

Pruebas de laboratorio para detectar el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio

Recomendaciones provisionales

Septiembre del 2013

1. Introducción

El propósito de este documento es presentar recomendaciones provisionales para los laboratorios y para los interesados directos que se ocupan de las pruebas de laboratorio para detectar el coronavirus causante del síndrome respiratorio del Oriente Medio (MERS-CoV). La OMS publica actualizaciones regulares acerca de la situación de todo evento relacionado con el MERS-CoV en:

http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/es/index.html

Estas recomendaciones fueron preparadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la base de los conocimientos actuales. Fueron revisadas por expertos de laboratorio, entre otros quienes tienen experiencia en el manejo de este y otros coronavirus, y también por quienes tienen experiencia y conocimientos técnicos en el diseño de pruebas diagnósticas para detectar los coronavirus. La OMS está vigilando muy de cerca los sucesos relacionados con este virus y modificará estas recomendaciones cuando sea necesario. A menos que se hagan modificaciones, este documento caducará el 28 de febrero del 2014.

2. Indicaciones para las pruebas

La OMS recomienda que los clínicos, epidemiólogos y científicos de laboratorio consulten la definición de casos de la OMS en

http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/case_definition/en/index.html, que se actualizará a medida que sea necesario, para determinar a cuáles pacientes deben hacerse las pruebas. También deberán hacerse pruebas para otros agentes patógenos respiratorios por medio de procedimientos usuales de laboratorio, según lo recomendado en las directrices locales de manejo para la neumonía extrahospitalaria, pero estas no deben retardar las pruebas para el MERS-CoV. Algunos ejemplos de otras etiologías son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Legionella pneumophila*, virus de la influenza y el virus sincitial respiratorio.

3. Recogida y envío de muestras

Siempre que se recojan muestras de casos que se están investigando, deben seguirse las instrucciones de control de infecciones. La OMS ha elaborado directrices que pueden consultarse en:

http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/IPcCoVguidance_06May13.pdf.

Hoy en día, hay cada vez mayor evidencia de que las muestras de las vías respiratorias inferiores como el lavado broncoalveolar, el esputo y el aspirado endotraqueal contienen las cargas virales más altas (1,2) y, por lo tanto, estas deben recogerse siempre que sea posible. Un informe reciente de una serie de casos de infección por MERS-CoV detectados en Arabia Saudita (3) también demostró la importancia de las muestras recogidas en las vías respiratorias superiores, como hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos para detectar el virus. Se recomienda que, siempre que sea posible, se recojan muestras tanto de las vías respiratorias superiores como de las inferiores.

Para aumentar la probabilidad de detectar el virus, en el curso de la enfermedad deben recogerse varias muestras de distintos sitios. Aun después de la detección inicial del virus, deben continuarse tanto el muestreo como las pruebas, a objeto de mejorar los conocimientos actuales acerca de la duración de la excreción vírica; por lo tanto, se recomiendan enfáticamente. Se ha detectado el virus en la orina y las heces pero a niveles inferiores a los encontrados en las vías respiratorias inferiores (1). Hasta la fecha, hay poca información acerca del valor de la sangre total como muestra para detectar el MERS-CoV.

Es necesario recoger muestras séricas. Son preferibles las muestras pareadas, pero también son útiles las muestras únicas. Las muestras séricas pareadas deben recogerse dejando entre 14 y 21 días de separación entre cada toma de muestra, mientras que la primera muestra debe recogerse en la primera semana de la enfermedad. Si se va a recoger solamente una muestra, esto debe hacerse por lo menos 14 días después del inicio de los síntomas.

En el cuadro 1 se enumeran las muestras que pueden recogerse, así como sus requisitos de almacenamiento y transporte.

Las muestras deben llegar al laboratorio lo más pronto posible después de haberlas recogido. Nunca se insistirá demasiado en la importancia del manejo adecuado durante el transporte. Cuando es probable que ocurra un retraso en la recepción por el laboratorio de las muestras extraídas de las vías respiratorias, se recomienda firmemente congelar las muestras, de preferencia a -80° y enviarlas en hielo seco. Sin embargo, es muy importante tratar de no congelar y descongelar las muestras varias veces. El suero debe separarse de la sangre total y puede almacenarse y transportarse a 4°C o congelarse a -20°C o menos y transportarse en hielo seco. Debe evitarse el almacenamiento de muestras de las vías respiratorias y de suero en los congeladores domésticos sin escarcha, debido las grandes fluctuaciones de temperatura.

El transporte de las muestras dentro de las fronteras del país debe satisfacer los reglamentos nacionales pertinentes. El transporte internacional de muestras de MERS-CoV debe regirse por los reglamentos internacionales aplicables, según se describen en el documento de la OMS: *Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2013-2014* que puede consultarse en: http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_20100801/es/index.html.

Cuadro 1. Muestras adecuadas para las pruebas de detección del MERS-CoV sobre la base de la evidencia actual

Tipo de muestras	Medio para transporte	Transporte al laboratorio	Categoría de transporte de sustancias peligrosas
Esputo	no	4°C* Si es probable retraso de > 48 horas considere congelar y transportar con hielo seco	Sustancia biológica, categoría B
Lavado broncoalveolar	no	igual que para esputo	igual que arriba
Aspirado traqueal	no	igual que para esputo	igual que arriba
Aspirado nasofaríngeo	no	igual que para esputo	igual que arriba
Hisopos combinados nasofaríngeos/orofaríngeos	medio para transporte del virus	igual que para esputo	igual que arriba
Tejido de biopsia o autopsia incluso de pulmón	medio para transporte del virus o solución salina estéril si la muestra se usará también para cultivo bacterial	igual que para esputo	igual que arriba
Suero para pruebas serológicas: son preferibles las muestras pareadas con la muestra inicial recogida en la primera semana de la enfermedad y la segunda recogida dos o tres semanas más tarde. Una muestra única de suero debe recogerse por lo menos en los 14 días siguientes al inicio de los síntomas.	no	4°C* o congelado y enviado en hielo seco	igual que arriba

* Con hielo o paquetes fríos, según sea el caso

4. Algoritmo para detectar MERS-CoV por PCR y secuenciación

La confirmación usual de los casos de infección por MERS-CoV se basa en la detección de las secuencias únicas del ARN viral por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa en tiempo real (rRT-PCR), con confirmación mediante la secuenciación de ácidos nucleicos cuando sea necesario. Véase más abajo, donde se exponen las pruebas serológicas para MERS-CoV.

En ciertas circunstancias, pero no para los diagnósticos corrientes, los laboratorios que tengan la experiencia pertinente y los establecimientos de control pueden intentar el aislamiento del virus en cultivos celulares. La versión actual de estas recomendaciones no abarca los procedimientos de aislamiento del virus.

Toda prueba para detectar este virus debe efectuarse en laboratorios que cuenten con los equipos adecuados y personal capacitado en los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes. Pueden encontrarse recomendaciones provisionales de la OMS para el manejo de laboratorios que presentan riesgo biológico con respecto al MERS-CoV en:

http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/NovelCoronavirus_InterimRecommendationsLaboratoryBiorisk_190213/en/index.html.

Los Estados Miembros decidirán individualmente cuál de sus laboratorios, si fuese el caso, debería efectuar estas pruebas.

Se han diseñado tres tipos de análisis rRT-PCR para la detección de MERS-CoV y se ha publicado en detalle. Las pruebas descritas actualmente consisten en un análisis corriente arriba del material genético de la proteína E (upE) (4) y de análisis dirigidos al marco de lectura abierto 1a (ORF 1a) (5). El análisis para el material genético que se encuentra en la proteína E se considera sumamente sensible y se recomienda para el tamizaje, mientras que el análisis ORF 1a se considera de sensibilidad igual. El análisis ORF 1b se considera menos sensible que el análisis ORF 1a. En las referencias 4 y 5 figuran descripciones detalladas para efectuar estos análisis. Por otro lado, los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos han desarrollado análisis rRT-PCR dirigidos a la proteína N de la nucleocápside que contiene material genético de MERS-CoV, que pueden complementar los análisis upE y ORF 1a para fines de tamizaje y confirmación.

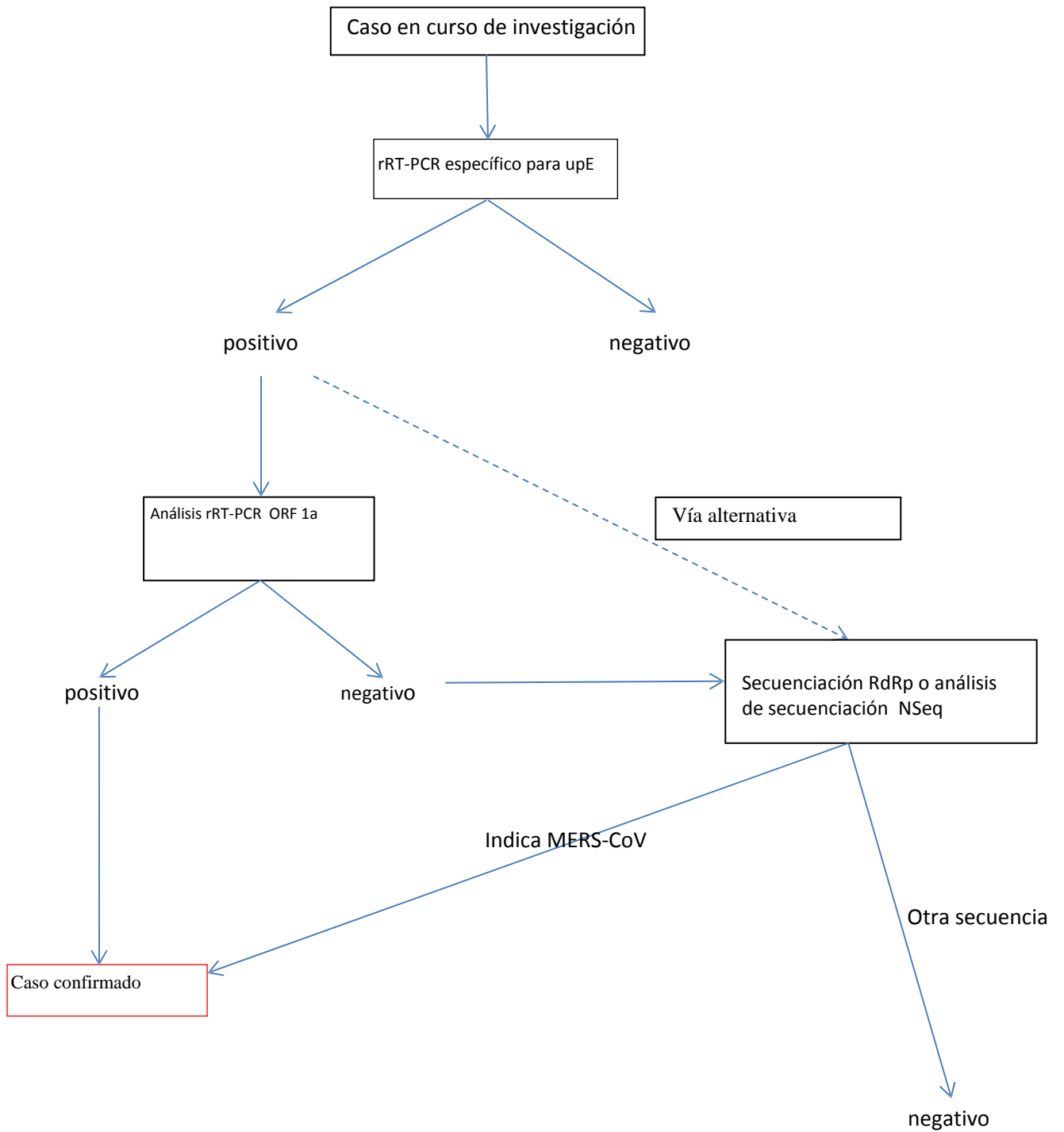
Se han identificado dos sitios del genoma del nuevo coronavirus adecuados para la secuenciación que contribuye a la confirmación. Estos se encuentran en la ARN polimerasa dependiente de ADN (RdRp) y en los genes (N) (5).

En el sitio web del Instituto de Virología, situado en Bonn (Alemania), encontrará más información acerca de estos análisis: <http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40>

Si desea más información acerca de los análisis desarrollados por los CDC (Estados Unidos) diríjase a Dean D. Erdman (dde1@cdc.gov).

En la figura 1 se muestra un algoritmo de pruebas para la investigación de casos sospechosos de MERS-CoV por rRT-RCP.

Figura 1 Algoritmo de pruebas para casos en curso de investigación para MERS-CoV por rRT-RCP



Se insta a los laboratorios con experiencia limitada en las pruebas para detectar MERS-CoV a que soliciten la confirmación de los resultados de sus pruebas a laboratorios que tengan más experiencia en el manejo de muestras que contengan este virus. La OMS puede ayudar a sus Estados Miembros a determinar cuáles son los laboratorios adecuados para prestar este servicio. Por otro lado, los laboratorios quizás deseen comprobar sus propios resultados positivos mediante la repetición de la extracción del ácido nucleico y efectuando de nuevo las pruebas en la muestra.

Cuando los resultados entre dos análisis rRT-PCR dirigidos a sitios únicos del genoma MERS-CoV son discordantes, debe hacerse la secuenciación de un amplicón generado a partir de un análisis apropiado de la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) para confirmar los resultados de la prueba. Estos datos de la secuenciación, además de confirmar la presencia del virus, también pueden aportar información valiosa para ayudar a comprender los orígenes del virus y cómo se propaga. En consecuencia, se recomienda la secuenciación del ácido nucleico de MERS-CoV de tantas muestras positivas como sea posible.

Cuatro coronavirus humanos (hCoVs) son causas conocidas de infecciones de las vías respiratorias, cuya gravedad puede ser de leve a moderada. Se trata de los betacoronavirus hCoV-OC43 y hCoV-HKU1 y de los alfacoronavirus hCoV-229E y hCoV-NL63. Los análisis comerciales multiplex PCR para los microorganismos patógenos respiratorios pueden detectar estos virus. Es importante que los resultados positivos para estos virus no se confundan con MERS-CoV.

Una serie de resultados negativos no debe descartar totalmente la posibilidad de infección. Varios factores podrían generar resultados negativos falsos, entre otros:

- mala calidad de la muestra
- la muestra fue recogida muy tarde o muy pronto en el curso de la enfermedad
- la muestra no se manejó ni transportó en la forma adecuada
- razones técnicas inherentes a la prueba, por ejemplo, mutación del virus o inhibición de la PCR

Si se obtiene un resultado negativo de muestras de pacientes con un índice alto de sospecha de infección por MERS-CoV, deben recogerse otras muestras y someterlas a las pruebas. Los laboratorios también pueden considerar la posibilidad de enviar una o más muestras negativas a laboratorios externos para su confirmación.

Para considerar que un caso fue confirmado por laboratorio, debe cumplirse una de las siguientes condiciones:

un resultado de PCR positivo para al menos dos segmentos específicos diferentes en el genoma de MERS-CoV

ó

un resultado de PCR positivo para un segmento específico en el genoma de MERS-CoV y otro producto diferente de PCR secuenciado, que confirme la identidad de las secuencias conocidas de MERS-CoV (6).

Un caso con un resultado de PCR positivo para un fragmento específico único sin hacer más pruebas, pero con una historia de posible exposición y signos clínicos uniformes se considera como un caso probable.

5. Pruebas serológicas para MERS-CoV

Se han publicado los detalles de dos análisis de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos

contra MERS-CoV (5), y se usaron estos análisis, junto con una prueba de neutralización sérica, para someter a tamizaje los contactos de un caso tratado en un hospital alemán, con aparentemente buena sensibilidad y especificidad (7). También se ha desarrollado un análisis para la detección de los anticuerpos de MERS-CoV mediante la tecnología de la micromatriz proteica y se han publicado los detalles (8). Este análisis parece ser sumamente específico. Los CDC de los EE.UU. han desarrollado un método en dos etapas para detectar anticuerpos contra MERS-CoV, basado en una prueba de tamizaje que utiliza un análisis inmunoenzimático indirecto (ELISA) de la proteína N recombinante de la nucleocápside, seguido de una prueba confirmatoria usando un anticuerpo fluorescente indirecto con el virus íntegro (IFA) o prueba de microneutralización. Todas las pruebas serológicas desarrolladas hasta el momento se han validado solo contra un número reducido de sueros de convalecencia de casos de MERS-CoV y todavía no ha sido posible comparar el desempeño de los diferentes análisis. Ningún estuche está actualmente disponible para la prueba serológica.

Se recomienda que cualquier resultado positivo obtenido mediante un análisis serológico único sea confirmado con un análisis de neutralización. Si bien es cierto que con el transcurso del tiempo algunas técnicas como la ELISA, usada para someter a tamizaje las muestras, podrían encontrarse fácilmente en los laboratorios de muchos países, siempre será necesario efectuar análisis de neutralización confirmatorios en laboratorios de establecimientos especializados y dotados de personal muy capacitado

Actualmente, no hay un consenso evidente en la interpretación de los resultados de las pruebas serológicas en pacientes individuales. En vista de que los análisis disponibles hoy en día se han validado utilizando solo un número limitado de sueros de convalecencia, es prudente adoptar un enfoque cauteloso al confirmar casos basados exclusivamente en las pruebas serológicas. En consecuencia, por el momento, aquellos casos con resultados positivos de pruebas serológicas efectuadas por el laboratorio, pero sin pruebas de PCR o de secuenciación, se consideran casos probables de infección por MERS-CoV, si cumplen las otras condiciones de esa definición de casos. La clasificación definitiva de los casos dependerá de la información clínica y epidemiológica combinada con los resultados de laboratorio. Las definiciones de casos usadas por la OMS pueden encontrarse en:

http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/case_definition/en/index.html.

Sin embargo, las pruebas serológicas pueden aportar información valiosa acerca de las tasas de infección en la población; por ende, se recomiendan las encuestas serológicas, en particular de grupos o poblaciones en riesgo. Los Estados Miembros y los laboratorios que desean efectuar pruebas serológicas para MERS-CoV deben comunicarse con las instituciones que han desarrollado los análisis mencionados más arriba a fin de considerar la manera más apropiada de satisfacer sus requisitos. Si fuese necesario, la OMS facilitará la comunicación entre los Estados Miembros y los laboratorios especializados. Se insta a la recolección y puesta a prueba continuas del suero de casos confirmados y de personas que posiblemente estuvieron expuestas al virus, ya que esto contribuye a la comprensión general de la infección por MERS-CoV y también a los resultados de los análisis desarrollados hasta ahora.

6. Reactivos

Debido a que ya se han publicado las secuencias iniciadoras y de la sonda para los análisis rRT-PCR para MERS-CoV, los laboratorios pueden adquirirlos de sus proveedores usuales. Como alternativa, los laboratorios también pueden consultar: <http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40>.

El material de control positivo para los análisis rRT-PCR específicos para upE y 1a pueden pedirse al portal European Virus Archive:

http://www.european-virus-archive.com/Portal/produit.php?ref=1386&id_rubrique=9.

Los Estados Miembros que necesiten apoyo para conseguir material de control para los análisis de rRT-PCR pueden dirigirse a la OMS.

Los CDC de los EE.UU. han elaborado un estuche de diagnóstico para la detección de MERS-CoV por rRT-PCR que estará a disposición en cantidades limitadas. Para recibir más información al respecto, comunicarse con Dean D. Erdman (dde1@cdc.gov).

7. Formación de redes mundiales de laboratorios

El acceso a pruebas de laboratorio oportunas y exactas de las muestras de los casos que se están investigando es parte esencial de la vigilancia de esta infección emergente. Todos los países deben tener acceso a la realización de pruebas confiables, a nivel nacional o internacional en laboratorios dispuestos a efectuar pruebas de detección primaria o de confirmación. En caso de que surja la necesidad, la OMS puede ayudar a los Estados Miembros a tener acceso a las pruebas en laboratorios internacionales. Los Estados Miembros quizás deseen suscribir Acuerdos de Transferencia de Material con los laboratorios internacionales, antes de enviar sus muestras. Estos acuerdos abarcan temas como la propiedad del material clínico y los derechos de propiedad intelectual.

8. Notificación de casos y resultados de las pruebas

Los laboratorios deben notificar a las autoridades de salud pública pertinentes en su país tan pronto como reciban una muestra para someterla a pruebas de detección del MERS-CoV, aun antes de que se haya hecho alguna prueba. Todos los resultados de las pruebas, ya sean positivos o negativos, deben comunicarse de inmediato a las autoridades.

Se solicita a los Estados Miembros que notifiquen de inmediato a la OMS los resultados de laboratorio inicialmente positivos aun antes de la finalización de todas las pruebas y la confirmación final. Los detalles de los análisis particulares efectuados deben incluirse en las notificaciones.

9. Referencias

1. Drosten C et al. Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Lancet* 2013; publicado en línea el 17 de junio. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70154-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70154-3)
2. Guery B et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet* 2013; publicado en línea el 29 de mayo. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60982-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60982-4)
3. Assiri A et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet* 2013; publicado en línea el 26 de julio. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70204-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70204-4)
4. Corman VM et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance* 2012; 17:20285
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>
5. Corman VM et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Eurosurveillance* 2012; 17:20334
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>
6. Van Boheemen S, et al. 2012. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio* 2012; publicado en línea el 20 de noviembre [10.1128/mBio.00473-12](http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00473-12)
7. Buchholz U et al. Contact investigation of a case of human coronavirus infection treated in a German hospital, October-November 2012. *Eurosurveillance* 2013; 18:20406
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20406>
8. Reusken C et al. Specific serology for emerging human coronaviruses by protein microarray. *Eurosurveillance* 2013; 18 20441.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20441>