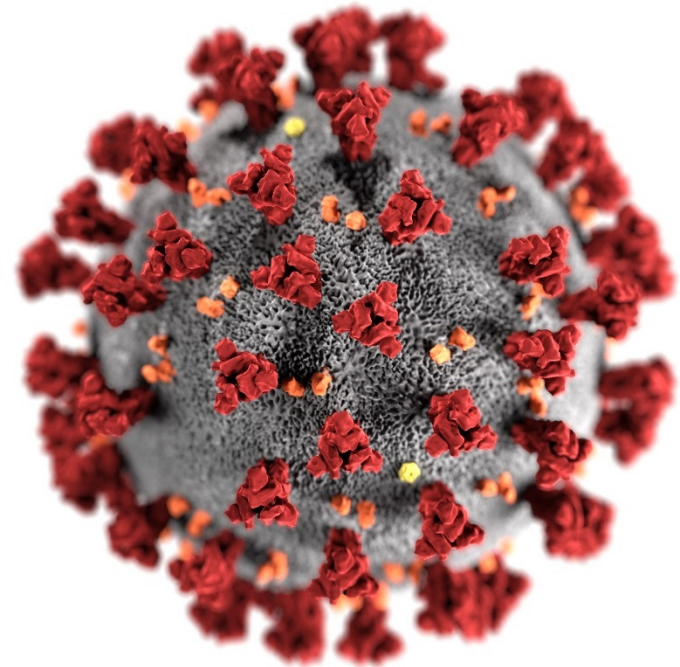




Diagnóstico de Laboratorio

Actualización Diagnóstica de Laboratorio SARS-CoV-2

Beatriz López y Sandra Juarez
CDC-Oficina Regional Centroamérica



For more information: www.cdc.gov/COVID19

Basado en ppt de Christina M. Scheel, PhD

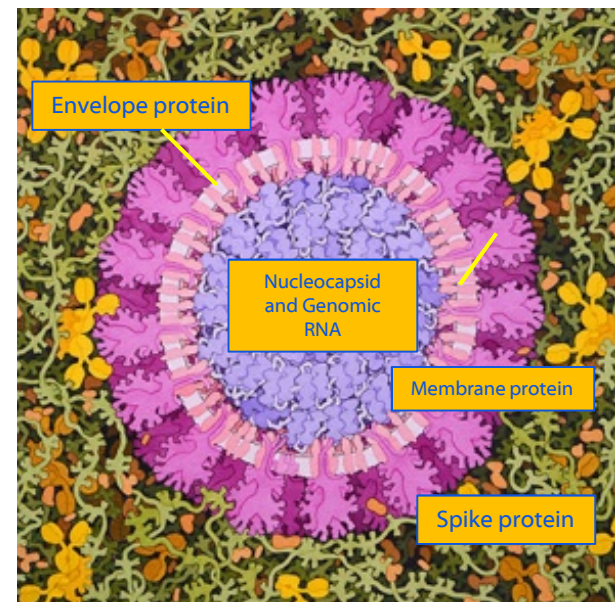
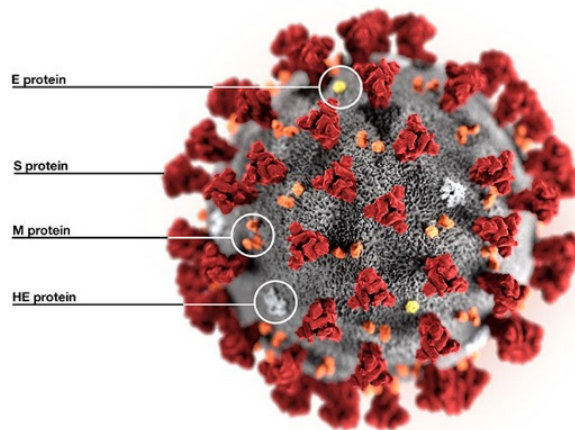
Objetivos

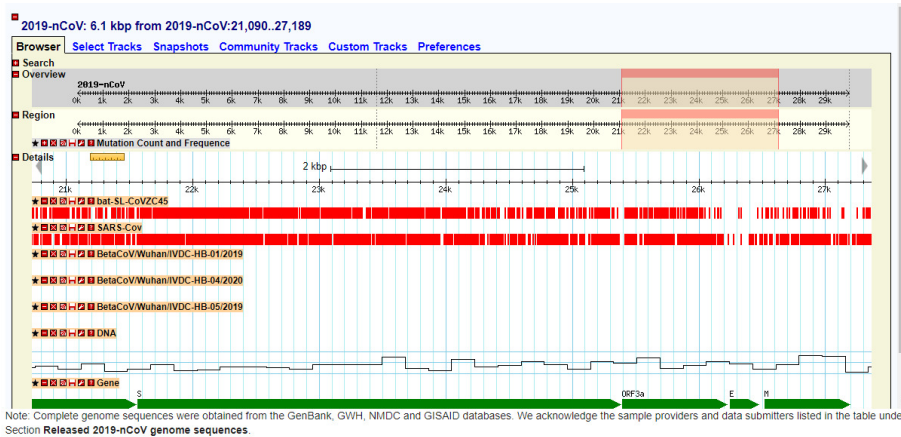
- Conocer las generalidades del diagnóstico de laboratorio de Covid-19
- Conocer las pruebas disponibles, su uso e interpretación

SARS-CoV-2 / Características

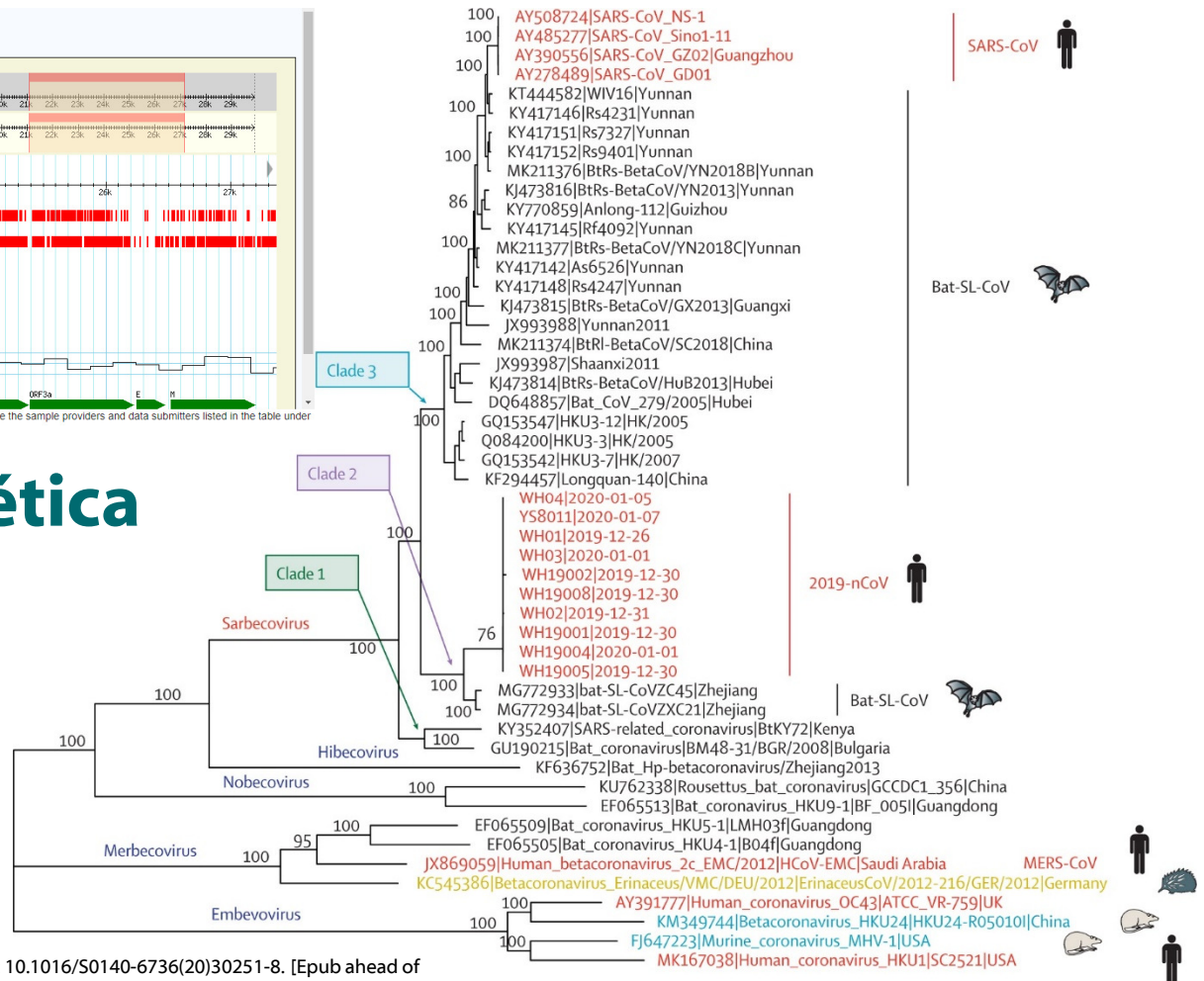
Virus envuelto ARN de cadena simple

- Proteínas
 - Nucleocápside (N)
 - Envoltura proteica (E)
 - Membrana proteica (M)
 - Espícula proteica (S)





Secuencia genética



Lu R, Zhou X, Li J et al. *Lancet*. 2020 Jan 30. pii: S0140-6736(20)30251-8. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8. [Epub ahead of print]

El papel del diagnóstico de COVID-19 en la respuesta a la pandemia

- Confirmación de infección en pacientes que cumplen con la definición de caso clínico COVID-19
- Selección rápida de casos sospechosos para una gestión rápida, triaje
- Detección de infección en contactos asintomáticos de casos confirmados.
- Determinar la exposición (actual y pasada) al virus SARS-CoV-2 para comprender el verdadero alcance del brote, mapear la pandemia, monitorear tendencias y rastrear contactos

Si bien las pruebas moleculares siguen siendo el estándar de oro para confirmar casos, se anticipa que las pruebas serológicas y otros ensayos rápidos desempeñarán un papel cada vez mayor para abordar la creciente necesidad de pruebas descentralizadas en el contexto de la capacidad básica de laboratorio y a medida que se expande la pandemia.

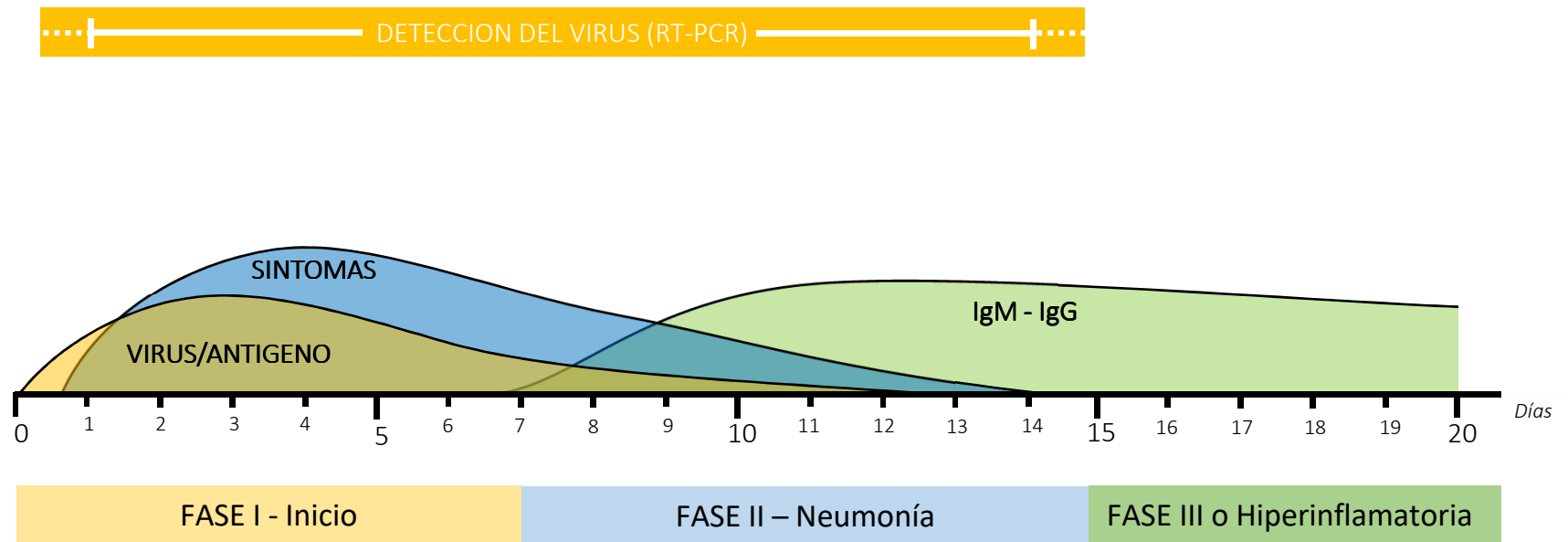


<https://aslm.org/wp-content/uploads/2020/04/Peeling-ECHO-COVID-19-Diagnostics-RP.pdf>

Pruebas Moleculares



Detección del SARS-CoV-2 en diferentes etapas de la infección por pruebas diagnósticas



Elaborado por S. Juarez, abril 2020

Pruebas de laboratorio para el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV) en casos sospechosos de infección en humanos

Orientaciones provisionales
17 de enero de 2020



Guía Técnica de Laboratorio de la OMS ¹

Protocolos de prueba de diagnóstico para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de COVID-19

- Alemania
- Hong Kong
- USA solo disponible dentro de USA
- China
- Tailandia
- Japón

Todas las pruebas detectan virus: no se detecta respuesta humoral (anticuerpos)

[1. file:///C:/Users/fdx8/Downloads/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf](file:///C:/Users/fdx8/Downloads/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf)

RT-PCR protocolos para detección de COVID-19¹

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa RT-PCR, del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction)

Muestras humanas respiratorias

- Hisopados oro y nasofaríngeos
- Lavado bronquial
- Aspirado traqueal
- Esputo

Figure 2. 2019-nCoV rRT-PCR Diagnostic Panel: Example of Sample and Control Set-up

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11*	12
A	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
B	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
C	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
D	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
E												
F												
G												
H												

*Replace the sample in this column with extracted HSC if necessary



Pruebas Moleculares para SARS-CoV-2 *Estandar de oro*

- Las pruebas moleculares están basadas en las secuencias genéticas del genoma viral del SARS-CoV-2
- Las pruebas moleculares requieren:
 - Enzimas y cebadores (primers) que copian el material genético
 - Los bloques de construcción del ácido nucleico (nucleótidos)
 - Solución buffer
 - El material genético viral (si esta presente) extraído de la muestra usando un kit de reactivos
- Las pruebas se llevan a cabo en un equipo que usa ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento lo que lleva a la amplificación de material genético viral hasta conseguir niveles detectable



Directrices de OPS (30 marzo)

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 y un protocolo de trabajo está disponible en el siguiente enlace:

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



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, 4]. 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

<https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con-virus-covid-19>



Interpretación

- Resultado Positivo: Confirma una Infección por SARS-CoV-2
- Resultado Negativo: Ausencia de virus/ARN o en cantidades no detectables (por la prueba en uso)
 - Recomendación: Procesar más muestras y repetir la prueba si hay fuerte sospecha clínica o epidemiológica.

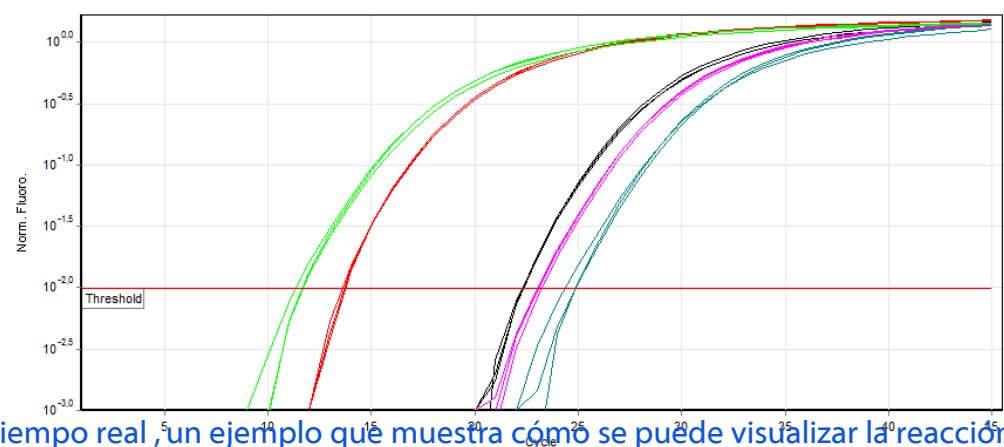


Figura genérica de PCR en tiempo real, un ejemplo que muestra cómo se puede visualizar la reacción de amplificación a medida que ocurre y también los números de ciclo y cómo se podrían interpretar según el valor de corte de CT



Diferentes tipos de pruebas moleculares

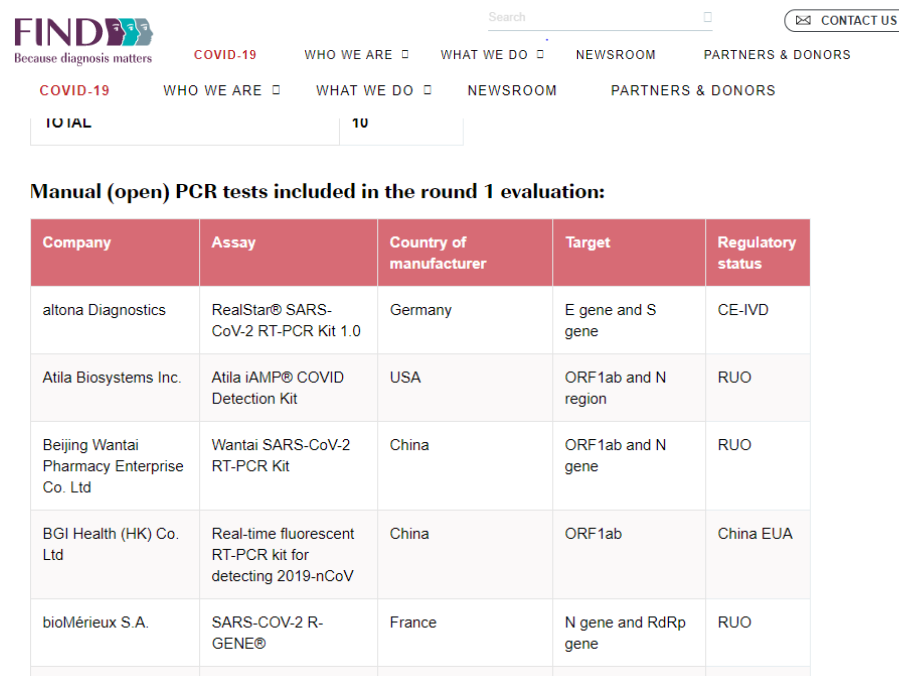


Procesos de validación

FIND.org, califica las pruebas para la OMS, ha enumerado las pruebas actuales que están en proceso de evaluación final

Es bueno estar atentos a cuáles están pasando a las evaluaciones finales)

La lista muestra dónde estamos al día:



The screenshot shows the FIND.org website header with the logo and navigation menu. Below the header, there is a search bar and a "CONTACT US" button. The main content area displays a table titled "Manual (open) PCR tests included in the round 1 evaluation:".

Company	Assay	Country of manufacturer	Target	Regulatory status
altona Diagnostics	RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0	Germany	E gene and S gene	CE-IVD
Atila Biosystems Inc.	Atila iAMP® COVID Detection Kit	USA	ORF1ab and N region	RUO
Beijing Wantai Pharmacy Enterprise Co. Ltd	Wantai SARS-CoV-2 RT-PCR Kit	China	ORF1ab and N gene	RUO
BGI Health (HK) Co. Ltd	Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV	China	ORF1ab	China EUA
bioMérieux S.A.	SARS-COV-2 R-GENE®	France	N gene and RdRp gene	RUO

<https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/>

Autorizaciones de Emergencia del FDA

www.fda.gov

[In Vitro Diagnostic EUAs](#)



Home / Medical Devices / Medical Device Safety / Emergency Situations (Medical Devices) / Emergency Use Authorizations

Emergency Use Authorizations

Test Kit Manufacturers and Commercial Laboratories Table:

Search: Show 100 entries

Date EUA Issued	Manufacturer	Diagnostic (Letter of Authorization)	Fact Sheet for Healthcare Providers	Fact Sheet for Patients	Manufacturer Instructions / Package Insert
04/07/2020	InBios International, Inc	Smart Detect SARS-CoV-2 rRT-PCR Kit	Healthcare Providers	Patients	IFU
04/06/2020	Gnomegen LLC	Gnomegen COVID-19 RT-Digital PCR Detection Kit	Healthcare Providers	Patients	IFU
04/03/2020	Co-Diagnostics, Inc.	Logix Smart Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Kit	Healthcare Providers	Patients	IFU
04/03/2020	ScienCell Research Laboratories	ScienCell SARS-CoV-2 Coronavirus Real-time RT-PCR (RT-qPCR) Detection Kit	Healthcare Providers	Patients	IFU
04/03/2020	Luminex Corporation	ARIES SARS-CoV-2 Assay	Healthcare Providers	Patients	IFU
04/02/2020	Becton, Dickinson & Company (BD)	BioGX SARS-CoV-2 Reagents for BD MAX System	Healthcare Providers	Patients	IFU
04/01/2020	Ipsium Diagnostics, LLC	COV-19 IDx assay	Healthcare Providers	Patients	EUA Summary
04/01/2020	Cellex Inc.	qSARS-CoV-2 IgG/IgM Rapid Test	Healthcare	Patients	IFU

<http://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations>

Pruebas disponibles en el mercado con autorización FDA de emergencia

33 pruebas autorizadas hasta el 14 de marzo

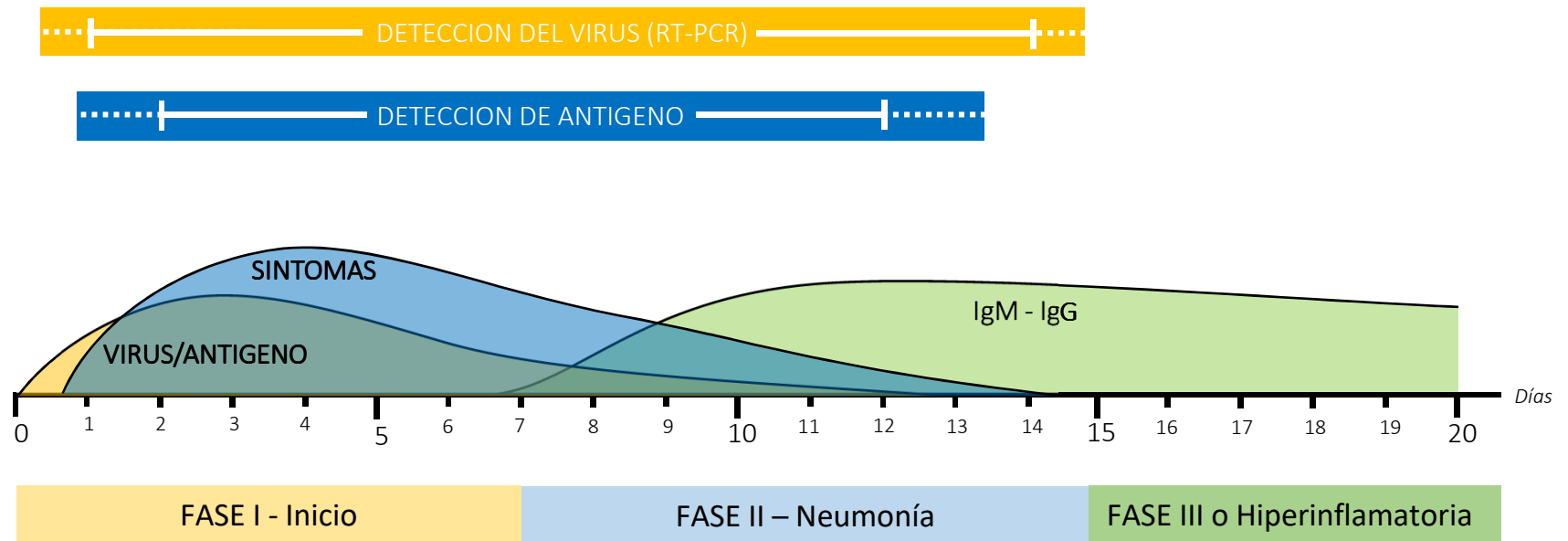
- Pruebas moleculares
 - CDC
 - ThermoFisher
 - Hologic
 - Roche
 - Abbott (2)
 - Cepheid
 - Biofire
 - PerkinElmer
 - Etc.
- Pruebas serológicas
 - Cellex (IgG-IgM)



Pruebas no Moleculares



Detección del SARS-CoV-2 en diferentes etapas de la infección por pruebas diagnósticas



Elaborado por S. Juárez, abril 2020



Pruebas de diagnóstico rápidas basadas en la detección de antígenos

En los primeros días tras el inicio de síntomas (1 a 5 días), se generan proteínas virales que pueden ser detectadas mediante diferentes ensayos.

- Tipo de muestra: Hisopado nasofaríngeo, nasal u orofaríngeo, potencialmente saliva y heces
- Principio: inmunocromatografía o ELISA
- Uso: evaluar personas sospechosas o para triaje e identificar candidatos para pruebas adicionales

Con los datos limitados disponibles, la OMS no recomienda actualmente el uso de pruebas de diagnóstico rápido de detección de antígeno para la atención al paciente, aunque se recomienda investigar su rendimiento y su potencial utilidad de diagnóstico.



<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>



Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19

Scientific Brief

8 April 2020

In response to the growing COVID-19 pandemic and shortages of laboratory-based molecular testing capacity and reagents, multiple diagnostic test manufacturers have developed and begun selling rapid and easy-to-use devices to facilitate testing outside of laboratory settings. These simple test kits are based either on detection of proteins from the COVID-19 virus in respiratory samples (e.g. sputum, throat swab) or detection, in blood or serum, of human antibodies generated in response to infection.

WHO applauds the efforts of test developers to innovate and respond to the needs of the population.

However, before these tests can be recommended, they must be validated in the appropriate populations and settings. Inadequate tests may miss patients with active infection or falsely categorize patients as having the disease when they do not, further hampering disease control efforts. At present, based on current evidence, WHO recommends the use of these new point-of-care immunodiagnostic tests only in research settings. They should not be used in any other setting, including for clinical decision-making, until evidence supporting use for specific indications is available.

WHO continues to evaluate available immunodiagnostic tests for COVID-19 and will update this scientific brief when necessary.

Interpretación

Resultado POSITIVO:

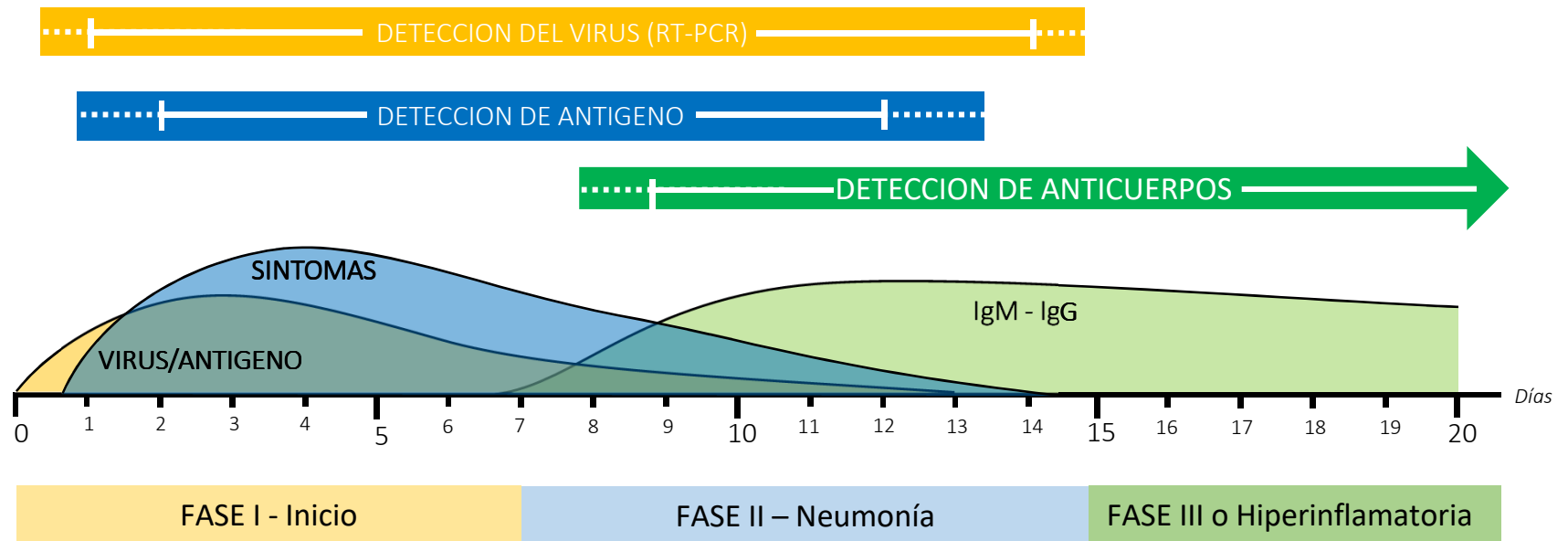
- Si se usa como una prueba de detección, significa probabilidad de infección; realizarle una PCR confirmatoria.
- Si se usa como una prueba confirmatoria, significa que la persona está infectada y debe aislarse en el hogar o ser admitido en el centro de salud

Resultado NEGATIVO:

- Significa que la persona probablemente no está infectada.
- Si es de baja sensibilidad en presencia de síntomas, necesita una prueba de PCR confirmatoria
- Si no hay síntomas, entonces debe monitorear y considerar una prueba confirmatoria



Detección del SARS-CoV-2 en diferentes etapas de la infección por pruebas diagnósticas



Elaborado por S. Juárez, abril 2020

Pruebas de diagnóstico rápidas basadas en la detección de anticuerpos del hospedero

- Tipo muestra: suero, plasma o sangre completa, potencialmente saliva
- Se basan en la detección de anticuerpos (IgA¹, IgM e IgG)
- Principio: inmunocromatografía o ELISA
- Uso: Evaluar la infección general y tasas de inmunidad en una comunidad
- Algunas pruebas han mostrado una sensibilidad del 70% siempre y cuando el paciente tenga 10 o más días de haber iniciado los síntomas

Hasta ahora OMS no recomienda el uso de pruebas de diagnóstico rápido de detección de anticuerpos para la atención del paciente, pero alienta continuar el trabajo para establecer su utilidad en la vigilancia de enfermedades y la investigación epidemiológica.

¹ https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2018.197.1_MeetingAbstracts.A5504

<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>



Interpretación

Resultado POSITIVO:

- Indica una infección actual o pasada.
- Para INCLUIR / EXCLUIR la infección activa, debe seguir con una prueba que detecta virus directamente (i.n. PCR o Ag)

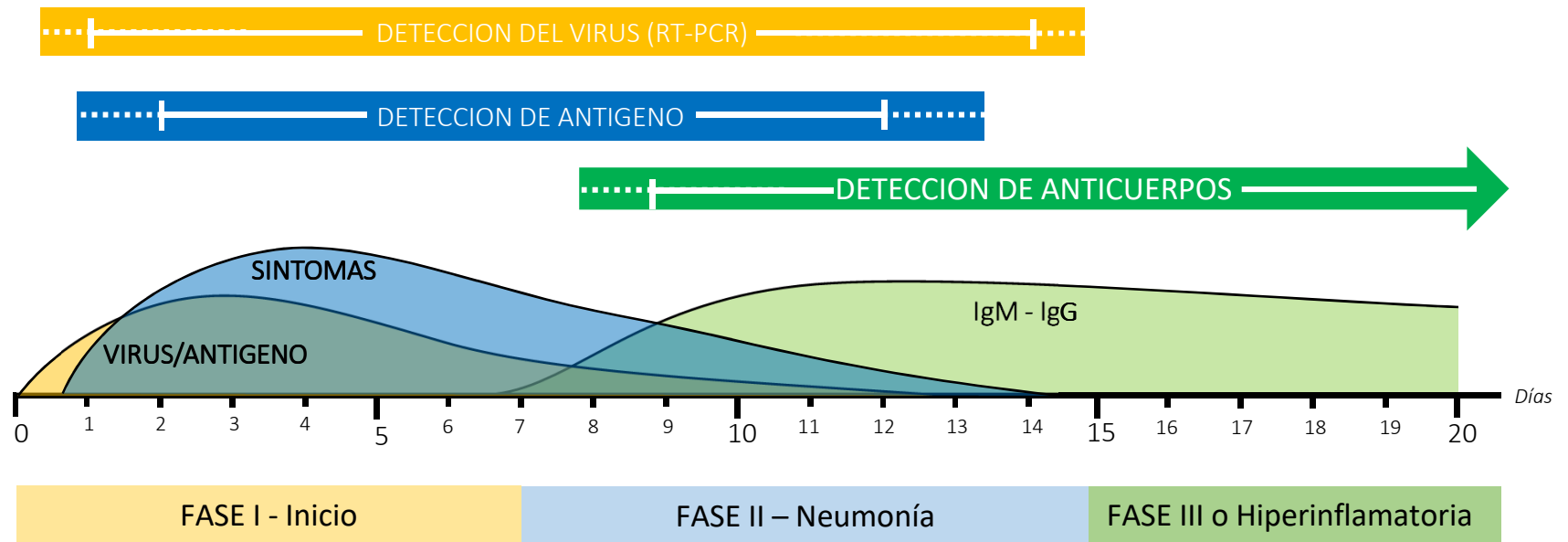
Resultado NEGATIVO:

- Puede indicar que la persona no ha estado expuesta al virus
- También podría significar que es temprano en el curso de una infección ACTIVA (período de ventana) y los anticuerpos aún no son detectables
- Para INCLUIR / EXCLUIR la infección activa, debe seguir con una prueba que detecta virus directamente (es decir, PCR o Ag)



COVID-19 Laboratory Testing <https://www.youtube.com/watch?v=m-c7dO1ALvE&feature=youtu.be>

Detección del SARS-CoV-2 en diferentes etapas de la infección por pruebas diagnósticas



Elaborado por S. Juárez, abril 2020

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

30 de marzo de 2020

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



Aplicaciones del uso de pruebas serológicas en la detección de anticuerpos durante la COVID-19

- Pacientes que llegan a sala de emergencia o han sido internados más de cinco días después de iniciados los síntomas
- En pacientes que presentan síntomas desde hace varios días, pero el RT-PCR es negativo.
- Detección de anticuerpos en el personal de salud
- Para entender la epidemiología del COVID-19 y conocer el papel que las infecciones asintomáticas pudiera tener
- Demostrar exposiciones previas e identificar donadores altamente reactivos para general un suero hiperinmune como un tratamiento



Información y criterios para la priorización de pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2 para dirigir las necesidades de adquisición por los sistemas de salud

8 de abril

- *¿Cuáles son las limitaciones de las llamadas “pruebas rápidas”? ¿Para qué podrían ser utilizadas?*
- *¿Son todos los productos (kits y/o reactivos) para detección de ácido nucleico de SARS-CoV-2 similares?*
- *¿Qué opciones tienen los países en el contexto de COVID 19 para acelerar su acceso a productos de calidad de manera efectiva?*

OPS

Abril 08, 2020

Información y criterios para la priorización de pruebas diagnósticas del SARS-CoV-2 para dirigir las necesidades de adquisición por los sistemas de salud

Preguntas/Respuestas

- *¿Qué tipo de diagnósticos in vitro deben priorizar los países para la confirmación de la infección por SARS-CoV-2, agente etiológico de COVID-19?*

Los países deben priorizar los ensayos basados en la detección de ácidos nucleicos (RT-PCR), ya sea en plataformas abiertas o cerradas. Por su naturaleza, este tipo de ensayos presenta una sensibilidad y especificidad muy alta (dependiendo del diseño, de la toma de la muestra y del operador).

- *¿Cuáles son las limitaciones de las llamadas “pruebas rápidas”? ¿Para qué podrían ser utilizadas?*

Es importante aclarar que las llamadas “pruebas rápidas” pueden ser de dos tipos: las que detectan antígenos (proteínas del virus) y las que detectan anticuerpos (IgM/IgG). Aquellas que detectan “antígenos” pueden ser útiles como criterio para confirmar la presencia del virus en el momento en que se toma la muestra. Sin embargo, aquellas que detectan anticuerpos, solo indican contacto previo con el virus, pero no permiten demostrar ni descartar la presencia del virus en el momento en que se toma la muestra. Por esta razón, se debe tener especial cuidado con su interpretación, teniendo además en cuenta la fase de la infección.

En general, las pruebas rápidas presentan una sensibilidad baja por lo cual un resultado negativo no descarta una infección. Por esta razón, en la actualidad, no se recomienda su uso como parte del diagnóstico de COVID-19 y en particular, no se recomienda su uso para descartar un caso de infección aguda. La presencia de anticuerpos no indica ausencia de virus (dependiendo del momento de la toma de muestra) y tampoco indica necesariamente protección contra el virus.

De estar disponibles, la utilidad podría estar en estudios de investigación epidemiológica o para inferir seroprevalencia en un sitio o área determinada. Su uso en la adecuación de medidas de

525 23rd St. NW
Washington, DC 20037
www.paho.org

PAHWHO
OPSSPAHO
PAHOTV



<https://www.paho.org/es/documentos/informacion-criterios-para-priorizacion-pruebas-diagnosticas-sars-cov-2-para-dirigir>

Asegurar la calidad de las pruebas moleculares de SARS-CoV-2: esquemas de AEC disponibles

Productor	Número de muestras	Aplicación	Fecha de registro	Periodo de evaluación
QCMS	8	Global	1 de abril 2020	Primavera 2020
INSTAND	8	Global	No se menciona	Primavera 2020
OMS Programa global de influenza y emergencias de salud	5	Influenza RL	31 de marzo 2020	Primavera 2020
ECCDC/EVD-Labnet/ERLI-net	Desconocido	EU Influenza RL	1 de abril 2020	Primavera 2020



COVID-19 Laboratory Testing <https://www.youtube.com/watch?v=m-c7dO1ALvE&feature=youtu.be>

Recomendaciones



Recomendaciones

- Usar pruebas que han sido evaluadas y que tenga autorización de uso para emergencia, aprobadas por FDA u otros organismos reguladores
- Seleccionar compañías que tengan un sistema de calidad reconocido
- Priorizar pruebas de distribuidores locales o que puedan adquirirse en su país
- Conocer los materiales y equipos necesarios para recolectar muestras y otros reactivos y consumibles que no son provistos por la compañías que vende los kits diagnósticos
- Pedir a la casa comercial una copia de las instrucciones de uso para tener claridad de los requerimientos en español



Enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19)

CDC > Enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) > Síntomas y pruebas

Pruebas para detectar el COVID-19

Síntomas y pruebas
 CDC Centers for Disease Control and Prevention
 CDC 24/7: Saving Lives. Protecting People.™

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)

CDC > Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) > Laboratories

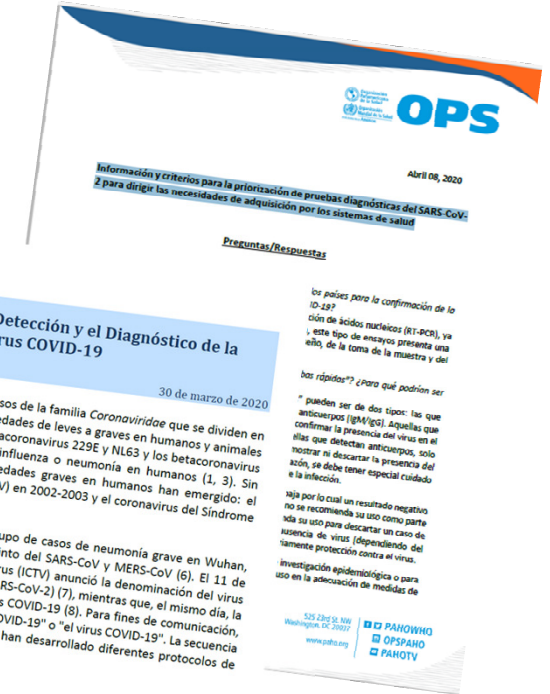
Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)

Symptoms & Testing +
 Prevent Getting Sick +
 Daily Life & Coping +
 If You Are Sick +
 Updated April 8, 2020
 Summary of Recent Changes

Enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19)

Cómo usar una cubierta de tela para la cara

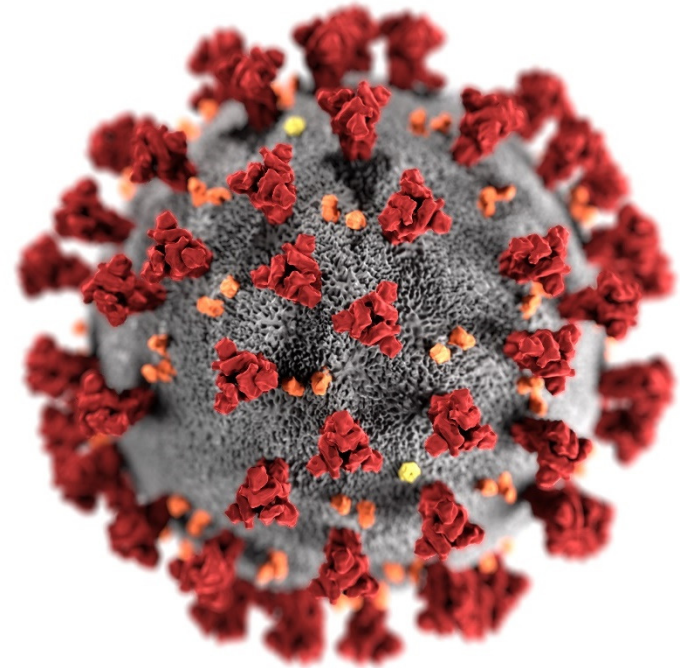
- Las cubiertas de tela para cara deben:
- ajustarse de manera firme pero cómoda contra los lados de la cara
 - asegurarse a las orejas con algún tipo de lazo
 - incluir varias capas de tela
 - permitir respirar sin restricción
 - poder lavarse y secarse en secadora sin sufrir daños ni deformarse



Pruebas de laboratorio para el nuevo coronavirus de 2019 (2019-nCoV) en casos sospechosos de infección en humanos
 Orientaciones provisionales
 17 de enero de 2020



Gracias



For more information, contact CDC
1-800-CDC-INFO (232-4636)
TTY: 1-888-232-6348 www.cdc.gov

The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention.

