputos y saliva. En este último caso, el laboratorio que realiza las determinaciones debe decidir su uso, ya que el procesamiento de la muestra es diferente al resto. Las ventajas de la saliva son que no necesita medio de transporte y la facilidad de la obtención.

¿Debemos actuar igual en todas las situaciones?

NO, diferentes situaciones clínicas y epidemiológicas plantean distintos escenarios y tiempos de respuesta.

Pacientes sintomáticos graves: por su inmediatez podría realizarse TRA, su rendimiento óptimo lo alcanza en pacientes con 5 días o menos de evolución de los síntomas. Un resultado positivo confirma el diagnóstico, si es negativo, realizar una prueba de detección molecular rápida o preferente, en función de la situación clínica y los recursos. Se debe tener en cuente que un resultado negativo no descarta necesariamente una infección por SARS-CoV-2, hay factores que pueden dar lugar a resultados falsos negativos, entre los que se encuentran una calidad deficiente de la muestra, mala conservación o transporte de la misma (no refrigeración), toma de la muestra muy temprana o tardía, o errores técnicos.

Pacientes sintomáticos vulnerables (enfermos crónicos, hematológicos, oncológicos, con trastornos neurológicos, inmunodeprimidos, obesos, embarazadas, ancianos) realizar TRA. El resultado positivo confirma el diagnóstico, si es negativo, o, no se dispone de TRA, realizar una técnica de detección molecular, siendo deseable obtener el resultado en menos de 24 horas.

Pacientes sintomáticos no vulnerables, sin clínica de gravedad y jóvenes: realizar TRA si hay menos de 5 días desde el comienzo de los síntomas Si es positiva confirmaría la infección. Si es negativa repetir a las 24-48 horas o realizar prueba de detección molecular, el resultado debería estar disponible en 24 horas.

Estudio de brotes activos: realizar PDIA en función de la población y los recursos. Puede emplearse TRA y a los negativos realizar pruebas de detección molecular

Contactos estrechos: realizar TRA. Se pueden repetir en días sucesivos, si el paciente persiste asintomático no es imprescindible realizar detección molecular (valorarlo en determinadas profesiones: fuerzas y cuerpos de seguridad, conductores de autobús…). Si comienzan con clínica, y los TRA siguen negativos, realizar detección molecular. Pasaría a ser un caso si fuera positivo. Los resultados deberían estar disponibles en 24-48 horas.

Cribados aleatorios: Es controvertido. En grupos poblacionales con elevada incidencia, es decir con la prevalencia pretest alta podría tener interés realizarlos, teniendo en cuenta que podemos encontrarnos con falsos negativo.

Profesionales sanitarios o del sector sociosanitario, sintomáticos o contactos, y pacientes que van a ser sometidos a cirugía, pruebas diagnósticas, tratamientos inmunosupresores o previo a ingresos: Realizar test de detección molecular. Al tratarse de situaciones programadas el resultado puede demorarse hasta 72 horas.

¿Se puede conocer la carga viral de la muestra?

NO están estandarizados procedimientos para la detección de la carga viral del SARS-CoV-2 como ocurre con otros virus como VHB, VHC, CMV o VIH. Aunque por el momento no se están realizando, las técnicas de RT-PCR pueden dar una información indirecta de la carga viral a través de los Ct.

Los Ct (cycle threshold o ciclo umbral), se definen como el número de ciclos de amplificación necesarios en un ensayo de RT-PCR para amplificar el ARN viral hasta que alcanza un nivel detectable. Se correlaciona de forma inversa con la carga viral, de modo que una muestra con elevada carga viral necesita pocos ciclos de amplificación en relación a otra muestra con poca carga que necesitará más ciclos de amplificación para alcanzar el límite de detección. Es una estimación semicuantitativa, que se ve influida por muchos factores como la calidad de la muestra, el tiempo transcurrido desde la infección o la técnica empleada. No hay una estandarización de estos parámetros, y no está establecido un punto de corte a partir del cual tomar decisiones, aunque se puede asociar

Ct bajos con replicación viral. Los Ct no pueden utilizarse como una herramienta aislada para la toma de decisiones sobre todo, cuando son elevados: pacientes con Ct altos (Ct > 30-35) pueden asociarse a infecciones en resolución, pero también a infecciones de inicio o una recogida de la muestra de mala calidad. Además, también se ha demostrado que la misma muestra con diferentes técnicas de RT-PCR puede dar diferentes Ct.

¿Existen las reinfecciones?

La reinfección se define como aquella que afecta a personas con historia de infección por SARs-Cov-2, que tras 3 meses asintomáticos y con detección del genoma viral en este tiempo negativa, presenta detección de genoma viral positiva utilizando dos técnicas de detección. En ausencia de secuenciación, no se puede decir si es el mismo virus o una variante.

¿Qué son las variantes?

Cada coronavirus tiene una secuencia de casi 30.000 nucleótidos en su ARN. En ella se incluye toda la información genética que le permite al virus secuestrar a las células y ponerlas a su disposición para producir nuevos virus.

En la generación de nuevos virus se producen errores en las copias, denominadas mutaciones. Si bien en los coronavirus la tasa de mutaciones es menor que en otros virus ARN por la presencia de enzimas correctoras, son inevitables. La única forma de que un virus no mute es que no se replique, y, por otra parte, a mayor replicación, más mutaciones.

Se han detectado miles de mutaciones en relación a la cepa original de Wuhan, la mayoría sin ninguna trascendencia biológica. Las mutaciones más preocupantes son las que afectan al gen de la proteína S (Spike), ya que es la estructura que permite el acceso a la célula diana.

Cuando un grupo de virus hereda el mismo conjunto de mutaciones en su secuencia se denomina variante.

Las mutaciones siguen una nomenclatura, en la que los números hacen referencia a la posición del aminoácido en la proteína, y las siglas al tipo de aminoácido. Así, por ejemplo, en la variante D614G ha sustituido el ácido aspártico (D) de la posición 614 por glicina (G). Esta variante apareció a principios de 2020 y se ha dispersado por todo el mundo, conformando el denominado Linaje B1.

La identificación de nuevas variantes sólo se puede realizar mediante secuenciación. Las diferentes variantes se han catalogado en variantes preocupantes **(VOC)** (aumento demostrado de transmisibilidad y/o letalidad y/o escape inmune), variantes en investigación **(VUI)** (aumento posible pero no suficientemente probado de transmisibilidad y/o letalidad y/o escape inmune) y variantes de interés **(VOI)** (no se sospecha aumento de transmisibilidad, letalidad o escape inmune).

Las variantes que presentan las mutaciones **N501Y, E484K** y diferentes mutaciones en **K147**, que afectan a la RBD (receptor binding domain) de la proteína S son las más preocupantes ya que facilitan la unión del virus al receptor celular. Además, algunas mutaciones (E484K, p.ej) originan una alteración en la forma de la proteína que condiciona que pueda evitar la neutralización por algunos tipos de anticuerpos, lo que puede tener repercusión en la respuesta frente a la infección, tanto natural como vacunal.

Es indispensable secuenciar el genoma viral para realizar una correcta vigilancia epidemiológica y valorar la evolución y posibles implicaciones de las misma en la pandemia.

Nomenclatura	Denominación geográfica	Mutaciones más importantes	Observaciones
Variantes preocupantes (VOC)			
B.1.1.7 **501Y.V1** **VOC 202012/01**	"Británica"	**17 mutaciones:** • **N501Y** • delección 69_70 • P681H • **Adquisición probada de E484K**	**Mayor transmisibilidad**: probable **Mayor virulencia**: probable **Escape vacunal / inmune**: improbable salvo adquisición generalizada de E484K
B.1.351 **501Y.V2**	"Sudafricana"	• **N501Y** • **E484K** • detección orf1b • …	**Mayor transmisibilidad**: probable **Mayor virulencia**: desconocida **Escape vacunal / inmune**: probable
B.1.1.28 **P1.**	"Brasileña"	• **N501Y** • **E484K** • K417T • detección orf1b	**Mayor transmisibilidad**: probable **Mayor virulencia**: desconocida **Escape vacunal / inmune**: probable *El Caso Manaus*
Variantes en investigación (VUI)			
B1.525	"Nigeriana"	• **N501Y** • **E484K**	**Mayor transmisibilidad**: posible (en investigación) **Mayor virulencia**: desconocida **Escape vacunal / inmune**: desconocido
B.1.526	"Nueva York"	• **E484K** • **S477K**	**Mayor transmisibilidad**: posible (en investigación) **Mayor virulencia**: desconocida **Escape vacunal / inmune**: posible (en investigación)
Variantes en investigación (VUI)			
B.1.429 **CAL.20C** **S452R**	"California"	• **L452R (RBD)** • S13I (Spike) • W152C (Spike) • I4205V (ORF1a) • D1183Y (ORF1b)	**Mayor transmisibilidad**: ¿aumento del 10-15%? **Mayor virulencia**: desconocida **Escape vacunal / inmune**: desconocido

Tomada de: https://proantibioticos.com/informacion-sobre-nuevas-variantes-de-sars-cov-2/

¿Qué ocurre con los pacientes con detecciones moleculares reiteradamente positivas?

Hasta en el 20% de las muestras de pacientes graves con detecciones moleculares positivas de forma reiterada mantuvieron positivos los cultivos celulares en estudios publicados. Lo mismo parece ser que ocurre en los pacientes inmunodeprimidos. En pacientes asintomáticos o leves esto no se ha descrito, pudiendo estar la positividad más en relación con fragmentos de genoma que con virus infectivos. De este modo, tanto la implicación epidemiológica como las medidas a tomar son diferentes en función del tipo de paciente, así en pacientes asintomáticos o con clínica leve, tras 10 días de cuarentena y 3 sin síntomas, la posibilidad de transmisión se considera baja.

¿La vacunación puede originar un resultado falso positivo?

Las PDIA positivas después de la vacunación traducen que el paciente se ha vacunado cuando estaba en el período de incubación de la enfermedad. Tiene la misma implicación que en un paciente no vacunado. No existe la posibilidad de resultados falsos positivos vinculados a la vacunación. La vacunación, con las vacunas empleadas hasta ahora, parece ser que no impide la infección, si bien, protege frente al curso grave de la enfermedad. Con la experiencia generada parece que la vacunación puede, además, disminuir la transmisibilidad e infectividad.

¿Qué utilidad tiene la serología?

La serología se utiliza para el diagnóstico indirecto de una infección pasada, no aguda. Evalúa la respuesta inmune del paciente mediante la detección de anticuerpos frente a diferentes estructuras del virus en las muestras.

Existen diversas metodologías para la detección de anticuerpos (Ac) producidos por la infección de SARS-CoV-2. Estas pruebas son capaces detectar Ac frente a determinados antígenos virales. Los más utilizados actualmente

se basan en la detección de Ac frente a los antígenos (Ag) del dominio de la unión al receptor (RBD), de la nucleocápside (anti-N) y los anti-S (producidos frente a la proteína de la espícula).

Los Ac pueden ser totales o bien detectar específicamente isotipos de las inmunoglobulinas como IgG, IgA o IgM. Si bien la detección de IgM se suele asociar en otros procesos virales con infección aguda, en la infección por SARS-CoV-2, la cinética de la IgM puede ser superponible a la de la IgG, por lo que algunos autores proponen no realizar su determinación, dada la confusión que produce su detección, dando lugar a estudios de detección de genoma viral innecesarias y a diagnósticos de infección aguda incorrectos.

La protección frente a SARS-CoV-2 se ha evaluado en los ensayos clínicos llevados a cabo por las diferentes vacunas que se han ido comercializando, y que son avaladas o no para su distribución por las diferentes agencias evaluadoras (EMA o Agencia Europea del Medicamento, por ejemplo). La aparición y diseminación de variantes como la británica, surafricana o brasileña puede complicar el panorama, pero ya se está trabajando en responder a la pregunta de si las vacunas cubren o no estas variantes. Por lo que respecta a la determinación serológica de las vacunas comercializadas hasta ahora en España (Pfizer/BioNtech, Moderna, Astra-Zeneca y la próxima que se espera, Janssen) provocan un aumento en el título de Ac anti-S, pero no afectan la respuesta anti-N, que sí deberían aparecer en los pacientes con inmunidad generada por la enfermedad. Dado que se ha demostrado la eficacia de la vacuna y la complejidad de la respuesta inmune frente a SARS-CoV-2, no está indicado solicitar la respuesta inmune vacunal en la población general.

Bibliografía:

Para más información:

https://covid19.seimc.org/wp-content/uploads/2020/12/SEIMC-Modulo-I_final_EstragegiaDiagnostica.pdf

https://covid19.seimc.org/wp-content/uploads/2020/12/SEIMC-Modulo-II_final_OrganizacionDiagnostico.pdf

https://covid19.seimc.org/wp-content/uploads/2020/12/SEIMC-Modulo-III_final_OrganizacionAsistencial.pdf

1-CDC Centers for Diseases Control and Prevention.COVID-19 Pandemic Planing Scenarios CDC. [Internet] 2020 [citado 30 Septiembre]. Disponible en: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planing-scenarios.html# table-1

2-Larremore DB, Wilder B, Lester E, Shehata S, Burke JM, Hay JA, et al. Test sensitivity is secondary to frecuency and turnaround time for COVID-19 surveillance. medRxiv [Internet] 8 de septiembre 2020 [citado 15-12-2020].Disponible en: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.22.20136309v2

3-Eliseo A,Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernendez-Fuentes MA et al. Field evaluation of a rapid antigen test (PanbioTM. Covid-19 Ag Rapid Test Device) for the diagnosis of COVID-19 in primary healthcare centers. medRxiv [Internet] 20 de octubre 2020 [citado 15-12-2020], Disponible en:https://doi.org/10.1101/2020.10.16.20213850

4-Fang FC, Benson CA., del Río C, Edwars KM, Fowler VG, Fredricks DN et al. COVID-19- Lessons Learned and Questions Remaining. Clin Infect Dis, ciaa 1654. [Internet],26 de octubre 2020 [citado 15-12-2020]. Disponible en: https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1654/5940148

5-Pekosz A, Cooper CK, Parvu V, Li M, Andrews JC, Manabe YC, et al. Antigen-based testing but nor real-time PCR correlates with SARS-CoV-2 virus culture. medRxiv [Internet] 5 de octubre 2020 [citado 15-12-2020], Disponible en: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.02.20205708v1

6- Hutcheon P. at Daily Record. Scotland has 18 confirmed cases of new Covid strain, announces chief medical officer. 21 Diciembre 2020. Disponible en: https://www.dailyrecord.co.uk/news/politics/eighteen-new-covid-strain-cases-23200533

7-Nextstrain. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 clusters in their international context - cluster S.N501. 25 Diciembre 2020. Disponible en: https://nextstrain.org/groups/neherlab/ncov/S.N501

8-Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. medRxiv [Preprint]. 22 Diciembre 2020; Disponible en: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.21.20248640v1

8-European Centre for Disease Prevention and Control. Detection of new SARS-CoV-2 variants related to mink. Posted November 12, 2020. Accessed January 3, 2021. https://www.ecdc. europa.eu/sites/default/files/documents/RRASARS- CoV-2-in-mink-12-nov-2020.pdf

9-Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. Science. 2020;eabe5901. doi:10.1126/ science.abe5901

10- Threat Assessment Brief: Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in United Kingdom. ECDC. Disponible en 11-https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variants-with-multiple-spike-protein-mutations-observed-in-united-kingdom

11https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/926410/Understanding_Cycle_Threshold__Ct__in_SARS-CoV-2_RT-PCR_.pdf

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.