

2. PROVES DIAGNÒSTIQUES *IN VITRO* PER A LA COVID-19

Glòria Soria Guerrero (1)

(1) *Especialista en Microbiologia i Parasitologia. Cap dels Laboratoris del Banc de Sang i Teixits. Barcelona.*

El diagnòstic de laboratori, ràpid i de qualitat, és un dels elements essencials en la cura dels pacients i el control de la malaltia per coronavirus 2019 (COVID-19), sempre que s'apliquin els procediments adequats de seguretat en la recollida, transport i anàlisi de les mostres per evitar el contagi (1).

1. Reacció en cadena per la polimerasa a temps real amb transcriptasa inversa (r-RT-PCR)

La prova recomanada per l'OMS pel diagnòstic d'infecció per SARS-CoV-2 és la detecció de l'ARN viral en mostres respiratòries per un mètode d'amplificació d'àcids nucleics, com la r-RT-PCR (2,3). El virus es detecta en mostres respiratòries 1 o 2 dies abans de l'inici dels símptomes i pot persistir més de 20 dies des de l'inici dels símptomes (4). També s'ha detectat en persones asimptomàtiques (5).

La reacció quantitativa (també anomenada a temps real) en cadena per la polimerasa amb transcriptasa inversa (r-RT-PCR) és una tècnica de laboratori que combina la transcripció inversa de l'ARN al seu ADN complementari i l'amplificació posterior de dianes específiques d'aquest ADN mitjançant la reacció en cadena per la polimerasa. La quantificació s'aconsegueix afegint a la barreja de reacció habitual de la PCR (encebadors específics, desoxiribonucleòtids, polimerasa termostable, motlle d'ADN) una sonda específica de la regió amplificada marcada amb un fluoròfor que emet fluorescència quan és excitat a la longitud d'ona apropiada. Això permet, en un termociclador dotat de sensors de fluorescència, mesurar la quantitat de producte amplificat a temps real, després de cada cicle d'amplificació, i estimar la quantitat d'ARN inicial.

La r-RT-PCR s'utilitza habitualment en laboratoris clínics i es disposa de sistemes automàtics d'elevada capacitat per quantificar l'ARN viral i així determinar la càrrega viral, per exemple del virus de l'hepatitis C. Per tant, adaptar aquesta tecnologia al diagnòstic del SARS-CoV-2 ha estat ràpid.

S'han descrit diverses estratègies diagnòstiques, desenvolupades als laboratoris o per la indústria del diagnòstic *in vitro*, tenint en compte que el coronavirus SARS-CoV-2 té un genoma idèntic en més d'un 80% al del SARS-CoV. Una de les primeres utilitzades (6) es basa en l'amplificació de dues regions del genoma: el gen E (que codifica la proteïna E de l'embolcall i és genèric pels sarbecovirus) i el gen RdRP (que codifica la RNA polimerasa RNA dependent i és específic del SARS-CoV-2). Altres dianes emprades són el gen N (nucleocàpsida) i S (espícula). L'assaig ha d'incloure controls positius, per demostrar la capacitat d'amplificació de la tècnica i l'absència d'inhibició, i controls negatius, per assegurar l'absència de contaminació. Els límits de detecció reportats són de 208 còpies/mL amb un 95% de probabilitat de detecció (6). Les càrregues virals en mostra respiratòria són de 5,2 log₁₀ còpies per mL en el moment del diagnòstic (4).

La Comissió Europea ha desenvolupat guies sobre el diagnòstic *in vitro* de COVID-19 i recomanacions de com validar el seu funcionament en termes de límit de detecció, especificitat, robustesa, precisió, sensibilitat i especificitat (24). La Fundació per nous diagnòstics innovadors (FIND) està realitzant la validació dels assajos disponibles (25).

La r-RT-PCR és d'una tècnica complexa, que triga al voltant de 2-3 hores, i requereix d'equipament i personal especialitzat. La capacitat de fer assaigs de r-RT-PCR per part del sistema sanitari ha estat insuficient davant l'elevada necessitat que ha generat la pandèmia, a causa de la combinació de falta de subministrament de suficient quantitat de reactius i falta de disponibilitat de suficients termocicladors i personal entrenat. Per fer front a aquestes dificultats, s'han proposat alternatives (3,7) com: 1) Amplificar només una diana enlloc de dues; 2) Escalfar la mostra enlloc de fer un procés d'extracció d'ARN i verificar amb un control intern basat en un gen humà que la quantitat d'ARN obtingut sigui suficient; 3) Fer proves amb barreges (pools) de mostres d'individus de baix risc i fer proves individuals si el pool ha resultat positiu; 4) Usar solució salina enlloc de medi de transport per virus.

En aquests moments la capacitat diagnòstica de laboratori enfront SARS-CoV-2 s'ha d'incrementar per poder fer front a la situació (8).

Però, més enllà de la saturació del sistema i de la dificultat logística d'arribar a tota la població que requereix diagnòstic, s'ha descrit una limitació de la r-RT-PCR: la seva baixa sensibilitat (38-89%) en la detecció de casos de COVID19, quan es compara amb l'exploració clínica i la radiografia de tòrax (9, 10, 17, 18). Per tant, un resultat negatiu en un pacient amb un quadre altament suggestiu no descarta COVID-19 (17). És ben coneguda l'elevada sensibilitat i especificitat analítica de la r-RT-PCR, però aquesta baixa sensibilitat en la pràctica pot tenir diverses causes (2): 1) L'ús de frotis nasofaríngis per major simplicitat de presa de mostra quan la màxima càrrega viral està en mostres d'esput o rentat broncoalveolar (16); 2) La presa de mostra massa aviat o massa tard després de l'inici de símptomes, o la incorrecta presa de mostra (23); 3) La mutació del virus que podria alterar la seva capacitat de ser amplificat pels encebadors utilitzats; 4) Els sistemes de transport de mostres o d'extracció que no preserven l'ARN de manera adequada o inhibeixen la PCR; 5) L'ús de mètodes analítics no suficientment validats degut a la pressió assistencial.

2. Amplificació isotèrmica

La r-RT-PCR requereix múltiples canvis de temperatura a cada cicle i s'ha de dur a terme en un termociclador. L'amplificació isotèrmica és una estratègia basada en amplificar a temperatura constant per tal d'eliminar el requeriment de termocicladors (19). Hi ha diversos mètodes d'amplificació isotèrmica.

Un d'ells és l'amplificació mediada per bucle i associada a transcriptasa inversa (RT-LAMP, *reverse transcription loop-mediated amplification*). L'amplificació es fa a una temperatura constant al voltant de 60°C i requereix dos o tres jocs d'encebadors, a banda de la polimerasa. La detecció del producte amplificat es pot fer per fluorimetria, fotometria o a simple vista. És la base d'algunes proves moleculars per a la detecció de patògens, com per exemple el virus de la grip (20). Mantenen l'elevada sensibilitat i especificitat de l'amplificació d'àcids nucleics però amb un procés més ràpid, econòmic i simple, de manera que es poden fer servir a prop del pacient. Recentment s'ha descrit un assaig basat en aquesta metodologia (21) que detecta SARS-CoV-2 en menys de 30 minuts.

L'amplificació mediada per transcripció (TMA) és una tecnologia (26) que amplifica regions específiques de DNA o RNA de manera molt més eficient que la r-RT-PCR i té una elevada capacitat (més de 1000 resultats diaris per analitzador). Ja s'estava utilitzant per detectar múltiples patògens, per exemple en el cribratge de donants de sang, i acaba de sortir al mercat la determinació de SARS-CoV-2. Utilitza una transcriptasa inversa retroviral i una RNA polimerasa del fag T7. Totes les reaccions

tenen lloc en el mateix tub. D'entrada es captura el RNA víric d'interès per hibridació amb una sonda unida a una partícula magnètica. A continuació, el RNA es retro-transcriu al seu cDNA complementari. L'activitat RNAsa de la transcriptasa inversa degrada el RNA deixant lliure la cadena de cDNA i es genera DNA de doble cadena. La RNA polimerasa de T7 transcriu múltiples amplicons de RNA, cadascun dels quals torna a entrar en el cicle de TMA, fet que permet una amplificació exponencial molt ràpida. La detecció es basa en sondes específiques, capaces d'emetre fluorescència quan han hibridat amb els amplicons de RNA.

3. Seqüenciació de l'ARN del virus

Les tècniques de seqüenciació, si bé estan disponibles en menys laboratoris, també tenen un paper important. Per una banda són molt més sensibles que la rRT-PCR: poden arribar a detectar 1-2 còpies del virus, fins i tot si la qualitat de l'ARN no és òptima (11). Per altra banda, tenen gran utilitat en la vigilància epidemiològica, per detectar les mutacions del virus que puguin afectar al tractament o a la capacitat d'amplificació de les rRT-PCR disponibles.

4. Detecció d'antigen

Degut als problemes esmentats anteriorment de limitacions d'infraestructura i restriccions de subministrament de reactius per fer r-RT-PCR, seria molt útil disposar de proves ràpides (10-15 minuts) basades en detecció d'antigen del virus per immunoassaig de flux lateral, que es puguin fer prop del pacient per personal no especialitzat, per cobrir les necessitats mèdiques i de salut pública (8).

S'han desenvolupat alguns sistemes d'aquest tipus però no estan encara del tot avaluats i no són els recomanats per fer el diagnòstic en el moment actual (2, 24). La limitació que tenen aquests assajos és la seva baixa sensibilitat, al voltant d'un 60% (12), quan es compara amb r-RT-PCR.

5. Detecció d'anticossos

La prova de neutralització per reducció de plaques (PRNT), que només pot dur-se a terme en laboratoris de virologia amb bioseguretat de nivell 3, és la tècnica de referència que permet determinar en quin grau els anticossos presents al sèrum són capaços de neutralitzar les partícules víriques i d'impedir la infecció cel·lular. El sèrum es barreja amb una suspensió viral i després es dispensa sobre un cultiu cel·lular. Al cap d'uns dies s'avalua el nombre de plaques (regions infectades) en el cultiu i es compara amb cultius control sense sèrum. Aquest assaig permet una mesura quantitativa de la capacitat de neutralització del sèrum però és lent i requereix infraestructures i personal especialitzat.

Els immunoassaigs amb tècnica ELISA que s'estan desenvolupant (25) mostren bona correlació amb PRNT (13, 22) i poden realitzar-se fàcilment en tots els laboratoris d'anàlisi clínics. Detecten anticossos (IgG, IgM, IgA o anticossos totals) contra antigens recombinants de l'espícula o de la nucleocàpsida. Una possible dificultat de les proves basades en la detecció d'anticossos és la reacció creuada amb altres coronavirus (22) i per això cal avaluar curosament l'especificitat dels assajos.

També s'han descrit proves ràpides per detectar anticossos en sang obtinguda de punció capil·lar, que es basen en immunoassaigs de flux lateral (14). Aquestes proves tenen l'avantatge de ser ràpides (10-15 minuts) i de no requerir equipament ni personal

especialitzat, però encara no estan completament avaluades i la seva sensibilitat és menor que la dels ELISA (24).

Els anticossos IgG i IgM no es detecten fins als 6-15 dies (13, 22, 23), després de l'inici dels símptomes i per tant la serologia té una utilitat limitada en el diagnòstic precoç de la COVID-19 (8). La seroconversió es detecta primer amb assajos d'anticossos totals, seguida per IgM i finalment IgG (23). A més, s'han descrit casos de pacients recuperats, confirmats per PCR, en els quals no es detectaven anticossos neutralitzants (13). Tot i això, la serologia pot ser útil en estudis retrospectius de pacients als quals no es va fer la r-RT-PCR o va resultar negativa, ja que també s'han descrit casos en què la serologia era positiva i la PCR negativa (14, 23). També s'ha suggerit que la combinació de la r-RT-PCR i la detecció d'anticossos millora la sensibilitat diagnòstica (23). A més, la seroconversió d'anticossos IgG o l'augment de quatre vegades el títol entre mostres corresponents a la fase aguda i a la de convallescència serien indicatives d'infecció aguda.

La serologia no és el mètode diagnòstic d'elecció però serà essencial en els estudis epidemiològics (8). Donat que la seroprevalença inicial en la població es considera negligible davant un nou coronavirus, els estudis serològics poblacionals són interessants per: 1) Tenir una estimació de la prevalença en la comunitat; 2) Conèixer la proporció de casos asimptomàtics; 3) Estimar el grau d'immunitat de la població i en concret dels treballadors sanitaris per poder guiar decisions durant el desescalament de les mesures de confinament; 4) Estudiar la durada de la immunitat en estudis longitudinals.

Per altra banda, s'està contemplant el tractament amb plasma amb anticossos anti SARS-CoV-2 de malalts recuperats de COVID-19 (15). La detecció d'anticossos és una tècnica essencial en la selecció dels donants d'aquest tipus de plasma.

6. Interpretació conjunta

La interpretació conjunta dels resultats de les diverses proves diagnòstiques es mostra en la següent taula extreta del document de la Comissió Europea (24).

Fase COVID-19	Detecció de RNA	Detecció d'Antigen	IgM	IgG
<i>Abans de la infecció</i>	negatiu	negatiu	negatiu	negatiu
<i>Primera fase de la infecció</i>	positiu	positiu (més tard que RNA)	negatiu	negatiu
<i>Segona fase de la infecció</i>	positiu	positiu	positiu	negatiu
<i>Última fase de la infecció</i>	positiu	positiu	positiu	positiu
<i>Després de la infecció</i>	negatiu	negatiu	positiu i després negatiu	positiu

La combinació dels resultats de diverses proves pot donar una imatge més clara de l'estat del pacient. Quan es detecta RNA, independentment dels símptomes, la persona està infectada, el virus s'està replicant en el seu cos i pot contagiar la infecció. La detecció d'anticossos indica que el sistema immune està reaccionant i desenvolupant immunitat, si bé encara no hi ha evidència sobre la durada i capacitat protectora d'aquesta immunitat.

7. QUESTIONS PER DISCUTIR SOBRE ELS MÈTODES DIAGNÒSTICS.

Agrairíem enviéssiu respostes o comentaris de les preguntes al següent correu: contacte@acclc.cat.

- 1) Quin algoritme diagnòstic s'aplicaria davant una sospita de COVID-19?
- 2) Quin algoritme s'aplicaria per conèixer el grau d'immunització de la població?

- (1) World Health Organization (WHO). Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19); Interim guidance 12 February 2020. Geneva: WHO; [11 March 2020].
- (2) World Health Organization (WHO). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: Interim guidance - 19 March 2020. Geneva: WHO; 2020 [11 March 2020].
- (3) World Health Organization (WHO). Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19; Interim guidance 21 March 2020 Geneva: WHO; [6 April 2020].
- (4) To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 23 March 2020. ([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1))
- (5) Mizumoto K et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(10):2000180.
- (6) Corman VM et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020;25 (3):2000045. 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- (7) European Commission (EC). COVID-19: EU recommendations for testing strategies. [6 April 2020].
- (8) European Center for Disease Control. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the EU/EEA and the UK – eighth Update. ECDC; [8 April 2020].
- (9) Liu, R et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta* 505: 172-175
- (10) Ai, T et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing in Coronavirus Disease 2019 in China *Radiology* 2020 Feb 26:200642
- (11) Li, C et al. High sensitivity detection of coronavirus SARS-CoV-2 using multiplex PCR and a multiplex-PCR-based metagenomic method. <https://doi.org/10.1101/2020.03.12.988246>doi. *BioRxiv*
- (12) COVID-19 Ag Respi-Strip. <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/Covid-19.php>
- (13) Wu F et al, Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.2004736>. *MedRxiv*
- (14) Li, Z. et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>
- (15) Duan K. et al. The feasibility of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients: a pilot study. *MedRxiv*. 16 March 2020. 20036145
- (16) Yu F. et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 28. doi: 10.1093/cid/ciaa345.
- (17) Kokkinakis, I. et al. Covid-19 diagnosis : clinical recommendations and performance of nasopharyngeal swab-PCR. *Rev Med Suisse*. 2020 Apr 8;16(689):699-701.
- (18) Kim H. et al. Diagnostic Performance of CT and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Coronavirus Disease 2019: A Meta-Analysis. *Radiology*. 2020 Apr 17:201343. doi: 10.1148/radiol.2020201343
- (19) Notomi, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28 (12): 63e–63. doi:10.1093/nar/28.12.e63.
- (20) Bell, J. Multicenter clinical evaluation of the novel Alere™ i Inﬂuenza A&B isothermal nucleic acid ampliﬁcation test. 2014. *J Clin Virology* 61:81-86, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.06.001>
- (21) Yan C. et al Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal ampliﬁcation assay. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Apr 7. pii: S1198-743X(20)30186-5. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001.
- (22) Okba NMA et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Speciﬁc Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis*. 2020 Apr 8;26(7). doi: 10.3201/eid2607.200841
- (23) Zhao J. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 28. pii: ciaa344. doi: 10.1093/cid/ciaa344.
- (24) European Commission (EC). Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria (16 April 2020). Brussels: EC; [21 April, 2020]. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805>.
- (25) FIND. SARS-COV-2 MOLECULAR ASSAY EVALUATION: RESULTS 2020 [22 April, 2020]. Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>.
- (26) *ACS Cent. Sci.* 2020, 6, 5, 591-605 American Chemical Society Publication Date: April 30, 2020 <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>