

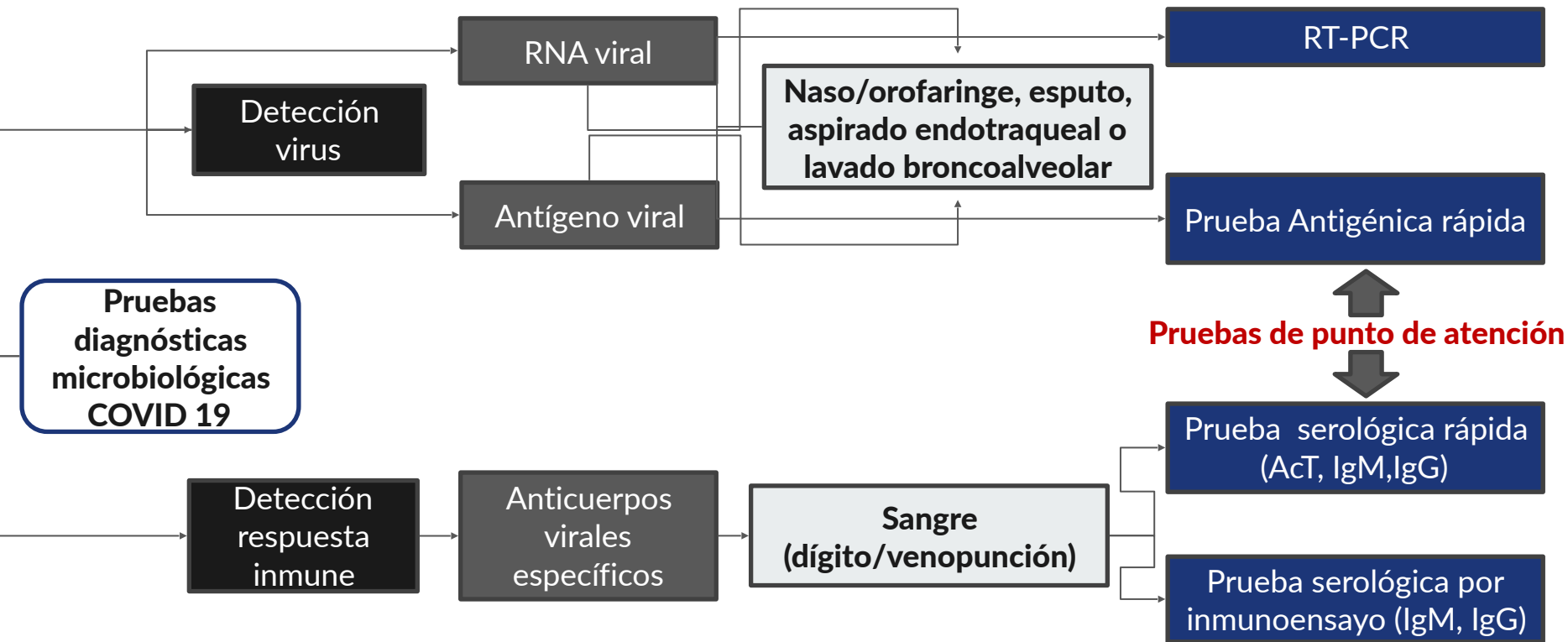
COVID-19

Diagnóstico



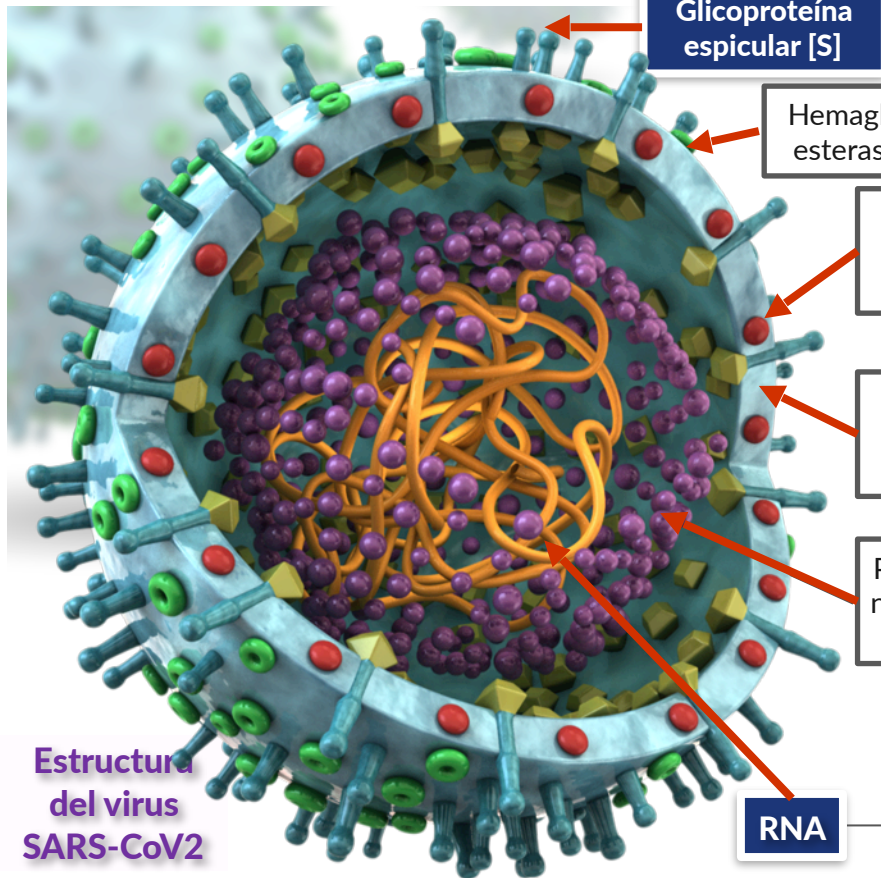
semFYC

Sociedad Española de Medicina
de Familia y Comunitaria



<https://threadreaderapp.com/thread/1263537661320531968.html>

Lauer SA, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application [published online ahead of print, 2020 Mar 10]. *Ann Intern Med.* 2020;10.7326/M20-0504. [Biopanda Reagents UK. COVID-19 Rapid Test \[Internet\]. Biopanda Reagents Ltd. \[Consultado : 20/03/2020\]](#)
SARS-COV-2 DIAGNOSTIC PIPELINE



Estructura del virus SARS-CoV2

Glicoproteína espicular [S]

Hemaglutinina esterasa [HE]

Proteína de membrana [M]

Proteína de envoltura pequeña [E]

Proteína de la nucleocápside [N]

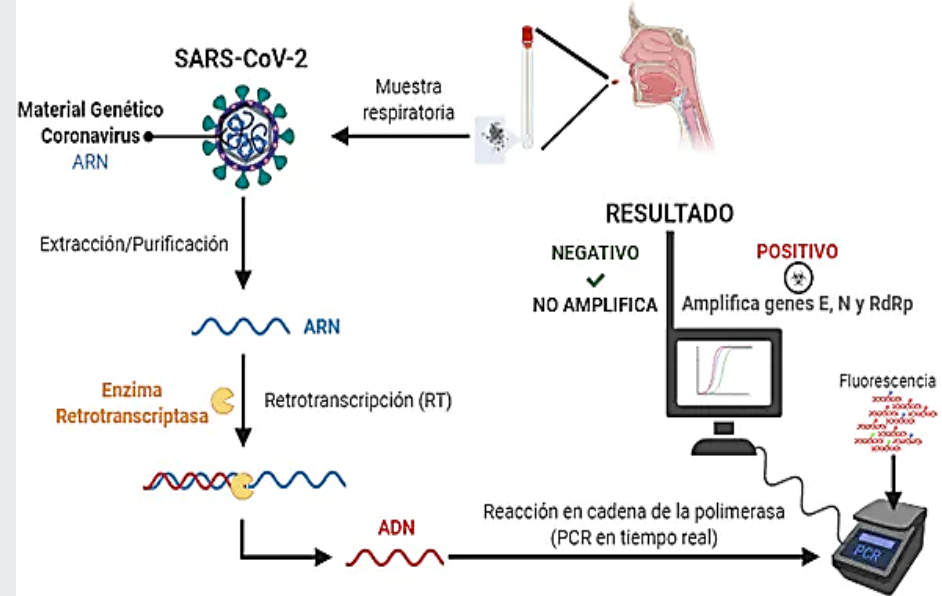
RNA

Prueba Antigénica rápida

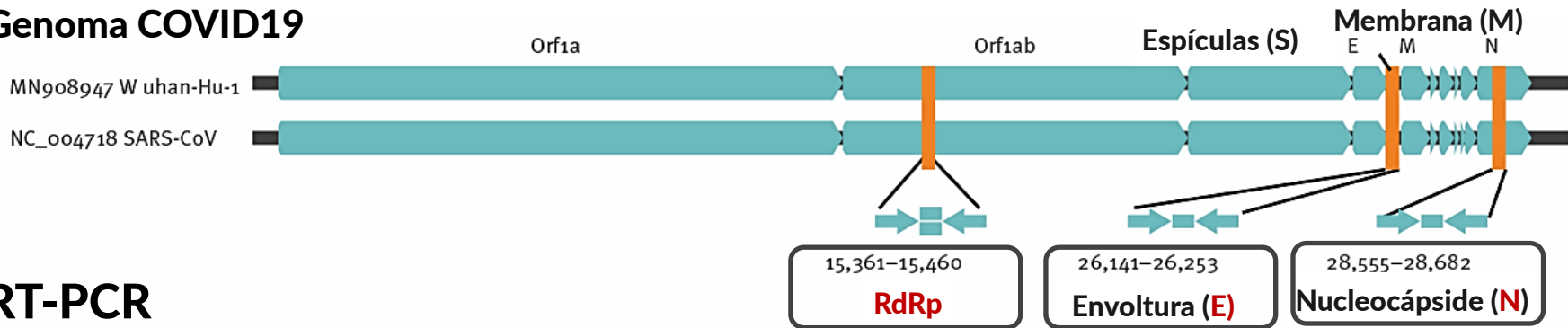
Detección de anticuerpos
Proteína S, nucleoproteína N
o dominio de unión al receptor de la proteína

RT-PCR

Prueba de detección del SARS-CoV-2 mediante amplificación de ácido nucleico por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)



Genoma COVID19



RT-PCR

“Dianas” de ampliación para detección del genoma del SARS-CoV-2 (OMS)

- **RdRp** transcriptasa dependiente de ARN (enzima copia RNAViral)
- Gen de proteína de **envoltura E**
- Gen de proteína **nucleocápside N**
- Gen de proteína **espiga S**
- Marco de lectura abierto **Orf1a**



Los tres valores por encima del umbral

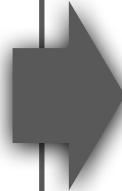
La RT-PCR no puede distinguir el **virus replicable viable** o simplemente el ARN residual

[Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus \(2019-nCoV\) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25\(3\):2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](#)

[WHO. Laboratory testing for coronavirus disease \(COVID-19\) in suspected human cases: interim guidance. Interim guidance 19 March 2020. \[Internet\]. WHO. 2020.](#)

Factores que determinan el rendimiento RT-PCR

- **Muestra**
 - Tipo de toma
 - Técnica
 - Transporte
- **Etapas de la infección**
 - Carga viral
 - Evolución clínica
- **Calidad y la consistencia de los ensayos de PCR**



Factores relacionados con falsos negativos de RT-PCR

- Toma inadecuada de muestra
- Incorrecta conservación y/o transporte (<4 °C, hasta 24 horas)
- Escasa eliminación de virus (estadio clínico, gravedad)
- Razones técnicas inherentes a la prueba (mutación, inhibición PCR)

Padhi A, Kumar S, Gupta E, Saxena SK. Laboratory Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) 2020* : 95-107

WHO. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. Interim guidance 19 March 2020. [Internet]. WHO. 2020. Disponible: t.ly/ansP

¿Qué muestra tomar?

Diagnóstico inicial:
exudado de **vías
respiratorias
superiores**

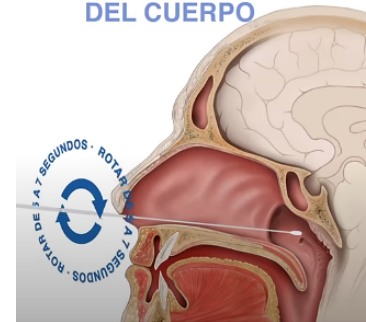
- **Nasofaríngeo**
- Orofaringeo
- Cornete nasal medio
- Fosa nasal anterior

Pacientes con
neumonía o
enfermedad respiratoria
grave

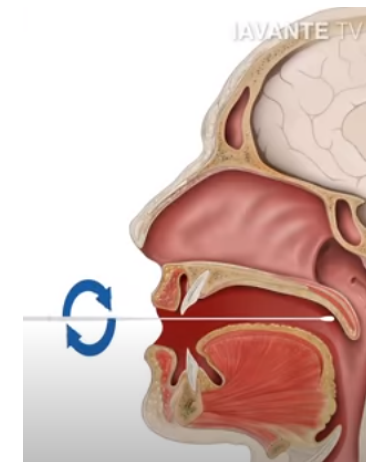
Muestras de tracto respiratorio inferior:
esputo o aspirado endotraqueal, lavado
broncoalveolar o broncoaspirado

LAVANTE TV

POSICIÓN CORRECTA:
PERPENDICULAR AL
EJE TRASVERSAL
DEL CUERPO



LAVANTE TV



[Documento técnico Toma y transporte de muestras para diagnóstico por PCR de SARS-CoV-2. CCAES.DGSPCI. 2020.](#)

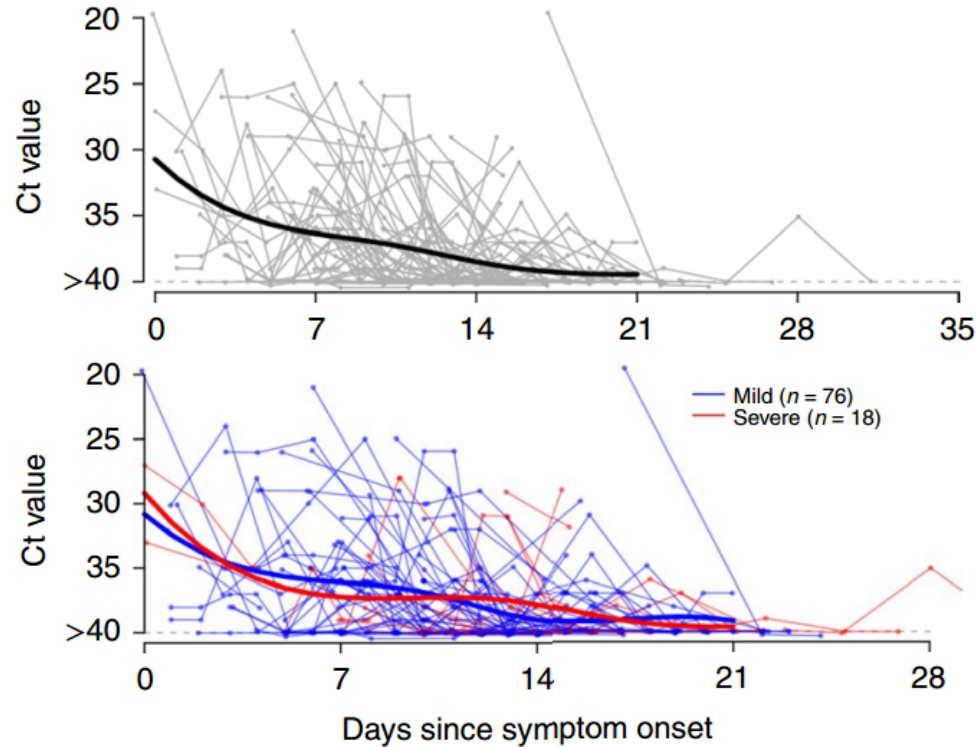
[CEBM. Comparative accuracy of oropharyngeal and nasopharyngeal swabs for diagnosis of COVID-19.. Oxford University. March 26, 2020 .](#)

[Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 \(COVID-19\). CDC 2020.](#)



Enfermedad moderada con neumonía

Mayor carga viral en los **hisopos de garganta** al momento del inicio de los síntomas



n=94 pacientes con COVID-19
Edad media. 47 años

He, X., Lau, E.H.Y., Wu, P. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nat Med (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>

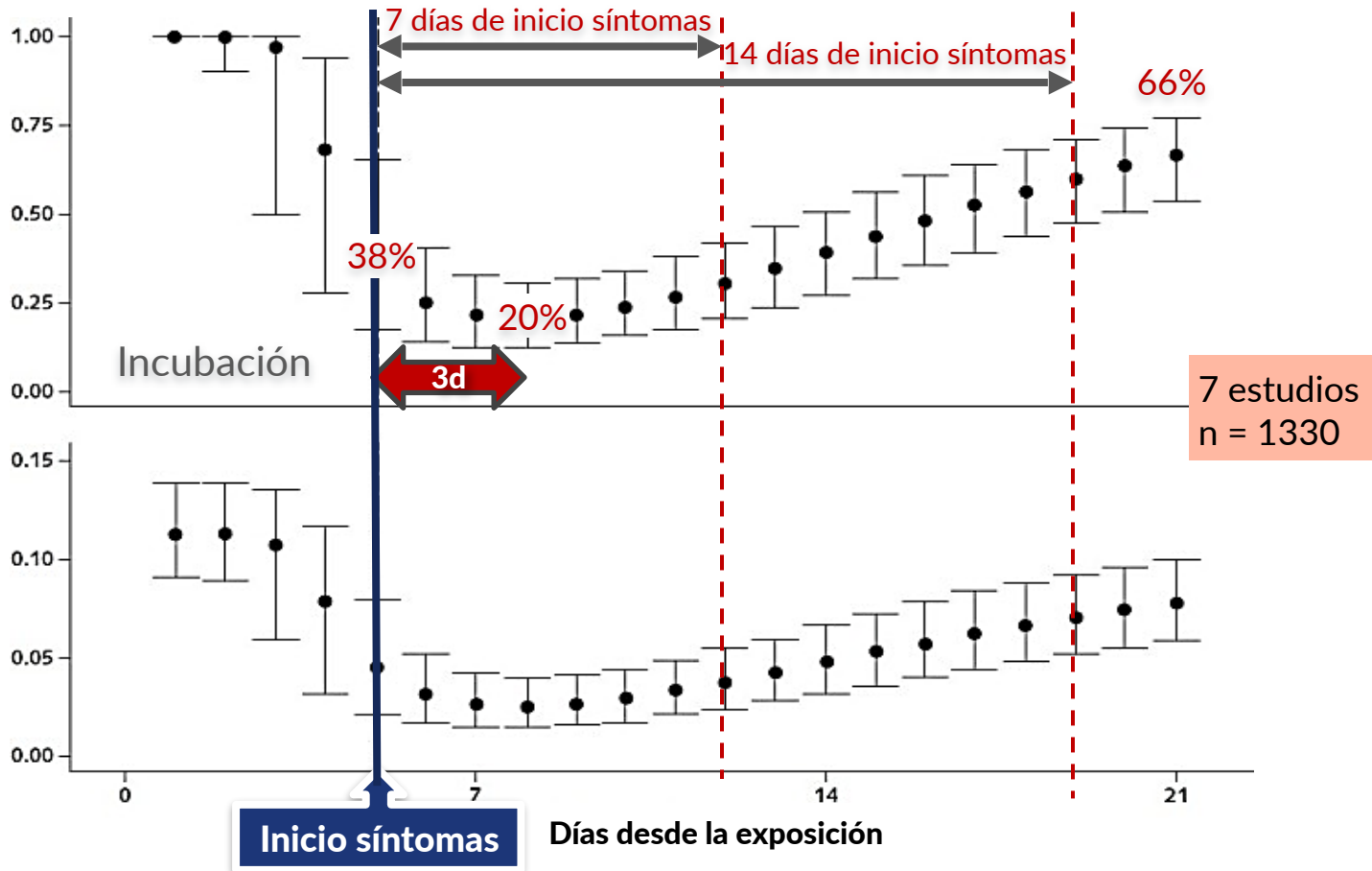
¿Cuándo tomar la muestra?

Tipos de muestra	Después de ingreso	Semanas desde el inicio de los síntomas				Valores de P
		1	2	3	4	
Todos						
• Respiratorio	96	42/44 (95)	74/90 (82)	64/89 (72)	31/57 (54)	<0.001
• Heces	55/93 (59)	9/23 (39)	28/59 (47)	32/71 (45)	20/57 (35)	0,54
• Suero	39/95 (41)	5/36 (14)	20/85 (23)	19/85 (22)	5/55 (9)	0,12
• Orina	1/67 (1)	0/15 (0)	1/53 (2)	0/21 (0)	0/19 (0)	NC
Enfermedad leve:						
• Respiratorio	22	11/12 (92)	15/21 (71)	9/19 (47)	4/9 (44)	0,04
Enfermedad severa:						
• Respiratorio	74	1ª semana	59/69 (86)	55/70 (79)	27/48 (56)	<0.001

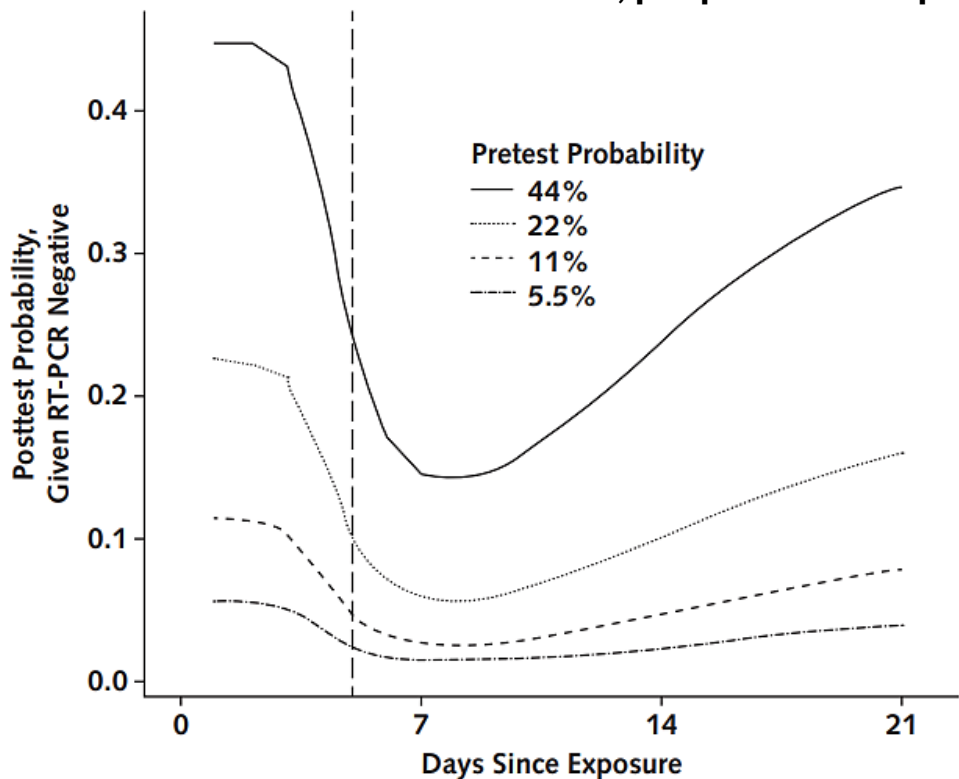
Zheng Shufa, Fan Jian, Yu Fei, Feng Baihuan, Lou Bin, Zou Qianda et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study BMJ 2020; 369 :m1443

Probabilidad RT-PCR falso [-] en un infectado por COVID-19

Probabilidad (post-test) de estar infectado después de una RT-PCR [-]



Probabilidad posterior a la prueba de infección por SARS-CoV-2 después de un resultado negativo de RT-PCR, por probabilidad previa de infección.



Si **RT-PCT [-]** y existe un **alto índice de sospecha de infección por SARS-CoV-2**, particularmente si solo se tomaron muestras del tracto respiratorio superior

Tomar muestras adicionales

Kucirka LM, et al. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med.* 2020;M20-1495. doi:10.7326/M20-1495

La sensibilidad global del resultado de una prueba de RT-PCR inicial :
89% (IC del 95%: 81% a 94%)

Mayor rentabilidad diagnóstica de RT-PCR

- **Casos Leves:** 1^a semana desde inicio de síntomas
- **Casos graves:** 2^a-3^a semana desde inicio de los síntomas

[SEIMC. interpretación de las pruebas diagnósticas frente a SARS-CoV-2. Versión 2. Actualizado el 24 de abril de 2020. \[Internet\] SEIMC.](#)

Interpretación del resultado positivo de la prueba de PCR (y/o antígeno) en ausencia de otras pruebas

Días desde inicio de síntomas	Sintomáticos		
	Leves	Graves	Críticos
< 7 días	IA	IA	IA
7-14 días	IR	IA	IA
15-50 días	IP	IA	IA
> 50 días	IP	IR	IA

IA: Infección aguda en curso con alta probabilidad de transmisión;

IR: infección aguda resuelta o en resolución con baja probabilidad de transmisión;

IP: infección pasada (siempre y cuando se haya resuelto la clínica) con muy baja probabilidad de transmisión.

*La consideración de IA en este grupo se mantendrá durante un plazo de 7 días, luego se considerará IR otros 7 días y después

RT-PCR [+] “fuera del curso clínico”

Persistencia de PCR [+] > 3 semanas (~9-19%):

- Cargas virales bajas, sin implicaciones clínico-epidemiológicas
- Desarrolla respuesta inmunitaria (Ac)
- PCR [+] refleja solo la detección de ARN viral y no necesariamente indica la presencia de virus viable.
- Relación con dinámica de eliminación del RNA viral a lo largo de la enfermedad.

PCR [+], tras prueba de PCR negativa y curación clínica (“PCR re-detectada”):

- No se ha comprobado reinfección
- En ningún caso el resultado positivo se ha asociado empeoramiento clínico, ni al contagio de personas en contacto ni mala evolución clínica
- Error de prueba (falso [-]), reactivación, dinámica eliminación del RNA viral

[Wajnberg, A. et al. Humoral immune response and prolonged PCR positivity in a cohort of 1343 SARS-CoV 2 patients in the New York City región. medRxiv 2020.04.30.20085613](#)

[Ye G, et al. Clínica characteristics of SARS-CoV-2 reactivación. J Infect. 2020;80\(5\):e14-e17.](#)

[Centro Cochrane Iberoamericano. ¿Cuál es el riesgo de reinfección por coronavirus SARS-CoV-2?. 17 marzo 2020, Cochrane iberoamericana.](#)

[KCDC. Findings from investigation and analysis of re-positive cases. Update2020-05-21 \[Internet\]. KCDC](#)

Indicaciones de la RT-PCR SARS-CoV-2

Identificación de infecciones por COVID-19 (diagnóstico clínico):

- Casos sospechosos
- ¿Contactos estrecho asintomáticos?

Identificación en el triaje e investigación de grupos

Confirmación de la eliminación del virus después de la recuperación

Test antigénicos rápidos

- Técnica inmunocromatográfica
- Antígeno en la glicoproteína S (espícula)
- **Sensibilidad general baja** (50-60%). Aumenta al 85% en muestras con alta carga viral.
- **Especificidad general: 99.5%**
- Precisión: 82.6%
- Valor predictivo positivo elevado
- **Posibles usos clínicos:**
 - **Diagnóstico complementario a RT-PCR:** "clasificación epidémica de pacientes sintomáticos"
 - **Confirmación de caso sospechoso** durante el pico de la pandemia, especialmente a la entrada en el servicio de urgencias cuando los pacientes presentan una alta carga viral.

Mertens P, De Vos N, Martiny D, Jassoy C, Mirazimi A, Cuypers L, et al. Development and potential usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip diagnostic assay in a pandemic context. medRxiv 2020.04.24.20077776;



Pruebas serológicas COVID19

¿Cuántos pacientes genera una respuesta de anticuerpos?

¿En cuánto tiempo se empiezan a producirse anticuerpos?

¿Cuánto tiempo se prolonga la detección de IgM ?

¿Cuándo es el momento más adecuado para realizar la prueba serológica?

¿Hay alguna diferencia significativa entre pacientes con infección graves y no grave?

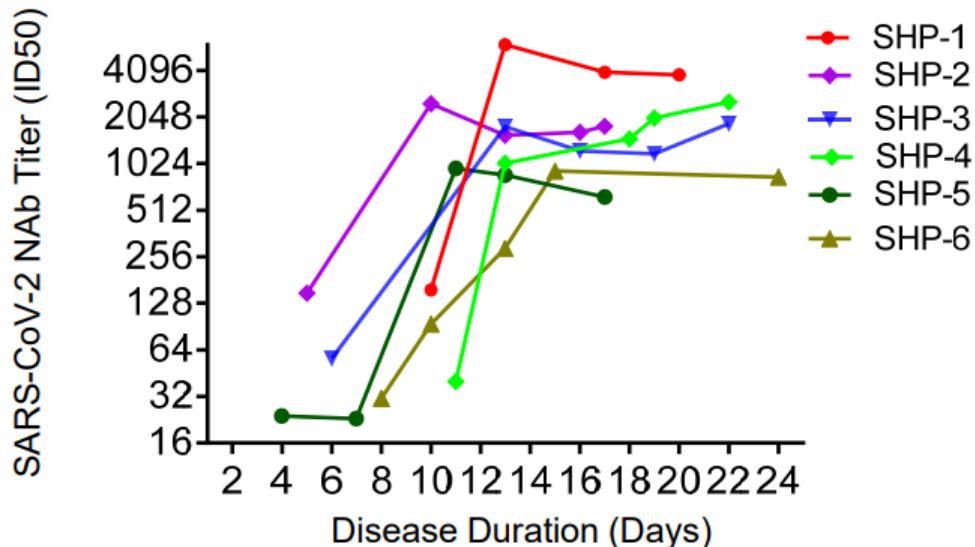
¿Cuáles son las sensibilidades de la detección de anticuerpos para pacientes en diferentes etapas de enfermedad?

¿Son fiables los test rápidos?

Dinámica de aparición de anticuerpos neutralizantes

Detección de **Ac neutralizantes desde el día 10-15 después del inicio de la enfermedad** y se mantuvieron

Niveles desarrollados	%
Muy bajos	30
Medio-Bajos	17
Medio-altos	39
Altos	14

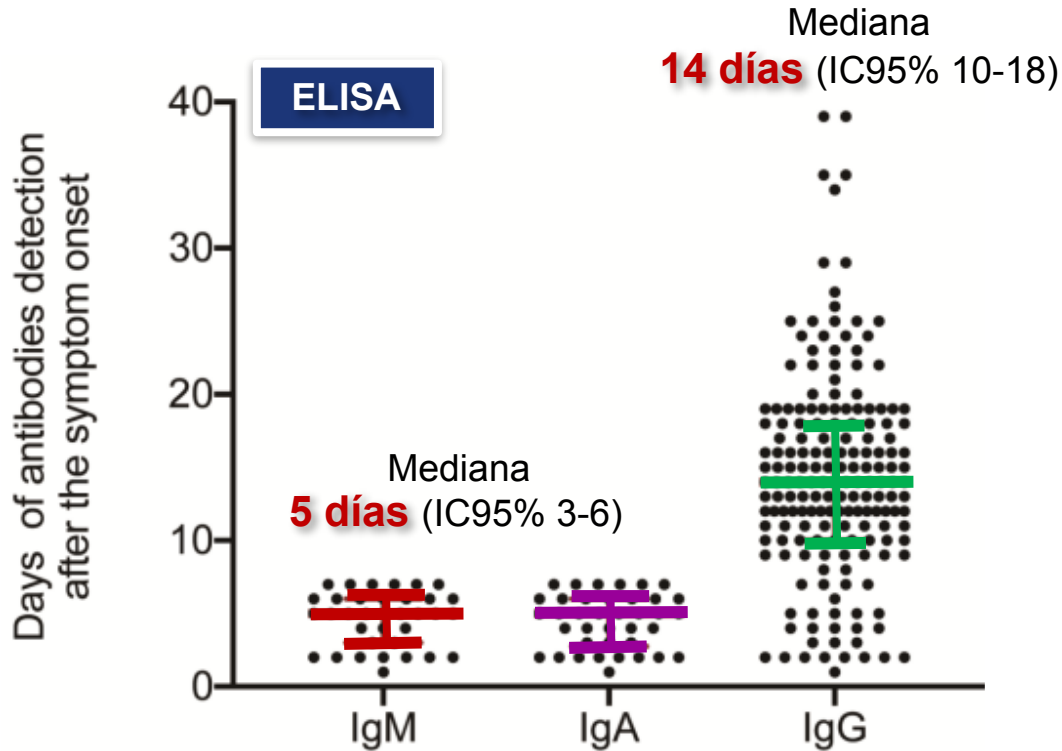


N =175 pacientes recuperados con síntomas leves

Niveles significativamente más altos en pacientes de edad avanzada y de mediana edad, con el aumento del valor de la proteína C reactiva y con descenso de nº de linfocitos

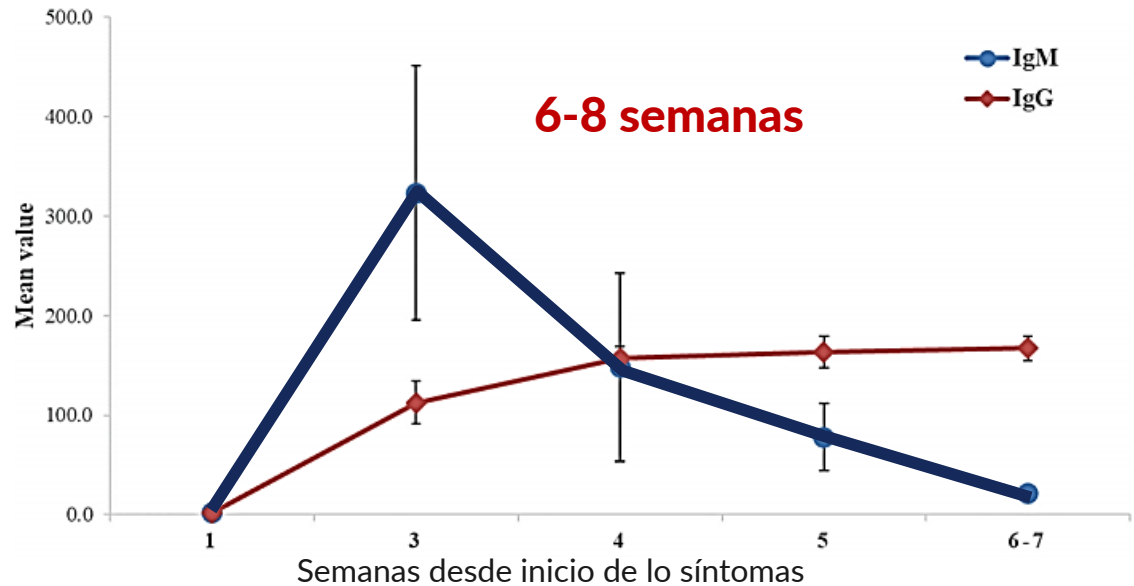
Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARSCoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. medRxiv 2020.03.30.20047365

¿Cuándo se empiezan a producir **IgA, IgM, IgG** frente a **SARSA-CoV-2**?



N= 208 muestras de plasma de 2 cohortes
65% casos leves a moderados

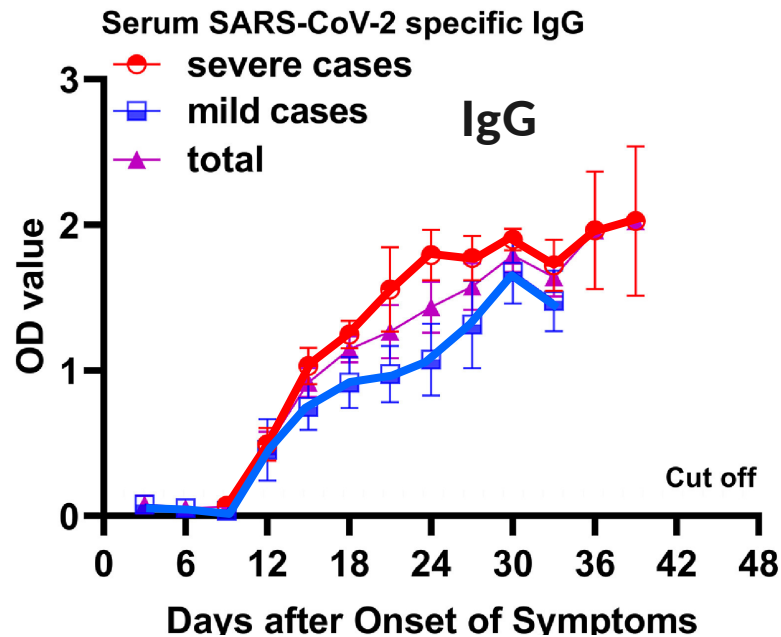
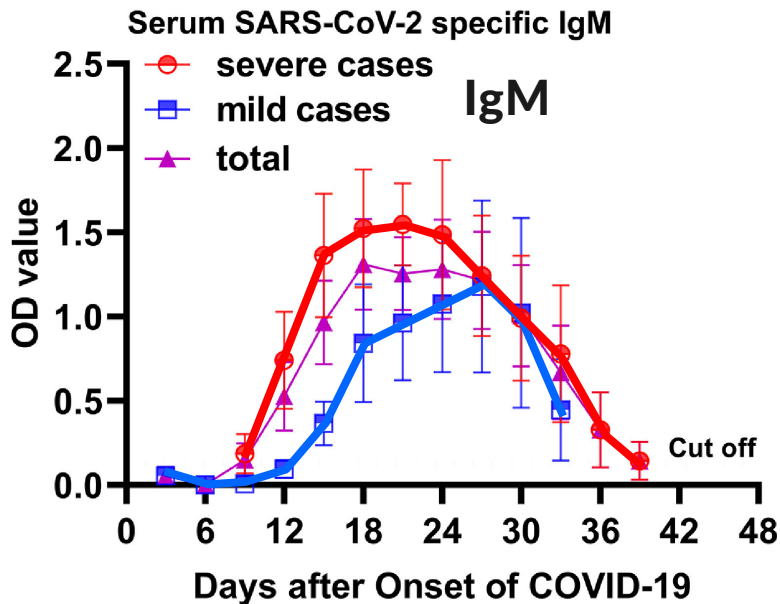
¿Cuánto tiempo tarde en desaparecer la IgM?



Todos los pacientes incluidos tuvieron pruebas de IgM e IgG **después de 2 semanas** desde el inicio de los síntomas

N= 34 pacientes hospitalizados
Método ELISA

- [Xiao AT, Gao C, Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report \[published online ahead of print, 2020 Mar 21\]. J Infect. 2020;S0163-4453\(20\)30138-9.](#)



Los **casos graves**:

- Respuesta IgM **más temprana**
- **Niveles más altos** de IgM e IgG

n= 27 COVID-19 hospitalizados (17 casos graves).
Mediana de edad. 62 años

Zeng Z, Chen L, Pan Y, et al. Re: Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report [published online ahead of print, 2020 Apr 10]. J Infect. 2020;S0163-4453(20)30180-8. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.052

Pruebas de serológicas en la infección por SARS-CoV-2

- **Antígenos:** nucleoproteína N, proteína S o el dominio de unión al receptor (RDB-S)
- **Ac Totales:** marcador más sensible y temprano (detección más rentable a partir 2ª semana de inicio síntomas)
- **IgM e IgG :**
 - Tiempo de **seroconversión** (tras inicio de síntomas)
 - IgM [5 a 10 días]
 - IgG [13-15 días]
 - Niveles óptimos para detección: 2ª y 3ª semana de la enfermedad
- **Sensibilidad**
 - Creciente con el curso de la infección: >90% a partir 2ª semana
 - Mayor con kits de inmunoensayo: ELISA (Enzima-Inmunoensayo), CLIA (Quimio-luminiscencia): 90-94%
- **Alta especificidad** (todos): ELISA ≈ 99%.

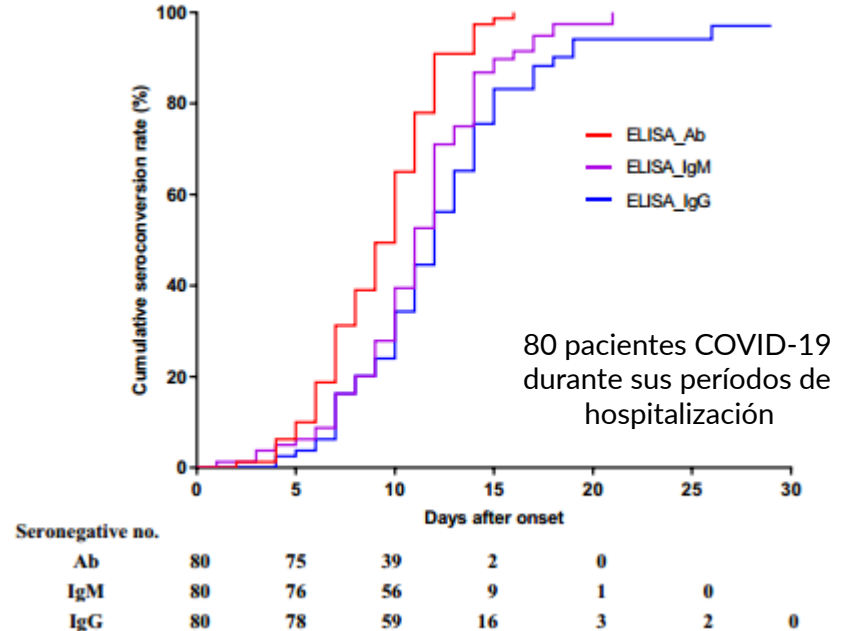
Número limitado de estudios sobre pruebas serológicas fuera del entorno hospitalario

[Kontou PI , Braliou GG , Dimou NL, et al Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: a meta-análisis. medRxiv 2020.04.22.20074914](#)

Dinámica de aparición de Ac totales (Ab), IgM e IgG,

N=80	Ab	IgM	IgG
Tasas de seroconversión	98,8%	93,8%	93,8%
Tiempo medio de seroconversión			
Días tras la exposición al COVID-19	15	18	20
Días después del inicio de síntomas	9	10	12
Sensibilidad desde inicio de los síntomas			
1-7 días	64,1%	33,3%	33,3%
> 2 semanas	100%	96,7%	93,3%

Medidos mediante técnica de ELISA



Lou B, Li T-D, Zheng S-F, et al. Serology characteristics of SARSCoV-2 infection since exposure and post symptom onset. Eur Respir J 2020; in press (<https://doi.org/10.1183/13993003.00763-2020>).

Sensibilidad detección RNA y Ac en diferentes días desde inicio síntomas [SARS-CoV-2]					
Días desde inicio	n	RNA [PCR]	Ac Totales	IgM	IgG
Total	173	67,1 (59.4-74.1)	93,1 (88.2-96.4)	82,7 (76.2-88)	64,7 (57.1-71.8)
1-7	94	66,7 (55.7-76.4)	38,3 (28.5-48.9)	28,7 (19.9-39.0)	19,1 (11.8-28.6)
8-14	135	54 (44.8-63.0)	89,6 (83.2-94.2)	73,3 (65.0-80.6)	54,1 (45.3-62.7)
15-39	90	45,5 (32.0- 59.5)	100 (96.0-100.0)	94,3 (87.2-98.1)	79.8 (69.9-87.6)

Método ELISA

Momento adecuado de la prueba de anticuerpos (detección del "pico"):

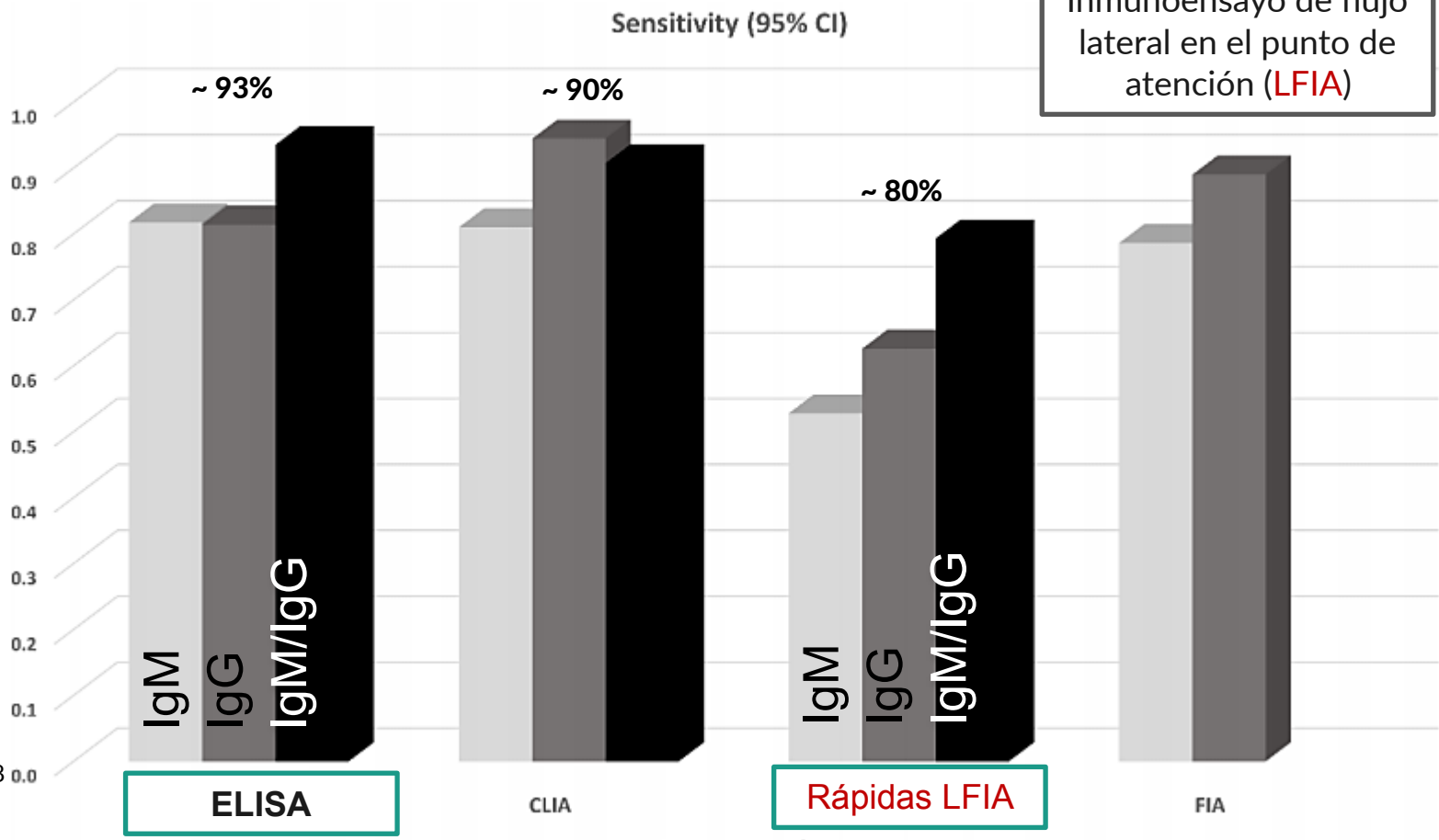
- **Ac totales:** a partir **2ª semana** desde inicio de los síntomas
- **IgM:** **3ª semana** desde inicio de los síntomas
- **IgG:** **3ª semana** desde inicio de los síntomas

Tests serológicos rápidos

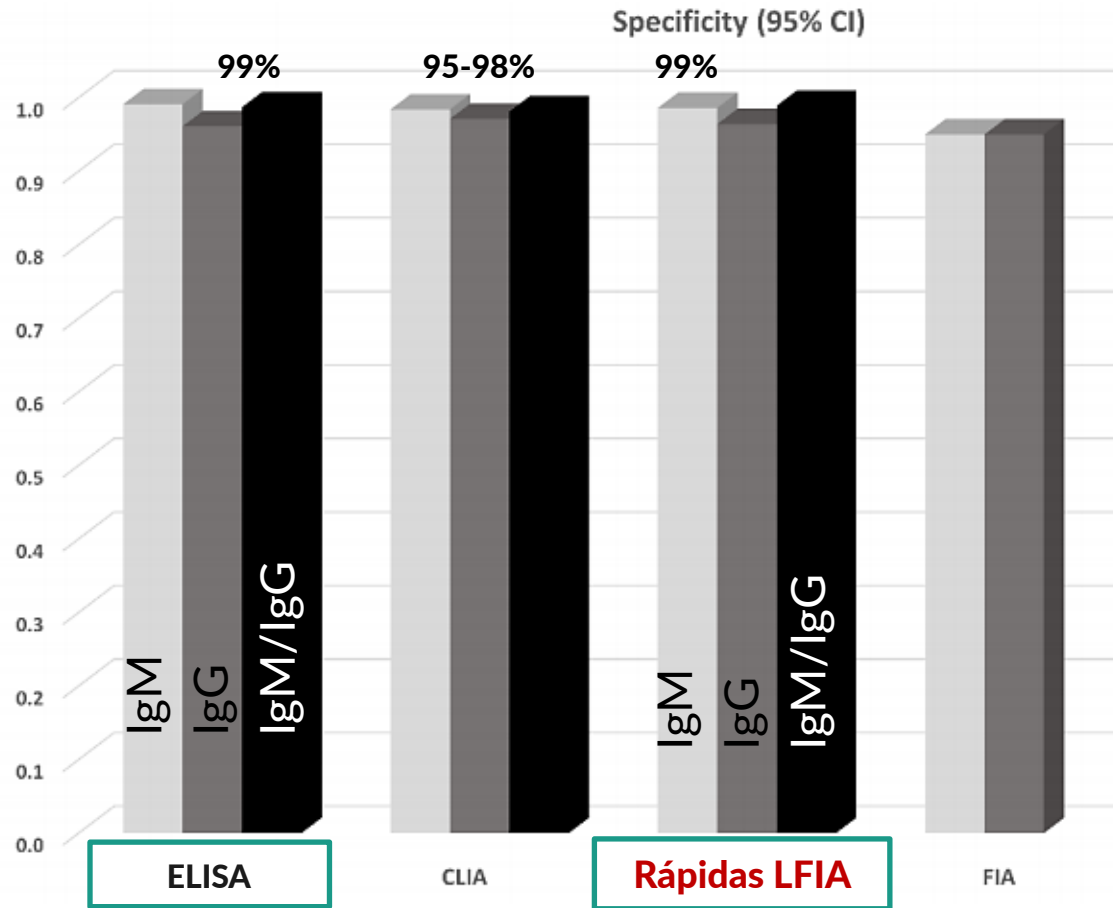
- Actualmente existen > 60 kits con marcado “CE”
- La mayoría se basan en la **inmunocromatografía (lateral-flow)**
- **Detección cualitativa** de anticuerpos (Totales, IgM o IgG)
- **Comparación de test de inmunoensayo**
 - **Menor sensibilidad** (~70 a 88.6%) y **especificidad** (~90.6%) que ELISA/CLIA
 - **Concordancia** 75.7-94.8% de **concordancia** (ELISA y LFA)
 - Más vulnerables a **falsas negativos y positivos**
- **Precisan validaciones** escenario clínico de uso habitual
- Mayor variabilidad en la detección de IgM más variable que la IgG
- El rendimiento disminuyen con **cargas virales bajas** (infección leve)
- **Poca utilidad en fase más aguda:** la seropositividad alcanza el máximo > 20 días después del inicio de los síntomas



Inmunoensayo de flujo lateral en el punto de atención (LFIA)



N= 38 estudios (7.848 individuos)

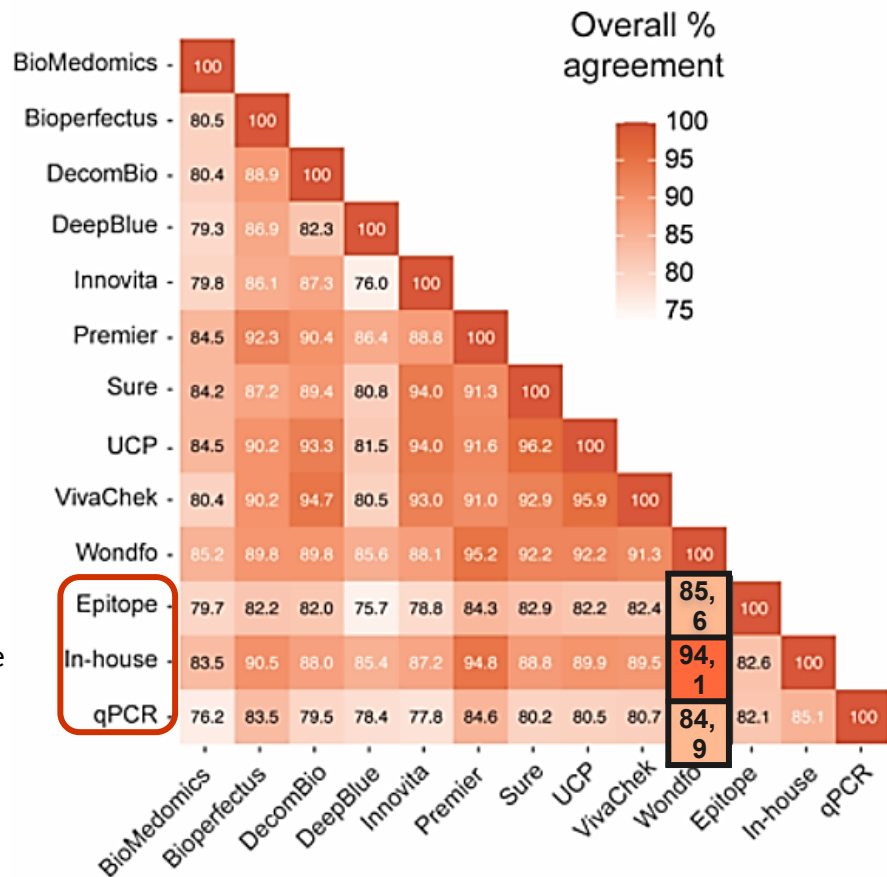


Kontou PI , Braliou GG , Dimou NL, et al Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: a meta-análisis. medRxiv 2020.04.22.20074914

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
ELISAs												
Epitope	108	3	97.2	92.1 - 99.4	108	10	90.7	83.6 - 95.5	108	11	89.8	82.5 - 94.8
In-House									108	1	99.1	94.9 - 100.0

Grado de concordancia de test antigénicos rápidos



10 Test de flujo lateral (LFA) vs 2 prueba de serología plasmáticas (ELISA)
 128 muestras de plasma o suero de 79 individuos RT-PCR [+]
 108 controles negativos pre-COVID-19

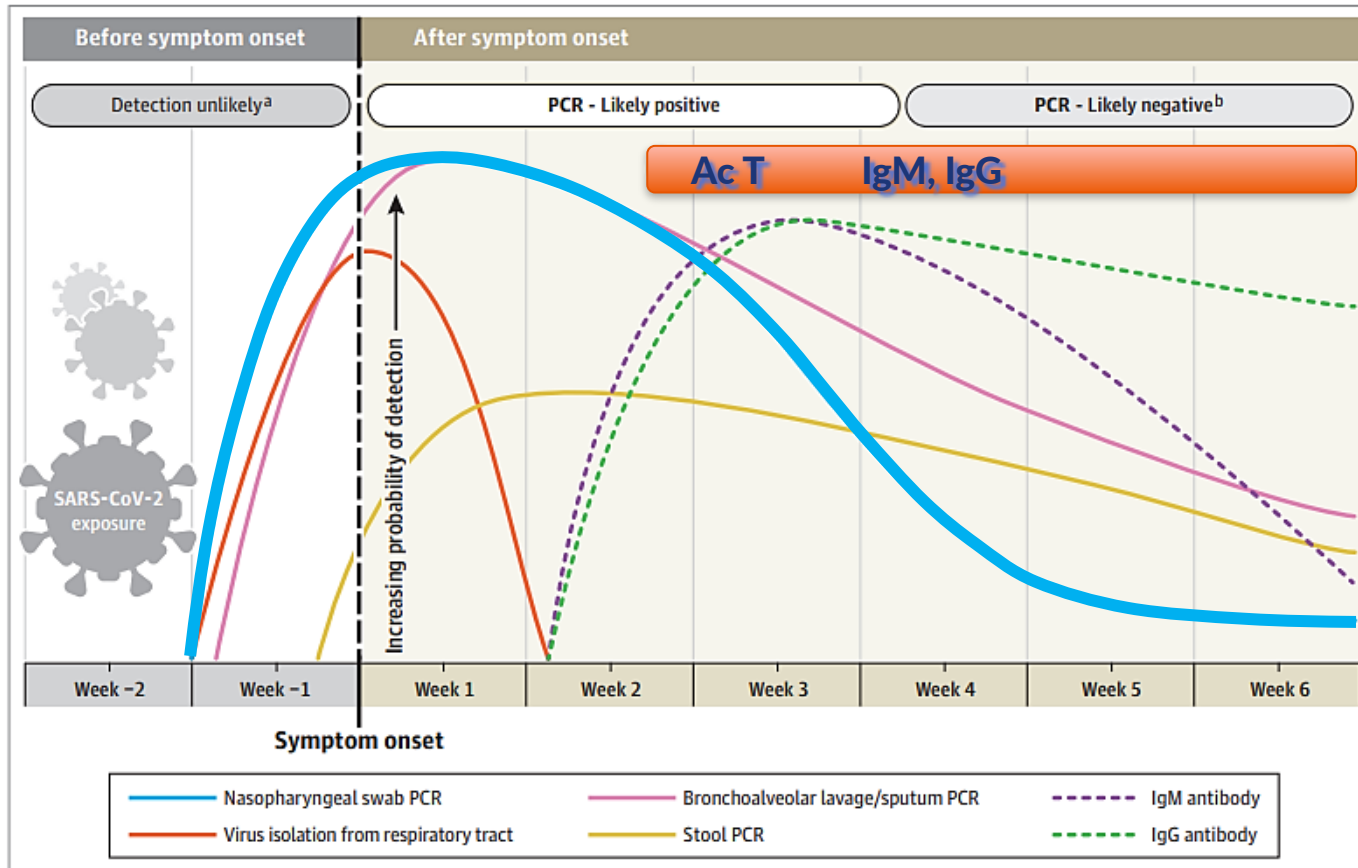
Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN, Rathore U, et al, Test performance evaluation of SARS-CoV-2 serological assays. medRxiv 2020.04.25.20074856;

Aplicaciones de las pruebas serológicas de inmunoensayos de detección de anticuerpos COVID-19

- **Encuestas de seroprevalencia**
- **Diagnóstico de infección por COVID-19 retrospectivo:**
 - PCR [-] con un fuerte vínculo epidemiológico con la infección por COVID-19
 - Muestras de suero en la fase aguda y convaleciente.
 - Diagnóstico es un diagnóstico retrospectivo y demasiado tarde para afectar el aislamiento.
- **Aplicaciones potenciales:**
 - Evaluación del estado inmune del personal de atención médica
 - Guiar las estrategias de levantamiento de medidas de bloqueo

La **OMS** los **desaconseja** con el objetivo de considerar a aquellos con anticuerpos como protegidos contra la reinfección ("**pasaporte de inmunidad**", "**certificado libre de riesgos**")
No se recomiendan para la **detección de casos agudos o activos.**

[Documento de posicionamiento de la SEIMC sobre el diagnóstico microbiológico de COVID-19. 27/04/2020 \(Internet\). SEIMC: Recomendaciones Institucionales. 2020](#)



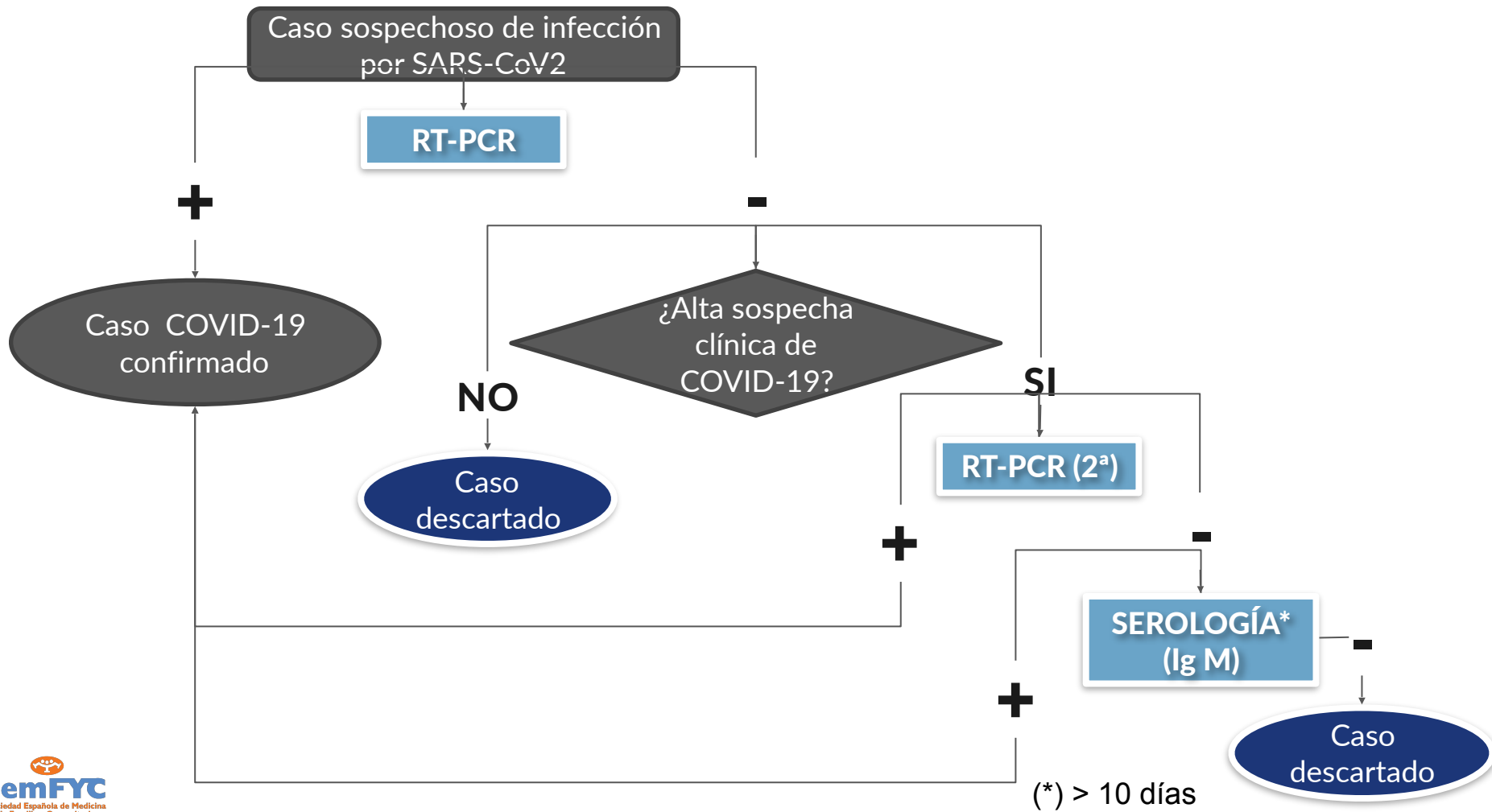
Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 [published online ahead of print, 2020 May 6]. JAMA. 2020;10.1001/jama.2020.8259. doi:10.1001/jama.2020.8259

Serología + PCR, mejoran significativamente la sensibilidad del diagnóstico de COVID-19

Sensibilidad detección RNA y Ac en diferentes días desde inicio síntomas [SARS-CoV-2]

Días desde inicio	n	RNA [PCR]	Ac Totales	IgM	IgG	RNA+Ac totales
Total	173	67,1 (59.4-74.1)	93,1 (88.2-96.4)	82,7 (76.2-88)	64,7 (57.1-71.8)	99,4 (96.8-100.0)
1-7	94	66,7 (55.7-76.4)	38,3 (28.5-48.9)	28,7 (19.9-39.0)	19,1 (11.8-28.6)	78,7 (69.1-86.5)
8-14	135	54 (44.8-63.0)	89,6 (83.2-94.2)	73,3 (65.0-80.6)	54,1 (45.3-62.7)	97 (92.6-99.2)
15-39	90	45,5 (32.0- 59.5)	100 (96.0-100.0)	94,3 (87.2-98.1)	79.8 (69.9-87.6)	100 (96.0-100.0)

Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019 [published online ahead of print, 2020 Mar 28]. Clin Infect Dis. 2020;ciaa344. doi:10.1093/cid/ciaa344

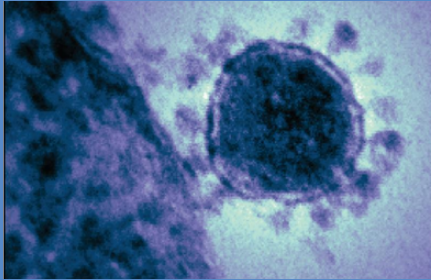


Diagnóstico de la infección COVID mediante pruebas microbiológicas

Situación clínica		PCR	IgM	IgG	Ac totales
Periodo ventana		+	-	-	-
Infección activa	Temprana (<14 días)	+	+	-	+
	Temprana , falso [-] PCR	-	+	-	+
	Convalecencia (>14 d)	-	+	+	+
	Tardía (> 1 mes)	-	+	+	+
Infección pasada y curada (>2meses)		-	-	+	+

PCR: Diagnostica infección (fase aguda)

Ac: Fase convalecencia, tardía y asintomáticos



COVID-19

Gracias



semFYC

Sociedad Española de Medicina
de Familia y Comunitaria