

Detección de SARS COV 2

Gabriel Muñoz Gutiérrez^{1*} & Karla Gutiérrez²

1. Infectólogo Hospital Clínica Bíblica.
2. Microbióloga especialista en Biología Molecular.

* Correspondencia: gmunoz90@hotmail.com

Recibido 03 de abril de 2020. Aceptado 07 de abril de 2020.

En diciembre del 2019 se realizó una alerta a la Organización Mundial de la Salud por una serie de casos de neumonía de etiología desconocida en Wuhan, China. Para el 11 de enero del 2020 se contó con las primeras secuencias del genoma del agente infeccioso que posteriormente se identificó como “*Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Severo Agudo*” (SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés y relación con el SARS-CoV) y la enfermedad se le nombró “*enfermedad por coronavirus del 2019*” (COVID-19).

Desde entonces se iniciaron una serie de investigaciones para desarrollar una prueba diagnóstica efectiva para detectar los casos agudos y contener los brotes. Las primeras pruebas publicadas corresponden a protocolos para la detección del ácido nucleico viral a través de lo que se conoce como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) y se convirtió en el estándar de oro para el diagnóstico del COVID19. Estos protocolos fueron inicialmente elaborados por distintos centros de investigación o de vigilancia epidemiológica como el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, el CDC de China, la Universidad de Hong Kong (HKU) y el Instituto de Virología Charité de Berlín.

En la actualidad se encuentran disponibles tanto los protocolos mencionados como distintas pruebas comerciales. En Costa Rica, el laboratorio que inició con el diagnóstico de los casos sospechosos fue el Departamento de Virología del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), la prueba que utilizan corresponde al protocolo del Instituto de Virología Charité de Berlín, conocido como el protocolo de Berlín, el cual consiste en una prueba inicial de tamizaje seguida por una o dos pruebas adicionales confirmatorias.

A partir del 23 de marzo, el Ministerio de Salud de Costa Rica autorizó el diagnóstico en laboratorios clínicos privados, la prueba de elección en la mayoría de estos centros es la Allplex™ 2019-nCoV de Seegene. Esta prueba identifica tres genes virales: el gen E, N y RdRP. El gen E corresponde a un gen común a los betacoronavirus, mientras que los genes N y RdRP corresponden a genes específicos del SARS-Cov-2.

En general, las pruebas de detección de ácidos nucleicos utilizan dos pasos: 1. Extracción de ADN/ARN y 2. Amplificación del material genético. Esto se realiza a partir de las muestras recolectadas, que en este caso corresponden a esputos, aspirados nasofaríngeos, lavados broncoalveolares, hisopados nasofaríngeos e hisopados orofaríngeos. Estas muestras deben recolectarse por personal capacitado y con experiencia para asegurarse obtener la mayor cantidad de células posible ya que los virus son microorganismos intracelulares. Adicionalmente, cuando se utilicen los hisopos debe asegurarse que sean de dacrón o un material similar y que la muestra se coloque en medio de transporte viral y en frío para evitar la pérdida de partículas virales.

1. Extracción de los ácidos nucleicos

La extracción del material genético se realiza por medio de una serie de pasos en los que se lisan las células y se llevan a cabo distintos lavados para eliminar las impurezas y finalmente obtener un eluido con los ácidos nucleicos que será el material de partida para el segundo paso. Cabe destacar que actualmente este procedimiento lo realizan instrumentos automatizados que permiten una mayor fluidez en el laboratorio así como una mayor protección al personal.

2. Amplificación del material genético

El segundo paso consiste en la amplificación del ARN viral a través de la RT-PCR, esto se lleva a cabo a través de cebadores o “*primers*” (en inglés) que son secuencias cortas complementarias a un fragmento del genoma viral, al ser secuencias específicas para el virus, permite junto con la polimerasa y otros reactivos, hacer múltiples copias de ese segmento y no de otros fragmentos de otros microorganismos. Adicionalmente a estos cebadores, a la mezcla de reacción se le agrega una sonda marcada con fluorescencia que es la que emite la señal que indica la presencia del virus en las muestras en el análisis final. En el caso de la prueba Allplex™ 2019-nCoV de Seegene, se detectan 3 segmentos del genoma viral

(gen E, N y RdRP) al mismo tiempo. Esta es una diferencia con el protocolo del Berlín, el cual detecta los mismos genes pero en pruebas por separado.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Como todas las pruebas de laboratorio, esta cuenta con sus propias limitaciones, la más importante es la posibilidad de obtener resultados falsos negativos cuando la muestra no se haya recolectado con la técnica correcta o cuando se haya hecho muy temprano o muy tarde en el curso de la infección. Esto porque la sensibilidad de la prueba corresponde a 100 copias genómicas/reacción, lo que quiere decir que si no hay suficientes células infectadas en la muestra podría no detectarse la presencia viral (se encontraría por debajo del límite de detección de la prueba). Es por esto que los resultados deben analizarse a la luz de la clínica que presente el paciente junto con la información epidemiológica con la que se cuenta.

Otras razones de resultados falsos negativos son una incorrecta manipulación de las muestras, reactivos e instrumentos, por lo que la prueba debe realizarse en laboratorios que cuenten con el personal capacitado y con los instrumentos adecuados.

Al momento existen 33 pruebas moleculares aprobadas por la FDA para diagnóstico de COVID19, entre ellas, las pruebas rápidas en donde se obtienen resultados en menos de 1 hora como la Xpert Xpress SARS-CoV-2 de Cepheid y la ID NOW™ COVID-19 de Abbott que da resultados en 15 minutos, sin embargo, al día de hoy no están disponibles para Centoamérica.

Otro grupo de pruebas disponibles son las de detección de anticuerpos o pruebas serológicas. Estas pruebas están basadas en la detección de la respuesta inmune del paciente, tanto del tipo IgM como IgG. La limitante de esta metodología es que se requiere que haya pasado un periodo de aproximadamente 7-14 días luego del inicio de los síntomas, por lo que su función para el diagnóstico aún es discutido, no obstante, son útiles para evaluar la exposición previa de personas que hayan cursado con infecciones asintomáticas, así como evaluar el estadio epidemiológico en el que se encuentra el país y para la selección de donantes para la obtención de

plasma convaleciente. Actualmente hay cuatro pruebas aprobadas por la FDA con esta metodología y hay muchas otras en evaluaciones de desempeño.

Otras pruebas que se han analizado son las detección de antígenos, en donde se detecta la presencia de proteínas virales en el suero del paciente y funcionan para las fases agudas de la infección, sin embargo, al ser un virus tan nuevo, estas aún no se ha desarrollado para la venta comercial.

En resumen, la metodología de la RT-PCR continua siendo el estándar de oro para el diagnóstico de COVID19. Es importante siempre analizar los resultados en conjunto con la clínica y epidemiología del paciente así como mantener un control estricto en la técnica de recolección, transporte y almacenamiento de las muestras con el fin de limitar los resultados falsos negativos. Sumado a lo anterior, es importante analizar la utilidad de las pruebas serológicas para la evaluación de exposiciones al virus como por ejemplo, personas asintomáticas que son contactos cercanos de casos confirmados y el desarrollo de inmunidad en personas que pertenecen al personal de salud, hogares de cuidado y demás centros en los que hayan personas vulnerables a la infección.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Minzhe Shen, Ying Zhou, Jiawei Ye, Abdu Ahmed Abdullah AL-maskri, Yu Kang, Su Zeng & Sheng Cai (2020) Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus, *Journal of Pharmaceutical Analysis*.<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>.
- Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* (2020). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Yan Xu, Meng Xiao, Xinchao Liu, Shengyong Xu, Tiekuan Du, Jun Xu, Qiwen Yang, Yingchun Xu, Yang Han, Taicheng Li, Huadong Zhu & Mengzhao Wang (2020) Significance of Serology Testing to Assist Timely Diagnosis of SARS-CoV-2 infections: Implication from a Family Cluster, *Emerging Microbes & Infections*, DOI: 10.1080/22221751.2020.1752610

