

Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS-CoV-2

Interpretation of diagnostic tests for the SARS-Cov-2 virus

Irma Virginia Díaz-Jiménez

Resumen

Al identificarse un nuevo agente infeccioso viral, causante de neumonía grave, en Wuhan, como el virus SARS-CoV-2, la carrera contra el tiempo para obtener métodos de diagnóstico rápidos y seguros se convirtió en una prioridad. En la actualidad, para el diagnóstico de la enfermedad de COVID-19, en la fase aguda, se cuenta con la técnica de RT-PCR en la primera semana y, para conocer la formación de anticuerpos ante la infección posterior a la primera semana está la serología, con dos técnicas: ELISA, recomendable para uso clínico en los hospitales y, tentativamente, la inmunocromatografía, porque aún faltan más estudios para recomendar su uso.

PALABRAS CLAVE: SARS-Cov-2; neumonía; COVID-19; RT-PCR; anticuerpos; infección; ELISA; inmunocromatografía.

Abstract

With a new viral infectious agent causing severe pneumonia identified in Wuhan as the SARS-Cov-2, the race against time for fast and safe diagnostic methods became a priority. Currently, for the diagnosis of Covid-19 disease in the acute phase, the RT-PCR technique in the first week and to know the formation of antibodies to infection after the first week, serology is available with two techniques. ELISA recommended for clinical use in hospitals and Immunochromatography, more studies are missing to recommend its use.

KEYWORDS: SARS-Cov-2; Pneumonia; COVID-19; RT-PCR; Antibodies; Infection; ELISA; Immunochromatography

Infectóloga pediatra, coordinadora del Área de Microbiología, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México.

Recibido: 27 de mayo 2020

Aceptado: 15 de junio 2020

Correspondencia

Irma Virginia Díaz-Jiménez
vdiazjimenez@yahoo.com

Este artículo debe citarse como

Díaz-Jiménez IV. Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS-CoV-2. Acta Pediatr Méx 2020; 41 (Supl 1):S51-S57.

Todo inició en diciembre del 2019, al reportarse, en Wuhan, China, pacientes con neumonía de causa desconocida que desencadenó un sinnúmero de estudios para la identificación del agente etiológico, que es un nuevo beta coronavirus: SARS-CoV-2. Este virus es el causante de la enfermedad COVID-19 y el séptimo coronavirus que infecta a los humanos.

Desde su identificación se ha incrementado, exponencialmente, la cantidad de casos en todo el mundo. Es sorprendente la gran rapidez

con la que se identificó la causa, valiéndose de las diferentes técnicas modernas para la secuenciación y obtención del ARN, que hizo posible, en alrededor de 1 mes, contar con el método diagnóstico en la fase aguda, que es la PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) para SARS-CoV-2. En una línea del tiempo puede observarse la secuencia de eventos en la que, desde que se reportan los casos de neumonía en Wuhan, pasaron solo 10 días para tener la primera secuenciación del genoma del virus, lo que es sorprendente.¹ **Figura 1**

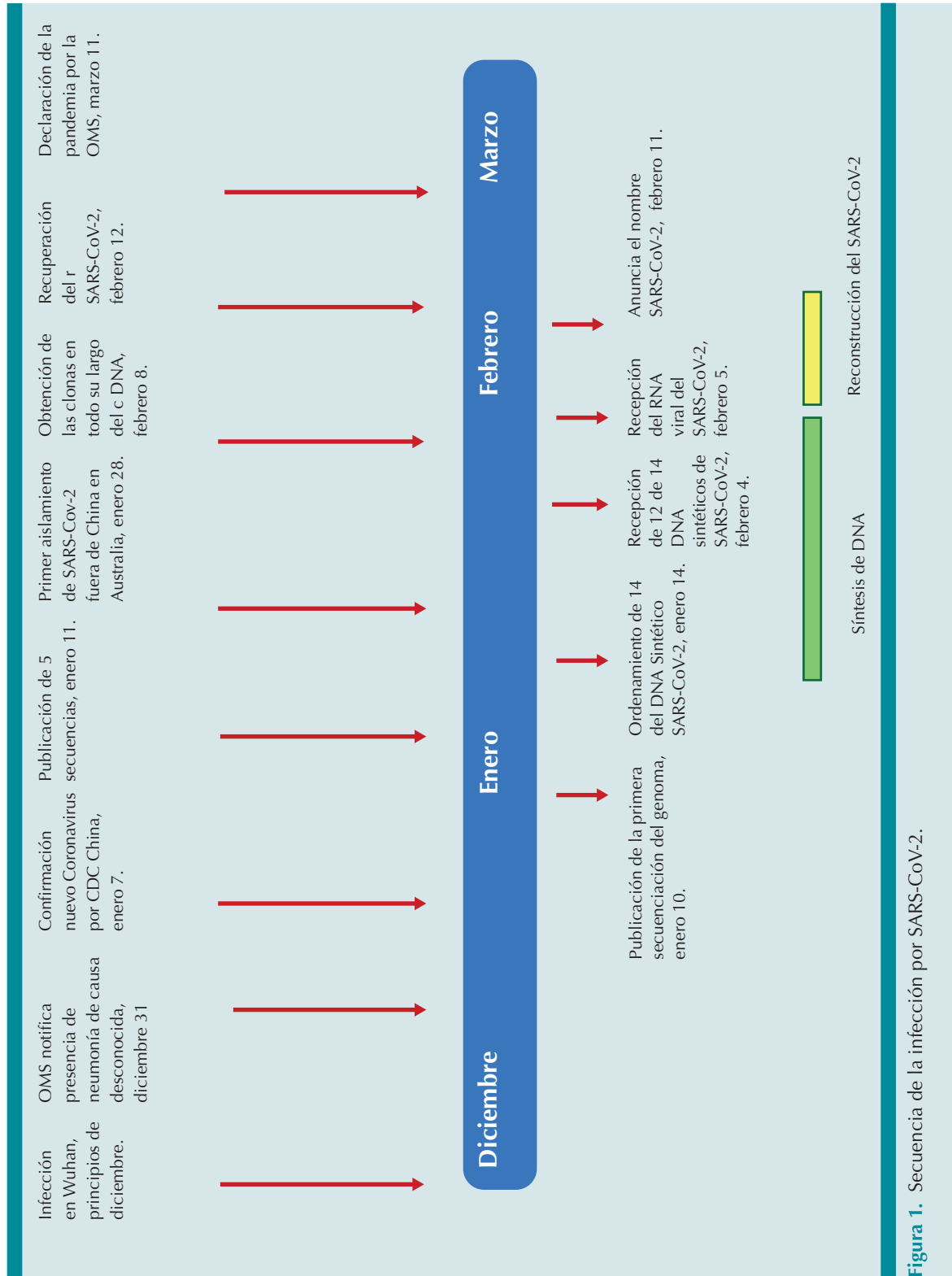


Figura 1. Secuencia de la infección por SARS-CoV-2.



Hasta el momento se dispone de dos tipos de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de COVID-2019:

1. Diagnóstico agudo del virus SARS- CoV-2 en enfermedad aguda 3-7 días: la prueba de referencia es la técnica de reacción en cadena de polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR), que es una prueba de biología molecular en la que se detecta y amplifica una o varias regiones específicas del virus.
2. Diagnóstico de formación de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 después de 7 días: la prueba indicada es por medio de ELISA o inmunocromatografía para la detección de anticuerpos IgM e IgG para el virus SARS-CoV-2.²

RT-PCR para detección del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de ~ 30 kb de tamaño del genoma, que pertenece al género Coronavirus y a la familia *Coronaviridae*. La estructura del SARS-CoV-2 es similar a la del SARS-CoV con un tamaño de virión que varía de 70 a 90 nm. Las proteínas virales de punta, membrana y envoltura del coronavirus están incrustadas en la bicapa lipídica derivada de la membrana del huésped que encapsula la nucleocápside helicoidal que comprende ARN viral. El genoma comprende 6-11 marcos de lectura abiertos (ORF) con 50 y 30 regiones flanqueadas no traducidas (UTR).¹

El método diagnóstico de la infección, en su fase aguda, se basa en la detección del ARN viral de las muestras clínicas de los pacientes infectados. Para ello se utiliza una técnica de RT-PCR que detecta diferentes regiones genómicas constantes.

Los protocolos autorizados por la OMS para la realización de la RT-PCR para virus SARS-CoV-2 durante la pandemia son: CDC de China, Instituto Pasteur, París, Francia, CDC de Estados Unidos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón, Alemania Charite, Hong Kong HKU, Instituto Nacional de Salud de Tailandia y las regiones genómicas específicas que amplifican cada uno de estos protocolos. **(Cuadro 1)** En estas primeras técnicas se lleva a cabo la extracción de ácidos nucleicos en un equipo aparte y, posteriormente, se practica una PCR individual para cada uno de los primeros, esto implica un tiempo de procesamiento de 6 horas.

Cuadro 1. Protocolos autorizados por la OMS y regiones genómicas.

Institución y protocolo aceptado por la OMS	Regiones genómicas amplificadas
CDC China, China	ORF1ab y N
Instituto Pasteur, París Francia.	Dos regiones en la región RdRp
CDC Estados Unidos.	Tres regiones del gene N
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón	Pancorona y múltiples regiones. Proteína de punta
Alemania Charite	RdRp, E, N
HKU, Hong Kong SAR	Orf1b-nsp14, N
Instituto Nacional de Salud de Tailandia	N

En el transcurso de estos meses se han autorizado equipos comerciales que han acortado el tiempo de proceso de 6 a 3 horas, en los que es posible la extracción, amplificación y lectura en un solo equipo automatizado, con lo que disminuye el riesgo de contaminación del personal y de la muestra.³

En este tipo de pruebas moleculares un punto crítico es la toma de la muestra. Hasta hoy, las pruebas aceptadas por la OMS para RT-PCR

para SARS-CoV-2 son hisopados nasofaríngeos, faríngeos y, en pacientes intubados, aspirados bronquioalveolares.^{2,3,4} **Cuadro 2**

La toma de la muestra es un proceso crítico para incrementar la sensibilidad de la prueba y disminuir el riesgo de contagio al tomador de la muestra. Para esto deben cumplirse los estándares de equipo de protección personal que constan de:^{5,6}

- a) Cofia para cubrir la cabeza.
- b) Lentes de protección ocular.
- c) Cubre bocas N95.
- d) Bata quirúrgica desechable.
- e) Doble guante desechable.
- f) Botas desechables.

Deben cumplirse los protocolos del CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) y el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica) para el vestido y retiro del equipo de protección mencionado.³⁻⁷

Envío y embalaje de muestras al laboratorio donde se procesará la muestra

Las muestras de COVID-19 deben seguir el Reglamento Modelo de las Naciones Unidas y cualquier otro reglamento aplicable, dependiendo del modo de transporte utilizado. Puede encontrarse información en la *Guía de la OMS* para regulaciones para el transporte de sustancias infecciosas 2019-2020 (aplicable a partir del 1 de enero de 2019). Las muestras de pacientes de casos sospechosos o confirmados deben transportarse como UN3373, "Sustancia biológica, Categoría B", cuando son para diagnóstico. Deberá hacerse con triple embalaje:

1. Todas las muestras deberán estar contenidas en un tubo con medio de transporte viral, perfectamente cerrado y etiquetado, que se manejará desde su toma hasta la recepción en el laboratorio a temperatura entre 2 a 8 °C.

Cuadro 2. Tipos de muestras, material requerido y temperatura de transporte para la prueba de RT PCR SARS-Cov-2

Tipo de muestra	Material	Temperatura de transporte	Comentarios
Exudado faríngeo y nasofaríngeo	Medio de transporte viral. Hisopos de dacrón o rayón con mango de plástico (exudado faríngeo) Hisopos de dacrón o rayón con mango flexible (exudado nasofaríngeo)	2-8 °C	El exudado faríngeo y nasofaríngeo se deben colocar en el mismo tubo para incrementar la carga viral
Lavado bronquioalveolar	Contenedor estéril con medio de transporte viral	2-8 °C	Puede haber dilución del patógeno, pero aún así vale la pena tomarla. Se requieren como mínimo 2 mL (1 mL de lavado bronquioalveolar más 1 mL de medio de transporte).
Aspirado traqueal, aspirado nasofaríngeo o lavado nasal	Contenedor estéril con medio de transporte viral	2-8 °C	Se requieren, como mínimo, 2 mL (1 mL de aspirado más 1 mL de medio de transporte).
Biopsia de pulmón	Contenedor estéril con medio de transporte viral	2-8 °C	2 cm ³ de la parte visiblemente más afectada.



2. Las muestras se colocarán en una gradilla dentro de una hielera rígida, que contendrá refrigerantes para mantener la muestra entre 2 a 8 °C.
3. La hielera se colocará en otro contenedor para su transporte hasta el laboratorio donde se procesará.^{2,3}

En el transcurso de estos meses, diversas plataformas moleculares han implementado nuevos equipos para identificación del SARS-CoV-2; por ejemplo: la plataforma Gene Xpert, con la prueba Xpert Xpress SARS-CoV-2 test de la compañía Cepheid, que amplifica los 2 genes: el gen de la proteína E y el gen de la proteína N2.⁸

El equipo Film Array Biofire ha agregado, a su panel de virus respiratorios, el SARS-CoV-2 II con el nombre Panel Respiratorio Biofire 2.1 que emite un reporte cualitativo en 45 minutos; detecta dos regiones genómicas del SARS-CoV-2: el gen de la proteína S y el gen de la proteína M. Esta prueba permite, además de la identificación del virus SARS-CoV-2, la detección de 19 virus respiratorios y la posibilidad de coinfección, que puede suceder en 17-20% de los casos. En la temporada invernal permitirá diferenciar entre infección por Influenza A o B vs enfermedad COVID-19.⁹

Ambas pruebas están autorizadas por la FDA (Federal Drug Administration) y los equipos permiten automatizar completamente la extracción, amplificación y lectura de la PCR. Son equipos pequeños que permiten una implementación sencilla que deberán cumplir los estándares de bioseguridad en el laboratorio de microbiología para el manejo de muestras con probable SARS-Cov-2, que son los mismos que la toma de la muestra.

De las plataformas moleculares destaca un grupo de uso cercano al paciente (*point of care*) durante

esta pandemia: la prueba para SARS-Cov-2 del equipo Abbot ID now permite el reporte en 5 minutos. Fue aprobada por la FDA aunque el 14 de mayo también publicó una alerta por el reporte de falsos negativos de la prueba. Por este motivo permanece en análisis para las consideraciones correspondientes; mientras tanto debe tenerse cautela en el diagnóstico con esta prueba.¹⁰

La prueba de RT-PCR puede dar resultados falsos negativos por los siguientes factores:

1. Toma inadecuada de la muestra. Por ejemplo, si se utilizan hisopos inadecuados. Los indicados deben tener base de plástico con punta de rayón o dacrón. Si se usa algodón puede dar un falso negativo o la toma de muestra con pobre calidad; es decir, que contenga poco material. Esto se identificará si la técnica de RT-PCR tiene un control interno que permita detectar ADN humano en la PCR; en estos casos no lo amplificará.
2. Recolección tardía de la muestra o en etapas muy tempranas de la infección.
3. Manipulación y envío inadecuado de la muestra (pérdida de la cadena fría).
4. Razones técnicas de la prueba relacionadas con los protocolos implementados al inicio de la pandemia: son muy manuales y por ello existe un sinnúmero de factores que pueden alterar la sensibilidad de la prueba.
5. Mutaciones virales.
6. Inhibición de la PCR.^{11,12}

Por los motivos anteriores, la bibliografía publica sensibilidades variables de 60 a 80%, en general.^{2,4,11}

Detección de IgA, IgM, IgG o anticuerpos totales

Este tipo de pruebas permite detectar si en el plasma o suero de los pacientes ya se formaron anticuerpos IgM e IgG contra el virus SARS-Cov-2. Por las fechas en los que se elevan dichas inmunoglobulinas vale la pena reforzar que este tipo de estudios no sirven para la fase aguda porque se incrementan después del día 10 de la enfermedad.

En la actualidad existen dos técnicas para medir anticuerpos:

1. Prueba de ELISA.
2. Pruebas rápidas de inmunocromatografía.

La importancia de conocerlas es que la sensibilidad y especificidad de ambas son diferentes y deben tomarse algunas consideraciones para la interpretación.¹²

Zhao J y su grupo¹³ describen que la mediana del tiempo de seroconversión para anticuerpos totales (Ab), desde el inicio de los síntomas, es el día 11, para IgM el día 12 y para IgG el día 14. La existencia de anticuerpos fue menor de 40% entre los pacientes en la primera semana desde el inicio, y aumentó rápidamente a 100% (Ab), 94.3% (IgM) y 79.8% (IgG) a partir del día 15 después del inicio de los síntomas. Con base en estos resultados, la detección de IgM sería ligeramente más temprana que la de IgG. Ese estudio se llevó a cabo mediante un método

comercializado de ELISA. En el mismo trabajo se determinó la sensibilidad de anticuerpos totales que fue de 38, 89 y 100% en la primera, segunda y tercera semana, respectivamente. Sin embargo, no se dispone de la información para considerar si estos tiempos son válidos con la inmunocromatografía. Los insertos de las pruebas rápidas mencionan sensibilidades y especificidades muy altas y, hasta ahora, al hacerse la verificación, los resultados son mucho más bajos de los reportados.¹³ **Cuadro 3**

Hasta ahora las sugerencias son: el uso de anticuerpos, que deberá practicarse con el método de ELISA en los hospitales. Esto permite conocer el nivel que ha elevado el paciente (protectores o no) y hará posible su proceso en plataformas que procesan un número superior de muestras a la vez, porque se han incorporado a sistemas automatizados de alto rendimiento. Quizá para población abierta las pruebas de inmunocromatografía, que solo permiten conocer si hay o no anticuerpos (según los datos obtenidos de verificación de los diferentes equipos, que son inferiores a la técnica de ELISA).^{12,13,14} Tampoco se sabe si en pacientes asintomáticos la cinética de la respuesta inmunitaria es similar o no.

Las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología en relación con el uso de las pruebas de detección de anticuerpos son:

Cuadro 3. Elevación de anticuerpos IgM e IgG según el tiempo de evolución de la infección COVID-19

Días después del inicio de los síntomas	Ig M. Núm. +	Sensibilidad	IgG Núm. +	Sensibilidad
1-7	27	28.70%	18	19%
8-14	99	73.30%	73	54%
15-39	83	94%	71	79.80%

En el hospital, con los pacientes

- En urgencias, como complemento de la PCR en pacientes con evolución de la infección superior a 7 días.
- En casos con PCR repetidamente negativa, en los que se hayan iniciado claramente los síntomas varios días antes. Es decir, para confirmar la infección en ausencia de PCR positiva, posterior a los 7 días.
- Para la selección de donantes de plasma.

Personal sanitario

La detección de anticuerpos en el personal sanitario ayuda a identificar a quienes ya podrían estar inmunes y en condiciones de atender a pacientes infectados; con ello se minimiza el riesgo de propagación del virus a colegas y otros pacientes. En la fase de reordenamiento, que se pretende aplicar en los hospitales, es recomendable disponer de un ensayo con elevada sensibilidad y especificidad para poder reubicar al personal sanitario en la zona limpia de COVID-19 o en la zona COVID-19, dependiendo del estatus inmunitario del personal de salud, evidentemente cumpliendo la normativa de protección de datos (con técnica de ELISA).

Residencias geriátricas

En las residencias, la técnica de elección es la PCR. Es recomendable hacer un cribado en el personal que trabaja en estas residencias con métodos serológicos, de preferencia con ELISA y PCR.^{13,14}

Es importante conocer las técnicas hasta ahora surgidas, saber cuál es la correcta y hacer uso de ellas, de acuerdo con el tiempo de evolución de la infección por COVID-19. Los estudios comparativos futuros permitirán conocer la sensibilidad y especificidad de los diferentes protocolos de RT-PCR y de las plataformas automatizadas.

REFERENCIAS

1. Gorbalenya AE, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
2. Padhi A, et al. Laboratory Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019. En: Shailendra K. *Coronavirus Disease 2019. Epidemiology, Pathogenesis, diagnosis and Therapeutics.* 5 th ed. Singapore: Springer, 2020; 95-107. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7>
3. Secretaría de Salud. Lineamiento estandarizado para la vigilancia epidemiológica y por laboratorio de COVID-19. Secretaría de Salud México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/552972/Lineamiento_VE_y_Lab_Enf_Viral_20.05.20.pdf
4. Cheng MP, et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related Coronavirus-2: A narrative review. *Ann Intern Med* 2020; M20-1301. doi:10.7326/M20-1301.
5. CDC/NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDCBiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>
6. CLSI Document M29 Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m29>
7. Centers for Disease Control. Refer to Interim Laboratory Safety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with SARS-CoV-2. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
8. Manual de Instrucciones de uso Xpert Xpress SARS-CoV-2. <https://www.cepheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpress-SARS-CoV-2/Xpert%20Xpress%20SARS-CoV-2%20Assay%20SPANISH%20Package%20Insert%20302-3787-ES%20Rev.%20A.pdf>
9. Biofire RP. Manual de instrucción del usuario. <https://docs.biofire.com/wp-content/uploads/BFR0000-8303-BioFire-RP2.1-Panel-Instructions-for-Use-EUA-EN.pdf>
10. Federal and Drug Administration. Coronavirus (COVID-19). Update: FDA Informs Public about possible accuracy concerns with abbot id now point of care Test. May 14, 2020. www.fda.gov.
11. Ai T, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A report of 1014 cases. *Radiology* 2020; 200642. doi:10.1148/radiol.2020200642.
12. Sociedad Española de Pediatría. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica sobre el uso de las pruebas de detección de anticuerpos. <https://seimc.org>.
13. Juanjuan Zhao, et al Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>
14. Nuccetelli M, et al. SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown? *Cell Death Discov* 2020; 6: 38. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>.