



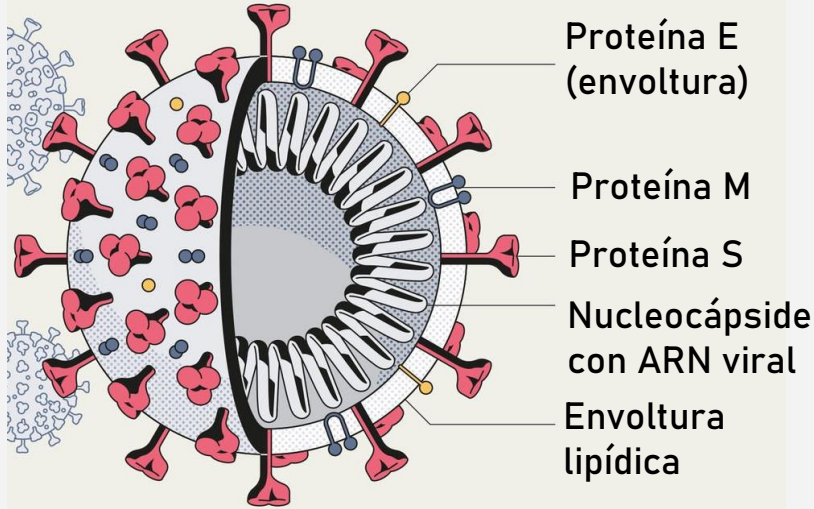
Diagnóstico virológico de la infección por SARS-CoV-2. Puesta al día.



MSc. César Cuadra-Sánchez
Managua, Nicaragua
e-mail: ccuadra73@gmail.com

El diagnóstico de un paciente infectado con el SARS-CoV-2 no depende de **una sola prueba**, sino que es el resultado final de la **evaluación crítica** por parte del médico tratante y otros profesionales de la salud, de los resultados de **diversas pruebas** paraclínicas realizadas a un paciente como imágenes (tomografías, radiografías, ecosonografía), biomarcadores hematológicos, bioquímicos e inflamatorios de laboratorio clínico y pruebas microbiológicas específicas para la detección directa o indirecta la infección

Tipos de pruebas disponibles



Virión de SARS-CoV-2
Imagen de Manuel Bortoletti

PARTO

¿Infección?

Detección directa

ARN viral

RT-PCR

Antígeno viral


Inmunoensayo (LFA)

Detección Indirecta

Anticuerpos

Inmunoensayos
Prueba rápida (LFA)
ELISA
Quimioluminiscencia

Pruebas de detección ARN viral

- RT-PCR (**R**etro **T**ranscriptase-**P**olimerase **C**hain **R**eaction)
- ARN viral → ADNc → Amplificación específica y detección simultánea
- Muestras de tracto respiratorio superior e inferior
- Genes blanco: Gen **E** (Screening) **RdRp** (Confir) Gen **N** y **ORF1a**
- Sensibilidad: 1^{era} sem 66.7%. 2^{da} 54.0% (1) 

Flujograma de trabajo de un laboratorio de biología molecular

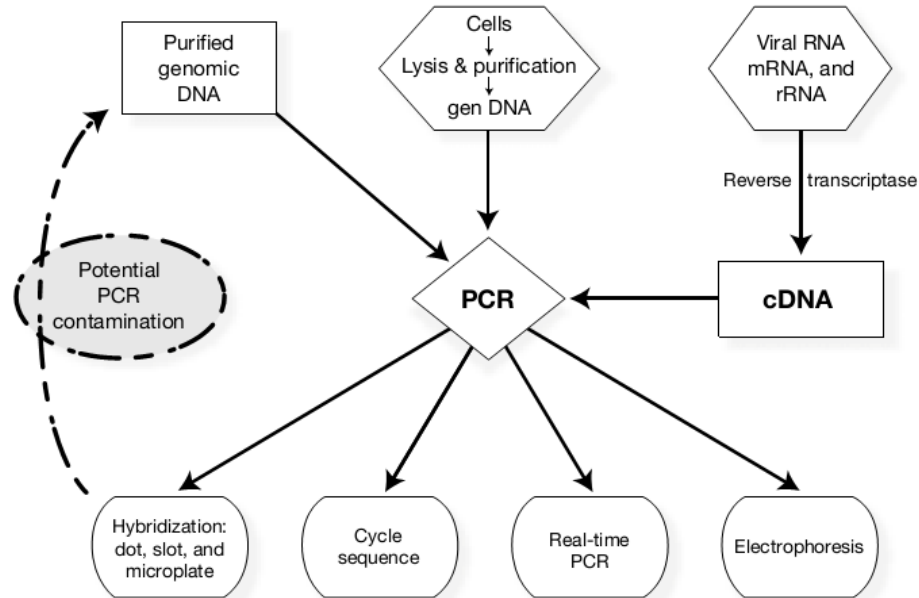


FIGURE 1. Outline of sample processing and analysis in a PCR laboratory.

qRT-PCR (Quantitative Retro transcriptase PCR)

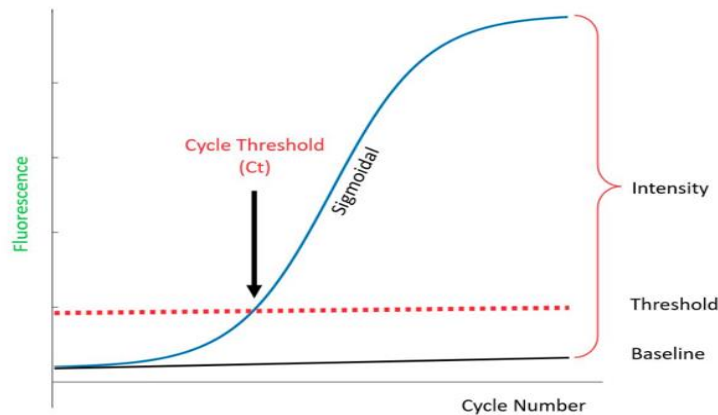
Fundamentada en la metodología de la PCR convencional.

Necesidad de paso previo de retrotranscripción para formar ADNc a partir de ARN viral

Detección del producto en cada ciclo de la reacción.



Figure 1: Real-time PCR amplification curve



Los termocicladores tienen incorporado un lector de fluorescencia

La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto (ADN) formado

Es posible que un paciente COVID19 salga negativo por RT-PCR?

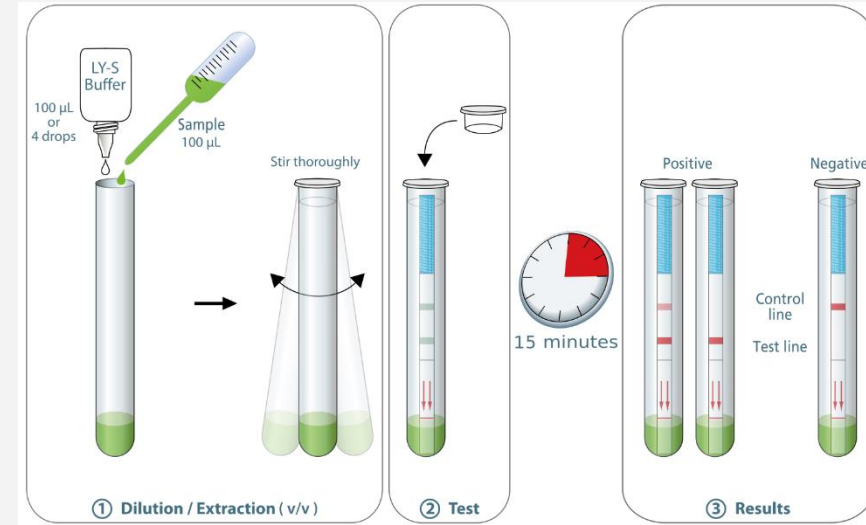
- **Si.** De hecho es probable que el 30-40% de los pacientes COVID-19 salga negativo la primera semana desde el inicio de los síntomas
- Fue un error del laboratorio? No necesariamente, aun con la muestra bien tomada hay pacientes con una carga viral baja que no son detectados por la RT-PCR

Es posible que un paciente COVID19 salga negativo por RT-PCR?

- Recientemente se identificó una mutación en el gen N de ciertas variantes de SARS-CoV-2 que puede afectar la alineación de algunos los primers de RT-PCR, **disminuyendo sensibilidad**
- Manu Vanaerschot, et al Identification of a polymorphism in the N gene of SARS-CoV-2 that adversely impacts detection by a widely-used RT-PCR assay
<https://doi.org/10.1101/2020.08.25.265074>

Pruebas Antigénicas

- Detectan proteína **N**
- Muestras respiratorias
- Sensibilidad: 60-80% vs RT-PCR
- Especificidad: 98-100%
- Usar en los primeros 5 días
- Sofia Quidel *aprobada FDA*, revelado por Fluorescencia



Prueba COVID-19 Ag Respi-Strip

<https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/Covid-19.php>

Pruebas Antigénicas

- Hay cuatro aprobadas por FDA
- Algunos países la van adquirir a través de OPS¹
- Fabricante asiáticos mucha variación en sensibilidad²
- Preferibles aquellas con revelado por Fluorescencia o Quimioluminiscencia

Table 2. Performance of four antigen detection tests for SARS-CoV-2 compared to RT-PCR

Antigen detection test		RT-PCR		Sensitivity		Specificity	
Assay	Result	Positive	Negative	%	CI95%	%	CI95%
RapiGen (n = 109) ¹	Positive	49	0	62.0	51.0-71.9	100	88.7-100
	Negative	30	30				
Liming bio (n = 19) ²	Positive	0	1	0	0.0-29.9	90.0	59.6-98.2
	Negative	9	9				
Savant (n = 109) ¹	Positive	13	0	16.7	10.0-26.5	100	89.0-100
	Negative	65	31				
Bioeasy (n = 111)	Positive	68	0	85.0	75.6-91.2	100	89.0-100
	Negative	12	31				

Tomado de <https://europepmc.org/article/ppr/ppr169142>

1- <https://efectococuyo.com/salud/ops-apoyara-a-venezuela-con-pruebas-de-antigeno/>

2- <https://europepmc.org/article/ppr/ppr169142>



Pruebas Antigénicas

Running title: Automated antigen test accurately detects SARS-CoV-2

Highlights

- We assess the performance of LUMIPULSE antigen test compared to RT-qPCR
- Antigen level was significantly high in PCR-positive samples than negative samples
- The antigen test determined all samples (>100 viral copies) to be positive
- The antigen test determined 85% of samples (>10 viral copies) to be positive
- Kinetics of viral loads and antigen levels showed a similar declining trend

[https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)30658-5/pdf](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)30658-5/pdf)

BinaxNOW™ COVID-19 Ag Card Performance within 7 days of symptom onset against the Comparator Method

BinaxNOW™ COVID-19 Ag Card	Comparator Method		
	Positive	Negative	Total
Positive	34	1	35
Negative	1	66	67
Total	35	67	102
Positive Agreement: 34/35	97.1% (95% CI: 85.1% - 99.9%)		
Negative Agreement: 66/67	98.5% (95% CI: 92.0% - 100%)		

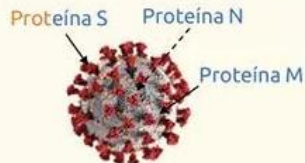
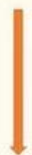
<https://www.fda.gov/media/141570/download>



Pruebas de anticuerpos

¿Qué tipo de anticuerpos hay?

Neutralizantes, que bloquean la infección por el virus.



- Aumentan con el curso de la enfermedad.
- Más abundantes en casos moderados y graves que en asintomáticos o leves.
- El 70% de las personas que se recuperan de una infección leve los desarrollan.

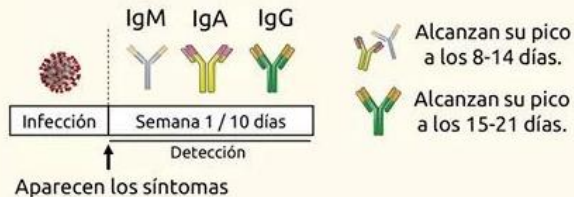
No neutralizantes*, con funciones diversas durante la enfermedad.



- Mas abundantes que los neutralizantes.
- Se han observado niveles más altos en pacientes graves.
- Pueden ayudar al sistema inmunitario a eliminar al virus.

*No solo frente a las proteínas N o M, sino frente a todas las proteínas virales.

¿Cuándo pueden detectarse?



Todos estos anticuerpos podrían coexistir durante y tras la infección, pero se desconoce **por cuánto tiempo**.

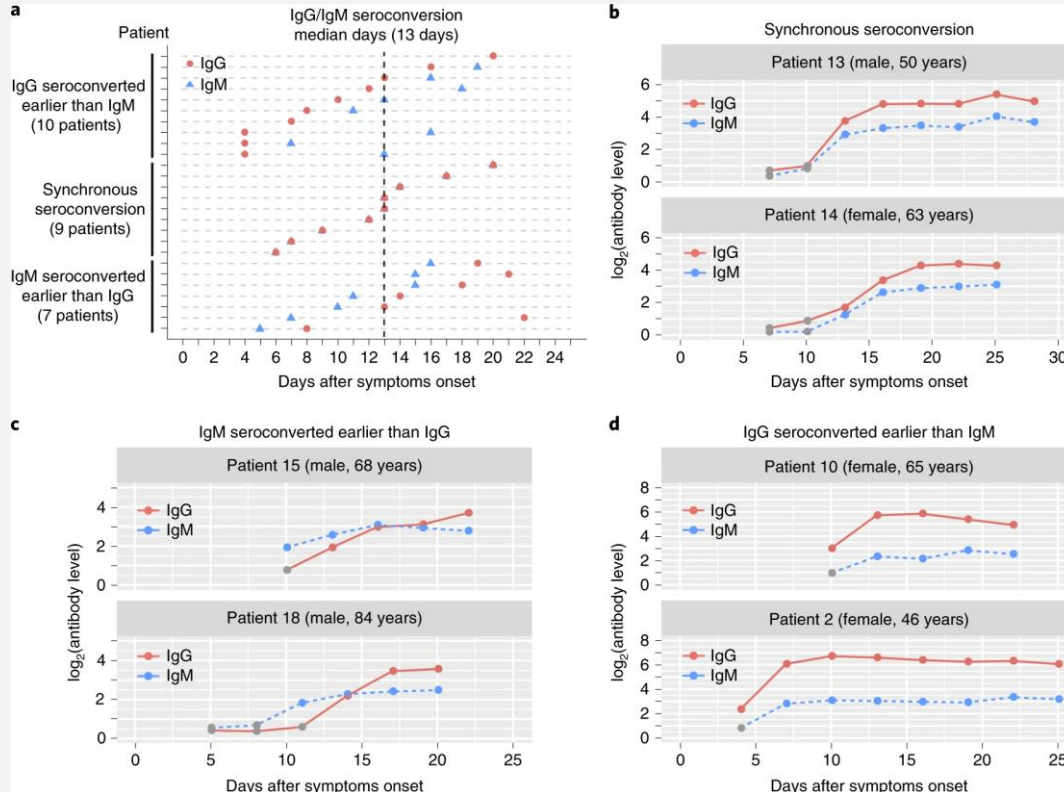
! La determinación conjunta de IgM e IgG ayuda a determinar la fase de la enfermedad, junto con la PCR.

¿Cómo pueden detectarse?

A través de inmunoensayos como:

- **ELISA y quimioluminiscencia (CLIA)**
- **Test rápidos (inmunocromatografía)**

Seroconversion



3 TIPOS!!!!

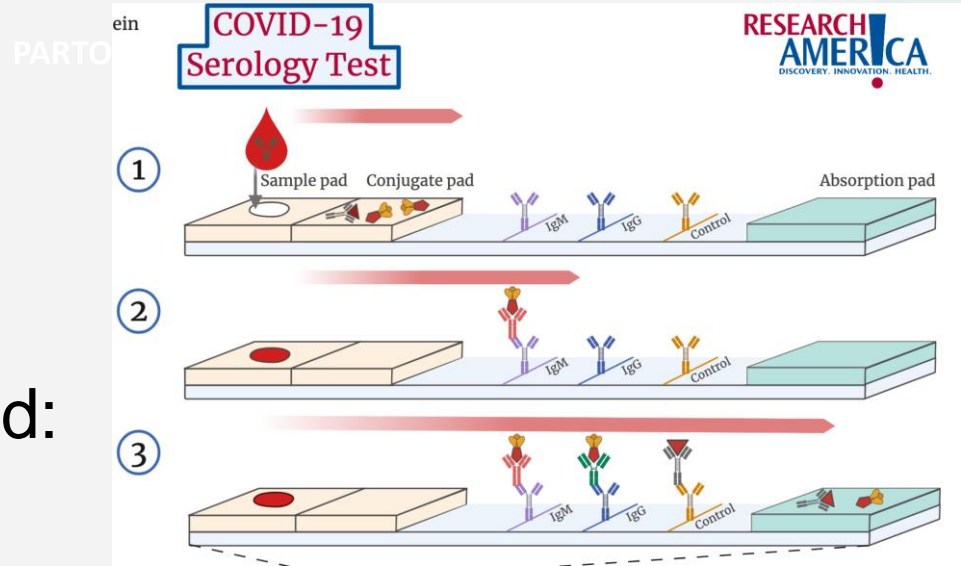
Pruebas de Rápidas

IgM-IgG contra N, S

Muestras séricas o sangre capilar,

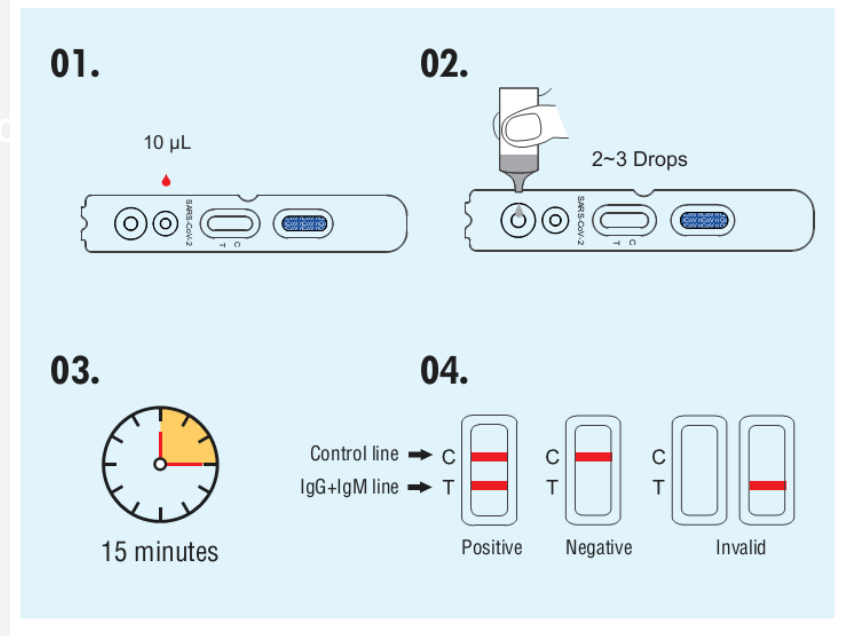
Sensibilidad y Especificidad:
Variable

Varios formatos



Prueba Rápida Wondfo

- Detecta Anticuerpos Totales
- Muestras Sangre/Suero/plasma
- Sensibilidad y Especificidad:
 - Fab: S **86.43%** E 99.57% (vs RT-PCR)
 - Pellanda et al¹. S **77.1%** E 98%
- VPP: **44%** (Prevalencia 2%)
81% (Prevalencia 10%)



1-Pellanda et al Sensitivity and specificity of a rapid test for assessment of exposure to SARS-CoV-2 in a community-based setting in Brazil <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.20093476>

Sensibilidad de pruebas rápidas

Percentage of positive specimens from patients with positive SARS-CoV2 RT-PCR by days since symptom onset

Assay	IgM				IgG				IgM or IgG			
	Total N	positive	%	95% CI	Total N	positive	%	95% CI	Total N	positive	%	95% CI
Immunochromatographic Lateral Flow Assays												
Biomedomics												
1-5 days	27	7	25.9	11.1 - 46.3	27	6	22.2	8.6 - 42.3	27	8	29.6	13.8 - 50.2
6-10 days	36	22	61.1	43.5 - 76.9	36	19	52.8	35.5 - 69.6	36	23	63.9	46.2 - 79.2
11-15 days	33	25	75.8	57.7 - 88.9	33	23	69.7	51.3 - 84.4	33	26	78.8	61.1 - 91.0
16-20 days	19	16	84.2	60.4 - 96.6	19	14	73.7	48.8 - 90.9	19	17	89.5	66.9 - 98.7
>20 days	11	9	81.8	48.2 - 97.7	11	9	81.8	48.2 - 97.7	11	9	81.8	48.2 - 97.7
Bioperfectus												
1-5 days	28	11	39.3	21.5 - 59.4	28	7	25.0	10.7 - 44.9	28	11	39.3	21.5 - 59.4
6-10 days	35	26	74.3	56.7 - 87.5	35	23	65.7	47.8 - 80.9	35	27	77.1	59.9 - 89.6
11-15 days	34	28	82.4	65.5 - 93.2	34	27	79.4	62.1 - 91.3	34	30	88.2	72.5 - 96.7
16-20 days	19	16	84.2	60.4 - 96.6	19	14	73.7	48.8 - 90.9	19	17	89.5	66.9 - 98.7
DeepBlue												
1-5 days	28	12	42.9	24.5 - 62.8	28	6	21.4	8.3 - 41.0	28	12	42.9	24.5 - 62.8
6-10 days	36	28	77.8	60.8 - 89.9	36	18	50.0	32.9 - 67.1	36	28	77.8	60.8 - 89.9
11-15 days	34	28	82.4	65.5 - 93.2	34	21	61.8	43.6 - 77.8	34	28	82.4	65.5 - 93.2
16-20 days	19	16	84.2	60.4 - 96.6	19	15	78.9	54.4 - 93.9	19	17	89.5	66.9 - 98.7
>20 days	11	10	90.9	58.7 - 99.8	11	9	81.8	48.2 - 97.7	11	10	90.9	58.7 - 99.8
Innovita												
1-5 days	27	4	14.8	4.2 - 33.7	27	7	25.9	11.1 - 46.3	27	7	25.9	11.1 - 46.3
6-10 days	36	12	33.3	18.6 - 51.0	36	17	47.2	30.4 - 64.5	36	20	55.6	38.1 - 72.1
11-15 days	31	12	38.7	21.8 - 57.8	32	25	78.1	60.0 - 90.7	32	25	78.1	60.0 - 90.7
16-20 days	13	4	30.8	9.1 - 61.4	13	9	69.2	38.6 - 90.9	13	9	69.2	38.6 - 90.9
>20 days	6	1	16.7	0.4 - 64.1	6	4	66.7	22.3 - 95.7	6	5	83.3	35.9 - 99.6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7273265/pdf/nihpp-2020.04.25.20074856.pdf>



Especificidad de pruebas rápidas

Specificity in 108 blood donor plasma specimens collected before July 2018												
Assay	IgM				IgG				IgM or IgG			
	Total N	positive	%	95% CI	Total N	positive	%	95% CI	Total N	positive	%	95% CI
Immunochromatographic Lateral Flow Assays												
Biomedomics	107	13	87.9	80.1 - 93.4	107	4	96.3	90.7 - 99.0	107	14	86.9	79.0 - 92.7
Bioperfectus	104	3	97.1	91.8 - 99.4	104	2	98.1	93.2 - 99.8	104	5	95.2	89.1 - 98.4
DecomBio	107	10	90.7	83.5 - 95.4	107	9	91.6	84.6 - 96.1	107	11	89.7	82.3 - 94.8
DeepBlue	108	17	84.3	76.0 - 90.6	108	1	99.1	94.9 - 100.0	108	17	84.3	76.0 - 90.6
Innovita	108	4	96.3	90.8 - 99.0	108	0	100.0	96.6 - 100.0	108	4	96.3	90.8 - 99.0
Premier	108	2	98.1	93.5 - 99.8	108	1	99.1	94.9 - 100.0	108	3	97.2	92.1 - 99.4
Sure	108	0	100.0	96.6 - 100.0	108	0	100.0	96.6 - 100.0	108	0	100.0	96.6 - 100.0
UCP	107	2	98.1	93.4 - 99.8	107	2	98.1	93.4 - 99.8	107	2	98.1	93.4 - 99.8
VivaChek	99	5	94.9	88.6 - 98.3	99	4	96.0	90.0 - 98.9	99	5	94.9	88.6 - 98.3
WondFo									106	1	99.1	94.9 - 100.0

Causas de Falsos positivos de pruebas rápidas

- Embarazo¹
- Niveles elevados de Factor reumatoideo²
- Anticuerpos contra otros patógenos (DENGUE)³
- A su vez, el uso de sangre capilar en vez de suero puede disminuir la **sensibilidad** de algunas pruebas rápidas (Wondfo)⁴

PARTO

1- Alger J, et al. Using Prenatal Blood Samples to Evaluate COVID-19 Rapid Serologic Tests Specificity. 10:18. doi:10.1007/s10995-020-02981-9

2- Wang Q, et al. A method to prevent SARS-CoV-2 IgM false positives in gold immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6). doi:10.1128/JCM.00375-20

3-Dengue antibodies can cross-react with SARS-CoV-2 and vice versa-Antibody detection kits can give false-positive results for both viruses in regions where both COVID-19 and Dengue co-exist
<https://doi.org/10.1101/2020.07.03.20145797>

4- Aparecida dos Santos V, Mayra Matias Rafael I, Ester Cerdeira I. Sensitivity of the Wondfo One Step COVID-19 test using serum samples. doi:10.6061/clinics/2020/e2013

Conclusión

- Se **desaconseja** el uso de las pruebas rápidas de detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en la práctica clínica diaria como un **instrumento de despistaje o confirmación de pacientes con COVID-19**. En el caso de usarlas, debe recordarse que un resultado tanto positivo como negativo en este tipo de pruebas, no debe ser lo único que prevalezca a la hora de hacer el diagnóstico
- Uso epidemiológico principalmente
- No sirven para saber si un paciente es inmune.

Quimioluminiscencia

- Detección de anticuerpos
- Automatizada
- Alta sensibilidad y especificidad
- Validada
- Costosa

Desempeño de test de CLIA SARS-CoV-2 Datos de FDA¹

Antibody	Performance Measure	Estimate of Performance	95% Confidence Interval
Pan-Ig	Sensitivity	100% (29/29)	(88.3%; 100%)
Pan-Ig	Specificity	99.8% (5262/5272)	(99.7%; 99.9%)
Pan-Ig	PPV at prevalence = 5%	96.5%	(93.9%; 98.1%)
Pan-Ig	NPV at prevalence = 5%	100%	(99.4%; 100%)

Quimioluminiscencia

Falsos positivos en sistema LIAISON DIASORIN

A

Journal of Clinical
Microbiology

141 **TABLE 1:** Specificity results

Samples	n	Negative*	Positive*	Equivocal*	Positivity (%)
Coronavirus 229E, NL63 and OC43	10	10	0	0	0
Primary CMV infection	5	4	1	0	20
Primary EBV infection	10	6	4	0	40
Acute HAV infection	5	5	0	0	0
Acute HBV infection	4	1	3	0	75
Acute HCV infection	3	2	1	0	33.3
Acute HEV infection	5	4	0	1	0
Acute HIV infection	5	5	0	0	0
Influenza A/B infection	10	10	0	0	0
Acute malaria	3	2	1	0	33.3
Unselected sera	40	40	0	0	0
Total	100	89	10	1	10

143

* Negative <12 UA/ml, positive ≥15UA/ml, equivocal 12- 15 UA/ml



Pruebas generales de laboratorio



Essential lab testing

Daily labs	CBC with differential (trend total lymphocyte count) Comprehensive metabolic panel: <ul style="list-style-type: none">• Electrolytes: Na, K, Total CO₂, Chloride• Total protein and Albumin• Creatinine• Bilirubin, ALT, AST CPK (total creatine kinase) Lactate
Risk stratification	D-dimer, Ferritin, CRP, ESR, LDH, Cardiac troponin
Viral serologies	HBV, HCV, HIV 1/2/O

Frequent laboratory abnormalities in patients with COVID-19*(1)



Decreased

Blood lymphocyte count (35–75%)
Albumin (50–98%)
Hemoglobin (41–50%)



Increased

Neutrophil count
Erythrocyte sedimentation rate (ESR; up to 85%)
C-reactive protein (CRP; 75–93%)
Lactate dehydrogenase (LDH; 27–92%)
Alanine aminotransferase (ALT)

Aspartate aminotransferase (AST)
Total bilirubin
Cardiac troponin
Procalcitonin (6–25%)
Prothrombin time (PT)
D-dimer (36–43%)

*Approximate percentage of patients

AST ≤ 25 U/L
VPN 90,6%

LDH ≥ 210 U/L Y AST ≥ 35 U/L
VPP 83.3%

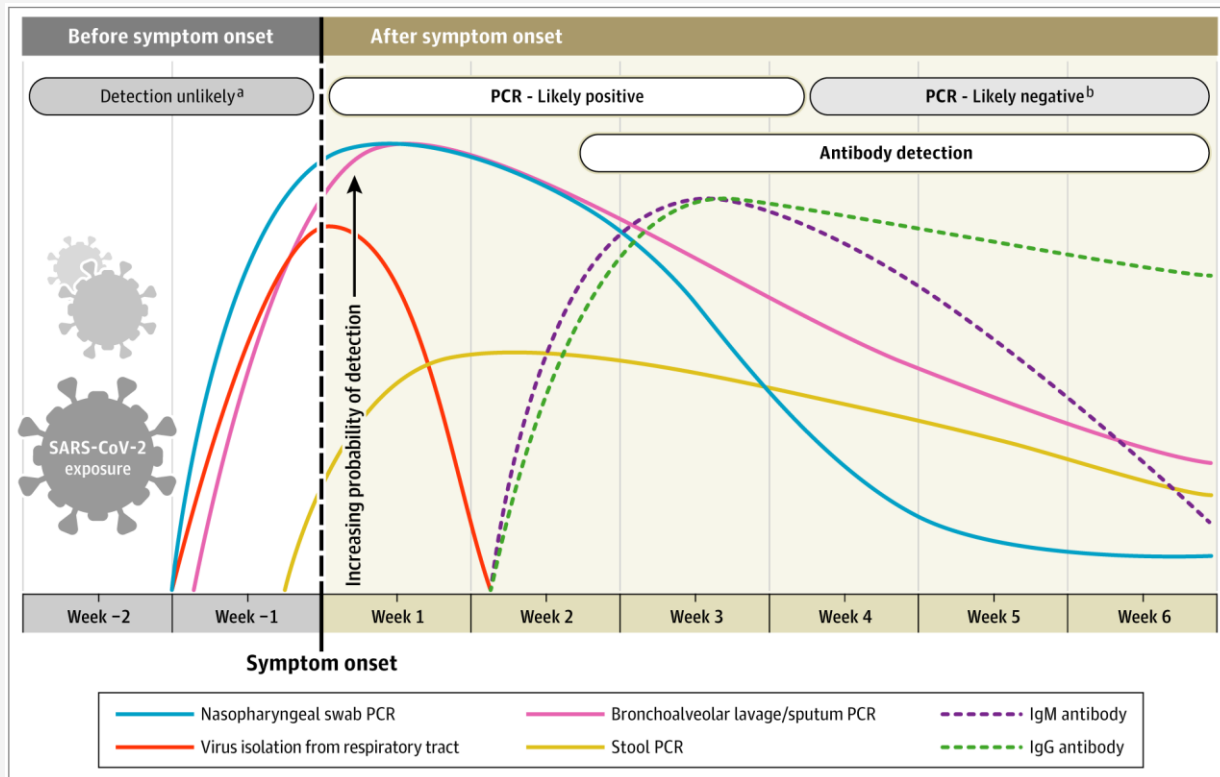
(2)

1- siemens-healthineers.com/covid-19

2- Routine blood tests as a potential diagnostic tool for COVID-19

<https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0398>

RESUMEN



From: **Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2**

JAMA. Published online May 06, 2020. doi:10.1001/jama.2020.8259