

¿Hay cabida para medir la inmunidad celular mediante un test cutáneo de hipersensibilidad retardada en la pandemia SARS-CoV-2?



YVELISE BARRIOS

Imunóloga, Hospital Universitario de Canarias, SC Tenerife



VICTOR MATHEU

Alergólogo, Hospital Universitario de Canarias, SC Tenerife

FERNANDO DÍAZ DE ESPADA

Jefe Servicio Inmunología (retirado), Clínica Puerta de Hierro, Madrid

El sistema inmunitario produce anticuerpos y diferentes linajes de células T en respuesta a la infección por SARS-CoV-2. El desarrollo de pruebas fiables para detectar estas diferentes ramas de la respuesta inmune ha sido el objetivo de muchos grupos de investigación en estos dos últimos años. En esta ocasión, nuestro objetivo es resumir los aspectos generales para comprender las ventajas de la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada desarrollada por nuestro grupo, adaptada al estudio de esta pandemia. Desde el punto de vista clínico es un método simple y muy informativo para medir tanto las respuestas de las células T después de la infección por SARS-CoV-2 como después de la administración de la vacuna.

Antecedentes Históricos

Las respuestas inmunitarias mediadas por células son el resultado de complejas interacciones entre las células presentadoras de antígenos que captan y presentan antígenos extraños en una forma restringida por MHC, al TCR de los linfocitos T. A esta fase de reconocimiento le sigue la activación celular, elaboración de mediadores solubles, proliferación y si procede, actividad citotóxica/efectora. Muchas de las técnicas *in vitro* para la medida de las respuestas celulares se basan por tanto en "imitar" esta estimulación antigénica específica con incubación de las células durante 12-24 horas y posteriormente, detectar la actividad proliferativa o de secreción de ciertas citoquinas que se induce tras la activación celular. En general, para descartar una enfermedad que afecte al componente celular de la respuesta y que nos dé una falsa medida de un déficit de activación, se realiza en paralelo una estimulación con un mitógeno que podamos considerar como control positivo. Todos estos métodos, en su diferentes variantes, exigen por tanto un laboratorio

con cierta sofisticación y un personal especialmente "entrenado" en la realización de estas técnicas celulares que no está disponible en la mayor parte de los laboratorios asistenciales hospitalarios. Esto normalmente no es un gran inconveniente, puesto que sabemos que las inmunodeficiencias primarias son enfermedades que impactan en una población minoritaria, y por tanto, su estudio se circunscribe a laboratorios especializados.

En la segunda mitad del siglo XX se aceleró el conocimiento científico sobre la naturaleza y la patogenia de una serie de inmunodeficiencias primarias hereditarias, pero fue la aparición del HIV, con su impacto devastador en el funcionamiento del sistema inmunitario de los pacientes afectados, la que obligó a la actualización de los protocolos de estudio de la inmunidad de forma que pudiesen ser aplicados en el contexto de una pandemia que afectó a millones de pacientes en todo el mundo. En este ámbito de infección en grandes grupos poblacionales es cuando se pensó en la utilidad de métodos de medición bastante automatizados en su manera de aplicación y que permitían obtener información sobre una gran gama de estímulos antigénicos habituales para la población a estudiar. El mejor ejemplo de tal dispositivo fue el Multitest CMI.

Este dispositivo utilizaba un aplicador propio Multitest IMC® de resina acrílica, precargado con siete antígenos y un control, para la punción múltiple, con la parte destinada a la parte proximal de la punción acabada en "T". Cada cabeza contiene un antígeno en solución glicerinada al 70% (tétanos, difteria, estreptococo grupo C, tuberculina, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Proteus mirabilis* y un testigo a base de glicerina). La técnica de aplicación consiste en limpiar cuidadosamente la superficie volar del antebrazo, teniendo en cuenta que la piel debe estar sana. Tras retirar los capuchones de cada cabeza precargada con un movimiento



ondulante para que se empapen de la solución con el antígeno, se aplica firmemente y rotándolo a derecha e izquierda con la parte en T hacia la cabeza del sujeto, ejerciendo una presión homogénea en las ocho cabezas. Tras su aplicación el paciente no debe cubrir ni lavar la zona en al menos una hora y debe leerse a las 48 horas. Con este dispositivo, y de una manera muy práctica, se procedía a la clasificación clínica del paciente HIV en función del número de pruebas “positivas”, permitiendo una anticipación en el pronóstico inmediato en cuanto a la preservación del compartimento T de los pacientes más afectados.

¿Es relevante medir la respuesta celular en infección por SARS-CoV-2?

En diciembre de 2019 se empiezan a describir los primeros casos de neumonía en la región de Wuhan, China. Posteriormente por parte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus fue denominado un nuevo virus de la familia coronavirus (CoV) y el síndrome asociado como síndrome respiratorio agudo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Desde entonces, el virus se ha extendido provocando una epidemia mundial que hasta este momento tiene cientos de millones

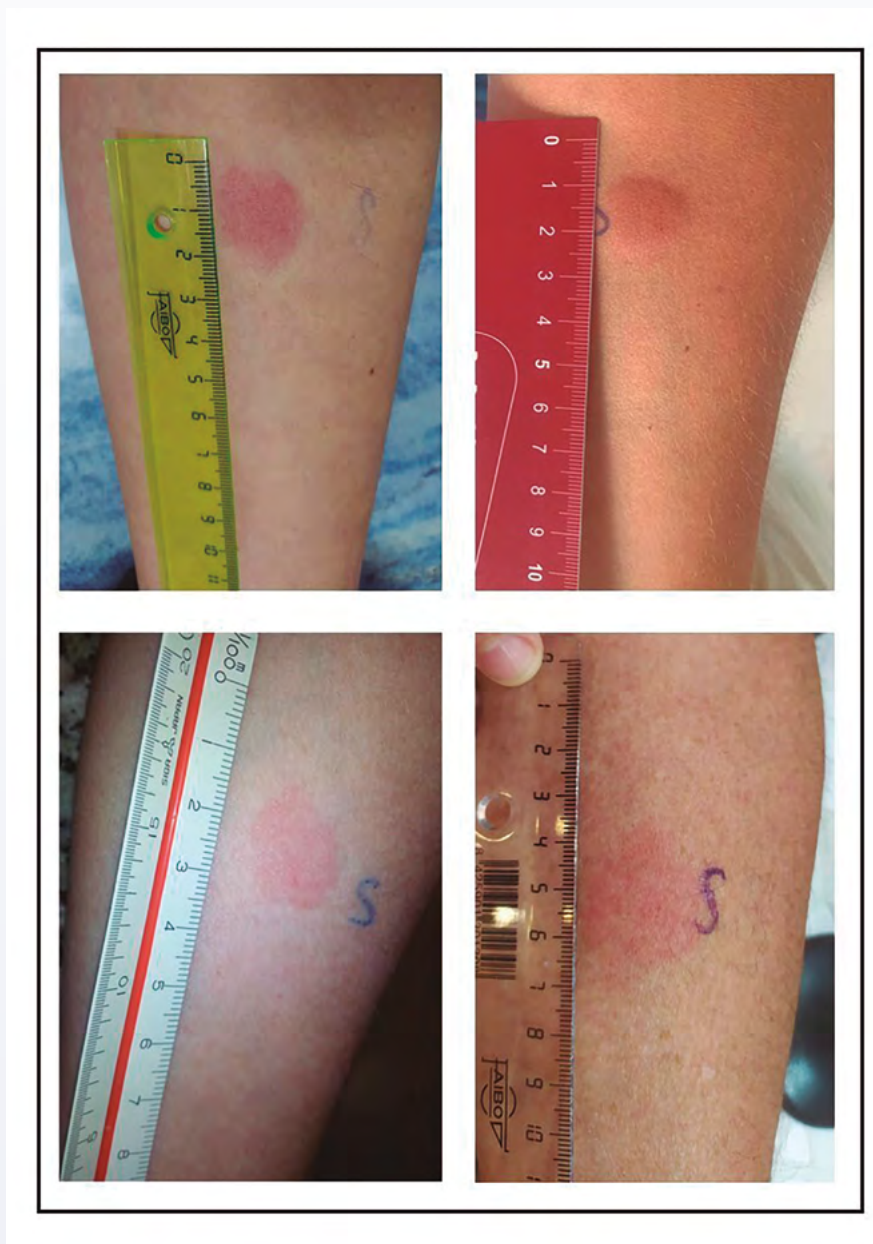


Imagen 1. Fotografías enviadas por los participantes en el estudio. Se visualiza la zona de punción en el brazo después de 48 h de la aplicación intradérmica en cuatro individuos inmunocompetentes dos semanas después de la pauta completa de diferentes vacunas COVID-19. Arriba izquierda: Comirnaty (Pfizer); arriba derecha: Spikevax (Moderna); abajo izquierda vacuna de Janssen; abajo derecha: Vaxzevria (Astra-Zeneca).



de afectados y un número de fallecidos cercano a los seis millones (<https://ourworldindata.org>). Durante los primeros meses se describió con detalle este patógeno, y en un periodo breve de tiempo se concretó la región inmunodominante (diana fundamental de la respuesta inmunitaria) del mismo (1). Esta región está situada en la proteína “spike” (S) del virus, y en concreto, en la región de unión al receptor por el que tiene la puerta de entrada a las células del huésped (RBD-receptor binding domain).

La descripción de la diana de la respuesta inmunitaria en individuos contagiados permitió el desarrollo de numerosas pruebas para estudiar de forma masiva la cinética y característica de la respuesta inmunitaria frente al patógeno. Estas pruebas iniciales se basaron en el estudio de la respuesta inmune humoral, esto es, la detección de los anticuerpos circulantes en el suero de los individuos afectados por la enfermedad (2). Tras muchos meses de controversias producida por la pobre calidad de los primeros ensayos que llegaron al mercado, se lograron pruebas de medida de la respuesta de anticuerpos que son fiables, con alta especificidad y sensibilidad, y alguno de ellos con una excelente correlación con pruebas de medida de capacidad neutralizante de anticuerpos (3, 4). Sin embargo, medir la respuesta inmune de los individuos contagiados sólo en función de la presencia de anticuerpos circulantes es claramente deficitario (5).

Las pruebas serológicas para anticuerpos anti-SARS-CoV-2 pueden no predecir con precisión la magnitud y durabilidad de la respuesta inmune mediada por células T al SARS-CoV-2 (6), particularmente en pacientes inmunocomprometidos con deterioro de la función de las células B (7, 8). Estudios recientes han demostrado que las respuestas de las células T son marcadores más sensibles de infecciones pasadas por SARS-CoV-2 en comparación con respuestas de anticuerpos y se postula que representan un correlato de la inmunidad protectora (9, 10). Además, las respuestas de células T son más sólidas que las respuestas de anticuerpos en convalecientes con infección leve o asintomática por COVID-19 (11, 12). Por lo tanto, la evaluación de la respuesta de células T para SARS-CoV-2 es necesaria para estudiar a las personas en cuanto a la respuesta inmunitaria mediada por células contra el SARS-CoV-2 como evidencia de infección pasada y respuesta inmune a la vacunación (13).

Bases inmunológicas de la reacción de hipersensibilidad retardada

De las 4 categorías fisiopatológicas de hipersensibilidad propuestas por Philip Gell y Robert Coombs en 1963, la IV o retardada, así llamada por visualizarse su reacción a partir de las 12 horas del estímulo antigé-

nico, es la única operada por la rama celular del sistema inmune, y la que presenta mecanismos efectores más complejos. En consonancia con las otras categorías, las reacciones inmunes contempladas como tipo IV en la clasificación de G&C pueden considerarse como beneficiosas en el control de infecciones provocadas por virus y bacterias intracelulares. Por ello, las pruebas in vivo (test cutáneos) que revelan las reacciones de hipersensibilidad tipo IV se usan tanto para el diagnóstico de pacientes que han sufrido un episodio de hipersensibilidad como para investigar el status inmune de un individuo en respuesta a determinadas infecciones.

En una reacción tipo IV prototípica, tras la aplicación intradérmica de un antígeno en un individuo previamente sensibilizado, la infiltración local de elementos celulares hace emerger a las 24-48 horas una hinchazón con eritema e induración fácilmente observable y cuantificable.

Dependiendo de la naturaleza de la sensibilización antigénica previa, diferentes tipos de células T pueden implicarse en la respuesta local, permitiendo subdividir las reacciones de tipo IV en los subtipos a (TH1), b (TH2), c (TH17) y d (T8). El antígeno captado por células fagocíticas es presentado a linfocitos T $\alpha\beta$ de memoria residentes en la piel y con fenotipo efector, que se activan y orquestan el influjo de otros tipos celulares que amplifican el daño tisular tras la liberación de citoquinas y enzimas lisosomales (subtipos IVa, b y c). En el influjo celular predominan los monocitos (subtipo a), eosinófilos (subtipo b) o neutrófilos (subtipo c). En el subtipo IVd, linfocitos T citotóxicos participan directamente en la lisis de las células diana. La reacción producida en una prueba cutánea que emplee proteínas purificadas como estímulo antigénico se corresponde principalmente con el subtipo IVa.

Motivación, desarrollo y validación de la aplicación de la DTH en COVID

Durante los meses críticos de la situación de pandemia de COVID, fue necesario pensar en algún enfoque práctico para diagnosticar la exposición al SARS-CoV-2 en individuos inmunocomprometidos que no eran capaces de producir anticuerpos debido a su defecto inmunológico subyacente. Dado que los pacientes con inmunodeficiencia humoral son las presentaciones más frecuentes de situaciones de inmunodeficiencia primaria y secundaria, faltaban pruebas específicas para analizar este subgrupo de personas infectadas por COVID mediante las pruebas ELISA convencionales desarrolladas en ese momento. Para superar esto, nuestro grupo clínico de PID (14) desarrolló una prueba cutánea Covid-Specific basada en RBD de la proteína spike del SARS-CoV-2 (Covid-CELL). Toda la investigación se realizó de acuerdo al



protocolo aprobado por el comité de ética del Hospital (CHUC_2020_92) y de acuerdo con los requisitos expresados en la Ley 737/2015 sobre investigación biomédica y la Declaración de Helsinki (revisada Brasil, octubre de 2013).

Hasta este momento nuestro grupo ha publicado los resultados de la aplicación de la DTH en pacientes que habían pasado la infección (15), en trabajadores sanitarios vacunados (16), en pacientes trasplantados renales (17) y en pacientes con inmunodeficiencias primarias (18). En estos estudios se ha correlacionado el resultado obtenido con la determinación de IgG específica frente a la misma proteína viral y/o estudios in vitro de medida de concentración de IFN-gamma tras estímulo con la proteína S. En nuestras manos, este test in vivo parece más representativo de la inmunidad global puesto que la presentación antigénica proporcionada por células profesionales del individuo analizado consigue una estimulación más fisiológica de las células T específicas para esta proteína del virus.

Muchos aspectos biológicos de la prueba deben investigarse más a fondo. Por ejemplo, ampliar el catálogo de estímulos antigénicos con un sistema parecido al multitest pero específico para distintas partes del virus, la influencia del diámetro y la cinética de la reacción en la distinción de respuestas inmunes naturales vs las obtenidas por vacunación, la correspondencia con las pruebas IGRA disponibles para mejorar la definición de corte de pruebas positivas, la correlación con la protección a contagio y clínica grave-hospitalización, posible influencia fenómeno boost, etc... También hay muchos detalles tecnológicos que podrían abordarse en los próximos meses como el tratamiento digital de las imágenes pero también trabajar en algoritmos automáticos que permitan procesar los datos masivos que podrían ser necesarios para manejar en estudios de inmunogenicidad realizados en grandes poblaciones. La realización de estudios longitudinales y multicéntricos proporcionarán información en estas áreas.

Aplicación práctica y aplicación al panorama de la vacunación

Con las publicaciones de nuestro grupo hemos rescatado una prueba clásica de la inmunología para que pueda competir en el repertorio de métodos de vanguardia que nos permitirán conocer mejor este nuevo desafío de la pandemia del SARS-CoV-2.

La relevancia de este trabajo es la revisión de métodos más imaginativos y sencillos para afrontar el tremendo reto de esta pandemia y quizás también para futuros escenarios pandémicos que estén por venir. En este sentido y después de dos años, la situación de la pandemia ha cambiado radicalmente por la disponibi-

lidad de vacunas para reducir la carga de enfermedad grave y fallecimiento por COVID que nos abrumó en los primeros tiempos. Diferentes estrategias de vacunación han ido sucediéndose a lo largo de este último año, y la disponibilidad de una prueba cutánea de medida de la respuesta inmune generada por las vacunas es una excelente noticia puesto que una individualización de las pautas de inmunización es más realista si puede estar guiada por un método sencillo, barato y fácil de interpretar. Este aspecto es especialmente importante para la definición de aquellos pacientes que necesitarán otras aproximaciones terapéuticas que no pasen por la vacunación debido al padecimiento de enfermedades que impacten en el funcionamiento de su sistema inmunitario o por tratamiento inmunosupresor.

Conocer en profundidad las bases inmunológicas que fundamentan los métodos diagnósticos en el ámbito de la inmunología es una competencia esencial para la formación de los inmunólogos del futuro. El impacto mediático (publicación en periódicos, TV nacionales y locales, revistas divulgación) y en redes (>800.000 impresiones en Tweeter) que ha tenido la divulgación de este test refleja el interés que suscita entre los ciudadanos una solución imaginativa que ya podemos definir como un éxito de la inmunología asistencial española en esta pandemia. En los próximos meses esperamos que esté disponible en el mercado algún método basado en la DTH para seguir avanzando en su conocimiento y aplicación práctica.

Agradecimientos

A los componentes del Laboratorio de Inmunología, Dr. A. Franco y nuestra reciente incorporación, la Dra. S. Medina, el equipo de TEL (M. Romera, MJ. Placer, M. Padilla, G. Camacho) y administrativo (N. Arteaga), por su inestimable colaboración. En el S de Alergología, a la Dra. Cristina Álava, por su interés y participación activa. A los Servicios de Laboratorio Central, Neumología, Nefrología, Aparato Digestivo, Neurología y Hematología, así como a la Dirección Médica y Gerencia del Hospital Universitario de Canarias, por su apoyo. Queríamos agradecer especialmente a todos los participantes en los diferentes estudios porque sin ellos este proyecto no se podría haber llevado a cabo.

Financiación

SEaic Beca 20A4.

Conflicto de interés

Y.B. es Medical Advisor de Biovaxys. V.M y FDE no presentan conflicto de interés.

Y.B and V.M han registrado CoviDCELL®.



- 1 Keeton 1 Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann A, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol*. 2020 Jun 11;5(48):eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413
- 2 Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun*. 2020 Sep 17;11(1):4704. doi: 10.1038/s41467-020-18450-4.
- 3 Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020 Jul 1;370:m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516
- 4 Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28;71(15):778-785. doi: 10.1093/cid/ciaa310.
- 5 Cox RJ, Brokstad KA. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020 Oct;20(10):581-582. doi: 10.1038/s41577-020-00436-4.
- 6 Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021; 371: 10.1126/science.abf4063.
- 7 Ferguson J, Murugesan K, Banaei N, Liu A. Interferon-gamma release assay testing to assess COVID-19 vaccination response in a SARS-CoV-2 seronegative patient on rituximab: A case report. *International journal of infectious diseases*, 2021; 110: 229-31.
- 8 Abbasi J. The promise and peril of antibody testing for COVID-19. *JAMA*, 2020; 323: 1881-3.
- 9 Cox RJ, Brokstad KA. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nature reviews. Immunology*, 2020; 20: 581-2.
- 10 Cañete PF, Vinuesa CG. COVID-19 makes B cells forget, but T cells remember. *Cell (Cambridge)*, 2020; 183: 13-5.
- 11 Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020; 183: 158,168.e14.
- 12 Gallais F, Velay A, Nazon C, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion, france. *Emerging infectious diseases*, 2021; 27: 113- 21.
- 13 Ameratunga R, Woon S, Jordan A, et al. Perspective: Diagnostic laboratories should urgently develop T cell assays for SARS-CoV-2 infection. *Expert review of clinical immunology*, 2021; 17: 421-30.
- 14 Barrios, Y., Franco, A., Alonso-Larruga, A., Sánchez-Machín, I., Poza-Guedes, P., Gonzalez, R., et al. (2020). Success With Multidisciplinary Teamwork: Experience of a Primary Immunodeficiency Unit. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 30, 208-210.
- 15 Barrios, Y., Franco, A., Sanchez-Machin, I., Poza-Guedes, P., Gonzalez-Perez, R., & Matheu, V. (2021). A novel application of delayed-type hypersensitivity reaction to measure cellular immune response in SARS-CoV-2 exposed individuals. *Clinical Immunology*, 226, 108730.
- 16 Barrios, Y., Franco, A., Sánchez-Machín, I., Poza-Guedes, P., González-Pérez, R., & Matheu, V. (2021). The Beauty of Simplicity: Delayed-Type Hypersensitivity Reaction to Measure Cellular Immune Responses in RNA-SARS-Cov-2 Vaccinated Individuals. *Vaccines (Basel)*, 9, 575. doi:10.3390/vaccines906057.
- 17 Barrios Y, Rodriguez A, Franco A, Alava-Cruz C, Marrero-Miranda D, Perez-Tamajon L, Matheu V. Optimizing a Protocol to Assess Immune Responses after SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney-Transplanted Patients: In Vivo DTH Cutaneous Test as the Initial Screening Method. *Vaccines (Basel)*. 2021 Nov 12;9(11):1315. doi: 10.3390/vaccines9111315. PMID: 34835246; PMCID: PMC8620584.
- 18 Barrios Y, Alava-Cruz C, Franco A, Cuesta R, Camara C, Matheu V. Easy approach to detect cell immunity to COVID vaccines in Common Variable Immunodeficiency: DTH after COVID vaccines in antibodies deficiency. *Allergologia et Immunopathologia (IN PRESS)* 2022

