

ESTUDIO DE LAS PRUEBAS ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

INTRODUCCIÓN

La PCR: reacción en cadena de la polimerasa, es una prueba para uso en investigación por la que su descubridor, Kary Mullis, recibió el premio Nobel de química en 1993. Se basa en la propiedad del ADN de autorreplicarse, por lo que en determinadas condiciones un fragmento o secuencia de ADN se puede copiar y multiplicar hasta llegar a concentraciones mensurables.

Para el diseño de la PCR es preciso contar con una serie de reactivos entre los que destaca la enzima ADN polimerasa, nucleótidos (elementos básicos de construcción de los ácidos nucleicos) y cebadores o iniciadores (primers) que son pequeñas cadenas de ADN que si son específicas se unirán al ADN diana (para formar la doble hebra característica del ADN) y en condiciones propicias químicas y físicas, irán incorporando nucleótidos hasta amplificar la secuencia original.

Un ciclo de amplificación supone la copia inicial que se irá multiplicando de manera exponencial al repetir el nº de ciclos de amplificación.

La RT-PCR: cuando el material que se quiere amplificar es ARN es preciso realizar un paso previo que consiste en transcribir la información contenida en dicho ARN al ADN complementario en virtud de la complementariedad de las bases y por tanto, de los nucleótidos que forman ambos ácidos nucleicos.

La RT-qPCR: También llamada PCR cuantitativa o a tiempo real, consiste en una RT-PCR con la que además de identificar un fragmento de ARN se pretende cuantificar. Para ello se añade a los cebadores un reactivo más, una sonda (probe) que consiste en un oligonucleótido (secuencia corta de ADN específico) marcado con un colorante fluorescente que permitirá medir la señal por emisión de dicha fluorescencia si se une al objetivo buscado.

Las pruebas PCR que se están haciendo para la detección del sars-cov-2 son de este último tipo y siempre nos referiremos a ellas aunque se empleen indistintamente los tres términos.

1º) LA RT-qPCR COMO PRUEBA DE DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO

A) La especificidad de los test PCR depende de la prevalencia epidemiológica de la enfermedad Covid-19.

Aún suponiendo una alta especificidad a la enorme diversidad y calidad de los test RT-PCR que se han aplicado en España para el diagnóstico de la Covid-19, es preciso aplicar un cierto margen de error analítico (inherente a todas las pruebas de laboratorio) a dichos test PCR. Aspecto sobre el que ha incidido el matemático alemán Klaus Pfaffelmoser.

Este margen de error es de al menos 1,4% según estudios actuales (Zeichhardt et al. 2020) así que por cada 100.000 test se produciría una media de 1.400 personas que son identificadas erróneamente como infectadas (falsos positivos) o como falsos negativos. Esto es mucho más dramático teniendo en cuenta la consideración falaz de “**positivos asintomáticos**” ya que en un contexto clínico los signos y síntomas de la persona son el mejor indicador de covid-19.

Como consecuencia de este margen de error, en una población de 100.000 habitantes es preciso que se supere el nº de 1400 positivos o 1400 negativos para poder tomar con rigor decisiones epidemiológicas que afecten gravemente la libertad o derechos civiles de dicha población. Y en el caso concreto del sars-cov-2 habría que superar los 1400 casos positivos por 100.000 habitantes ya que, como demostraremos más adelante, el sesgo analítico está claramente inclinado hacia el falso positivo.

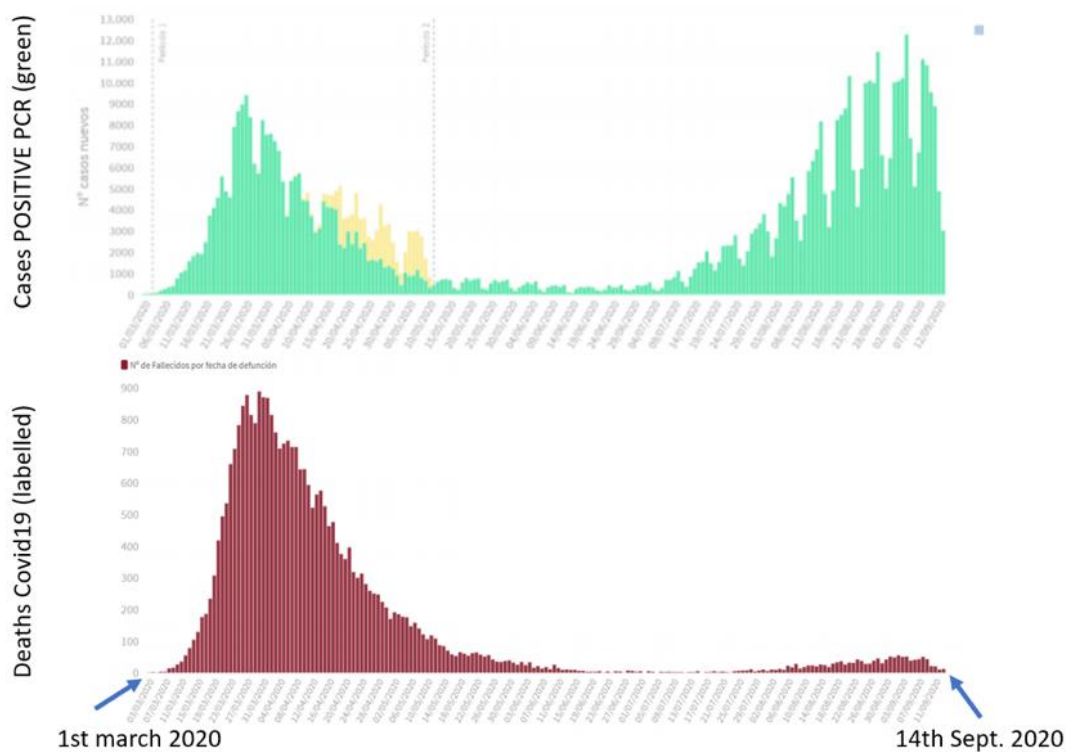
Las consecuencias de este uso masivo de test están siendo **extrapoladas abusivamente** desde el punto de vista epidemiológico, por políticos irresponsables, sin tener en cuenta el mencionado margen de error de las pruebas, para confinar a personas y municipios, privándoles de los más elementales derechos civiles, cuando el nº de positivos (la mayoría asintomáticos) no supera los 1.400 /100.000 habitantes.

B) El pico de positivos por PCR no conduce a un pico de muertes 10-20-40 días después

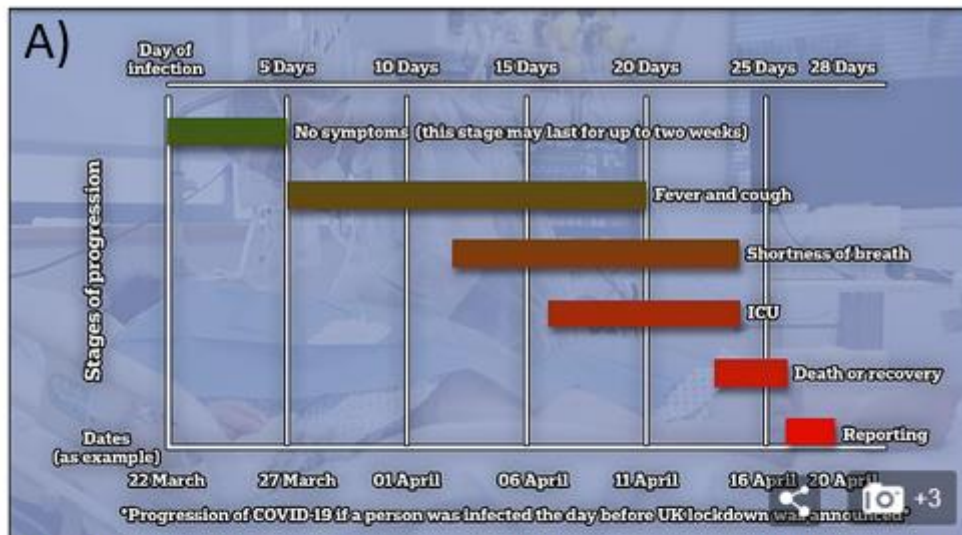
Si los positivos por PCR tienen algún poder predictivo sobre el número de muertes esperadas (lo único realmente preocupante en una epidemia) debería haber alguna correlación, es decir, cuantos más positivos por PCR para el Sars-cov-2 un día determinado, más muertes por covid-19 en un futuro próximo (presumiblemente entre 2 y 4 semanas después, que es la evolución clínica conocida de la enfermedad de curso grave).

Sin embargo, en el documento titulado **Positivos por PCR ¿qué significan?**, del 23 de septiembre de 2020 elaborado por el **Departamento de Física y Tecnología de The Artic University of Norway** se demuestra que los positivos por PCR no se correlacionan con el exceso de muertes en el futuro inmediato (se puede observar con claridad en las figuras 4 a 9 de dicho documento). (bibliografía doc-2)

En última instancia esto significa que los positivos por PCR no se pueden utilizar para saber si la pandemia está avanzando pues para eso entendemos que las muertes deben aumentar o mantenerse elevadas.



Positivos Figura 4. PCR en España (Top en verde) frente a muertes etiquetados como muertes Covid19 (marrón Bottom) de marzo al 14 ° de septiembre en España según el Ministerio de Salud. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_207_COVID-19.pdf



There can be a time lag of more than three weeks between someone becoming infected with coronavirus and dying. Symptoms take days - if not weeks - to become life-threatening. The death has to be recorded and reported, and the family notified, in a process that takes days

B)

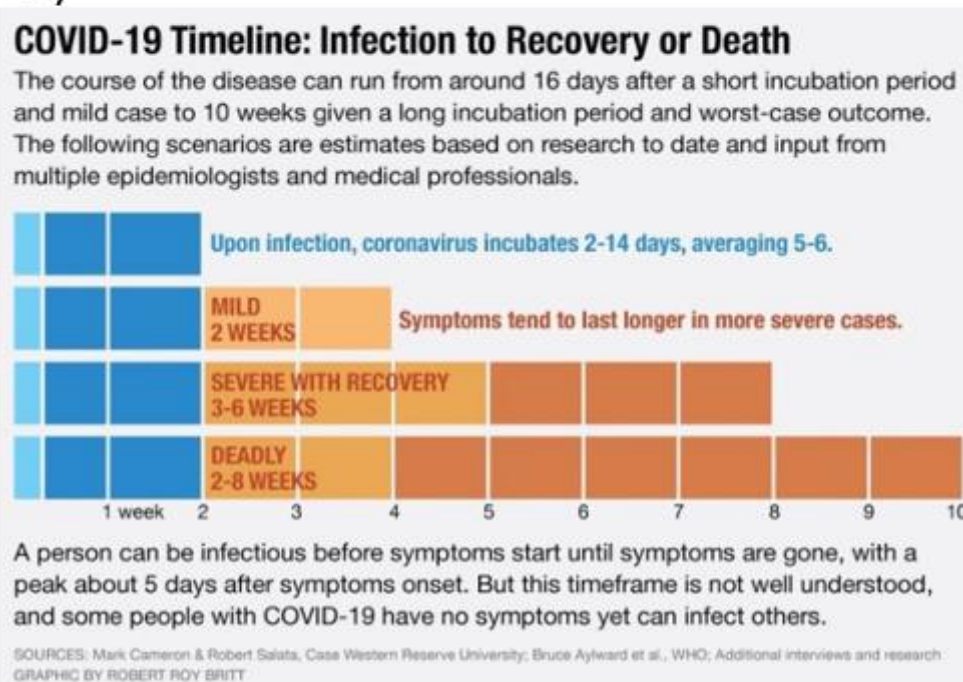


Figura 5. Secuencia de tiempo desde la infección hasta la recuperación o muerte por diferentes fuentes como en a) 4 semanas aprox. [8] y b) 2 a 8 semanas aprox. [9]

(los nºs entre corchetes corresponden a los artículos referenciados en el documento citado de la Universidad de Noruega)

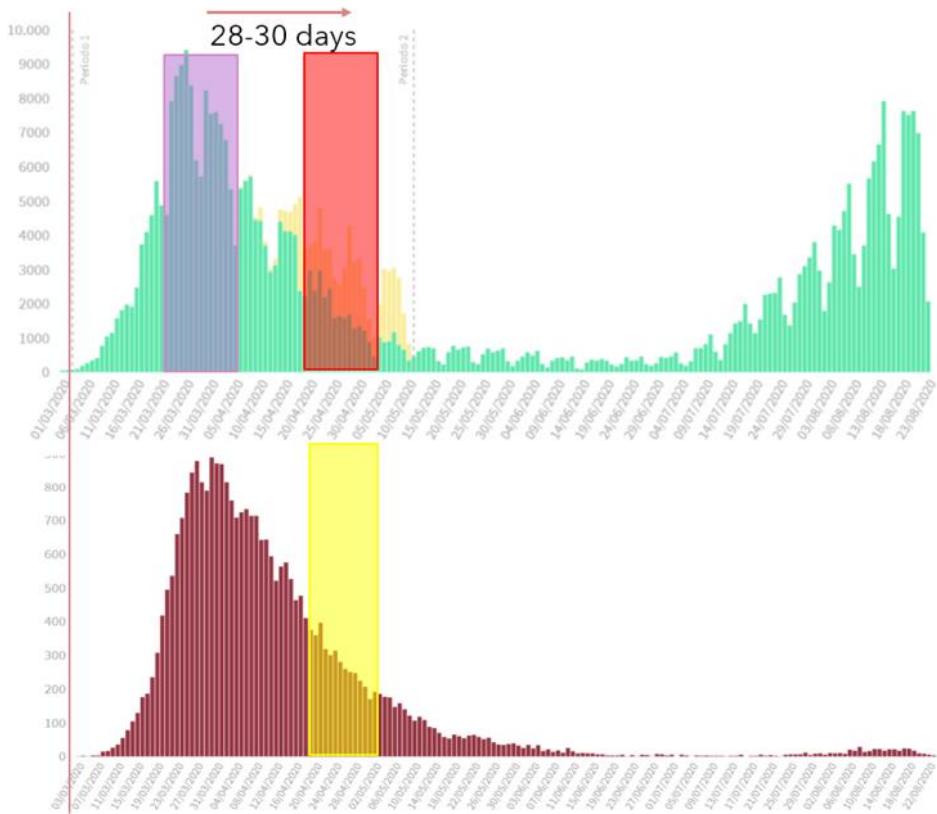


Figura 6. El pico de positivos por PCR en marzo-abril en España (parte superior verde) no conduce a un pico de muertes 20-40 días después (parte inferior marrón).

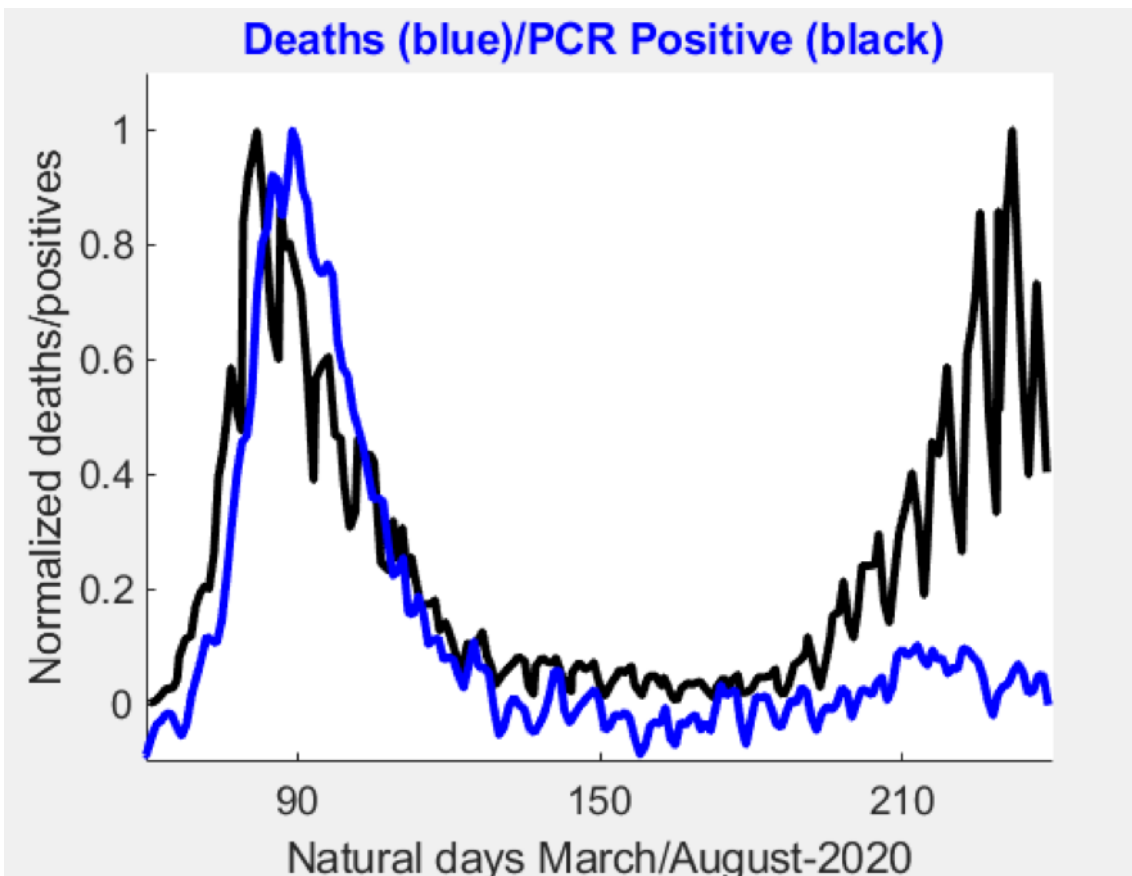


Figura 7. Exceso normalizado de muertes en España (azul) frente a positivos por PCR (negro).

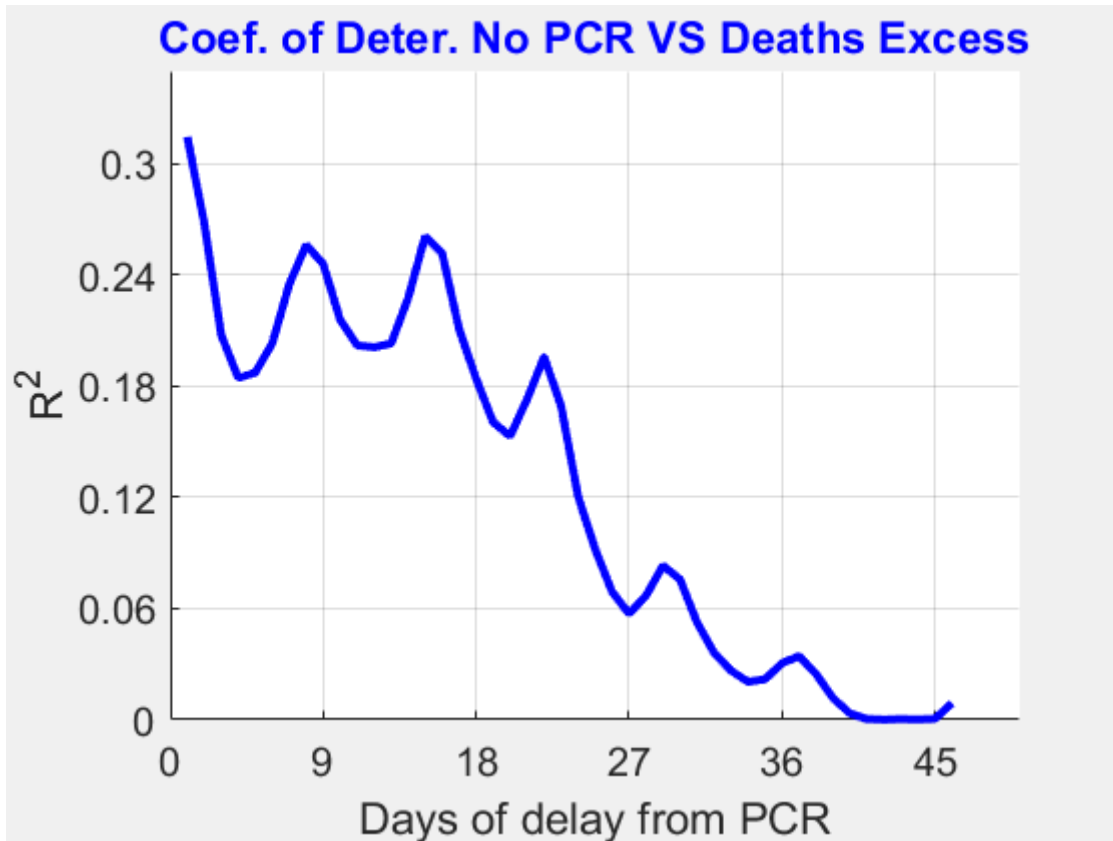


Figura 8. El eje x representa los días de retraso desde el número de PCR positivo registrado hasta el número de muertes en exceso. Por ejemplo, si los positivos de X PCR se registraran hoy, 27 días de retraso significarían que X se asigna al exceso de muertes 27 días después del registro de los positivos de PCR. El eje y da el coeficiente de determinación R^2 en función de los días de retraso. Los valores más altos corresponden a la proporcionalidad entre el exceso de muertes “hoy” y los “positivos por PCR hoy”, lo que implica que las pruebas de PCR carecen de poder predictivo por ser como máximo redundantes.

PCR and excess deaths recorded on the same days
May to end of August 2020 (Spain)

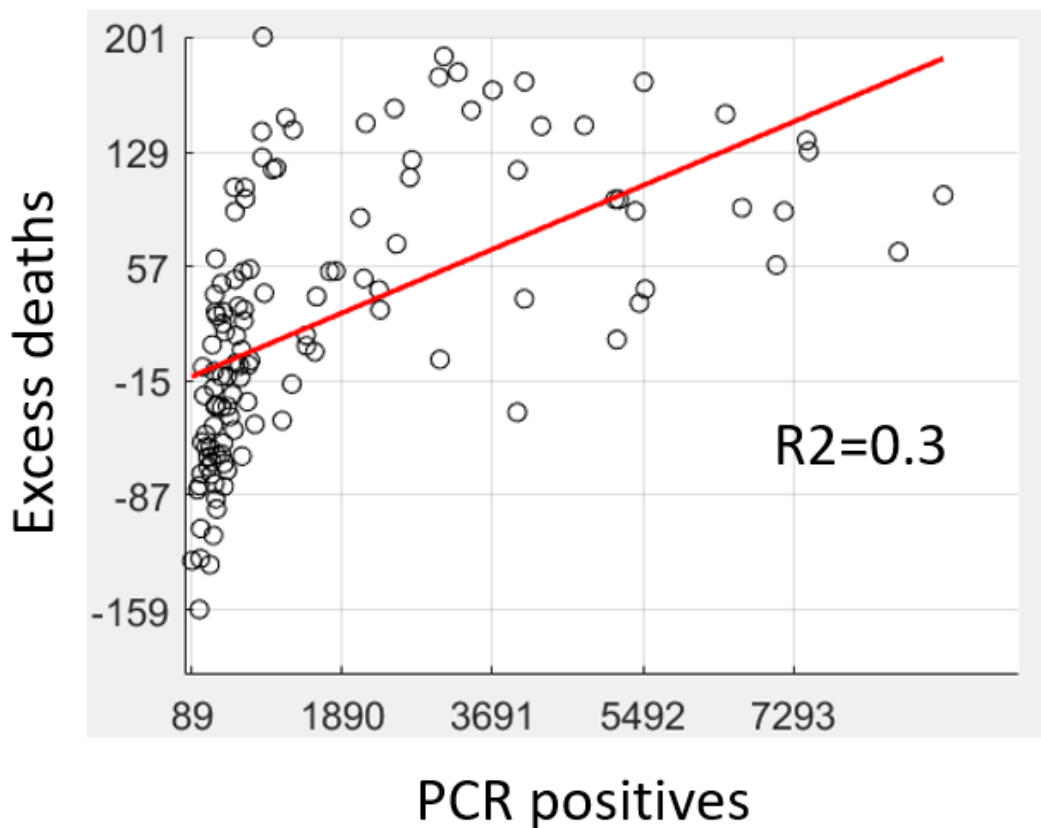


Figura 9. Diagrama de dispersión que muestra los positivos por PCR frente al exceso de muertes desde mayo hasta finales de agosto. El coeficiente de determinación R^2 es 0,3 y es más alto cuando se grafican los positivos de PCR registrados el mismo día en que se registran las muertes en exceso. La implicación es que los positivos por PCR no tienen "poder predictivo", ya que de esta manera no pueden predecir si el exceso de muertes seguirá a los positivos por PCR. Como se muestra en la Figura 8, cuanto más retraso le damos a la PCR en relación con el exceso de muertes, menor R^2 . Un retraso de al menos unos días o semanas sería significativo, ya que los gobiernos podrían "esperar" lo que vendrá en el futuro sobre la base del número de casos positivos de PCR registrados. Como se muestra, los positivos de PCR no se correlacionan con el exceso de muertes en el futuro y, por lo tanto, carecen de poder predictivo.

Lo mismo ocurre cuando se comparan resultados de la PCR versus mortalidad en los demás países europeos

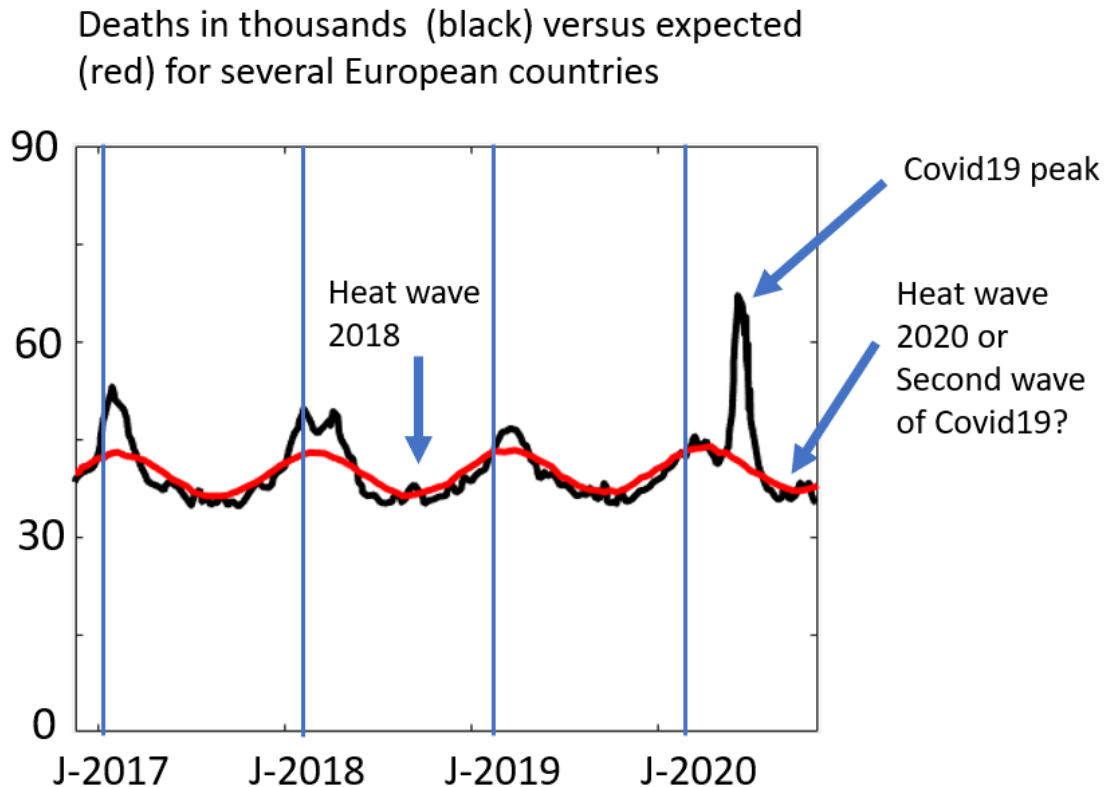


Figura 10. Muertes desde 2017 hasta septiembre de 2020 para varios países de Europa según lo registrado por euromomo.eu (<https://www.euromomo.eu/graphs-and-maps/>).

C) Un RT-PCR verdadero positivo no significa infecciosidad ni virulencia.

Un verdadero positivo en la PCR no significa una persona infecciosa ni capaz de contagiar, ya que la PCR solamente detecta pequeños fragmentos del genoma vírico (de menos de 200 nucleótidos cuando el virus tiene en torno a 30.000, concretamente la cepa de Wuhan tiene 29.903 nucleótidos).

La única forma de saber si un resultado PCR positivo corresponde a un virus infeccioso es mediante cultivo vírico en células especiales, para ello el espécimen obtenido del paciente PCR positivo debe inocularse, en el laboratorio especializado, al cultivo celular y observar citopatogenicidad en el mismo, es decir, muerte celular. Si esta citopatogenicidad no se observa es debido a que el virus no es infeccioso (virus viable o “vivo” aunque esta expresión es inadecuada ya que los virus son entidades inertes)

Los datos sobre cómo se relacionan los resultados de la PCR con los resultados del cultivo viral son escasos. Existe alguna evidencia de una cierta relación entre el tiempo transcurrido desde la recolección de una muestra hasta la prueba, la gravedad de los síntomas y las posibilidades de que alguien sea infeccioso.

Sobre este aspecto llama poderosamente la atención la **falta de estudios publicados y la escasa calidad de los mismos**. En uno de los estudios que encontramos (**Bullard et al**) investigó el cultivo viral en muestras de un grupo de pacientes y comparó los resultados con los datos de las pruebas de PCR y el tiempo de aparición de los síntomas.

Figura 1.

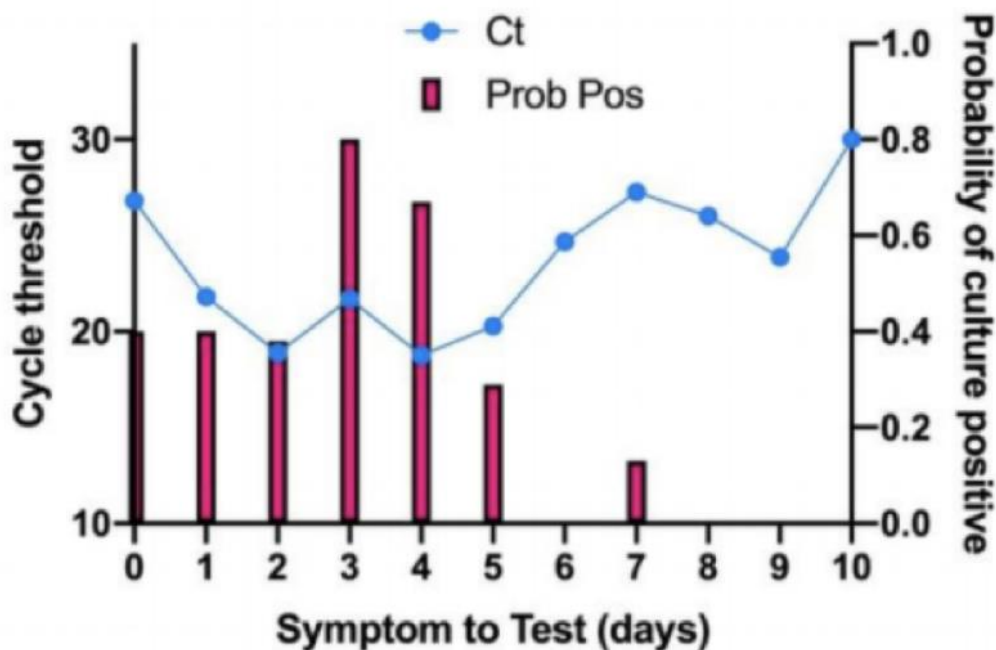


Figura 1. El tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la RT-PCR, o los síntomas hasta la prueba (STT), se calculó en base a los registros de laboratorio. La probabilidad de cultivar con éxito SARSCoV-2 en cultivo de células Vero en comparación con STT. La probabilidad de obtener un cultivo viral positivo alcanzó su punto máximo el día 3 y disminuyó desde ese punto. [6]

Como puede observarse en la gráfica, los días correspondientes al periodo de estado de la enfermedad covid-19, es decir, con mayor manifestación sintomática (días 3 y 4 desde el inicio de los síntomas) son los que mayor probabilidad tienen de generar un cultivo de virus infecciosos, mientras que, **a partir del día 8 la probabilidad de ser infeccioso es prácticamente nula**.

En la gráfica se observa que, sobre todo, si el nº de ciclos de amplificación de la PCR es elevado: **Ct mayor de 33 ciclos, la PCR seguirá dando positivo.**

Es de destacar que las pruebas PCR que se han realizado y se están realizando en España **tienen todas un Ct de entre 40 y 45 ciclos**, lo que como explicamos más adelante, es una aberración analítica.

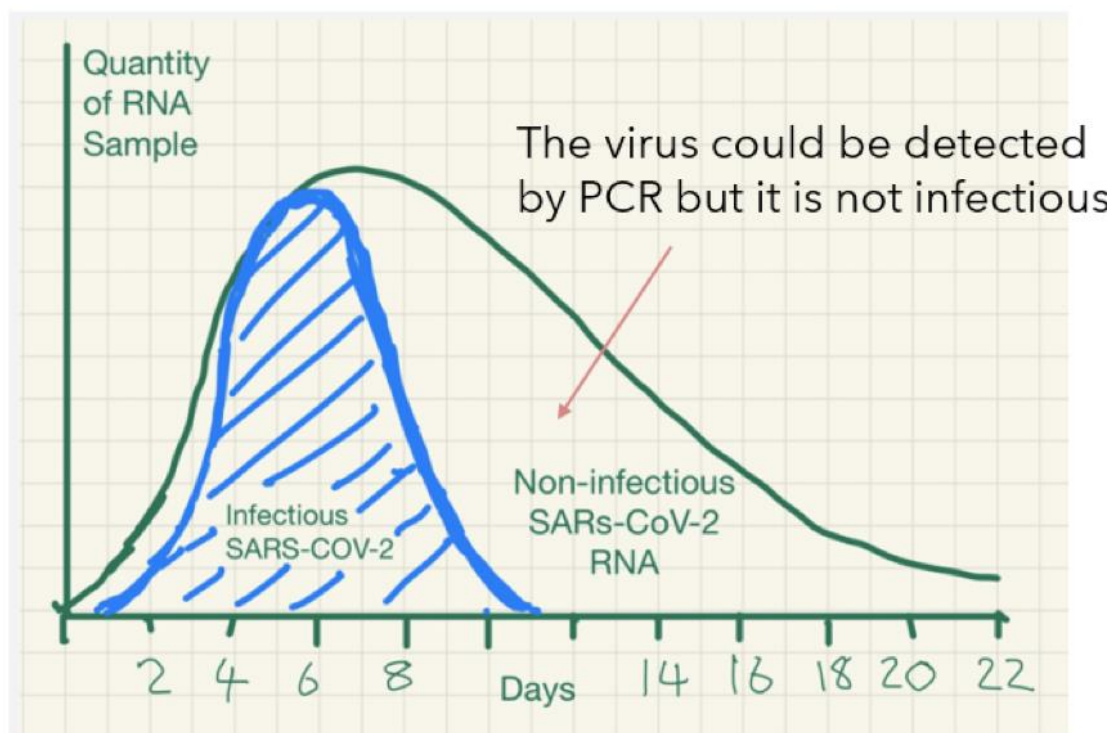


Figura 2. El área sombreada muestra que hasta X días, es decir, 10 días aproximadamente después de la infección, el virus es infeccioso. Pero el virus sigue presente muchos días después. Esto podría resultar en una PCR positiva, pero no significa que el virus sea virulento o infeccioso, más bien significa que los residuos y el ARN viral "no activo" todavía son detectables por PCR

Por esta razón **NO HAY JUSTIFICACIÓN BASADA EN LA CIENCIA** para mantener que los **asintomáticos, presintomáticos y convalecientes puedan contagiar**. Los estudios que así lo afirman están basados en suposiciones, elucubraciones y son de muy baja calidad.

Según datos obtenidos del **CEBM (Centro de Medicina Basada en la Evidencia) de la Universidad de Oxford** (revisiones de agosto y septiembre por Tom Jefferson et al):

“Hay muy pocos estudios que refieran cultivo del SARS-CoV-2, menos aún que aporten una referencia de algún valor entre la relación del diagnóstico realizado por test PCR y la infecciosidad en base a la prueba de citopatogenicidad en cultivo que es **“el único dato objetivo que permitiría valorar dicha infectividad.”**”

Además, **NO SE HA DETERMINADO LA DOSIS INFECCIOSA MEDIA**, es decir, la estimación de la cantidad de partículas víricas que, tras sucesivos pases en cultivo de tejidos son capaces de matar al 50% de las células de dicho cultivo. Esto es un verdadero sinsentido desde el punto de vista científico, ya que ese parámetro: **dosis infecciosa media**, es imprescindible para elaborar estándares de cuantificación adecuados para los test que pretendan determinar carga viral.

2º) CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Las especificaciones técnicas que definen una prueba de laboratorio son fundamentalmente su **sensibilidad y especificidad** que se relacionarán directamente con el **error o incertidumbre** de dicha prueba definidos como **imprecisión** (error aleatorio) e **inexactitud** (error sistemático).

SENSIBILIDAD: es el factor de respuesta del método o lo que es lo mismo, el cociente entre la variación de señal asociada a un determinado analito y la variación de su concentración o cantidad de un determinado patrón o estándar del mismo (si tuviésemos un solo patrón simplemente es el cociente entre señal debida al analito y concentración del mismo en la muestra o espécimen obtenido del paciente).

En el caso de la RT-PCR para detectar al Sars-cov-2 se debe comparar la posible presencia de un fragmento u objetivo vírico del Sars-cov-2 en la muestra tomada del paciente y una determinada cantidad conocida (o concentración conocida si se pretende cuantificar, es decir, medir carga viral) de un estándar del mismo fragmento vírico extraído de un cultivo de sars-cov-2

Como se ha dicho anteriormente **NO SE HA DETERMINADO LA DOSIS INFECCIOSA MEDIA** del Sars-cov-2 mediante cultivo celular, por lo que se carece de un verdadero estándar de cuantificación que, dicho sea de paso pero no menos importante, sería **EL VERDADERO GOLD STANDARD** o estándar de oro de la RT-PCR.

A pesar de que en varios medios se afirma sin rubor que la RT-PCR es el gold standard para Sars-cov-2, **una prueba nunca puede ser un estándar o referencia de sí misma** ¿pues con qué se la va a comparar para determinar su sensibilidad y especificidad? Para el Sars-cov-2 el único estándar de oro válido es el **CULTIVO DEL VIRUS** que es lo único que permite su estudio y determinación de su infecciosidad.

Para obviar este problema, no sabemos con qué objeto, se han utilizado, y se siguen utilizando (lo que tiene menos explicación, pues ya no se puede alegar urgencia) como estándares del virus, ARNs retrotranscritos in vitro, es decir fragmentos de ARN sintéticos obtenidos de bancos genómicos, que remedan

los objetivos o secuencias víricas que se quiere determinar. (una excusa que se ha puesto ha sido: para no manipular directamente el virus, pero se sabe que los virus fuera de las células no mantienen su infecciosidad y menos aún los de cadena de ARN inverso como es el caso del Sars-cov-2).

Precisamente a este respecto **los CDC** en el documento publicado el 13 de julio de 2020 reconocían “**no disponer de virus aislados cuantificados**” para poder determinar el límite de detección de las pruebas PCR.

El biólogo molecular y genetista argentino Luis Marcelo Martínez plantea un tema muy interesante: ¿Cómo es posible que siendo el Sars-cov-1 y el Sars-cov-2 tan coincidentes en su genoma como para que el 1º sirva de estándar en cuanto a la especificidad de la PCR del 2º, hayan tenido que tomar dicho estándar de transcripciones sintéticas de bancos genómicos? ¿por qué no existían líneas de cultivo celular del Sars-Cov-1?

Todo apunta a que en realidad los coronavirus tipo SARS son estructuras quiméricas de coronavirus y por ello inestables y difíciles de cultivar. Sólo en situaciones muy características, los virus endógenos salen de sus células (como por ejemplo durante el desarrollo embrionario). De ahí que el cultivo de virus como el de la gripe se haya hecho en embriones de pollo.

Según el ensayo publicado por el Instituto Pasteur, la RT-PCR diseñada para el Sars-cov-2, es una prueba muy sensible que puede detectar desde unas 100 copias del virus (límite de detección) pero para hacerla aún más sensible (detectar desde 10 copias) se pueden utilizar los ensayos multiplex, es decir, PCRs que contienen reactivos mezclados (cebadores y sondas) para más de un gen u objetivo vírico, de esta manera se minimiza mucho el nº de falsos negativos, pero **se puede aumentar extraordinariamente el nº de falsos positivos**, ya que como hemos dicho, una pequeña cantidad de copias víricas no significa infecciosidad, lo que han comprobado Tom Jefferson y colaboradores del CEBM mediante estudios con cultivos víricos en relación a la PCR.

PCR MULTIPLEX SEGÚN:

The MIQE Guidelines:

Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶ Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹² Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

La multiplexación requiere la presentación de evidencia que demuestre que la cuantificación precisa de varios objetivos víricos en un solo tubo no sufre deterioro, es decir, que la eficiencia de la prueba y el LOD (límite de detección)

son los mismos para cada uno de los objetivos virales amplificados que cuando estos mismos se realizan en uniplex (por separado).

Esta preocupación es de particular importancia cuando los objetivos virales de menor abundancia se coamplifican con objetivos muy abundantes. Por esta razón, para que un ensayo de este tipo tenga validez analítica es preciso:

Si hay dos o tres objetivos víricos diseñados en la PCR, **todos ellos deben tener aproximadamente el mismo límite de detección: LoD.** (no sería prueba válida si solamente se amplifica bien un objetivo y otro no). Cuando la señal emitida es la fluorescencia ligada a las sondas reactivas, la emisión de fluorescencia se debe producir en toda las sondas a la vez y con el mismo Ct, o sea, con el mismo n^o de ciclos de amplificación.

AMPLIFICACIÓN DE CICLO

Es el n^o de veces que se repite la amplificación del ADN para hacer que la posible presencia del objetivo diana sea perceptible. Es un factor clave en la sensibilidad de la prueba y debe estar perfectamente estandarizado de acuerdo a la dosis infecciosa media de un microorganismo, si se quiere establecer una correlación con la carga viral del mismo. En el caso que nos ocupa, del Sars-cov-2, establecida mediante cultivo celular. Como ya hemos comentado, **dicha dosis infecciosa media no se ha determinado.** Los únicos estudios que establecen una relación entre la posible carga viral de un enfermo con posibilidad de ser infecciosa, determinan que dicha carga viral debe ser lo suficientemente elevada como para que se pueda observar reacción positiva mediante fluorescencia en torno a los 20-25 ciclos de amplificación. El documento **Predicting infection Sars-cov-2 from diagnostic samples** dice en sus conclusiones que sólo se detectan fragmentos del virus si la PCR da positivo a los 24 ciclos de amplificación.

La guía **MIQUE** establece que una PCR por encima de 35 ciclos no es fiable y el mismo **Kary Mullis**, premio Nobel por descubrir la prueba PCR decía que si había que llegar a los 40 ciclos de amplificación algo estaba muy mal en esa PCR. Pues bien, nos consta que **todas las pruebas RT-PCR que se han hecho en España para Sars-cov-2 realizaban entre 40 y 45 ciclos de amplificación** Lo que para muchos autores supone un falso positivo.

En base a este estudio publicado en marzo 2020:

Cuantificación (carga viral) : An analysis of SARS-CoV-2 viral load by patient age

Terry C. Jones 1,2 , Barbara Mühlemann 1,3 , Talitha Veith 1,3 , Guido Biele 4 , Marta Zuchowski 5 , Jörg Hofmann 1,5, Angela Stein 5 , Anke Edelmann 5 , Victor Max Corman 1,3 , Christian Drosten 1,3

Cargas virales de 250.000 copias supondrían apenas un 5% de probabilidad de ser infecciosas (determinado mediante cultivo) lo que conlleva que una prueba que puede ser positiva con 100, e incluso con 10 copias de fragmentos del virus pueda interpretarse como un falso positivo.

ESPECIFICIDAD: también llamada selectividad. Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito (elemento o sustancia analizada) sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra.

La RT-PCR para el análisis del Sars-cov-2 fue diseñada inicialmente por el Dr. Christian Drosten del hospital de la Charité de Berlin. Este ensayo, publicado por **Corman et al. el 23 de enero de 2020**, se considera la prueba de referencia para dicho análisis, aunque después se han diseñado otros similares (Instituto Pasteur)

La PCR diseñada por Drosten tomó como referencia bancos de datos genómicos (Gene Bank), en particular los referentes al Sars-cov-1, puesto que en esas fechas aún no se había publicado la secuencia completa del genoma del Sars-cov-2 (por lo que nos consta que tiene interpuesta una demanda internacional).

Analizando el trabajo publicado sobre la RT-PCR de Drosten se determina en el mismo que la prueba está dirigida a tres objetivos de la secuencia genómica del virus (también llamados genes, aunque impropriamente). Dichos objetivos víricos son:

N gene, E gene, RdRp gene

Reconociéndose en dicho trabajo que los objetivos N gene y E gene, **no son específicos del Sars-cov-2** sino comunes a todos los sarbecovirus (pansarbeco). Para detectarlos mediante RT-PCR se diseñan dos cebadores (primers forward y reverse) y una sonda de fluorescencia (probe) para cada uno.

Mientras que el **objetivo RdRp sería específico para el sars-cov-2** y para el mismo se diseñan dos cebadores (primers forward y reverse), una sonda específica: Porbe2 y otra no específica o pansarbeco:Probe1

El objetivo vírico RdRp forma parte del marco abierto de lectura del virus denominado **ORF 1ab** y está comprendido entre los nucleótidos 15.361 y 15.460 del genoma del Sars-cov-2. Corresponde a ARN dependiente de ARN polimerasa, es decir a la parte del genoma vírico que codificaría la enzima necesaria para la replicación del virus, ya que el Sars-cov-2 es un virus de ARN de sentido inverso. Sin embargo, este fragmento del genoma vírico (RdRp) es común con todos los virus ARN de sentido inverso tales como los virus de la gripe (virus influenza y para-influenza), el VSR, virus del sarampión, parotiditis, etc, por lo que resultaba extraña la afirmación de Drosten de que dicho fragmento fuera específico del sars-cov-2.

Analizadas las fichas técnicas de varios kits de RT-PCR observamos que especifican que **SON SOLO PARA INVESTIGACIÓN** y que presentan interferencia con los citados virus y otros patógenos respiratorios. Es decir, reconocen **QUE NO SON ESPECÍFICOS PARA EL SARS-COV-2**. Por ejemplo en el kit RT-qPCR multiplexado para dos objetivos víricos (Orf1ab y N) del Sars-Cov-2 de Creative Diagnostics se puede leer respecto a su especificidad: **“presenta interferencia no específica con el virus de la influenza A (H1N1), virus de la influenza B (Yamagata), virus sincitial respiratorio (tipo B), adenovirus respiratorio (tipo3 y tipo 7), virus de la parainfluenza (tipo 2), Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae etc.”** Es decir puede dar positivo **CON LOS PRINCIPALES PATÓGENOS RESPIRATORIOS PRODUCTORES DE NEUMONÍA INTERSTICIAL.**

Para probar la veracidad de dichas afirmaciones recurrimos a realizar **un estudio con el programa Blast** (Basic Local Alignment Search Tool), herramienta de búsqueda de alineamientos de secuencias que permite comparar una secuencia determinada con todas las secuencias almacenadas en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (es pública y puede consultarse en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.)

Y lo que encontramos es **que tanto la sonda específica P2 como los cebadores específicos (F y R) del objetivo vírico RdRp del Sars cov-2 COINCIDEN AL 100% para la sonda supuestamente específica (probe 2) o a más del 90 % para los cebadores, CON SECUENCIAS DEL CORONAVIRUS HUMANO NL63.**

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome	44.1	695	100%	6e-08	100.00%	NC_045512.2
SARS coronavirus Tor2, complete genome	44.1	853	100%	6e-08	100.00%	NC_004718.3
Human Coronavirus NL63, complete genome	20.3	618	100%	0.80	100.00%	NC_005831.2

Graphic Summary



En la figura puede observarse el resultado de dicha coincidencia de la sonda probe-2.

Se adjuntan, en documentación anexa, los pdf de dichas búsquedas con los resultados obtenidos con el programa Blast para la sonda P2 y los cebadores R y F del citado objetivo vírico RdRp y se puede comprobar la coincidencia al 100% y más del 90% de dichos fragmentos del genoma de Sars-cov-2 con secuencias del coronavirus humano NL63.

Esto significa que cuando una persona sufra un catarro en el que se exprese el coronavirus humano NL63 (coronavirus corriente en resfriados y otros procesos respiratorios en humanos) puede ser **IDENTIFICADO MEDIANTE PCR COMO UN POSITIVO** para sars-cov-2 sin serlo, lo que supondría un **GRAN N° DE FALSOS POSITIVOS**.

Por otra parte, demuestra **QUE LA RT-PCR diseñada para el Sars-cov-2 CARECE DE ESPECIFICIDAD** y que, por tanto, no detecta únicamente al sars-cov-2.

Otro investigador español: D. Jesús García Blanca, también ha realizado búsquedas con el programa informático Blast y sus conclusiones apuntan en la misma dirección:

“En primer lugar recopilamos todos los cebadores (primers) de las PCR descritas en los protocolos alojados en la web de la OMS en aquel momento que eran estos: -Protocolo de los CDC de China: utiliza como diana los genes ORF1ab y N. -Protocolo del Instituto Pasteur (Francia): utiliza dos fragmentos del RdRP (que se supone es específico del SARS.CoV-2). -Protocolo de los CDC de Estados Unidos: utiliza tres fragmentos del gen N -Protocolo del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón: es el único que tiene como diana el gen S junto a otros genes supuestamente compartidos con otros coronavirus. -Protocolo de Charité (Alemania): utiliza los genes E, N y RdRP. -Protocolo de la Universidad de Hong

Kong: utiliza el ORF1b-nsp14 y el N. -Protocolo del Instituto Nacional de Salud de Tailandia: utiliza el gen N. A continuación fuimos introduciendo la secuencia de los cebadores -el que indica el comienzo de la secuencia a detectar (forward) y el que indica el final (reverse)- en el BLAST para que las buscara en dos bases de datos: una recopilación de genomas de microbios y la correspondiente al genoma humano.

LAS SECUENCIAS GENÓMICAS DEL SARS-COV-2 SE ENCUESTRAN EN EL GENOMA HUMANO Y EN NUMEROSOS MICROBIOS

Veamos en detalle el procedimiento tomando como ejemplo los iniciadores del protocolo francés. Una vez en la web de BLAST elegimos Microbes (Microbios) para buscar en las bases de datos de genomas microbianos y avanzamos página. Aparece entonces un formulario en el que introducimos la secuencia del iniciador forward del protocolo francés -que es ATGAGCTTAGTCCTGTTG-, seleccionamos la opción Highly similar sequences (Secuencias muy similares) y pulsamos la tecla BLAST. Apenas unos segundos después aparecieron los resultados y se nos mostraron 100 secuencias de microbios -en particular de bacterias y arqueas- con una coincidencia de entre un 77% y un 100% con un porcentaje de identidad del 100%. A continuación volvimos a la página de inicio y esa segunda vez elegimos Human (Humanos) para buscar en el genoma humano, repetimos la misma operación y tras unos segundos apareció el resultado . Y resulta que la secuencia introducida coincide con 74 secuencias del genoma humano, con una coincidencia de entre el 66% y el 100% y un porcentaje de identidad del 100%. Y eso indica que la secuencia de ese cebador inicial de la PCR que se supone es específica para el SARS-CoV-2 corresponde en realidad igualmente a 74 fragmentos del genoma humano y a un centenar de fragmentos microbianos".

A continuación decidimos repetir la operación pero con el cebador final o reverse -que es CTCCTTTGTTGTGTTGT- y los resultados fueron similares. Como quiera que se trataba de secuencias muy cortas -en torno a una veintena de letras genéticas o nucleótidos- decidimos probar de nuevo pero con la secuencia diana que definen esos dos cebadores, es decir, la secuencia del supuesto genoma del SARS-CoV-2 que se encuentra entre el cebador de inicio y el del final. Obviamente para ello necesitábamos la secuencia que oficialmente se admite como la del "genoma del SARS-CoV-2" Decidimos acudir a la página oficial del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica): [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512.2?report=genbank&to=29903](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512.2?report=genbank&to=29903). Una vez en ella localizamos la "secuencia diana", fragmento de 108 nucleótidos situados entre las posiciones 12.690 y 12.797 del "genoma" y que es ésta: ATGAGCTTAGTCCTGTTGCACTACGACAGATGTCTTGTGCTGCCGGTACTACACAACTGCT TGCACTGATGACAATGCGTTAGCTTACTACAACACAACAAAGGGAG. Pues bien, repetimos con ella las operaciones antes descritas y los resultados volvieron a ser sorprendentes ya que aparecieron de nuevo un centenar de secuencias de microbios con un porcentaje de coincidencia del 100% y cuatro secuencias del genoma humano con un porcentaje de identidad de entre el 83% y el 95%. Las coincidencias eran pues menores pero lo trascendente e importante es que seguimos encontrando fragmentos de la supuesta "secuencia diana" del SARS-CoV-2 tanto en microbios como en nuestro propio genoma.

Realmente atónitos dimos un paso más y probamos con el gen considerado en ese momento como el más específico del SARS-CoV-2, el Gen E que se supone genera las proteínas de envoltura y está situado entre las posiciones 26.245 y 26.472. Se trata de una secuencia de 227 nucleótidos considerada de las más específicas y es ésta:
ATGTACTCATTTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTT
GCTTTCGTGGTATTCTTGCTAGTTACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTAC
TGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTCTTGTAACCTTCTTTTTACGTTTACTCTCGTGTTAAAA
ATCTGAATTCTTCTAGAGTTCCTGATCTTCTGGTCTAA. Repetimos con ella las operaciones ya descritas y el resultado fue aún más sorprendente porque a pesar de su longitud aparecieron otras cien secuencias de microbios con un porcentaje de identidad del 100% y 10 secuencias del genoma humano con un porcentaje de identidad de entre el 80% y el 100%.

Y resultados similares obtuvimos con un fragmento elegido al azar y con el gen N que dicen corresponde a las proteínas de la nucleocápside del SARS-CoV-2. Finalmente decidimos probar con el Gen S que según se afirma es el que generaría las proteínas estructurales de "espiga" que son claves para la entrada en la célula y posteriormente se consideró como el gen más específico del SARS-CoV-2. Por tratarse de un gen cuya secuencia es mucho más larga -3.821 nucleótidos entre las posiciones 21.563 y 25.384- probamos con dos fragmentos escogidos al azar dentro de ese gen y el primero - TTGGCAAATTCAAGACTCACTTTC- arrojó como resultado otro centenar de secuencias de microbios y 93 secuencias del genoma humano y el segundo - CTTGCTGCTACTAAAATGTCAGAGTGT- un centenar de secuencias microbianas y 90 del genoma humano. Finalmente decidimos probar con los iniciadores del Protocolo de Japón, único que incluye secuencias diana del Gen S y los resultados fueron una vez más similares: jun centenar de secuencias de microbios y 93 secuencias del genoma humano con un porcentaje de identidad de entre 94,12% y 100%!

CONCLUSIONES La consecuencia de todo lo que acabamos de explicar es clara e inmediata: **NO HAY NINGÚN TEST VÁLIDO PARA DETECTAR EL SARS-COV-2**, Ni los test de anticuerpos o antígenos ni los RT-PCR. E incluimos los basados en el supuesto gen que se afirma codifica la proteína S1 o de espiga.

Terminamos añadiendo que en estos test no cree en realidad ni la propia OMS. Basta leerse el documento que publicó el pasado 11 de septiembre como guía de laboratorio para el SARSCoV-2 titulado *Diagnosis festina for SARS-CoV-2 (Pruebas de diagnóstico para el SARS-CoV-2)* - lo tiene en [https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1302661/retrieve-](https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1302661/retrieve) y en él se dice literalmente en la página 5 lo siguiente: "Cuando sea posible la sospecha de infección activa debería testarse con un test de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) como la RT-PCR. Las pruebas de NAAT deberían tener como diana el genoma del SARS-CoV-2 pero puesto que no existe circulación global conocida del SARS-CoV-1 una secuencia de Sarbecovirus (supuesta especie que incluye al menos cinco coronavirus humanos y animales entre los que se encuentran el SARS-CoV-1 y el SARS-Cov-2) es también una diana razonable". Es decir, la OMS acepta utilizar para detectar el SARS-CoV-2 **secuencias no específicas**. Y eso no es todo porque el manual dice más adelante: "Un diagnóstico óptimo consiste en una prueba NAAT con al menos dos dianas independientes

del genoma del SARS-CoV-2; no obstante, en zonas donde la transmisión esté muy extendida se puede utilizar un simple algoritmo con una sola diana”.

(fragmento extraído del artículo escrito por Jesús García Blanca para la revista D-Salud)

Por lo tanto, es importante probar e informar el alcance de contaminación de ADN genómico de las muestras para PCR, pues hemos podido comprobar que los reactivos de la PCR para Sars-cov-2 (primers y probes) son comunes a muchas secuencias del genoma humano. Esto es necesario para registrar criterios de corte de umbral para las cantidades de dicha contaminación que son tolerables e informar de si la muestra de ARN ha sido tratada con ADNasa, (enzima que elimina los restos no deseados de ADN interferente) incluido el tipo de ADNasa y tipo de reacción. Aspectos que no nos consta que se tengan en cuenta por lo que **NO SE PUEDEN DESCARTAR LOS FALSOS POSITIVOS POR INCLUIR RESTOS DE ADN CELULAR HUMANO.**

Se ha comunicado que la proteína espiga del sars-cov-2 es el punto de entrada del virus en las células humanas, algo así como la llave que abriría la cerradura de nuestras células que sería la proteína de membrana AC2 (un análogo del enzima convertidor de angiotensina o ACE). Como consecuencia de las anteriores investigaciones con la herramienta BLAST podemos concluir que dicha proteína no es específica del Sars-cov-2 puesto que la secuencia que la codifica en el genoma del virus tampoco es específica. Pero además hay otros datos que apoyan esta falta de especificidad:

LA PROTEINA ESPIGA ES UNA PROTEINA HERV, es decir es una proteína de tipo Syncitina-1 producida por un virus endógeno y está codificada en un fragmento del cromosoma 7 del genoma humano. Esta afirmación está apoyada por los trabajos y publicaciones científicas que se citan a continuación.

But, beyond a few virologists, who has noticed that the spike protein of Sars-Cov-2, against which teams are competing to develop a vaccine, is highly homologous with a human HERV protein, syncytin-1.(4) What, indeed, are HERV proteins? What are HERVs?

Extracto traducido de:

DE HERVS Y COVID-19: PREGUNTAS PARA EL FUTURO

Por otra parte, es bien conocida la utilización de esta secuencia proteica: **la proteína espiga, común al coronavirus humano NL63 y al Sars-cov-2**, para poder producir la apertura de las células humanas en trabajos de investigación que sirven de base a la producción de quimeras víricas (virus artificiales que combinan secuencias de varias especies) como el Sars-cov-2. Este, (Sars-cov-2) combinaría secuencias de virus de murciélago de herradura, pangolín y humanas, pues una recombinación vírica como la que se ha producido en el Sars-cov-2 es extremadamente improbable que se produzca de manera natural y no es posible que un virus recombinante atraviese la barrera de especie y, por ejemplo, pueda infectar células humanas si no posee secuencias propias de la especie a la que puede infectar.

PNAS PNAS

Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry

Heike Hofmann*, Krzysztof Pyrc[†], Lia van der Hoek[†], Martina Geier*, Ben Berkhout[†], and Stefan Pöhlmann**

*Institute for Clinical and Molecular Virology and Nikolaus Fiebiger Center, University Erlangen–Nürnberg, 91054 Erlangen, Germany; and [†]Department of Human Retrovirology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands

Edited by Diane E. Griffin, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, and approved February 27, 2005 (received for review December 17, 2004)

Coronavirus (CoV) infection of humans is usually not associated with severe disease. However, discovery of the severe acute respiratory syndrome (SARS) CoV revealed that highly pathogenic human CoVs (HCoVs) can evolve. The identification and characterization of new HCoVs is, therefore, an important task. Recently, a HCoV termed NL63 was discovered in patients with respiratory tract illness. Here, cell tropism and receptor usage of HCoV-NL63 were analyzed. The NL63 spike (S) protein mediated infection of different target cells compared with the closely related 229E-S protein but facilitated entry into cells known to be permissive to

In general, the functional organization of CoV S proteins is similar to that of glycoproteins from several unrelated viruses (12), such as retroviruses, and the SARS-CoV-S protein can be incorporated into the membrane of retroviral particles (13). These so called pseudovirions (“pseudotypes”) accurately mimic receptor engagement and membrane fusion of SARS-CoV and can be used to study S function (13–18). Here, we used retroviral pseudotypes to analyze cell tropism and receptor engagement of HCoV-NL63. We report that the NL63-S protein engages the SARS-CoV receptor angiotensin-converting enzyme (ACE) 2,

1

Extracto del artículo publicado en 2005 en PNAS titulado “**El coronavirus humano NL63 emplea el mismo receptor para su entrada a las células que el coronavirus del síndrome agudo respiratorio (SARS)**” y este receptor no es otro que el ACE2.

Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond

Johanna K. Kaufmann and Dirk M. Nettelbeck

Helmholtz University Group Oncolytic Adenoviruses, German Cancer Research Center (DKFZ) and Department of Dermatology, Heidelberg University Hospital, Im Neuenheimer Feld 242, 69120 Heidelberg, Germany

Este artículo publicado en Cell, cuyo título traducido es “**Quimeras de virus para terapia génica, vacunación y oncolisis: adenovirus y más.**” Es una prueba de que se está investigando en la producción de quimeras víricas con diversas excusas sin tener en cuenta la peligrosidad de dichos experimentos.

APROBACIÓN DE LOS TEST PARA USO DE EMERGENCIA

Un problema adicional de los test PCR para detectar Sars-cov-2 es su aprobación para uso de emergencia en base a la declaración de pandemia de Covid-19 realizada por la OMS. Esto ha dado lugar a la rápida producción de kits de RT-PCR sin control de calidad adecuado y, sobre todo, sin responsabilidad por parte de los laboratorios en su fabricación y de los gobiernos en su compra. En el caso de España no ha habido un protocolo que unifique los procedimientos y resultados de los test en las distintas Comunidades Autónomas, sino que cada una ha comprado los test y marcas de PCR que le ha parecido oportuno. Hay cuatro grandes empresas que fabrican las PCRs y son a las que los laboratorios les compran sus productos y luego los comercializan con su propio nombre.

En un estudio publicado en **Journal of Clinical Virology** en junio 2020 ,cuyo título traducido es:

Comparación de ensayos comerciales de PCR con transcripción inversa en tiempo real para la detección del SARS-CoV-2

Zsófia Iglói ^aMargareta Ieven ^bZain Abdel-Karem Abou-Nouar ^{a,c}Babette Weller ^aVeerle Matheussen ^{b,d}Jasmine Coppens ^dMarion Koopmans ^aRichard Molenkamp ^a

Se analizan dieciséis de los mejores kits comerciales de RT-PCR para detección del Sars-cov-2 y llama poderosamente la atención que **ninguno de ellos está aprobado para diagnóstico**. Ninguno está aprobado por la FDA ni por los CDC, y la mitad especifican que son sólo para uso en investigación (entre ellos el de Tib Molbiol comercializado por Roche y que se supone es el desarrollado a partir del test estándar de Drosten)

Cuadro 1 . Detalles de los kits de PCR comparados.

Empresa	Producto	País	Situación regulatoria	Gen o genes diana
Diagnóstico de Altona	RealStar SARS-CoV2 1.0	Alemania	CE-IVD	E, S
Tibmolbiol	LightMix Sarbeco-E / SARS-CoV-2 RdRp	Alemania	RUO	E, RdRp
ThermoFisher	Kit de ensayo Taqman 2019-nCoV v1	Estados Unidos	RUO	ORF1ab, S, N
Gene DAAN	Kit de detección para 2019-nCoV	China	RUO	ORF1ab, N
Kogene Biotech	Powercheck 2019-nCoV	Corea	RUO	ORF1ab, E
Liferiver	RT-PCR multiplex en tiempo real 2019-nCoV	China	CE-IVD	ORF1ab, N
Biocología Maccura	PCR fluorescente de SARS-CoV2	China	NMPA	ORF1ab, E, N
R-Biopharm	Ridagene SARS-CoV2	Alemania	RUO	mi
Sansure Biotech	Kit de diagnóstico de ácido nucleico 2019-nCoV	China	CE-IVD, NMPA	ORF1ab, N
Diagnóstico centinela B (RUO)	STAT-NAT COVID19 B	Italia	RUO	E, RdRp, N
Sentinel Diagnostics B (CE-IVD)	STAT-NAT COVID19 B CE-IVD	Italia	CE-IVD	E, RdRp, N
Sentinel Diagnostics HK (RUO)	STAT-NAT COVID19 HK	Italia	RUO	ORF1ab, N
Sentinel Diagnostics HK (CE-IVD)	STAT-NAT COVID19 HK CE-IVD	Italia	CE-IVD	ORF1ab, N
XABT	Kit de RT PCR para la detección de 2019-nCoV	China	CE-IVD	ORF1ab, E, N
Hecin Scientific	Kit de ensayo de PCR en tiempo real para SARS-CoV-2	China	RUO	RdRp, N

Empresa	Producto	País	Situación regulatoria	Gen o genes diana
Ensayo de referencia	Corman y col.			E, RdRp

CE-IVD: Conformité Européenne-In Vitro Diagnostic; RUO: Solo para uso en investigación; NMPA: Administración Nacional de Productos Médicos; CDC- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.

En este estudio comparativo se reconoce, además, que aquellas pruebas positivas para el Sars-cov-1 no se consideran reacción cruzada ya que este ARN viral se utiliza como estándar de especificidad. Finalmente, reconocen que son pruebas realizadas con ARNs víricos sintéticos y no con muestras clínicas tomadas de enfermos, citamos un fragmento de dicho artículo: " En tercer lugar, **no realizamos una evaluación con muestras clínicas.** Es difícil establecer criterios para un nivel mínimo de desempeño clínico. La positividad de la PCR en muestras clínicas está influenciada por varios factores, incluido el tipo de muestra y el momento. **Además, la presencia de ARN no se correlaciona necesariamente con la infectividad o la capacidad de transmisión**"

El profesor Stephen Bustin, uno de los mayores expertos en PCR cuantitativa y autor entre otros de la guía MIQUE, en el artículo:

RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer

Stephen A. Bustin ^{1,*} and Tania Nolan ^{2,3}

¹ Medical Technology Research Centre, Faculty of Health, Education, Medicine and Social Care, Anglia Ruskin

University, Chelmsford, Essex CM1 1SQ, UK

² Institute of Population Health, Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester; Manchester M13 9NT, UK; tanianolan@btinternet.com

³ The Gene Team, Bury St Edmunds, Su_olk IP31 1AA, UK

* Correspondence: Stephen.bustin@aru.ac.uk or Stephen.bustin@gmail.com

Received: 13 April 2020; Accepted: 23 April 2020; Published: 24 April 2020

Publicado en International Journal of Molecular Sciences

Afirma lo siguiente:

“La velocidad y escala de la epidemia de Covid-19 ha dado como resultado una relajación de la normas estrictas que rigen los procedimientos llevados a cabo

en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados y otros, con la FDA abriendo un proceso de autorización de uso de emergencia para el desarrollo de ensayos regulados en la emergencia actual. Claramente, una consideración primordial para usar cualquier prueba nueva o modificada es informar con precisión y sensibilidad, reduciendo el riesgo de falsos positivos o falsos negativos.

Ciertamente, la inclusión de conocidos negativos y las muestras de control positivo en la realización de cada prueba es un parámetro de control de calidad esencial”

No nos consta que esto se esté realizando, ni mucho menos. Es más, en algunos test comerciales se pueden comprar **reactivos de diagnóstico diferencial** que, según afirman sus fichas técnicas, permitirían diferenciar un positivo por Sars-cov-2 de un positivo debido a gripe o VSR (virus que comparten secuencias genómicas con el Sars-cov-2 y que clínicamente producen síntomas similares) y no nos consta que se estén utilizando y ni siquiera comprando, ya que no van incluidos en el kit RT-PCR sino que tienen que comprarse aparte.

En otro párrafo del artículo citado se afirma:

“Los cebadores y la sonda específicos del sars-cov-2 deben ser 100% específicos para el virus y, por tanto, amplificar sólo las secuencias virales. Los cebadores son el componente más crítico de un ensayo RT-qPCR fiable, ya que sus propiedades controlan la exquisita especificidad y sensibilidad de este poderoso método”

Como hemos demostrado en el apartado dedicado a la especificidad de la prueba RT-qPCR para el sars-cov-2 **NO SE SOSTIENE QUE DICHS REACTIVOS (CEBADORES Y SONDA) SEAN ESPECÍFICOS PARA ESTE VIRUS**, ya que comparten identidad con secuencias del **HCov.NL63** y otros fragmentos del genoma humano y del microbioma.

Y en la conclusión del artículo se dice lo siguiente:

“Los programas de pruebas de RT-qPCR para el sars-cov-2 son totalmente inadecuados, están mal organizados y rodeados de confusión y desinformación”

“Son los retrasos en la validación burocrática y el proceso de aprobación y la falta de participación del proveedor de servicios comerciales y la falta de una investigación más amplia, los que están en el centro de la incertidumbre de las pruebas”

“El grupo de trabajo de estándares de Coronavirus (<https://jimb.stanford.edu/covid-19-standards>) liderado por la Iniciativa Conjunta

para Metrología en Biología, está desarrollando un conjunto de directrices para garantizar la disponibilidad de estándares, controles, pruebas de validación y protocolos comunes y apropiados que son esenciales para la precisión de los resultados de las pruebas.”

Es decir, en dicho trabajo se reconoce que **no existen estándares, controles, pruebas de validación y protocolos comunes y apropiados que garanticen la precisión y reproductibilidad d las pruebas.**

OTROS TEST

Últimamente han salido al mercado los llamados test rápidos de antígeno para el Sars-cov-2. De dichos test, hemos analizado el llamado **PANBIO™ COVID-19 AG RAPID TEST DEVICE.**

MANUFACTURER: ABBOTT

NAME OF TEST: PANBIO™ COVID-19 AG RAPID TEST DEVICE (NASOPHARYNGEAL)

LATERAL FLOW

Podemos comprobar que es una inmunocromatografía de flujo lateral comercializada (aunque no fabricada) por Abbot. Estas pruebas nunca han sido consideradas nada más que pruebas de screening por lo que siempre se deben complementar con otros datos clínicos y de diagnóstico.

Test de **antígenos** del SARS-CoV-2.

- Tipo: Inmunocromatografía con micropartículas de oro coloidal: tira de membrana, que está pre-revestida con anticuerpos de la nucleocápside del SARS CoV-2 fijadas en la línea de test e IgY anti-pollo monoclonal de ratón en la línea de control.

Lo primero que llama la atención es que utiliza como diana la **proteína de la nucleocápside** del Sars-cov-2, es decir, la proteína codificada por el **Ngene** que como vimos en el apartado dedicado a la especificidad de las PCR, las propias publicaciones al respecto (Corman et al.) reconocen que **NO ES ESPECÍFICO DEL SARS-COV-2** sino pansarbecovirus. Por lo tanto puede dar **falsos positivos** por reacción cruzada con otros coronavirus.

Lo segundo y no menos importante, es que este test como las RT-PCR para el Sars-cov-2 están aprobadas para uso de emergencia y **NO SON VÁLIDOS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19** (por más que su nombre lo sugiera) pues en su ficha técnica se reconoce que son **SÓLO PARA INVESTIGACIÓN:**

Autorizaciones: IVD device (Solo para investigación) CE MARK. Código: 41FK10

En cuanto a los datos de estudio para evaluar su fiabilidad, la ficha técnica dice lo siguiente:

- El estudio que presenta el fabricante se determinó analizando 60 muestras positivas y 181 negativas para el antígeno (Ag) del SARS-CoV-2 obteniendo una sensibilidad de 93,3% (IC del 95%: 83,3-98,2%) y una especificidad de 99,4% (IC del 95%: 97,0-100%) Se determinó que las muestras clínicas eran positivas o negativas utilizando un método de referencia RT-PCR (FDA EUA)
- Los datos se obtuvieron a partir de un estudio en individuos con sospecha de exposición a COVID-19 o que presentaron síntomas en los últimos 7 días.

La concordancia positiva del test es mayor con valores de **Ct ≤33** con una sensibilidad del 98,2%. Como se sugiere en las referencias 8 y 9, los pacientes con un valor de Ct >33 ya no son contagiosos

Por último el propio laboratorio Abbot recomienda:

Nuestra recomendación

- Los datos preliminares del fabricante parecen buenos. **Sin embargo el número de muestras que avalan los datos de sensibilidad/especificidad (60 positivas y 181 negativas) nos parece pequeño.**
- Merecería la pena esperar a tener estudios más sólidos antes de hacer un uso masivo o compras generalizadas.

TEST DE ANTICUERPOS

Existen dos tipos

- a) **Test rápidos:**
- b) **Test Elisa o Clia.**

Los test rápidos son también inmunocromatografías de flujo lateral, así que serían pruebas de screening. Mientras que los test Elisa y Clía, debido a su mayor sensibilidad y precisión se consideran de una categoría analítica superior. Además permiten la cuantificación **siempre que se disponga de estándares adecuados para realizar una curva de calibrado.** Lo que nos supone una importante duda ya que no nos consta la existencia de estándares adecuados de las proteínas del Sars-cov-2.

Ambos test se basan en la búsqueda de anticuerpos en la sangre del paciente que deben ser específicos para el Sars-cov-2. Estos anticuerpos son de dos tipos: las IgM que indicarían infección activa o reciente y las IgG que indicarían infección pasada y probable inmunidad.

El problema de dichos test, tanto los rápidos como los Elisa y Clía es que, para detectar anticuerpos, es preciso tener un reactivo que los detecte al reaccionar

con ellos y dicho reactivo tiene que ser un antígeno o proteína perteneciente al Sars-cov-2. Nos consta que se han usado como antígenos del virus las proteínas N (codificada en el N gene) y la proteína espiga. Y como hemos demostrado en el apartado dedicado a la especificidad **NINGUNA DE ESTAS PROTEINAS ES ESPECÍFICA DEL SARS-COV-2**. La N porque es común a todos los coronavirus (sarbecovirus) y la S porque es común al coronavirus humano NL63 y es una proteína HERV.

EN RESUMEN:

LOS TEST RT-qPCR para determinación del Sars-CoV-2 CARECEN DE VALIDEZ CIENTÍFICA por las siguientes razones:

- 1) **NO APORTAN INFORMACIÓN ÚTIL** desde el punto de vista epidemiológico:
 - Su inexactitud se ve ampliamente incrementada al aumentar el nº de test realizados a una población.
 - No hay correlación entre el nº de positivos y el nº de muertes esperadas en la población objeto de los test.
- 2) **NO SON ESPECÍFICOS para Sars-cov-2:**
 - Los cebadores y la sonda supuestamente específica del test PCR de referencia y considerado, aunque inadecuadamente, el estándar de oro, son **secuencias comunes al HCovNL63** (coronavirus humano)
 - Los cebadores y las sondas usadas para determinar los diferentes objetivos víricos en los distintos test son **todos ellos secuencias que se encuentran con bastante frecuencia en el genoma humano y en el microbioma**.
 - Por lo tanto pueden dar positivo ante procesos inflamatorios relacionados con otros virus e incluso bacterias.
 - Presentan **interferencia no específica con la mayoría de virus y bacterias capaces de producir neumonía intersticial**.
- 3) **SON DEMASIADO SENSIBLES** aunque carecen de estándares de cuantificación adecuados:
 - **No hay estándares obtenidos de cultivos del Sars-Cov-2**, sino que se utilizan como estándares fragmentos de ARN retrotranscritos in vitro. Es decir ARN sintético.
 - No se ha determinado por cultivo la **dosis infecciosa media**.
- 4) **NO SE PUEDE DETERMINAR LA RELACIÓN ENTRE INFECCIOSIDAD Y POSITIVIDAD AL TEST.**
 - Los datos obtenidos en los estudios que correlacionan positivos a la PCR y cultivo de virus viables son escasos y de mala calidad.
 - No se puede determinar mediante PCR que las personas asintomáticas sean transmisoras del virus y, por tanto, contagiosas.
 - No se puede determinar que más allá de ocho días un enfermo pueda ser contagioso.
 - **CARECEN DE SUPERVISIÓN ADECUADA** al haber sido aprobados por la vía de uso de emergencia.
- 5) **SON PARA USO EN INVESTIGACIÓN Y NO PARA DIAGNÓSTICO.**

- 6) **EN TODAS LAS RT-PCR COMERCIALES SE UTILIZAN ENTRE 40 Y 45 DE AMPLIFICACIÓN** lo que además de ser una aberración analítica no guarda relación con la clínica. Y puede aumentar extraordinariamente el nº de falsos positivos.
- 7) **NO HAY HOMOGENEIDAD** en su uso en las distintas Comunidades Autónomas de España ya que cada una ha adquirido las marcas comerciales que ha querido:
 - **No existen estándares, controles, pruebas de validación y protocolos comunes y apropiados que garanticen la precisión y reproducibilidad de las pruebas**

RESPECTO A OTROS TEST

- 1) Los test rápidos de antígeno **no son específicos del Sars-Cov-2** y pueden dar positivo a otros procesos víricos.
- 2) Los test de anticuerpos en sangre tipo Elisa, Clia o rápidos por inmunocromatografía **no son específicos para Sars-Cov-2** por las mismas razones que los test de antígeno y pueden tener reacción cruzada con los anticuerpos producidos por otros procesos víricos.

BIBLIOGRAFÍA: (en orden de cita)

- 1) Artículo titulado “**¿Por qué la pandemia nunca terminará?**” KLAUS PFAFFELMOSE, 24 de mayo de 2020.
- 2) Artículo titulado **Positivos por PCR ¿qué significan?**, del 23 de septiembre de 2020 elaborado por el Departamento de Física y Tecnología de The Arctic University of Norway.
- 3) **CEBM (Centro de Medicina Basada en la Evidencia) de la Universidad de Oxford** (revisiones de agosto y septiembre por Tom Jefferson et al)
- 4) **Documento CDC 5ªrevisión “CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Panel de Diagnóstico RT-PCR en Tiempo Real”**. 13 de julio de 2020. En la que se reconoce no disponer de virus aislados cuantificados de Sars-Cov-2 para estándares.
- 5) **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments** Stephen A. Bustin, et al.
- 6) **Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR** (Victor M. Corman et al.)
- 7) **Ficha técnica del kit RT-qPCR de Creative Diagnostics para Sars-Cov-2.**
- 8) Artículo de la bióloga Almudena Zaragoza titulado **El resfriado común, la sentencia a los virus y la mentira de la Covid-19.** Publicado en “Tejiendo la red de la vida” octubre 2020.
- 9) Artículo del investigador Jesús García Blanca titulado: **La estafa se constata: la PCR no detecta el SARS-CoV-2** (de próxima aparición en la revista D-salud.

- 10) Artículo titulado: **RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2 : A Primer** por Stephen A. Bustin and Tania Nolan. **Publicado en International Journal of Molecular Sciences** (abril 2020).
- 11) Artículo titulado **“De HERVS y covid-19: Preguntas para el futuro”** Publicado por BJGP (British Journal of General Practice) 21 mayo 2020.
- 12) Artículo titulado **“Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry.”** publicado en 2005 en PNAS
- 13) Artículo titulado **Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond.** Por Johanna K. Kaufmann and Dirk M. Nettelbeck. Publicado en Cell.
- 14) Artículo titulado **“Comparison of commercial realtime reverse transcription PCR assays for the detection of SARS-CoV-2”** Zsófia Iglói et al. publicado en **Journal of Clinical Virology**.en junio 2020.
- 15) Ficha técnica del test rápido de antígeno para Sars-cov-2 **“PANBIO COVID-19 AG RAPID TEST DEVICE.** (laboratorios ABBOT).
- 16) Artículo titulado **Las pruebas de Covid-19 por PCR carecen de sentido desde el punto de vista científico.** Por Torsten Engelbrecht y Konstantin Demeter Publicado en Archivos editorial Cauac, 27 de junio 2020.

ANEXOS Se adjunta carpeta con los pdf que demuestran las coincidencias mediante el programa Blast, de la sonda P2 supuestamente específica para Sars-Cov-2 y los cebadores del test de referencia para el objetivo vírico RdRp de la RT-PCR de Drosten (publicado en el estudio de Corman et al.) con el coronavirus humano HCovNL63.