

Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el Virus COVID-19

30 de marzo de 2020

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 (1-3). 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 (1, 3). Sin embargo, 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) (1-5).

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, distinto del SARS-CoV y MERS-CoV (6). El 11 de febrero de 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) anunció la denominación del virus como coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) (7), mientras que, el mismo día, la OMS nombró la enfermedad como enfermedad por coronavirus COVID-19 (8). Para fines de comunicación, haremos referencia a este virus como "el virus responsable de COVID-19" o "el virus COVID-19". 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 (9). Sin embargo, a la luz de la circulación actual de COVID-19 en la región de las Américas, la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS / OMS) recomienda a los Estados Miembros garantizar la identificación oportuna de casos sospechosos, la toma y el envío de muestras a los laboratorios de referencia, y la implementación de protocolos de detección molecular, según la capacidad del laboratorio.

El 19 de marzo de 2020, la OMS actualizó su guía provisional sobre las pruebas de laboratorio para la enfermedad por coronavirus (COVID-19) en casos humanos sospechosos que incluye información sobre la toma y envío de muestras, pruebas de laboratorio, e informes de casos y resultados (9). La OMS también actualiza las definiciones de casos sospechosos de COVID-19 según sea necesario (10).

Toma de muestras y envío adecuado

Toma de muestras

Las muestras deben ser tomadas por personal capacitado y teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad, incluyendo el uso de los equipos de protección personal adecuados para las precauciones estándar, de contacto y de transmisión aérea. En particular, el personal debe usar higiene de manos adecuada, bata, respirador (N95 o FFP2), protección para los ojos (gafas) o faciales (protector facial) y guantes (11).

Muestras respiratorias

Las muestras recomendadas son las del tracto respiratorio inferior, incluidos el esputo, el lavado broncoalveolar y el aspirado traqueal (cuando sea posible según los criterios médicos). Sin embargo, cuando la toma de una muestra del tracto respiratorio inferior no es posible, las muestras del tracto respiratorio superior también son útiles. En general, se recomienda la toma de hisopados nasofaríngeo y orofaríngeo

combinados (los hisopos deben colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral) (9).

Si el muestreo de contactos asintomáticos se considera en las guías nacionales, las muestras de las vías respiratorias superiores se prefieren para la toma.

Solo se deben usar hisopos de Dacrón flocados o poliéster. Los protocolos para la producción casera de medios de transporte viral están disponibles previa solicitud en la Oficina Regional de la OPS. Además, si el medio de transporte no está disponible, podría usarse solución salina estéril (ver abajo para consideraciones de transporte de muestra).

Envío de muestras

Las muestras respiratorias deben mantenerse refrigeradas (4-8 °C) y enviarse al laboratorio donde se procesarán dentro de las 24-72 horas de la toma. Si no se pueden enviar las muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -70 °C (o menos) hasta que se envíen (asegurando que se mantenga la cadena de frío). Si los hisopos se colocaron en solución salina estéril en lugar de medio de transporte viral, el envío debe ser expedito.

El envío de muestras sospechosas a laboratorios de referencia o centros colaboradores fuera del país y por vía aérea debe cumplir con todas las normas internacionales (IATA) para Sustancias Biológicas de Categoría B (12).

Otros tipos de muestra

El virus COVID-19, así como el SARS-CoV y el MERS-CoV, se ha detectado en otros tipos de muestras, como heces y sangre (9). Sin embargo, la dinámica viral en estas muestras no se ha caracterizado completamente. Las muestras de tejido pulmonar o del tracto respiratorio también pueden ser útiles para la detección molecular en casos fallecidos, siempre y cuando existan las condiciones apropiadas para realizar la autopsia, particularmente la protección respiratoria. Las muestras de sangre agudas y convalecientes podrían ser útiles a medida que las pruebas serológicas estén disponibles (ver abajo).

Ensayos de laboratorio

Las directrices de bioseguridad para el manejo de muestras sospechosas en el laboratorio se han publicado anteriormente (12, 13).

Métodos moleculares

La confirmación rutinaria de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Extracción de ARN

El ARN se puede extraer de las muestras mencionadas anteriormente utilizando cualquier protocolo estándar o estuche de extracción. En general, la etapa de lisis de la muestra en la extracción de ARN inactiva cualquier virus. Por lo tanto, las muestras después de la lisis se consideran generalmente como no infecciosas. La inactivación del virus COVID-19 a través de la lisis de la muestra se ha verificado para algunos kits comerciales (14).

Las muestras de esputo requieren licuefacción antes de la extracción molecular (15), mientras que las muestras de tejido requieren lisis y homogeneización.

Protocolos de detección molecular

La OMS ha puesto a disposición varios protocolos de diagnóstico molecular (utilizando RT-PCR) en la página web:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

Favor notar que la OMS no prefiere ni respalda los nombres de los vendedores ni los fabricantes incluidos en los protocolos. Además, estos protocolos aún no han sido validados a través del proceso de la OMS.

Gracias al esfuerzo de los Estados Miembros de la OPS, todos los laboratorios nacionales con capacidad para realizar pruebas moleculares, incluidos los Centros Nacionales de Influenza (NIC), recibieron capacitación en el uso del primer protocolo puesto a disposición por la OMS, desarrollado por el Instituto de Virología Charité – Universitätsmedizin Berlín, Alemania. La evaluación del protocolo ha sido publicada (16) y un protocolo de trabajo está disponible en el siguiente enlace:

<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>

El protocolo se basa en la detección de dos marcadores en el genoma del virus: el gen E, utilizado como tamizaje, seguido de la confirmación de los positivos al gen E a través de la detección del gen RdRP utilizando las sondas P1 y / o P2. El ensayo E es específico para todos los virus relacionados con el SARS-CoV (es decir, SARS-CoV, el virus COVID-19 y los virus de murciélagos relacionados), mientras que el ensayo RdRP con la sonda P2 solo detecta el virus COVID-19. La OPS / OMS ha distribuido reactivos específicos (cebadores, sondas y controles positivos) y protocolos de trabajo para estos ensayos en toda la Región.

Otros ensayos moleculares están disponibles y se pueden realizar en plataformas abiertas (o “manuales”) o cerradas (es decir, que los estuches solo funcionan en sistemas propietarios que realizan los ensayos de manera automatizadas). Estos incluyen ensayos que han sido aprobados para su comercialización por las autoridades reguladoras nacionales (en particular, aquellas consideradas por la OMS como SRA [*Stringent Regulatory Authority*] para su precalificación acelerada de pruebas de diagnóstico in vitro). La OMS también está evaluando solicitudes para inclusión en el Listado de Uso de Emergencia (EUL) de ensayos para la detección del ácido nucleico del virus COVID-19 (17). Bajo la supervisión de la autoridad sanitaria nacional y con el apoyo técnico de los Laboratorios Nacionales de Salud Pública y Centros Nacionales de Influenza, estos ensayos pueden ser utilizados en centros de atención que cuenten con la capacidad instalada, o en laboratorios descentralizados.

Implementación e interpretación

Aunque la recomendación para la confirmación de casos en el laboratorio es detectar dos marcadores genéticos diferentes (gen E seguido por gen RdRP, como se describe anteriormente para el protocolo Charité), una vez que se establece y se extiende la circulación del virus COVID-19 en un área / país dado, ya no es necesario ejecutar la PCR para ambos genes. Por lo tanto, se puede implementar la confirmación mediante la detección de un solo marcador genético, si las curvas y otros parámetros de aseguramiento de la calidad son óptimos. Se pueden usar los genes E o RdRP para el diagnóstico; sin embargo, la PCR del gen E ha demostrado una sensibilidad ligeramente mayor, por lo que recomendamos priorizar el gen E como el marcador seleccionado.

La detección molecular del virus COVID-19 utilizando protocolos bien diseñados suele ser muy específica; por lo tanto, un resultado positivo confirma la detección del virus. Por el contrario, un resultado negativo no siempre significa la ausencia de infección por el virus COVID-19 (9). Varias razones pueden explicar un resultado negativo en una persona infectada con el virus COVID-19, principalmente:

- Calidad de la muestra, manipulación, transporte y / o almacenamiento deficientes (como control, se puede realizar la detección cualitativa de un gen constitutivo (*housekeeping*) humano [por ejemplo, RNase P (18)]).
- Extracción de muestra deficiente / fallida, presencia de inhibidores de PCR en el ARN extraído (como control, se puede usar un control de extracción o la detección de un constitutivo como se mencionó anteriormente).
- La muestra se recolectó en un momento en que el paciente no estaba secretando cantidades suficientes de virus, por ejemplo, muy temprana o tardíamente durante la infección (este punto es particularmente relevante ya que la dinámica de la presencia del virus en diferentes tipos de muestra no se ha establecido del todo).
- Al igual que con cualquier ensayo de detección molecular, las mutaciones del virus en las regiones a las que se dirigen los ensayos pueden afectar la sensibilidad de la detección.

Métodos serológicos

Los ensayos basados en la detección de anticuerpos IgM / IgG pueden ayudar a investigar un brote en curso y a realizar estudios de seroprevalencia. Existen varios ensayos (tanto pruebas rápidas como ELISA) disponibles en el mercado para la detección de anticuerpos IgM / IgG que se comercializan para la detección de las infecciones por el virus COVID-19. Sin embargo, estas pruebas no están recomendadas para su uso al día de hoy.

Este tipo de pruebas puede estar limitado debido a la reactividad cruzada con otros coronavirus que normalmente están presentes en la comunidad y que hacen difícil la interpretación de los resultados (19). Además, en la actualidad la dinámica de la respuesta y producción de anticuerpos durante las diferentes fases de la infección no está completamente establecida, lo cual limita aún más el uso de estas pruebas. Algunos estudios han demostrado que durante los primeros 7 días desde el inicio de síntomas, menos de un 40% de pacientes presentan anticuerpos detectables (20). Así, estos ensayos no deben ser usados para descartar un caso durante los primeros días de enfermedad. Asimismo, la detección de anticuerpos después del día 7 solo indica contacto previo con el virus, pero no dice nada respecto a la presencia y excreción del virus. Los anticuerpos así detectados podrían resultar de una infección previa y no de la infección aguda para la cual se está requiriendo el diagnóstico.

Se están comercializando muchos productos para la detección de anticuerpos (IgM y / o IgG) inducidos por la infección por el virus COVID-19, incluidas las pruebas rápidas. El rendimiento de cualquier prueba de este tipo en términos de especificidad y sensibilidad debe validarse y evaluarse. Actualmente y a solicitud de la OMS, se están llevando a cabo procesos de evaluación y validación eventual para algunas de estas pruebas. Sin embargo, hasta ahora, ninguna tiene una validación independiente y, por lo tanto, se debe tener precaución en su uso. Además, no se recomienda el uso de pruebas rápidas ya que (además de lo mencionado anteriormente), estos tipos de pruebas pueden tener baja sensibilidad (ver abajo). Por estas razones, la detección de anticuerpos no se considera (todavía) una prueba apropiada para la confirmación o el diagnóstico de los casos de COVID-19. Protocolos serológicos caseros también se están desarrollando en varios laboratorios.

Detección de antígenos

Durante los primeros días tras el inicio de síntomas (1 a 5 días aproximadamente), se generan proteínas virales que pueden ser detectadas mediante diferentes ensayos (ELISA, inmunofluorescencia, etc.). En general, este tipo de ensayos presentan una especificidad aceptable (dependiendo del ensayo) por lo cual su detección puede ser usada como criterio de confirmación (en conjunto con la definición de caso, la historia clínica y los antecedentes epidemiológicos) y para tomar decisiones en salud pública (aislamiento).

Sin embargo, no se ha establecido la dinámica de producción y excreción de estas proteínas (antígenos), por lo cual un resultado negativo (en cualquier estadio de la infección) no debe ser usado como criterio para descartar un caso, y por lo tanto otros criterios deben ser tenidos en cuenta

Pruebas rápidas

Hasta el momento no existen pruebas rápidas (inmunocromatografía o detección con oro coloidal) que hayan sido autorizadas por autoridades reguladoras competentes y/o formalmente validadas. En general, este tipo de ensayos tienen una sensibilidad baja. Por eso, su valor predictivo positivo es bueno (pueden ser usadas para confirmar) pero su valor predictivo negativo es bajo (no deben ser usadas para descartar un caso). Además, las limitaciones descritas anteriormente para las pruebas serológicas y la detección de antígenos aplican a las pruebas rápidas.

Algoritmo de laboratorio

Las pruebas para el virus COVID-19 deben considerarse para pacientes que cumplan la definición de caso (10). Los laboratorios deben continuar utilizando el algoritmo de laboratorio de influenza recomendado por la OPS para la vigilancia rutinaria de la influenza y de los casos inusuales de IRAG.

Fortalecimiento de las capacidades de laboratorio y redes

Todos los laboratorios nacionales de salud pública con capacidad de diagnóstico molecular, incluidos los NIC, han implementado la detección del virus COVID-19. Se insta a los laboratorios a garantizar la disponibilidad de recursos humanos e insumos genéricos (por ejemplo, kits de extracción y enzimas de RT-PCR) para la detección del virus COVID-19, y a planificar un aumento en las pruebas de laboratorio.

Además, las plataformas de secuenciación pueden usarse para la caracterización genética del virus COVID-19 en laboratorios con capacidad de secuenciación de Sanger o *Next Generation*. Se alienta a estos laboratorios a secuenciar oportunamente muestras positivas y compartir información genética a través de GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data Platform*). La OPS está trabajando para establecer y fortalecer una red de secuenciación genómica COVID-19 en la región de las Américas para que los datos genómicos estén disponibles de manera oportuna.

Los países sin capacidad de diagnóstico molecular para implementar la detección del virus COVID-19 deben enviar muestras clínicas sospechosas (ajustadas estrictamente a la definición del caso) a un laboratorio de referencia. La lista de laboratorios de referencia de la OMS que realizan pruebas de confirmación está disponible en:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

En las Américas, hasta la fecha hay dos laboratorios de referencia de la OMS para el virus COVID-19:

- Laboratorio de diagnóstico de virus respiratorios, CDC, Atlanta, EE. UU.
- Laboratorio de Virus Respiratorios y Sarampión, Fiocruz, Río de Janeiro, Brasil.

Se debe contactar a la OPS antes de remitir las muestras a los laboratorios de referencia de la OMS.

Los países que no tienen capacidad de diagnóstico molecular para implementar la detección del virus COVID-19 pero que tienen la intención de establecer dicha capacidad pueden contactar a la OPS para obtener orientación y apoyo.

Reporte de datos

Conformemente el Reglamento Sanitario Internacional (RSI), todos los casos confirmados de COVID-19 deben notificarse en 24 horas a través de los canales oficiales del RSI (10).

Además, todos los resultados positivos y negativos para COVID-19 deben informarse en la base de datos FluNet que se envía semanalmente a la OPS / OMS. Las hojas de cálculo de FluNet fueron actualizadas con la adición de una nueva columna para COVID-19 y se han enviado a los países para reemplazar la versión anterior. Se puede obtener información adicional a través de flu@paho.org.

Referencias

1. Azhar EI, Hui DSC, Memish ZA, Drosten C, Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):891-905.
2. Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med*. 2003;9(8):325-7.
3. Hui DSC, Zumla A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):869-89.
4. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):523-34.
5. Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res*. 2013;100(1):286-95.
6. Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). Newly discovered betacoronavirus, Wuhan 2019-2020. 2020 [Available from: platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223].
7. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv*. 2020:2020.02.07.937862.
8. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Geneva: WHO; 2020. Disponible en: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
9. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. WHO/COVID-19/laboratory/2020.5. Geneva: WHO; 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
10. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with coronavirus disease (COVID-2019), Interim guidance. WHO/2019-nCoV/SurveillanceGuidance/2020.6. Geneva: WHO; 2020. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>.
11. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Requerimientos para uso de equipos de protección personal (EPP) para el nuevo coronavirus (2019-nCoV) en establecimientos de salud. Washington, DC: OPS / OMS; 2020. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/requerimientos-para-uso-equipos-proteccion-personal-epp-para-nuevo-coronavirus-2019-ncov>.
12. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Directrices provisionales de bioseguridad de laboratorio para el manejo y transporte de muestras asociadas al nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV). Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Disponible en: www.paho.org/es/file/58508/download?token=fc5J8kWB.
13. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). WHO/WPE/GIH/2020.2. Geneva: WHO; 2020. Disponible en: [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)).
14. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, Instructions for Use. Atlanta: CDC; 2020. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Processing of Sputum Specimens for Nucleic Acid Extraction. Atlanta: CDC; 2020. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/processing-sputum-specimens.pdf>.

16. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3).
17. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak – Emergency Use Listing Procedure (EUL) announcement. Geneva: CDC; 2020. Disponible en: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/EUL/en/.
18. Centers for Disease Control and Prevention. CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1). Geneva: WHO; 2009. Disponible en: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimerTPCRprotocol_20090428.pdf.
19. Meyer B, Drosten C, Muller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. Virus Res. 2014;194:175-83.
20. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medRxiv. 2020:2020.03.02.20030189.

Número de referencia: OPS/PHE/IMS/COVID-19/20-0003

© Organización Panamericana de la Salud, 2020. Algunos derechos reservados. Esta obra está disponible en virtud de la licencia CC BY-NC-SA 3.0 IGO.