

## SARS-CoV-2: ASPECTOS BIOLÓGICOS, EPIDEMIOLÓGICOS Y DIAGNÓSTICOS DE UN CORONAVIRUS EMERGENTE

Cristina Gutiérrez García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Profesor Asistente Cátedra de Virología. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV.

Recibido 3 mayo 2020. Aceptado 20 mayo 2020

### RESUMEN:

El SARS-CoV-2 es una variante viral emergente, luego de SARS-CoV-1 y MERS-CoV, causante de la pandemia por COVID-19 de elevada morbilidad y mortalidad en el humano. Esta revisión muestra aspectos biológicos de los Coronavirus, en especial del SARS-CoV-2, su ciclo de replicación, transmisión y diagnóstico de laboratorio. El SARS-CoV-2 es un virus envuelto, resistente al medio ambiente, cuyo genoma ARN de simple cadena y polaridad positiva sirve de molde para la traducción de la polimerasa viral, responsable de una transcripción discontinua durante la replicación del virus, fenómeno que favorece la recombinación genética. En el caso del SARS-CoV-2, la recombinación en la región genómica de la proteína S pudiera explicar el salto zoonótico de murciélagos a humanos y la rápida propagación de la infección viral, transmitida principalmente por vía respiratoria. Las pruebas diagnósticas para COVID-19 son indicadas en personas consideradas como casos sospechosos. Los métodos moleculares, tales como la RT-qPCR en tiempo real que determinan las regiones E y RdRP son los más recomendados para la detección directa del virus. Las pruebas rápidas para detección de antígeno son más sensibles que aquellas que determinan anticuerpos, las cuales han mostrado un elevado porcentaje de resultados falsos negativos ante de los 7 días de aparición de síntomas. En medio de una cuarentena global, el estudio de las características virológicas y de transmisión del SARS-CoV-2 contribuye a una mayor comprensión sobre la inmunopatogenia en COVID-19, el desarrollo de una vacuna contra el virus, pruebas diagnósticas rápidas más sensibles y protocolos terapéuticos efectivos.

**Palabras Clave:** Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, Replicación, Transmisión, Diagnóstico.

## SARS-CoV-2: BIOLOGICAL, EPIDEMIOLOGICAL, AND DIAGNOSTIC ASPECTS OF AN EMERGING CORONAVIRUS

### SUMMARY

SARS-CoV-2 is an emerging viral variant, after SARS-CoV-1 and MERS-CoV, causing the COVID-19 pandemic with high morbidity and mortality in humans. This review shows Coronaviruses biological aspects, especially SARS-CoV-2, replication cycle, transmission, and laboratory diagnosis. SARS-CoV-2 is an enveloped virus, environment resistant, whose positive-polarity single-stranded RNA genome serves as a template for the viral polymerase translation, responsible for discontinuous transcription during viral replication, phenomenon advantage genetic recombination. Protein S genomic region recombination in SARS-CoV-2 could explain the zoonotic jump from bats to humans and the rapid spread of viral infection, mainly transmitted by respiratory route. Diagnostic tests for COVID-19 are indicated in patients considered suspicious cases. Molecular methods, such as real-time RT-qPCR used to determine E and RdRP regions are the most recommended test for direct virus detection. Rapid antigen detection tests are more sensitive than rapid antibodies tests, which have shown a high percentage of false negative results within 7 days of symptom onset. In the middle of the global quarantine, SARS-CoV-2 virological and transmission characteristics studies contribute to a better understanding about COVID-19 immunopathogenesis, viral vaccine development, rapid diagnostic tests more sensitive and effective therapeutic protocols.

**Key words:** Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, Replication, Transmission, Diagnosis.

### Introducción

Los coronavirus son un grupo de virus ARN envueltos que infectan mamíferos y aves, causando principalmente enfermedades respiratorias y

gastrointestinales. La familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, comprende 4 géneros: alfa, beta, gamma y delta (1). Se han descrito cuatro miembros de esta familia viral, responsables de infecciones agudas leves del tracto respiratorio

superior en humanos, tales como los alfacoronavirus: HCoV-229E, HCoV-NL63 y los betacoronavirus: HCoV-OC43 y HCoV-HKU1, los cuales pueden causar enfermedades tipo gripe o neumonía, cuya prevalencia es cosmopolita (1,2). Sin embargo, dos variantes de coronavirus zoonóticos que originan enfermedades graves en humanos emergieron, causando un problema de salud pública: La primera constituye el agente responsable del síndrome agudo respiratorio severo (SARS-CoV) originado como salto zoonótico a través del contacto y la ingesta de murciélagos, adaptado a un hospedador intermediario (la civeta de palma) al sureste de China en Noviembre de 2002, produciendo un brote epidémico que se propagó con rapidez a otros países, caracterizado por una elevada transmisión entre humanos (8422 casos confirmados) y una tasa de mortalidad de 11% (3). Ningún caso de SARS fue reportado a partir del año 2004. La segunda variante viral es la responsable del síndrome respiratorio del Medio Este (MERS-CoV), un brote de neumonía severa, confinado a la península arábiga con casos esporádicos en otras partes del mundo, comenzó en Arabia Saudita en Junio de 2012, teniendo como reservorio el camello y el murciélago y a diferencia de la epidemia de SARS no se transmitió de manera eficiente por contacto entre humano, originando poco más de 2000 casos a nivel global y una mayor tasa de casos fatales (34%) (4).

A finales de 2019, emerge una nueva variante de coronavirus, responsable de una infección respiratoria aguda grave (IRAG) de elevada morbilidad y mortalidad, reportado originalmente en la Ciudad de Wuhan, Provincia de Hubei, China. Debido a que es un virus nuevo para el cual no existe inmunidad preexistente en la población humana, se expandió rápidamente a nivel global, transformándose en una pandemia(5). En febrero de 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) anunció la denominación del virus como coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) y la OMS nombró la enfermedad como enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19, por sus siglas en inglés)(6,7). Análisis por comparación de secuencias genómicas entre SARS-CoV-2 y otros coronavirus, incluidos aquellos reportados en animales sugieren al murciélago como el reservorio clave y principal fuente zoonótica de esta variante viral (8). El SARS-CoV-2 es un virus nuevo perteneciente a la

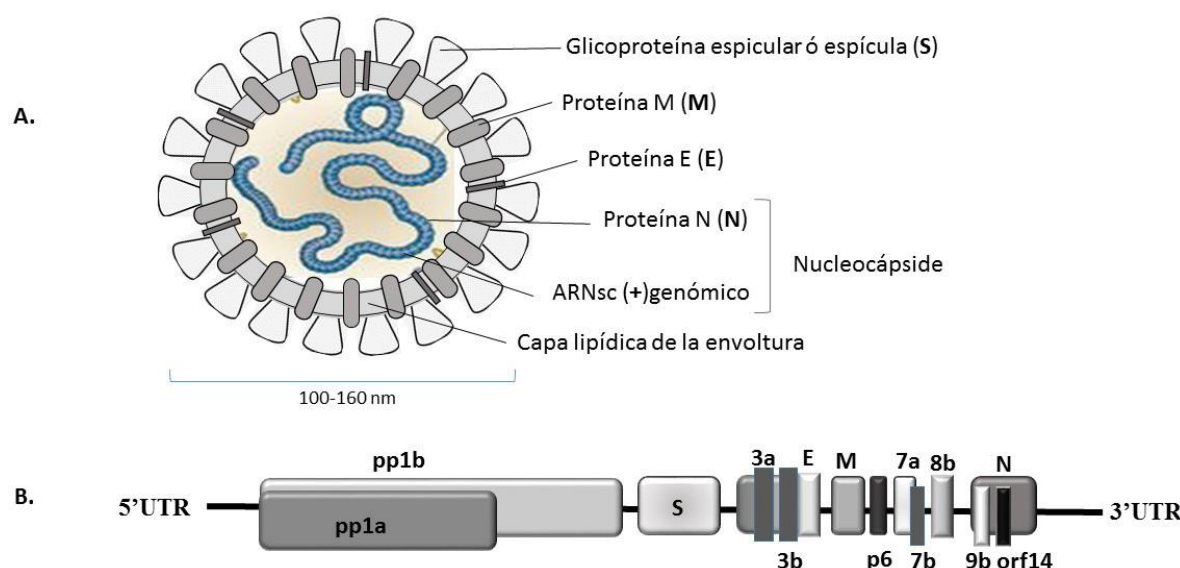
subfamilia *Orthocoronavirinae* género *Coronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus* (beta-coronavirus, beta-2b) y dentro de ellos al clado o linaje 2, que está mucho más próximo genéticamente a los coronavirus de los murciélagos que del SARS humano. Debido al patrón de expansión pandémica a nivel mundial que ha exhibido el SARS-CoV-2 en pocos meses, diversos grupos de investigación se han abocado al desarrollo de pruebas moleculares y rápidas para su diagnóstico a nivel de laboratorio así como la investigación de prospectos de vacunas y diversos protocolos terapéuticos (9,10,11).

A continuación se tratarán aspectos relevantes sobre las características biológicas generales de los Coronavirus, en especial del SARS-CoV-2, ciclo de replicación, aspectos relevantes de su transmisión así como de su diagnóstico a nivel de laboratorio.

### **Características estructurales y organización genómica de los coronavirus:**

Los coronavirus son partículas esféricas o pleomórficas de gran tamaño, entre 80 y 120 nm de diámetro. Bajo el microscopio electrónico la superficie del virión presenta dos proteínas transmembranas tipo I, constituidas por la glicoproteína trimérica S, espiga o peplómero y una hemaglutinina-esterasa (HE), observada esta última en algunos betacoronavirus, tales como: HCoV-OC43 y HCoV-HKU1. La proteína S está compuesta de dos subunidades funcionales: S1 (bulbo) y S2 (tallo), involucrados en los procesos de adhesión, fusión y entrada del virus en la célula hospedera. La envoltura viral está constituida por la glicoproteína de membrana (M), la estructura proteica más abundante incrustada a través de tres dominios transmembrana y la proteína de envoltura (E), transmembrana, presente en una menor proporción. Finalmente, la proteína de la nucleocápside (N) se une al genoma de ARN a modo de cuentas de un collar, formando una nucleocápside simétrica helicoidal (Figura 1A) (12).

El genoma de los coronavirus consiste en una hebra de ARN no segmentado, sentido positivo, ARN(+) de gran tamaño (27 a 32 kb) (Figura 1B). El ARN genómico contiene múltiples marcos abiertos de lectura (MALs), es poliadenilado hacia el extremo 3' y presenta una caperuza metilada hacia el extremo 5'. La organización genómica viral presenta el siguiente



Adaptado de: Abduljalil JM, Abjuljalil BM, 2020 (12)

Figura 1. Estructura viral y organización genómica del SARS-CoV-2

A) Estructura del virión. B) Organización del genoma del SARS-CoV-2.

Se muestra los 14 MALs. MALs: Marco abierto de lectura. UTR: Región no traducida, siglas en inglés

orden: 5'-replicase-S-E-M-N-3' con numerosos MALs que codifican proteínas accesorias, dispersos entre los genes estructurales. La replicasa de los coronavirus es codificada por dos grandes MALs (MALs1a y MALs1b), abarcando cerca de los dos tercios del genoma (Figura 2) (13). Estudios recientes han demostrado que la organización genómica del SARS-CoV-2 presenta 14 MALs: Los dos primeros MALs hacia el extremo 5' son regiones no codificantes para la poliproteína (pp1a/ab) requerida para la replicación viral, seguido de los MALs que codifican a las proteínas estructurales: Espícula (S), membrana (M) y nucleoproteína (N). Hacia el extremo 3' se ubican los genes que codifican proteínas accesorias (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b y orf14) (Figura 1B). Las proteínas accesorias no son requeridas para la replicación viral u otras funciones conocidas (8).

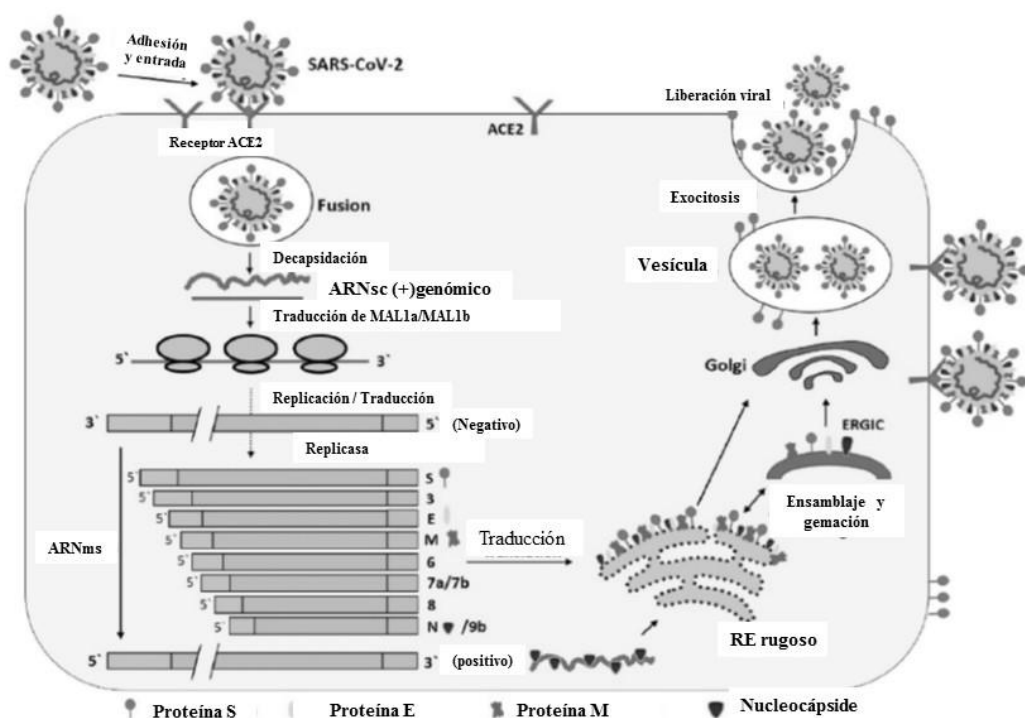
### Ciclo de replicación de los coronavirus:

El SARS-CoV-2 infecta y se replica de forma eficiente en los neumocitos, macrófagos y células dendríticas de las partes más profundas del parénquima pulmonar en las que reside el receptor celular ACE-2 (angiotensin converting enzyme II) que es utilizado

por este virus para unirse a estas células e iniciar el proceso infeccioso.

La replicación de los coronavirus se inicia por la unión de la proteína S a receptores presentes en la superficie de la célula (Figura 2)(14). Algunos coronavirus han adoptado como receptores enzimas de superficie celular, tales como la aminopeptidasa N (APN) para HCoV 229E, enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) para HCoV-NL63, SARS-CoV y SARS-CoV-2 y la dipeptidilopeptidasa 4 (DPP4) para MERS-CoV mientras que HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 usa un receptor con ácido siálico 9-O-acetilado (13).

Un estudio reciente, indica la posibilidad de que una única mutación en la posición N501T de la proteína S1 pueda incrementar de forma significativa la capacidad para unirse al receptor ACE2; debiendo monitorizarse la evolución de la misma (9). Así mismo ha comprobado, de acuerdo con la afinidad de la proteína S1 por el ACE2, que el SARS-CoV-2 no es capaz de infectar a la civeta (reservorio del SARS-CoV) ni tampoco a los ratones, por ello no se podrán utilizar como modelos experimentales salvo que se modifiquen genéticamente. Los animales que sí han mostrado capacidad para ser infectados por el SARS-CoV-2 son los cerdos, hurones y primates



Adaptado de: Muhammad AS *et al.* 2020 (8)

Figura 2: Ciclo de vida del SARS-CoV-2.

ACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2. RE: Retículo endoplásmico.

ERGIC(siglas en inglés): Complejo intermedio retículo endoplásmico-Golgi

no humanos, de modo que podrían ser huéspedes intermediarios y/o modelos de experimentación(15).

La interacción específica entre la subunidad S1 de la proteína S y el receptor dispara un cambio conformacional drástico en la subunidad S2, permitiendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular y la entrada del virus por endocitosis (Figura 2). El clivaje S1/S2 de la proteína S del coronavirus es mediada por una o más proteasas celulares. La fusión de la membrana ocurre típicamente en el endosoma, liberando la nucleocápside en el citoplasma, ocurriendo luego una decapsidación. El ARN genómico (ARNg) sirve como molde para la traducción de las poliproteínas replicasas virales pp1a y pp1ab, las cuales son clivadas por proteasas virales en proteínas más pequeñas no estructurales (nsps, en inglés) que inducen el rearrreglo de la membrana celular a vesículas de doble membrana (DMVs, sigla en inglés), donde se anclan los complejos de replicación y transcripción viral (RTCs, siglas en inglés). Posteriormente, el MALs que codifica a la polimerasa viral es traducido

directamente a partir del ARN(+) genómico y esta enzima genera una hebra de ARN(-) intermediario y un grupo de ARN subgenómicos (ARNsg) por transcripción discontinua, ya que entre cada MALs hay una secuencia intergénica repetida UCUAAAC la cual interactúa con la transcriptasa, haciendo que la secuencia patrón sea leída y escindida sucesivamente en cada MALs, fenómeno que favorece la recombinación genética. Estos ARNsg codifican las proteínas estructurales y accesorias virales. El ensamblaje del virión ocurre en el complejo intermedio retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC), luego las partículas virales geman a partir del ERGIC y los viriones maduros son transportados en vesículas de pared lisa a través de la vía secretora para su liberación por exocitosis al exterior de la célula hospedera (Figura 2) (13).

### Aspectos epidemiológicos del SARS-CoV-2:

El virus se transmite de persona a persona a través de gotitas respiratorias mayor de 5 micras de la



tos o el estornudo de una persona infectada que se encuentren a una distancia menor a dos metros y así ingresa a los pulmones por inhalación bien sea por la nariz o la boca. Existe evidencia que la conjuntiva ocular puede ser una puerta de entrada alterna del virus. Las partículas virales en suspensión pueden contaminar el entorno del paciente (muebles, pasamanos, botones de ascensores, ropa, etc) así como artículos de uso frecuente que pueden fungir como fómites (llaves, celulares, carnets, carteras, billeteras, juguetes, etc) y persistir viables desde horas hasta días dependiendo de la superficie impregnada. No se descarta la posibilidad de la transmisión fecal del virus (5). A diferencia del SARS-CoV, donde solo las personas sintomáticas transmitían el virus, en el caso del COVID-19 se ha demostrado que personas infectadas asintomáticas, incluyendo infantes, pueden transmitir la infección viral, dificultando las medidas de prevención. No obstante, el SARS-CoV-2 ha mostrado una estabilidad similar al SARS-CoV en condiciones experimentales, indicando que las diferencias en las características epidemiológicas entre ambos virus pueda deberse a otros factores como una elevada carga viral que permita al virus permanecer viable e infeccioso por horas en aerosoles y por días en superficies y fómites, así como explicaría la capacidad de ser transmitido por individuos infectados sin síntomas (16). La recombinación genómica encontrada en la región que codifica la glicoproteína S, la cual muestra una secuencia mixta de SARS-CoV ó CoVzC45 con la región RBD de otro coronavirus Beta CoV, pudiera ser la razón del salto zoonótico de animales como murciélagos, pangolines, entre otros al humano y la rápida expansión de la infección (8).

El SARS-CoV-2 ha infectado a la fecha muchas más personas que sus predecesores (más de 3 millones y medio de personas) a nivel mundial. La presencia del virus en la orofaringe con elevada carga viral, incluso antes de la aparición de los síntomas, aunque sin una demostrada capacidad replicativa en esta zona, es la que determina la transmisibilidad del virus, asociada a los mecanismos que facilitan su expansión como la tos, estornudo, expectoración, fómites y el contacto directo a través de las manos con la persona infectada. Investigaciones han analizado la carga viral del SARS-CoV-2 en la faringe y fosas nasales de personas sintomáticas y no sintomáticas han observado que las cargas virales más elevadas se detectan a partir del momento de inicio de los

síntomas, siendo mayor en las fosas nasales. La carga viral de las personas asintomáticas es muy similar a la de los sintomáticos y puede persistir en algunas ocasiones hasta 5 días o más, lo cual apoya la posible transmisión eficiente de este tipo de personas (15,17).

La transmisibilidad de una enfermedad infecciosa se define por lo que conocemos como su tasa reproductiva o  $R_0$ . En el caso del SARS-CoV-2, el  $R_0$  está entre 2,4 a 3,3, indicando que en promedio una persona infectada transmite el virus a tres personas sanas. Este número es dos a tres veces mayor que el  $R_0$  calculado para el virus de la influenza estacional, lo que explica el rápido crecimiento de la pandemia del COVID-19. Este valor es parecido al SARS ( $R_0$  2-5) y mucho mayor que el del MERS ( $R_0$  <1), pero el número de personas infectadas por nuevo coronavirus por transmisión interhumana es unas 3-10 veces superior que los virus previos (17).

Desde los meses iniciales de la pandemia, la tasa de morbilidad de Influenza estacional es mayor que la del COVID-2019, sin embargo, la letalidad de COVID-2019, estimada con base en las tasas más bajas en China excluyendo Hubei son de 42 veces hasta al menos 3 veces más altas que las de la Influenza estacional (1,18,19).

Se han presentado algunas evidencias que el SARS-CoV-2 puede producir infección intestinal y estar presente en las heces, especialmente a los 4-5 días de inicio de los síntomas (20). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha notificado transmisión fecal-oral.

Se ha encontrado pacientes con COVID-19 en diversos grupos etarios, predominando en edades comprendidas entre 30-79 años (86,6%) con una edad media de 55 años. Los síntomas principales son fiebre (87,9%), tos seca (67,7%), linfopenia (82,1%), disnea, y neumonía en su forma grave; mientras que la diarrea es infrecuente. La tasa de letalidad global se sitúa en el 3,6% en China y es del 1,7% y en ascenso los casos detectados fuera de este país (21). El período de incubación se ha establecido en unos 3 días (intervalo 0-24 días) (17,21). El análisis clínico y epidemiológico posterior de 1.099 casos confirmados por laboratorio ha mostrado que la edad media de los pacientes es algo menor (47 años) y que el 58,1% son hombres. De ellos solo el 1,18% habían tenido contacto directo con animales silvestres, un 31,3% eran residentes de Wuhan y un 71,8% eran

contactos con personas de esta ciudad (22). Un estudio realizado en China sobre 72.314 pacientes, de los cuales solo el 61,8% fueron confirmados por el laboratorio, el 22,4% eran casos sospechosos, el 14,6% casos diagnosticados clínicamente y el 1,2% asintomáticos; el 80,9% se consideraron como casos moderados o leves, el 13,8% graves y el 4,7 muy graves, de los cuales fallecieron el 2,3%. Se infectaron 1.716 trabajadores de la salud con un 0,3% de letalidad (20).

### Diagnóstico de laboratorio de COVID-19:

Las pruebas de laboratorio para COVID-19 van dirigidas a aquellos individuos que se ajusten a la definición de casos sospechosos, una vez descartada la Influenza y la Influenza Aviar, según lo establecido por la OMS (23, 24, 25). Entran en la definición de casos sospechosos:

- Persona con infección respiratoria aguda (IRA), quién presente fiebre y un signo o síntoma de enfermedad respiratoria (tos, dificultad para respirar), sin otra etiología que explique la clínica e historial de viaje o haber vivido en país, área o territorio con transmisión local de COVID-19 durante 14 días previos al inicio de síntomas.
- Persona con IRA que tuvo contacto con caso confirmado o probable de COVID-19, durante 14 días previos al inicio de los síntomas.
- Paciente con IRAG (grave) que presente fiebre y un signo o síntoma de enfermedad respiratoria (tos, dificultad para respirar), que requiere hospitalización y sin otra etiología que explique la clínica.

### Toma de muestras:

De acuerdo a los requerimientos establecidos por la OMS para uso de equipos de protección personal (EPP) para el SARS-CoV-2 en establecimientos de salud, las muestras deben ser tomadas por personal capacitado bajo las debidas normas de bioseguridad, incluyendo el uso de los equipos de protección personal adecuados, según precauciones estándar de contacto y transmisión aérea. En particular, el uso de una higiene de manos adecuada, bata, respirador (N95 o FFP2), protección para los ojos (lentes) o faciales (protector facial) y guantes. Después de procesar las muestras, las superficies de trabajo

y el equipo utilizado deben descontaminarse con desinfectantes de uso hospitalario o de laboratorio debidamente registrado (26).

### Muestras respiratorias: Tipo, conservación y envío:

Las muestras recomendadas son las del tracto respiratorio inferior, incluidos el esputo, el lavado broncoalveolar y el aspirado traqueal en pacientes con enfermedad respiratoria severa (24, 25). No obstante, cuando la toma de una muestra del tracto respiratorio inferior no es posible, las muestras del tracto respiratorio superior (hisopados nasofaríngeo y orofaríngeo) combinados también son útiles, especialmente en caso de muestreo de contactos asintomáticos (25). Luego, los hisopos deben colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral. Las muestras respiratorias deben mantenerse refrigeradas (4-8 °C) y enviarse al laboratorio donde se procesarán dentro de las 24-72 horas de la toma. Si no se pueden enviar las muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -70 °C (o menos) hasta que se envíen (asegurando que se mantenga la cadena de frío) al laboratorio de referencia. Si los hisopos se colocaron en solución salina estéril en lugar de medio de transporte viral, el envío debe ser expedito (25).

### Otros tipos de muestra

El SARS-CoV-2 se ha detectado en otros tipos de muestras, como heces y sangre. Sin embargo, la dinámica viral en estas muestras no se ha caracterizado completamente (27). Un estudio reciente evidenció presencia de SARS-CoV-2 a través de determinación de carga viral en orina. En esta misma investigación se evidenció que la duración del SARS-CoV-2 es significativamente mayor en muestras de heces que en muestras respiratorias y en sangre (28). Las muestras de tejido pulmonar o del tracto respiratorio también pueden ser útiles para la detección molecular en casos fallecidos, siempre y cuando existan las condiciones apropiadas para realizar la autopsia, particularmente la protección respiratoria. Las muestras de sangre agudas y convalecientes podrían ser útiles a medida que un mayor número de pruebas serológicas de mayor sensibilidad y especificidad estén disponibles (25).

La OMS ha recomendado en una de sus directrices

que los laboratorios nacionales de referencia con capacidad para análisis moleculares de genomas virales deben continuar utilizando el algoritmo diagnóstico para vigilancia rutinaria de influenza y de los casos inusuales de IRAG (25).

## Ensayos de laboratorio

### 1. Métodos moleculares

De acuerdo a las directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el SARS-CoV-2 de la OMS, la confirmación rutinaria de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-qPCR (PCR cuantitativa con paso previo de transcripción reversa). Para tal fin, la OMS dispone de dos protocolos de diagnóstico molecular para los laboratorios nacionales de referencia con capacidad para realizar pruebas moleculares a nivel global, incluyendo los Centros Nacionales de Influenza (NIC) (25.).

El ARN se puede extraer de las muestras mencionadas anteriormente, utilizando cualquier protocolo estándar o estuche de extracción. En general, la etapa de lisis de la muestra en la extracción de ARN inactiva cualquier virus. Por lo tanto, las muestras después de la lisis se consideran generalmente como no infecciosas. La inactivación del virus COVID-19 a través de la lisis de la muestra se ha verificado para algunos kits comerciales (29).

El primer protocolo para la determinación molecular del SARS-CoV-2 puesto a disposición por la OMS fue desarrollado por el Instituto de Virología Charité – Universitätsmedizin Berlin en Alemania (30). El protocolo se basa en la detección por RT-qPCR en tiempo real de dos marcadores en el genoma del virus: el gen E, utilizado como tamizaje, seguido de la confirmación de los positivos al gen E a través de la detección del gen común de la ARN polimerasa (RdRP) utilizando las sondas P1 y/o P2. El ensayo E es específico para todos los virus relacionados con el SARS-CoV, entre ellos el SARS-CoV-2 y los virus de murciélagos relacionados, mientras que el ensayo RdRP con la sonda P2 detecta exclusivamente el genoma del SARS-CoV-2. La OPS / OMS ha distribuido reactivos específicos (cebadores, sondas y controles positivos) y protocolos de trabajo para estos ensayos a nivel mundial (25). La región NP ha sido utilizada igualmente para el diagnóstico

molecular específico del SARS-CoV-2 junto al gen E (31). Una vez que se expande la circulación del virus COVID-19 en un área o país dado, la OMS sugiere que ya no es necesario ejecutar la PCR para ambos genes por lo que se puede implementar la confirmación mediante la detección de un solo marcador genético, recomendando priorizar la detección del gen E ya que se ha demostrado presentar una sensibilidad ligeramente mayor, aunque cualquiera de ambos marcadores (E y RdRP) pueden ser utilizados (25).

Otros ensayos moleculares disponibles pueden realizarse en plataformas abiertas o cerradas con estuches que funcionan solo en sistemas automatizados. Algunos de estos ensayos han sido aprobados para su comercialización por autoridades reguladoras consideradas por la OMS y otros se encuentran en revisión.

En cuanto a la interpretación de los resultados obtenidos, la detección de actividad de replicación viral mediante determinación del material genómico del SARS-CoV-2 es específica, de modo tal que un resultado positivo confirma la detección del virus mientras que un resultado negativo no siempre significa la ausencia de infección por el virus responsable de COVID-19, debido a que diversos factores (calidad de la muestra, transporte, almacenamiento ó extracción de muestra deficiente, toma de muestra en una fase muy temprana o tardía de la infección, presencia de mutaciones en regiones genómicas analizadas) pueden influir en el resultado (25).

La RT-qPCR puede detectar ARN viral en hisopado nasofaríngeo, medido por el umbral del ciclo o Ct (número de ciclos de replicación necesarios para producir una señal fluorescente) desde unos días antes de la aparición de los síntomas hasta ser máxima alrededor del séptimo día y disminuyendo a partir de ahí hasta aproximadamente el final de la segunda semana (32). En casos de COVID-19 grave se han encontrado valores de Ct promedio entre 2.5 y 2.8 en hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos, siendo estos valores más bajos que los valores de Ct de los casos leves (21.48-30.76) (33). Por lo tanto, en los primeros días del periodo de incubación y tras la desaparición de los síntomas la carga viral es baja y puede no ser detectada por la PCR por estar por debajo del umbral de detección (32, 33). Los valores de Ct más bajos representan mayor carga de ARN viral (33). Un valor de Ct inferior a 40 se informa



clínicamente como PCR positivo (32). La positividad de la RT-qPCR disminuye más lentamente en el esputo y aún puede ser positiva después de 4 a 11 días de que los hisopos nasofaríngeos son negativos, pero no parece relacionarse con la gravedad clínica (34).

En un estudio de 205 pacientes con infección confirmada por COVID-19, la positividad de RT-qPCR fue más alta en muestras de lavado broncoalveolar (93%), seguida por esputo (72%), hisopo nasal (63%) e hisopo faríngeo (32%) (35).

## 2. Métodos inmunológicos.

Existen varios ensayos, unos para determinación de anticuerpos y otros para determinación de antígenos, tanto pruebas rápidas (inmunocromatográficas en su mayoría), como ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA, disponibles a nivel comercial.

### Determinación de anticuerpos:

Los ensayos inmunológicos para determinación de anticuerpos se realizan a partir de muestras de suero sanguíneo. Los inmunoensayos tipo ELISA para detección de anticuerpos inmunoglobulina M e inmunoglobulina G se ha diseñado utilizando la nucleoproteína (NP) del coronavirus del murciélago que presenta una identidad genética del 92% y no muestra reacción cruzada con la del resto de coronavirus 36. Este tipo de pruebas puede estar limitado debido a la reactividad cruzada con otros coronavirus que normalmente están presentes en la comunidad y que hacen difícil la interpretación de los resultados (37). Además, en la actualidad la dinámica de la respuesta y producción de anticuerpos durante las diferentes fases de la infección no está completamente establecida, lo cual limita aún más el uso de estas pruebas. Algunos estudios han demostrado que durante los primeros 7 días desde el inicio de síntomas, menos de un 40 % de pacientes presentan anticuerpos detectables (32,38). Así, estos ensayos no deben ser usados para descartar un caso durante los primeros días de enfermedad. Asimismo, la detección de anticuerpos después del día 7 solo indica contacto previo con el virus, pero no dice nada respecto a la presencia y excreción del virus. Los anticuerpos así detectados podrían resultar de una infección previa por otros

coronavirus y no de la infección aguda para la cual se está requiriendo el diagnóstico (31). En los casos negativos para las pruebas moleculares con un fuerte vínculo epidemiológico con la infección por SARS-CoV-2, el análisis de los sueros sanguíneos en pareja (fase aguda y convaleciente) podrían respaldar el diagnóstico (cambiar de negativo a positivo o  $\geq 4$  veces en el título). Cabe destacar que este resultado sería retrospectivo y demasiado tardío para la emisión de un diagnóstico (39).

Los anticuerpos se producen durante días o semanas después de la infección con el virus. La fuerza de la respuesta de anticuerpos depende de varios factores, como la edad, el estado nutricional, la gravedad de la enfermedad y ciertos medicamentos o infecciones como el VIH que inhiben el sistema inmunitario (39). Se han reportado pacientes con respuestas de anticuerpos débiles, tardías o ausentes (39, 40). Los estudios sugieren que la mayoría de los pacientes desarrollan respuesta de anticuerpos solo en la segunda semana después del inicio de los síntomas (40, 41). Esto significa que un diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 basado en la respuesta de anticuerpos a menudo solo será posible en la fase de recuperación, cuando muchas de las oportunidades de intervención clínica o interrupción de la transmisión de la enfermedad ya han pasado. Los inmunoensayos para determinación de anticuerpos son útiles en investigaciones de un brote en curso o en retrospectiva para estudiar el alcance de un brote, conocer los casos asintomáticos, para los estudios de seroprevalencia que evalúan la proporción de individuos en una población que tiene o tuvo exposición a COVID-19 y potencialmente para analizar el estado inmunitario del personal sanitario y guiar el regreso al trabajo como parte de las estrategias de desescalada o levantamiento del bloqueo (31). Mientras las pruebas moleculares indican la presencia del virus durante la infección, los anticuerpos contra el virus persisten cuando los pacientes se recuperan, por lo que las pruebas serológicas permiten conocer si una persona sintomática o no alguna vez estuvo infectada y para tener una mejor idea de la expansión real de la COVID-19 (42). Así mismo, se han sugerido para el diagnóstico de pacientes con presentación tardía en hospitales en conjunto con el diagnóstico de referencia. La OMS no recomienda el uso de este tipo de pruebas hasta el momento (25).



### Determinación de antígenos:

Las pruebas rápidas para determinación de antígenos se realizan a partir de muestras respiratorias provenientes del tracto respiratorio superior (nasofaríngeo u orofaríngeo) y se basan en ensayos inmunocromatográficos que utilizan anticuerpos monoclonales isotipo IgG anti-SARS-CoV-2 para la detección de antígenos del virus. Si el antígeno viral está presente en concentraciones suficientes en la muestra, se unirá a anticuerpos específicos fijados a una tira de papel encerrada en una carcasa de plástico y generará una señal visualmente detectable, típicamente dentro de los 30 minutos. Los antígenos detectados se expresan solo cuando el virus se replica activamente; por lo tanto, tales pruebas se utilizan mejor para identificar infecciones agudas o tempranas (25, 43).

Este tipo de prueba está indicada en el diagnóstico temprano de pacientes con síntomas clínicos de infección por COVID-19 y provee solo un despistaje inicial por lo que se sugiere realizar un método diagnóstico alternativo más específico para confirmar la infección por COVID-19 (43). Estas pruebas al igual que aquellas que determinan anticuerpos requieren ser evaluadas y validadas y no se recomiendan para diagnóstico clínico ni siquiera en casos de emergencia hasta tener un mayor número de evidencia sobre la utilidad operacional de esta prueba (25).

### Aislamiento viral:

Así mismo, se ha utilizado realizado el aislamiento del SARS-CoV-2 en cultivos celulares utilizando las líneas Vero y Huh7. El efecto citopático se detecta a los 3 días de incubación y puede detectarse mediante una inmunofluorescencia dirigida contra la NP, por lo cual ha sido sugerido como método diagnóstico. Sin embargo, los resultados obtenidos tardan varios días por lo que queda remitido su uso con fines de investigación (31, 42).

### Consideraciones finales:

El SARS-CoV-2 es un virus reciente de rápida propagación que ha confinado al mundo en una cuarentena que lleva varios meses, debido a una

pandemia que ha infectado a millones de personas y provocado casi 300.000 defunciones a nivel global hasta la fecha. La determinación de la carga viral en muestras respiratorias ha permitido explicar en parte, la elevada capacidad de transmisión del nuevo coronavirus. La evaluación de dicha carga en distintos momentos del curso de la infección por SARS-CoV-2, inclusive en individuos en vías de recuperación contribuirá a una mayor comprensión en casos de posibles recaídas en pacientes presuntamente “recuperados”.

Se han descrito más de cien protocolos con diversas combinaciones de fármacos con resultados variables (44). Hallazgos de interés en la inmunopatogenia viral, tales como la linfopenia y la inducción de una respuesta hiperinflamatoria a expensas de una “tormenta de citoquinas” en pacientes infectados han puesto en jaque la eficacia de muchos de estos tratamientos en los pacientes con COVID-19 grave (45, 46). Si bien el sistema inmunitario se ha asociado a la severidad de la enfermedad, éste juega un papel fundamental en la recuperación del paciente y el establecimiento de una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos protectora, quedando aún por dilucidar el tiempo exacto de duración de dicha protección. Las pruebas para detectar respuestas de anticuerpos al COVID-19 en la población serán críticas para apoyar el desarrollo de vacunas y para aumentar nuestra comprensión del alcance de la infección entre las personas que no se identifican a través de la búsqueda activa de casos y los esfuerzos de vigilancia y la tasa de ataque en la población. Actualmente, existen seis protocolos de prospectos de vacunas en fase experimental en humanos tras un proceso acelerado de diversos grupos de investigación a nivel mundial en la búsqueda de prevenir la infección (47). El estudio de tratamientos antivirales específicos en combinación con otros fármacos eficaces de acuerdo con la presentación clínica de la COVID-19 podría contribuir a la erradicación del virus. Se requieren de futuras investigaciones a fin de dilucidar otras posibles rutas de transmisión viral y el impacto de la diversidad genética del SARS-CoV-2 a la luz de la evolución en la aparición de síntomas atípicos de COVID-19 y la repercusión de todos estos aspectos en el desarrollo de pruebas inmunológicas más sensibles para determinación de antígenos que permitan obtener resultados en menos tiempo, así como de nuevas drogas y vacunas contra la

infección. Cada día aprendemos algo más del nuevo coronavirus, sumando conocimientos a nivel virológico, epidemiológico, clínico y diagnóstico en base a las evidencias de diversas investigaciones tras un esfuerzo extraordinario mientras la pandemia continúa en pleno desarrollo.

## Referencias bibliográficas

- Hui D, Zumla A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. *Infect Dis Clin North Am* 2019;33(4):869-889. doi: 10.1016/j.idc.2019.07.001.
- Masters PS. Coronavirus Genomic RNA packaging. *Virology* 2019;537:198-207. doi: 10.1016/j.virol.2019.08.031.
- Chan-Yeung M, Xu RH. SARS: Epidemiology. *Respirology* 2003;8(Suppl 1):S9-14. doi: 10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x.
- Azhar EI, Hui DSC, Memish ZA, Drosten C, Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am* 2019;33(4):891-905. doi: 10.1016/j.idc.2019.08.001.
- Esparza J. COVID-19: Una pandemia en pleno desarrollo. *Gac Méd Caracas* 2020;128(1):1-7.
- Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5:536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- who.int/es [homepage on the Internet] Brote de enfermedad por coronavirus (COVID-19) [actualización del 25 de Febrero 2020; citado 28 de Febrero 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
- Muhammad AS, Suliman K, Abeer K, Nadia B, Rabeea S. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human Coronaviruses. *J Adv Res* 2020;24:91-98. doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.
- Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* 2020;30(3):269-271. doi: 10.1038/s41422-020-0282-0.
- Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents* 2020;20:105949. En prensa. 2020. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105949.
- Haiou L, Yunjiao Z, Meng Z, Haizhou W, Qiu Z, Jing L. Updated approaches against SARS-CoV-2 Antimicrob Agents Chemother 2020;64(6):e00483-20. doi: 10.1128/AAC.00483-20.
- Abduljalil JM, Abduljalil BM. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. *New Microbes New Infect* 2020;35:1-8. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100672.
- Fung TS and Liu DX. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol* 2019;73:529-557. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115759.
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Rev* 2019;17:181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.
- Li X, Zai J, Wang X, Li Y. Potential of large "first generation" human-to-human transmission of 2019-nCoV. *J Med Virol* 2020;92:1-7. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25693>.
- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-1567. doi: 10.1056/NEJMc2004973.
- Munster VJ, Koopmans M, van Doremalen N, van Riel D, de Wit E. A novel coronavirus emerging in China. Key questions for impact assessment. *N Engl J Med* 2020(8);382:692-694. doi: 10.1056/NEJMp2000929.
- Rísquez A, Márquez B. Proyecciones de epidemia en Venezuela por Coronavirus 2019 y sus preparativos para el 5 de Marzo de 2020. *Rev de la Fac de Med* 2020;43(1): 7-19. [Citado 13 abril 2020] Disponible en: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_fmmed/article/view/17952/144814484363](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_fmmed/article/view/17952/144814484363)
- Gralinski LE, Menachery VD. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 2020;12:135. doi: 10.3390/v12020135.
- Zhang Y, Chen C, Zhu S. Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory-confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19). *China CDC Weekly*. 2020;2(8):123-124. [Citado 13 abril 2020] Disponible en: <http://weekly.chinacdc.cn/en/article/id/ffa97a96-db2a-4715-9db-ef662660e89d>.
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu F, Gong F, Han Y, *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020;395:507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, *et al.* Clinical features of patients with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
- who.int/es [homepage on the Internet] Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV) [actualización del 15 de Enero 2020; citado 3 de Marzo 2020]. Disponible en: [https://www.who.int/who-documents-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(ncov\)](https://www.who.int/who-documents-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(ncov))
- who.int [homepage on the Internet] Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. [actualización del 19 de Marzo 2020; citado 5 Abril 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
- paho.org/es [homepage on the Internet] Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el Virus COVID-19 [actualización del 30 de Marzo 2020; citado 4 Abril 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con>

- virus-covid-19
26. paho.org/es [homepage on the Internet] Requerimientos para uso de equipos de protección personal (EPP) para el nuevo coronavirus (2019-nCoV) en establecimientos de salud - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. [actualización del 19 de Febrero 2020; citado 1 Abril 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/requerimientos-para-uso-equipos-proteccion-personal-epp-para-nuevo-coronavirus-2019-ncov>
  27. De Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(8):523-534. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
  28. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q *et al.* Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 2020;369:m1443. doi: 10.1136/bmj.m1443.
  29. fda.gov [homepage on the Internet]. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RTPCR Diagnostic Panel, Instructions for Use. [actualización del 30 de Marzo 2020; citado 15 Abril 2020] Atlanta: CDC; 2020. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
  30. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25(3):1-8. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
  31. Reina J. The SARS-CoV-2, a new pandemic zoonosis that threatens the world. *Vacunas* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2020.03.001>
  32. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 2020:E1-E3. doi:10.1001/jama.2020.8259.
  33. Zou, L Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, *et al.* SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. Editor's Note. *N Engl J Med* 2020;382(12):1177-1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737.
  34. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller M, *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020;581(7809):465-469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
  35. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Guizhen W, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* 2020;323(18):1843-1844. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
  36. Chan J, Yuan S, Kok K, To K, Chu H, J. Yang, *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020;395:514-523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
  37. Meyer B, Drosten C, Muller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res* 2014;194:175-183. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.018
  38. Juanjuan Z, Quan Y, Haiyan W, Wei L, Xuejiao L, Yingying S *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020;ciaaa344. doi: 10.1093/cid/ciaa344.
  39. Gorse GJ, Donovan MM, Patel GB. Antibodies to coronaviruses are higher in older compared with younger adults and binding antibodies are more sensitive than neutralizing antibodies identifying coronavirus-associated illnesses. *J of Med Virol* 2020;92(5):512-517. doi: 10.1002/jmv.25715.
  40. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W *et al.* Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 2020;58(6):e00461-20 doi: 10.1128/JCM.00461-20.
  41. Zhang W, Du R, Li B, Zheng X, Yang X, Hu B, *et al.* Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* 2020;9(1):386-389. doi: 10.1080/22221751.2020.1729071.
  42. medrxiv.org [homepage on the Internet]. Lassaunière R, Frische A, Harboe ZB, Nielsen ACY, Fomsgaard A, Krogfelt KA, *et al.* Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. medRxiv [actualización del 9 de Abril 2020; citado 20 Abril 2020]. 2020; Disponible en: <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.20056325>
  43. who.int. [homepage on the Internet] Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19 [actualización del 8 de Abril 2020; citado 29 Abril 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>
  44. Viveiros SG y Santos WC. Clinical trials on drug repositioning for COVID-19 treatment. *Rev Panam Salud Publica* 2020;44:e-40. doi: 10.26633/RPSP.2020.40.
  45. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, *et al.* Clinical features of patients with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
  46. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* 2020;8(4):420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
  47. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner LV, Watkins SP, Carter L, *et al.* Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent Sci* 2020;6(3):315-331. doi: 10.1021/acscentsci.0c00272.