

La infección por SARS CoV2 y el Laboratorio: ¿Qué me detectan las pruebas de PCR vs las pruebas de Anticuerpos de COVID?

Dr. Pedro A. Zárate Rodríguez, Jefe del Laboratorio Clínico
Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX. CDMX



ANTECEDENTES

La infección por SARS CoV2 que inició como epidemia el pasado mes de Diciembre en Wuhan China y que actualmente persiste como Pandemia mundial, causando hasta el día de hoy 6 de septiembre casi 27 millones de personas contagiadas y poco menos de 900,000 muertes; ha permitido el desarrollo de estrategias de diagnóstico que como sucede con todas las infecciones virales se han definido en dos líneas, la identificación de la presencia del virus causante de la enfermedad y la detección de los anticuerpos como respuesta inmune al agente patógeno.

Como lo describen la OMS y OPS, "los coronavirus son un grupo de virus ARN altamente diversos de la familia Coronaviridae que se dividen en 4 géneros: alfa, beta, gamma y delta, y que causan enfermedades de leves a graves en humanos y animales. Existen coronavirus humanos endémicos como los alfacoronavirus 229E y NL63 y los betacoronavirus OC43 y HKU1 que pueden causar enfermedades de tipo influenza o neumonía en humanos. Dos coronavirus zoonóticos que causan enfermedades graves en humanos han emergido: el coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) en 2002-2003 y el coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV)." Posteriormente, en enero de 2020, el agente etiológico responsable de un grupo de casos de neumonía grave en Wuhan, China, fue identificado como un nuevo betacoronavirus (2019-nCoV), distinto del SARS-CoV y MERS-CoV. Respecto a la secuencia genómica completa de este nuevo agente está disponible y se han desarrollado diferentes protocolos de detección, aunque aún no se han validado por completo. En el Instituto Pasteur de París fue secuenciado el virus que ha llegado a nuestro continente y la secuenciación de los casos posteriores continua en proceso de realización, siendo la primera secuenciación en nuestro país, un esfuerzo de varias instituciones a partir del virus identificado en 13 pacientes.

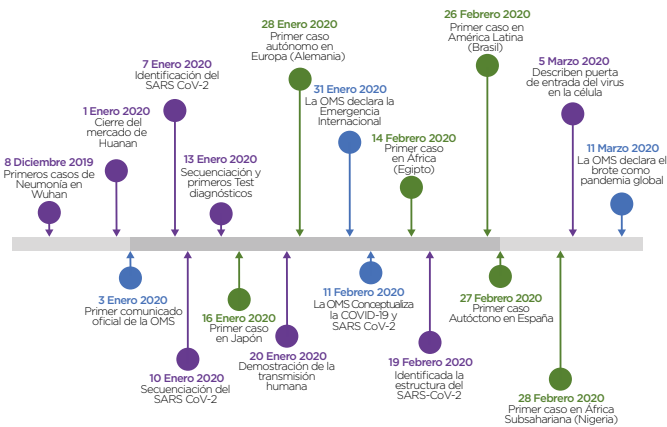


Imagen 1. Time line del inicio y evolución del desarrollo de la infección por SARS CoV2 en el mundo

Como ha sido señalado por el Dr Claudio Galli, "...los clínicos y laboratoristas han trabajado en el estudio de las infecciones virales para identificar los patógenos y luego ayudar al tratamiento de las enfermedades que estos virus han causado. El uso de métodos de detección directa como la amplificación del ácido nucleico viral, DNA o RNA, a través de la reacción de la cadena de la polimerasa o los inmunoensayos para detección de los antígenos virales, generalmente garantiza la mayor sensibilidad para la detección temprana de la infección viral. El otro grupo son las pruebas para detectar anticuerpos humanos contra el virus pero éstas siempre tendrán retrasos debido al tiempo necesario para que el cuerpo humano monte su respuesta humoral completa".

Por esta situación, ambas pruebas para la identificación de una infección viral se deben complementar para definir mejor la etapa clínica de la enfermedad.

PRUEBA DE RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2

Cuando se pronosticó su llegada al continente americano, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) definió lineamientos para realizar el diagnóstico molecular "...a través de la detección por PCR en tiempo real y recomendó a sus Estados Miembros garantizar su identificación oportuna, el envío de las muestras a laboratorios Nacionales y de referencia y la implementación de la detección molecular para 2019-nCoV, mediante la realización de dos protocolos ya publicados y desarrollados en dos diferentes instituciones".

Uno de ellos fue el de los Centros para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), disponible en el siguiente enlace: <https://www.fda.gov/media/134922/download>

El segundo protocolo recomendado para América Latina fue el de la Charité - Universitätsmedizin Berlin, Hospital Charité de Berlin, el cual fue desarrollado en conjunto con Erasmus MC de Holanda y Public Health England, así como la empresa alemana TibMol Biol. Fue Publicado el 17 de enero de 2020 y se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>

En nuestro país, se realizaron desde principios del año 2020, esfuerzos enormes por parte del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) junto con la red de Laboratorios Estatales, para la validación de la PCR en tiempo real en México; con este protocolo fue con el que capacitaron y validaron desde finales de febrero del presente año, tanto a Instituciones públicas como laboratorios privados.

Para la detección de SARS-CoV-2 por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa (qRT-PCR o RT-PCR en tiempo real, por sus siglas en inglés), adaptaron su integración y estandarización, con el uso de iniciadores y sondas para la detección cualitativa y caracterización del virus a partir de muestras de las vías respiratorias para discriminar la positividad entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV; recomendando el desarrollo de la técnica mediante el uso de una enzima específica; los iniciadores y sondas "E_Sarbeco" diseñados para la detección del gen de la proteína de envoltura de los Sarbecovirus, como SARS-CoV y SARS-CoV-2, los iniciadores "RdRP_SARsR" para la detección del gen de la RNA-polimerasa dependiente de RNA, con dos 2 sondas, una que tiene reactividad con SARS-CoV y SARS-CoV-2 (P1) y una con reactividad específica para SARS-CoV-2 (P2), completaron el protocolo operativo estandarizado recomendado.

La OPS estableció que la entidad regulatoria del Estado debe proporcionar los controles positivos o negativos a los laboratorios de su red supervisada, o en su defecto recomendar controles comerciales evaluados y validados por ellos mismos.

El protocolo Charité-Berlin se basa en la detección de 3 marcadores diferentes: genes N, E y RdRp. Los ensayos para los genes E y N se entienden como protocolos de tamizaje para detectar cualquier beta-coronavirus asociado a murciélagos (no detectan coronavirus humanos comunes); el ensayo para RdRp es específico para coronavirus SARS y tipo SARS (incluyendo el 2019-nCoV).

Respecto a la recomendación de nuestra dependencia técnica, la interpretación de la prueba Molecular con el protocolo Charité, debe ser la siguiente:

Tabla 1. "Tabla de interpretación de resultados para SARS-CoV-2 por Biología Molecular"

Gen E	Interpretación		Resultado
	RdRp Discriminatorio	RNasaP	
+	+	+	Positivo a SARS-CoV-2
+	-	+	Probable Sarbecovirus
-	-	+	Negativo a Sarbecovirus y SARS-CoV-2
-	-	-	No Adecuado
-	+	+	Repetir / Enviar al InDRE

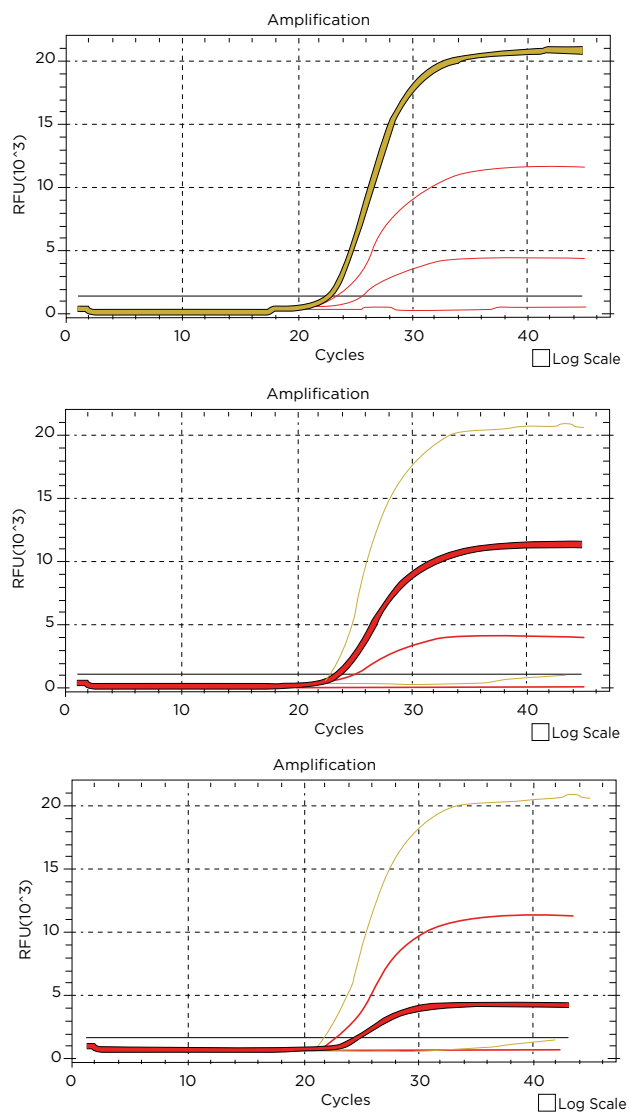


Imagen 2. "Curvas de amplificación de los genes RdRp, E y N de SARS-CoV2, en un termociclador BioRad CFX96, en un caso positivo. Se interpreta el CT (Cycle Threshold) donde inicia la curva"

Además, de la recomendación de la fase analítica de la prueba molecular, el InDRE definió toda una estandarización, desde la toma de la muestra (fase preanalítica) hasta el análisis e interpretación de resultados, (fase postanalítica), incluyendo recomendar procesos de extracción de ácidos nucleicos ya sea manuales o automatizados (también fase preanalítica)

Los laboratorios de Biología molecular validados por el InDRE a nivel nacional, debemos realizar este protocolo completo, así como llevar a cabo el análisis de las curvas de amplificación de los tres genes, interpretando el resultado de acuerdo a lo ya enunciado.

Además de cumplir con las disposiciones de supervisión y control, así como verificación de resultados positivos enviando las muestras que se requieran confirmar de acuerdo a lo establecido.

La prueba molecular, por tanto, nos indica la presencia del virus en las vías respiratorias del paciente, por lo que correlacionando con el paciente que lo presenta, establece y confirma el diagnóstico de detección positiva del virus de SARS-CoV-2.

Actualmente, con base en las publicaciones previas y posteriores, se ha ampliado la información de la prueba molecular, calculando el número de copias de los genes de los virus estudiados en protocolo Charité Berlin, mediante la elaboración de curvas estandarizadas, estimando la carga viral a partir de las CT (grado de fluorescencia en la que inicia la amplificación del gen durante el proceso de la prueba), más específicamente del gen RdRP y del gen E.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA SARS COV-2

Para la práctica clínica es primordial considerar las pruebas diagnósticas que se disponen, es importante saber en cuál etapa de la enfermedad se encuentra el paciente, la velocidad e intensidad con la que se ha desarrollado una respuesta inmune y cuáles tipos de anticuerpos son los que se están generando (IgG o IgM). En el siguiente esquema se señala lo anteriormente enunciado:

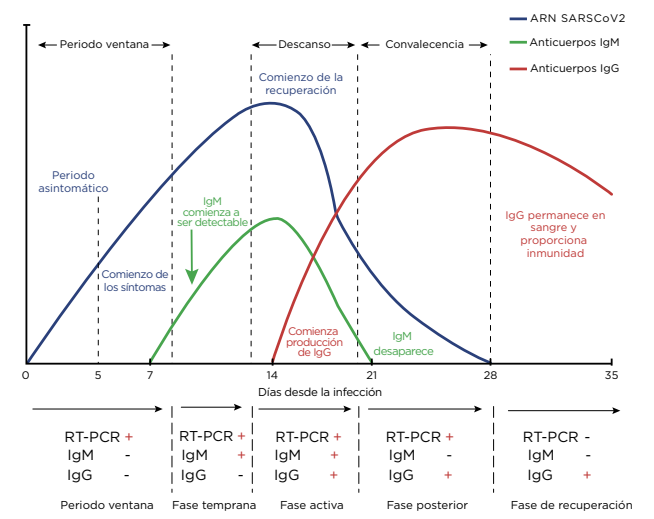


Imagen 3. "Desarrollo de la respuesta inmune ante el SARS-CoV-2"

Respecto a este punto la detección de anticuerpos, los métodos que examinan por separado IgM e IgG en suero pueden ayudar a abordar mejor estas necesidades y facilitar la interpretación clínica a diferencia de los métodos que determinan los anticuerpos totales. Correlacionando con los genes del virus CoV2, los reactivos contra IgG identifican los anticuerpos en su mayoría dirigidos contra el Gen N del SARS COV2, como el reactivo de quimioluminiscencia marca Abbott, el primero en su naturaleza, autorizado por COFEPRIS, la entidad regulatoria de nuestro país.

La determinación por métodos inmunológicos como la ELISA y otros métodos más sensibles y específicos en equipos automatizados y estandarizados como la, Quimioluminiscencia, Electroquimioluminiscencia y otros, es más recomendable que la detección de los anticuerpos a través de las pruebas rápidas, porque los reactivos que se emplean han sido validados de acuerdo a lineamientos de instituciones internacionales como CLSI, donde se estableció la imprecisión (Coeficiente de variación) de cada lote de reactivo, utilizando materiales de control de calidad de la misma naturaleza de la muestra biológica donde se determinarán dichos anticuerpos (suero o plasma).

Con base en el siguiente cronograma de evolución de la infección y su detección de acuerdo al momento de evolución del caso sospechoso, la entidad regulatoria federal de nuestro país ha establecido la interpretación siguiente de las pruebas de detección de anticuerpos IgG e IgM contra SARS CoV2.

COFEPRIS ha establecido como INTERPRETACION de la Prueba

Tabla 2. "Tabla de interpretación de resultados para SARS-CoV-2 por métodos serológicos"

Anticuerpo	Interpretación
IgM - / IgG -	No hay evidencia de infección por SARS-CoV2
IgM + / IgG-	Probable infección reciente aun sin anticuerpos protectores
IgM + / IgG+	Probable infección reciente con anticuerpos protectores en desarrollo
IgM - / IgG+	Probable infección pasada con anticuerpos protectores

Positiva para anticuerpos contra SARS CoV2 que:

1. La presencia de anticuerpos IgG sugiere que el sujeto ha sido expuesto al virus y ha desarrollado una respuesta inmune, típicamente esto ocurre dos semanas después de la exposición y expresión clínica de la enfermedad. NO determina en forma

SARS-CoV-2 CONTROL AMPLIRUN® Y AMPLIRUN® TOTAL

AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL

Diseñado para validar y controlar el proceso del **proceso de amplificación**, contiene RNA purificado de SARS-CoV-2 para la determinación del COVID-19 por el método de PCR.

- Genoma microbiano completo cuantificado
- Permite realizar la amplificación de cualquier fragmento del genoma
- Rango de concentración: 12.500-20.000 copias/ μ l determinado por qPCR
- Válido para cualquier plataforma (PCR Real-Time y PCR convencional)
- No contiene material infeccioso
- Presentación liofilizada
- Incluye un vial de resuspensión con agua de grado molecular



AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL

Diseñado para validar y controlar **el proceso completo** para el diagnóstico del COVID-19 por el método de PCR.

- Virus completo y no infeccioso, con certificado de inactivación
- Contiene todo el genoma y es compatible con cualquier análisis molecular
- Permite controlar el proceso completo: extracción, amplificación y detección
- Resultados a una concentración clínica significativa
- Control liofilizado para garantizarla estabilidad y evitar la manipulación



- categoría que ya no se tiene riesgo de contraer la enfermedad
- La presencia de anticuerpos IgM indica que el sujeto ha sido expuesto al virus y sugiere que el contacto ha ocurrido en las dos semanas anteriores al día de la toma de la muestra
 - La presencia de anticuerpos IgG e IgM en forma simultánea, indica que la enfermedad está pasando su forma o etapa aguda. ⁽¹⁾

ESTRATEGIA COMBINADA PARA EL DIAGNÓSTICO DE SARS COV2: PRUEBA PCR Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

El significado clínico combinando los dos tipos de pruebas (molecular por PCR y de serología de anticuerpos) es el esquematizado en la tabla anexa:

Con el tiempo transcurrido de esta pandemia, se han encontrado

Tabla 3. "Tabla de interpretación de resultados para SARS-CoV-2 por métodos serológicos"

PCR	IgM	IgG	Diagnóstico (Significado clínico)
-	-	-	Negativo
+	-	-	Fase inicial o precoz de la infección
+	+	-	Fase aguda o temprana de la infección
+	+	+	Fase activa de la infección
+	-	+	Fase avanzada o final de la infección
-	-	+	Fase de resolución de la infección (infección pasada)
-	+	-	Fase temprana con falso negativo de PCR
-	+	-	Enfermedad en evolución. PCR de confirmación

muchos comportamientos heterogéneos en cuanto a la magnitud de la respuesta inmune de producción de anticuerpos IgG específicos contra SARS-CoV2, observando que los niveles de anticuerpos de acuerdo al tipo de paciente, tipo y severidad de la infección cursada, tienen distintos títulos y la duración en el tiempo de los mismos, es muy variable. Concluyéndose que no es posible asegurar que la producción de anticuerpos IgG es permanente.

Debido a la amplia difusión de las pruebas serológicas para escenarios como el retorno a la vida laboral o escolar, así como para el estudio en pacientes convalecientes de la infección pulmonar con la finalidad de obtener su plasma (protocolos de plasma convaleciente) para transfundir a pacientes con infección aguda y coadyuvar en su recuperación, han tomado relevancia enorme por lo que se deberá ir acumulando experiencia para poder utilizarlas en los escenarios clínicos preventivos y asistenciales donde se requiera conocer el estado de las personas en relación a su entorno.

PRUEBAS RÁPIDAS PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SARS COV2

Están disponibles en forma de dispositivos individuales para realizar en sangre o suero obtenido por centrifugación, basados en el método de inmunocromatografía lateral. Son los denominados kits rápidos. Tienen la ventaja de la rapidez y facilidad tanto de obtención de muestra como de uso. No requieren personal especializado, ni para la extracción ni para la realización. Determinan IgG, IgM o ambos.

Podrían ser utilizados en servicios de atención primaria, tamizaje o en áreas de urgencias hospitalarias. Hay diferentes tipos de kits rápidos, según detecten IgG e IgM conjunta o separadamente y la sensibilidad y especificidad varían según la casa comercial. No existen estudios comparativos entre los diferentes reactivos comerciales.

La sensibilidad y especificidad es baja por lo que no son recomendables realizar como estudio de diagnóstico de Infección por SARS-CoV2.

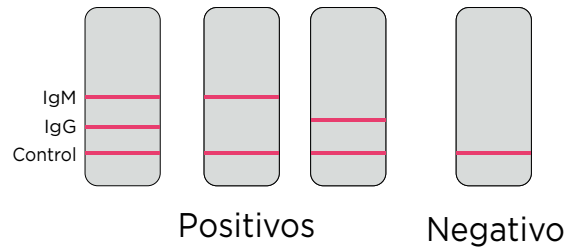


Imagen 4. "Posibles resultados obtenidos a partir de pruebas rápidas"

Esquema para interpretación de anticuerpos IgM e IgG contra SARS CoV2 en dispositivos tipo prueba rápida basado en Inmunocromatografía lateral.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que las pruebas de laboratorio para SARS CoV2, moleculares y serológicas para identificar anticuerpos, se complementan para coadyuvar a que el médico no solo establezca el diagnóstico de la infección viral, sino la etapa clínica que cursa cada paciente.

Sea una persona asintomática o un caso sospechoso, el significado clínico dependerá de la adecuada valoración de médicos con experiencia, sin olvidar que la definición operativa de caso sospechoso debe cumplirse para dar valor a las pruebas, tanto la molecular PCR en tiempo real como las determinaciones de los anticuerpos.

Tomando en cuenta la historia natural de la infección, el dato clínico más relevante para interpretar las pruebas son los días de evolución de los síntomas, por lo que el interrogatorio debe ser muy preciso al respecto; los médicos deben contar también con la experiencia para interpretar otros estudios coadyuvantes como son la oximetría y los estudios de imagen desde la Radiografía simple de tórax o la Tomografía pulmonar, para integrar su diagnóstico.

No debemos olvidar como profesionales de laboratorio, que las condiciones preanalíticas son muy importantes en la toma de la muestra, como en toda prueba o estudio de laboratorio. En etapa preanalítica debe estandarizarse la toma de hisopado nasofaríngeo, así como el hisopo y el medio de transporte viral deben ser los recomendados por los estándares nacionales y mundiales. Los controles de calidad en todas las etapas de los procesos de extracción y de realización de PCR, así como la unificación en el análisis e interpretación por profesionales en biología molecular que hayan adquirido la experiencia derivada de esta pandemia.

BIBLIOGRAFÍA

- (CENAM), C. N., & (EMA), E. M. (Abril de 2008). Guía para la validación y la Hui, DSC and Zumla, A. Severe Acute Respiratory Syndrome - Historical, Epidemiologic; and Clinical Features. [book auth.] HW Boucher, A Zumla and DSC Hui. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases - Clinics Review Articles . Philadelphia : Elsevier, 2019, pp. 869-889.
- Drosten, C, et al. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. Trends Mol Med. 2003, Vol. 9, pp. 325-7.
- El, Azhar, et al. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). [book auth.] Boucher HW, Zumla A and DSC Hui. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases - Clinics Review Articles. Philadelphia : Elsevier, 2019, pp. 891-905.
- de Wit, E, et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. Nature Reviews Microbiology. 2016, Vol. 14, pp. 523-524.
- R, Hilgenfeld and M, Peiris. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. Antiviral Res. 2013, Vol. 100, pp. 286-95.
- World Health Organization. Laboratory testing of human suspected cases of novel coronavirus (nCoV) infection - Interim guidance. WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.1. [Online] January 17, 2020. <https://www.who.int/health-topics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>.
- GISAID. Newly discovered betacoronavirus, Wuhan 2019-2020. GISAID EpiFlu - Global Initiative on Sharing All Influenza Data. [Online] January 2020. <https://platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223>.
- <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>