

INMUNODIAGNÓSTICO PARA SARS-CoV-2

Eva Blanco de Orozco

Coordinadora

Comisión de Investigación y Desarrollo

Mayo de 2020



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

Contenido

1. Fundamentación teórica.
 - 1.1 Respuesta Inmune Vs Enfermedad.
 - 1.2 Inmunoensayos.
 - 1.3 Inmunoprecipitación.
2. Consideraciones para la selección de pruebas.
3. Consideraciones para cada una de las fases del procesamiento de pruebas en el Laboratorio Clínico.
4. Conclusiones.



SISTEMA INMUNITARIO VS. ENFERMEDAD



Imagen tomada de Google

¿Cuál es la explicación para que algunas personas estando en contacto con los agentes causales de enfermedad, no la desarrollan?



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

RESPUESTA INMUNE

El sistema inmunitario evolucionó bajo la presión selectiva impuesta por los agentes patógenos.

Es el resultado de las interacciones de órganos, células y moléculas del sistema inmune frente al agresor.

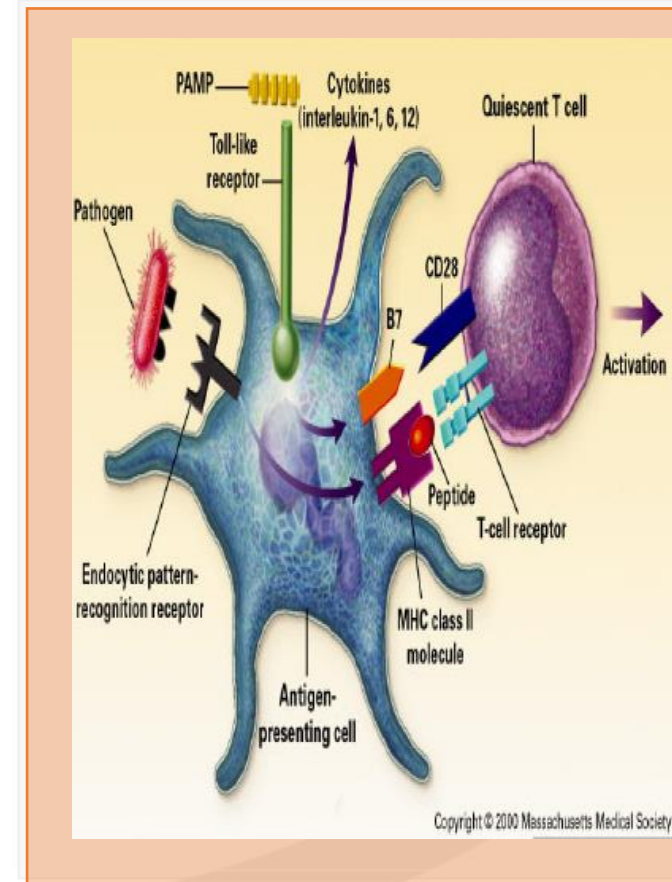
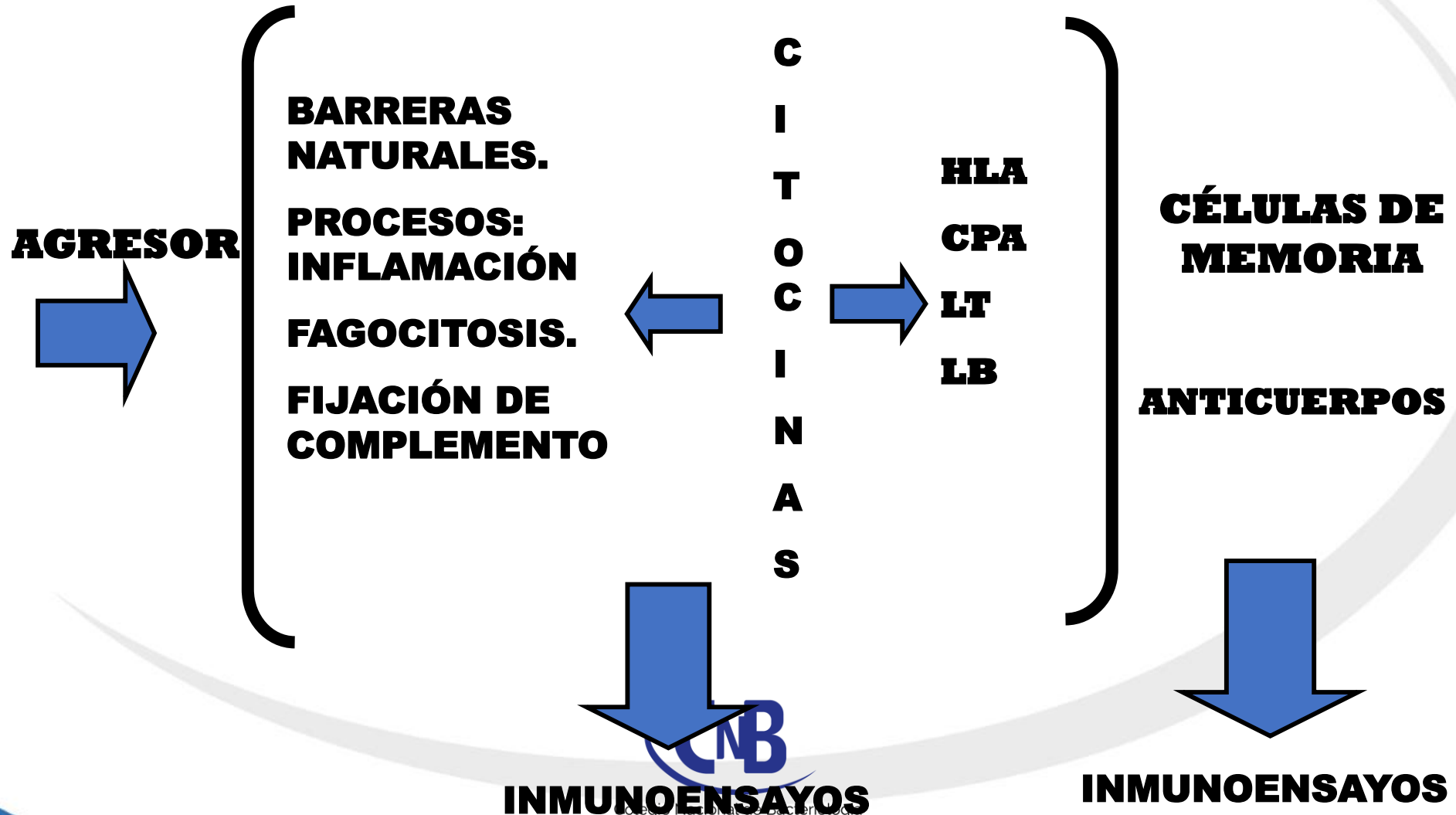


Imagen tomada de Google



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

RESPUESTA INMUNE



INMUNOENSAYOS

INMUNOENSAYOS

RESPUESTA INMUNE

TIENE DOS MOMENTOS:

1. El inmediato, al contacto con el agresor, llamada respuesta innata.
2. Uno posterior al contacto, en donde se requiere aprender acerca del agresor y que se denomina adaptativa o específica.

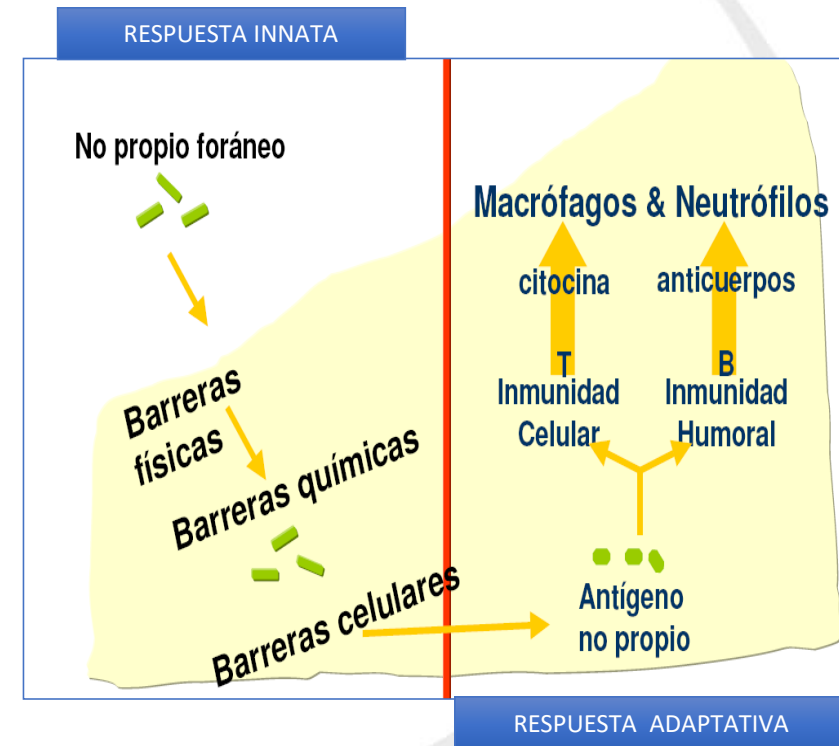


Imagen tomada de Google



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

RESPUESTA INMUNE

En los dos momentos de la respuesta inmunitaria, la detección de anticuerpos difiere, debido a que está en relación con la clase de inmunoglobulina que se sintetiza, en concordancia con la fase de la enfermedad:

ENTRE EL DÍA 0 A 10: IgM

ENTRE EL DÍA 7 A 15: IgG



RESPUESTA DE ANTICUERPOS Y PERIODOS DE LA ENFERMEDAD

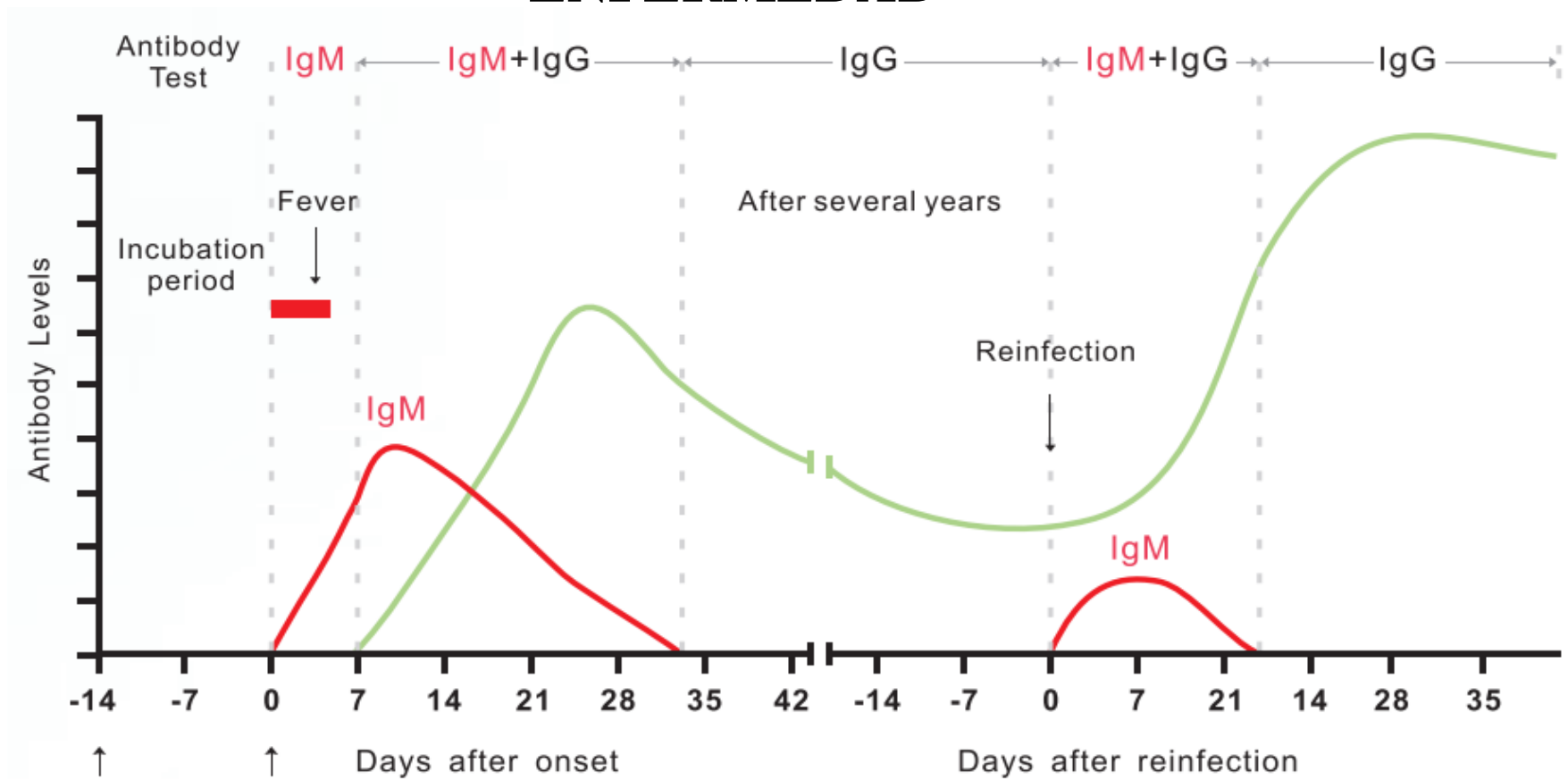


Imagen tomada de BIOGEN en Google



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia



Imagen tomada de Google

INMUNOENSAYOS



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

DEFINICIÓN DE INMUNODIAGNÓSTICO, INMUNOANÁLISIS O INMUNOENSAYOS

Son pruebas de laboratorio fundamentadas en la reacción antígeno-anticuerpo, que permiten hoy día hacer pronóstico, diagnóstico, seguimiento al tratamiento y rehabilitación, de enfermedades autoinmunes, endocrinas, infecciosas, marcadores tumorales y cardíacos, fertilidad, control de drogas de abuso, entre otras.



JUSTIFICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS

- Detectar enfermedades en etapa subclínica.
- Confirmar diagnóstico sospechado clínicamente.
- Diferenciar enfermedades con similares presentación clínica.
- Predecir el pronóstico de una enfermedad.
- vigilar el tratamiento.
- Precisar factores de riesgo.
- Apoyar actividades de promoción y mantenimiento de la salud.
- Detectar y confirmar alteraciones de los mecanismos de respuesta inmune.



EN ÚLTIMAS Y EN ESENCIA

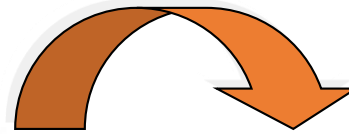


Imagen tomada de Google

**EL MÉDICO ENVIA AL PACIENTE
AL LABORATORIO PORQUE
NECESITA
INFORMACIÓN, PARA TOMAR
DECISIONES ADECUADAS.**



BONDADES DE LOS INMUNOENSAYOS

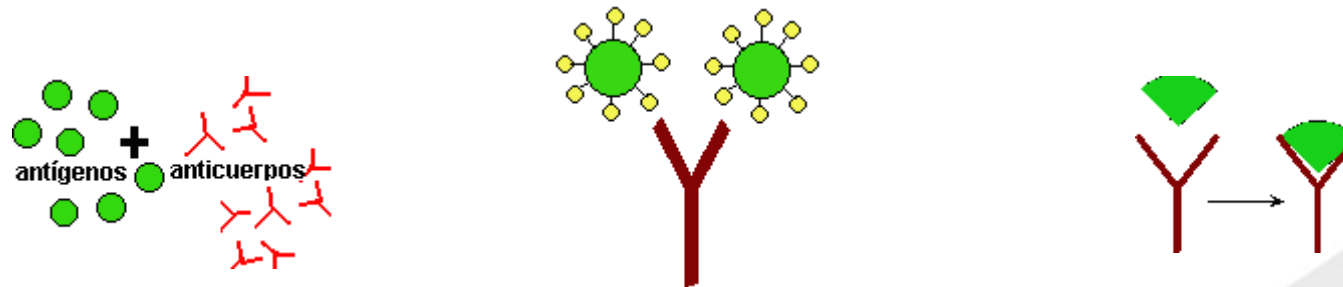
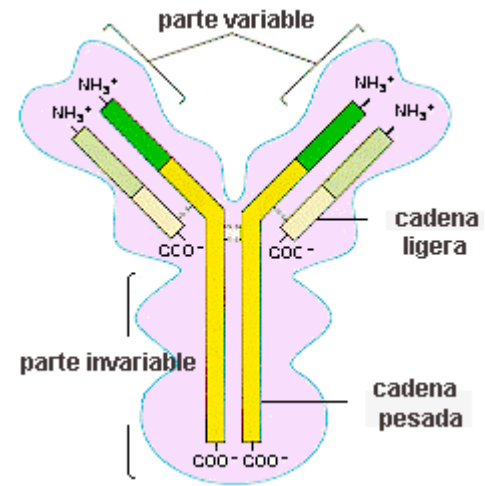
- ➡ Especificidad.
- ➡ Sensibilidad.
- ➡ Precisión.
- ➡ Rapidez.
- ➡ Versatilidad.
- ➡ Con la última generación: control de calidad en tiempo real; manejo de muestras pediátricas; autodilución; software amigable con ayuda permanente y tutorial en línea; amplio menú disponible; reactivos de excelente calidad y con consumo mínimo; manos libres.



ETAPAS DE LA REACCIÓN

1. UNIÓN DEL ANTIGENO CON EL ANTICUERPO POR INTERACCIÓN FÍSICO-QUÍMICA ENTRE LAS MOLECULAS.

2. VISUALIZACIÓN DE LA UNIÓN.



PRINCIPIO DEL INMUNOENSAYO

ANTÍGENO + ANTICUERPO



REACCIÓN VISIBLE



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

FACTORES QUE INCIDEN

INTRÍSECOS O INMODIFICABLES

- **Edad-Raza- Género.**
- **Altitud.**
- **Embarazo.**
- **Ciclos biológicos- Cronobiología.**
- **Fase de la enfermedad.**
- **Memoria inmunológica.**
- **Manipulación del sistema inmune:
Inmunosupresión, vacunación,
Inmunización pasiva,
inmunopotencialización.**



Imagen tomada de Google



FACTORES QUE INCIDEN

EXTRÍNSECOS O MODIFICABLES

- **Temperatura.**
- **pH.**
- **Concentración de electrolitos.**
- **Carga Eléctrica.**
- **Agitación.**
- **Tiempo.**
- **Proporción antígeno-anticuerpo.**



Imagen propia



CLASIFICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS CON BASE EN LA SEGUNDA ETAPA DE LA REACCIÓN

- **REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN O INMUNOPRECIPITACIÓN**

Medio Líquido: Floculación

Medio Sólido Celulosa:

Inmunoprecipitación o Inmunocromatografía. (Pruebas Rápidas).

Medio Sólido Agarosa:

Inmunodifusión, IDR, Electroinmunodifusión, Inmunoelectroferesis, Contrainmunoelectroforesis.

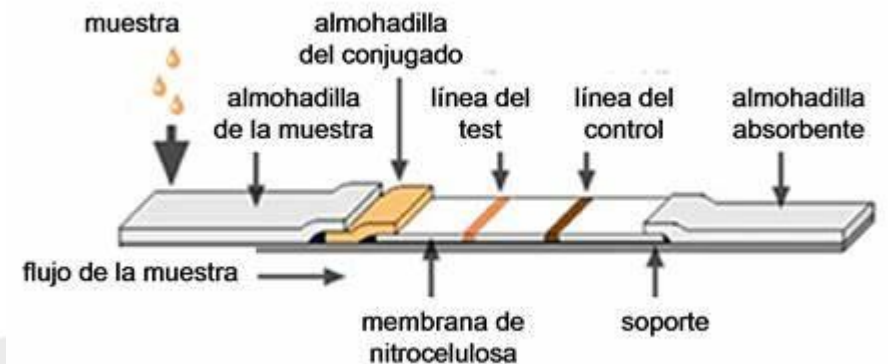
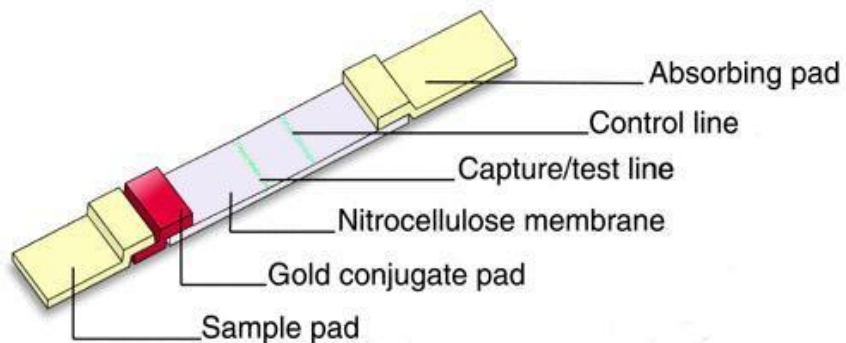


INMUNOCROMATOGRAFÍA

FUNDAMENTO

Para el caso de las pruebas para COVID-19, hay dos sistemas reaccionantes antígeno-anticuerpo. El primero lo conforman los posibles anticuerpos presentes en el suero del paciente y el antígeno recombinante de proteína N y proteína S más oro coloidal. El segundo corresponde a los anti-anticuerpos cuyo propósito es capturar el inmunocomplejo anticuerpos del paciente + proteínas virales, para formar la banda de precipitación, cuando hay presencia de anticuerpos en la muestra del paciente.

Lateral Flow Immunochromatographic Device



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

Imágenes tomadas de google

**CONSIDERACIONES
FUNDAMENTALES
PARA LA CONFIABILIDAD
DE LOS RESULTADOS
EN EL LABORATORIO
CLÍNICO**



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

SELECCIÓN DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

APLICABILIDAD:

OPORTUNIDAD.

COSTO.

SEGURIDAD.

COMPLEJIDAD.

CONFIABILIDAD:

SENSIBILIDAD.

ESPECIFICIDAD.

EXACTITUD.

PRECISIÓN.



ESPECIFICIDAD

- Capacidad de la prueba de detectar y cuantificar el mensurando en estudio sin dar falsos positivos.
- Proporción de individuos sanos, que son identificados correctamente por la prueba.

- Son útiles para confirmar un diagnóstico sugerido por otras pruebas.
- La especificidad hace que casi no se obtengan resultados positivos, cuando la enfermedad está ausente.



SENSIBILIDAD

➤ **Capacidad de la prueba de detectar concentraciones mínimas de un mensurando.**

➤ **Proporción de individuos con la enfermedad que son identificados correctamente por la prueba.**

☛ **Es usualmente positivo en presencia de la enfermedad, aún en etapas tempranas.**

☛ **No debe dejar por fuera de la detección ningún positivo.**

☛ **Son útiles cuando la probabilidad de la enfermedad es baja y el fin es descubrirla.**



RECOMENDACIONES PARA OFERTAR EL SERVICIO DE PRUEBAS RÁPIDAS PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL SARS-CoV-2

1. Para la selección y compra, debe exigir al proveedor que le facilite la siguiente información:
 - Certificado INVIMA. Verifique información disponible en: <https://www.invima.gov.co/autorizaciones-de-fabricación-e-importación-para-vitales-no-disponibles>
 - Certificado de un organismo internacional como FDA (USA), AEMPS (España) o del país donde se diseñó la prueba.
2. Hacer lectura reflexiva de los Lineamientos para el uso de pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2 en Colombia. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos%20y%20procedimientos/GIPS21.pdf>.
3. Para los kits fabricados en China, Delgado (2020), recomienda que la fecha de fabricación debe ser posterior al 3 de abril, porque China exigió nuevos requisitos de calidad para las pruebas rápidas para COVID-19 fabricadas en su país.



RECOMENDACIONES PARA OFERTAR EL SERVICIO DE PRUEBAS RÁPIDAS PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL SARS-CoV-2

3. Verifique que el producto esté relacionado en el listado de la OMS disponible en https://www.who.int/diagnostics_laboratory/200324_imdrf_covid19_listing_update_24_march_2020.pdf.

4. Al leer el inserto chequee la información relacionada con las características de rendimiento de la prueba:

- N estadístico de validación.
- Sensibilidad, especificidad y sus intervalos de confianza.
- Tasas de coincidencia positivas y negativa con la prueba Gold Estandar.
- Coeficientes de probabilidad positivos y negativos.
- Reacciones Cruzadas.
- Umbrales de sustancias interferentes (lipemia, BRB, hemólisis).
- Fundamento del diseño y origen de los anticuerpos de captura que se utilizan.



FASE PRE-ANALÍTICA

- La muestra ideal es suero libre de hemólisis, lipemia e ictericia. Se deben tomar 5 cc de sangre en tubo seco cumpliendo con todas los requisitos de calidad y bioseguridad. Almacenar el suero para comparación posterior con una segunda muestra para análisis de comportamiento de la respuesta inmune o para fines de investigación epidemiológica.
- Si va a trabajar con plasma, todos los desarrolladores de las pruebas recomiendan tomar la muestra en tubo que contenga como anticoagulante EDTA o citrato de sodio.



FASE PRE-ANALÍTICA

- La muestra de sangre total ofrece la posibilidad de ser aun más rápida, porque no hay necesidad de centrifugar para obtener el suero o el plasma; sin embargo, se debe ser muy cuidadoso porque en el caso de que el buffer no cumpla con una buena separación de los eritrocitos, el color rojo de estos, puede dificultar la lectura de la prueba y dar datos errados. Recuerde que las bandas de precipitación que se visualizan en el control y el test son de color morado-rojizo.
- Se debe diligenciar la ficha 346 del Registro al Sistema de Datos del SIVIGILA.
- Se debe obtener el consentimiento informado.
- Se recomienda guardar bajo custodia no solo la muestra, sino toda la información registrada del paciente.
- Para ingresar el paciente al laboratorio puede usar la ficha que le presentamos a continuación; la información allí consignada es útil para la validación del resultado, su interpretación y en un futuro próximo para posibles investigaciones epidemiológicas.



FICHA DE INGRESO AL LABORATORIO CLÍNICO

La Información solicitada en la ficha es con el fin de correlacionar los resultados, teniendo en cuenta los factores intrínsecos que pueden estar afectando los datos.

DATOS PERSONALES		
Fecha:	Hora:	EPS:
Nombres:	Apellidos:	Género:
Edad:	Número de cédula:	Dirección:
Barrio:	Número de personas que habitan en su casa:	
Contacto con personas que hayan regresado del extranjero. SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Número de días en que ha presentado los síntomas: <input type="checkbox"/>		
Posible causa de contagio:		
Vacunas que ha recibido:		
Recibe Medicamento Interferón	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Es asmática	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Recibe droga inmunosupresora	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Recibe inmunoterapia de potencialización	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Medicamentos que ha tomado (tanto de medicina alternativa como de la occidental)		
Observaciones (aquí se puede ampliar información que tanto el paciente como el bacteriólogo quieren adicionar).		

Condiciones de las Muestras para los análisis de sangre



Seguridad

Homogeneidad



Preservación

Cadena de frío



Sin cambios físicos, químicos, ni contaminación microbológica.



FASE ANALÍTICA

1. Revise el empaque individual en el que viene la prueba, para verificar que el transporte y almacenamiento hayan sido en optimas condiciones, como lo establece el fabricante.
2. Verifique los números de los lotes del kit con los números de cada prueba o empaque individual.
3. Debe disponer de superficie plana porque así lo requiere la prueba de inmunoprecipitación para que el desplazamiento de las moléculas sea el ideal.
4. Realice la verificación de la técnica mediante sueros positivos provenientes de pacientes, que dieron positivos para la prueba molecular; y negativos históricos de su seroteca o simplemente solución salina estéril.



FASE ANALÍTICA

5. Cumpla estrictamente con las cantidades indicadas para colocar en el pozo marcado como muestra (el kit trae su dispensador de la muestra).
6. Se debe seguir estrictamente las indicaciones del inserto, en el tiempo requerido para realizar la lectura y poder observar las bandas de precipitación.
7. Cumpla con las instrucciones del inserto para lectura y determinar si es positivo, negativo o un resultado no valido. Las bandas de precipitación deben ser nítidas.



FASE POST-ANALÍTICA

1. Recuerde que si la banda de precipitación del control no se observa, la prueba se invalida. **NO SE PUEDE REPORTAR.** Se debe volver a montar la prueba.
2. Si aparece la banda de precipitación en el control y en IgM, indica que la prueba es positiva para anticuerpos clase IgM; la interpretación clínica posible, es que el paciente estuvo expuesto al virus, su sistema inmune está respondiendo y está en la fase aguda de la enfermedad, o periodo clínico.
3. Si aparece la banda de precipitación en el control y en IgG indica la prueba es positiva para anticuerpos anti SARS-CoV-2 clase IgG; la interpretación clínica posible es que el paciente estuvo expuesto al virus, cursó o cursa el final de la enfermedad, pudiendo estar en fase de convalecencia o de recuperación y será necesario con base en la historia clínica determinar si queda en observación domiciliaria.



FASE POST-ANALÍTICA

4. A toda prueba rápida positiva, se le debe hacer la prueba de Biología Molecular que se basa en una técnica de amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rRT-PCR), que detecta secuencias únicas del ARN viral.
5. Los anticuerpos heterófilos interfieren en los resultados de la prueba.
6. Se pueden presentar reacciones cruzadas con otros virus de IRA y también con autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes. De ahí la importancia de registrar la información, en la ficha de ingreso al laboratorio del paciente y de leer cuidadosamente los insertos, para revisar si los paneles de virus y otros patógenos, que utilizaron en la validación corresponden a los que recomendó la OMS.



Las dos posibilidades que ofrecen las pruebas rápidas, que hay en el mercado



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

CONCLUYENDO

- Las pruebas rápidas también conocidas como POCT, son pruebas de diagnóstico indirecto, es decir van a evaluar la respuesta inmunológica del paciente frente a los agresores. Su positividad indican que el paciente estuvo en contacto con el agresor y ha desarrollado anticuerpos. **No son confirmatorias.**
- Un resultado negativo con datos sugestivo de contacto de riesgo, amerita hacer prueba confirmatoria.



CONCLUYENDO (2)

- Los factores tanto intrínsecos como extrínsecos obligan al laboratorio a ser muy cuidadosos con todas las fases del procesamiento de la muestra.
- Lo sencillo de la prueba exige un mayor control y aplicación de los fundamentos teóricos por parte del bacteriólogo, por ello es este el único profesional que debe realizar las pruebas.
- Los hallazgos deben ser interpretados por el bacteriólogo y el equipo interdisciplinario que está dando apoyo a las secretarías de salud y LSP. De lo contrario se creará mucha confusión y se tomarán conductas inadecuadas.



CONCLUYENDO (3)

- La prueba diagnóstica avalada por la OMS, no es comercial; es una prueba *in-house* basada en el protocolo desarrollado por el hospital Charité de Berlín, Alemania.
- Los Laboratorios de Salud Pública como cabeza de la Red en el Departamento y directos delegados del INS, son los idóneos para dar la información sobre las pruebas que están avaladas para realizar los laboratorios clínicos.
- El CNB COLOMBIA, está trabajando articuladamente con el INS y ha sido llamado como organismo consultor en varios requerimientos que ha solicitado el MSPS y otras instituciones de salud.



CONCLUYENDO (4)

- Criterios para seleccionar las pruebas rápidas que se implementarán:
 1. Especificidad mayor de 95%
 2. Sensibilidad mayor de 85%
 3. La prueba debe permitir identificar Ig M e IgG de manera independiente. Este criterio es fundamental para poder correlacionar los hallazgos de laboratorio con la clínica del paciente, porque el hecho que aparezca banda de precipitación en el control y en IgM está sugiriendo que la infección está en curso.



CONCLUYENDO (5)

- La autorización por parte del INVIMA y el Ministerio de Salud para las pruebas rápidas, sólo indica que han autorizado su importación, pero todas las casas comerciales deberán lograr la validación de sus productos por autoridad competente, para poder ofertarlo a los laboratorios clínicos, ya sean públicos o privados, como lo establece la norma.
- Asegúrese que lo que le ofrecen, cumple con todos los requisitos de calidad y control sanitario.



Referencias Bibliográficas

Abbas, A., Litchman, A., Pillai, S. (2012). INMUNOLOGÍA celular y molecular. Madrid: Elsevier Saunders.

Delgado, G. (2020). Recomendaciones para la selección de pruebas serológicas (Pruebas rápidas de la detección de anticuerpos anti-SARS-Cov-2, COVID-19).

Garzón, A. (2020). Recomendaciones para el aseguramiento de la calidad. Disponible en www.cnb.colombia.org.

INVIMA. Disponible en <https://www.invima.gov.co/autorizaciones-de-fabricación-e-importación-para-vitales-no-disponibles>

MSPS, 2020. Lineamientos para el uso de pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2 en Colombia. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos%20y%20procedimientos/GIPS21.pdf>.



MUCHAS GRACIAS

Cúidense cumplan con todas las normas de
bioseguridad

Ánimo Dios con nosotros

evablanca2807@gmail.com



Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia