

Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el coronavirus del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV)¹

23 de diciembre de 2022

Contexto y consideraciones generales

Los coronavirus son un grupo de virus ARN altamente diversos de la familia *Coronaviridae* que se dividen en 4 géneros: alfa, beta, gamma y delta, y que causan enfermedades de leves a graves en humanos y animales (1-3). Existen coronavirus humanos endémicos como los alfacoronavirus 229E y NL63 y los betacoronavirus OC43 y HKU1 que pueden causar enfermedades de tipo influenza o neumonía en humanos. Sin embargo, tres betacoronavirus zoonóticos que pueden causar enfermedad severa en humanos han emergido: el coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), el coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el virus de COVID-19 (SARS-CoV-2).

El virus MERS-CoV fue detectado por primera vez en el 2012 y desde entonces se han reportado más de 2,600 casos confirmados en 27 países, la mayoría correspondiendo a casos identificados en Arabia Saudí. La información, actualizada mensualmente, de los casos de MERS se puede encontrar en: <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>. Según la situación a diciembre de 2022, la OMS no recomienda imponer restricciones a los viajes ni al comercio, ni cribados de entrada en relación con el MERS-CoV (2). Sin embargo, la OPS/OMS recomienda, en todos los Estados Miembros, el fortalecimiento de la vigilancia de las infecciones respiratorias agudas incluyendo el MERS-CoV y la investigación detallada de eventos o patrones inusuales.

Los síntomas típicos del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) son fiebre, tos y dificultad respiratoria. La neumonía es frecuente, pero los pacientes con MERS no siempre desarrollan esta afección. También se han notificado síntomas gastrointestinales entre los pacientes con MERS, como la diarrea. Hasta un 35% de los casos de pacientes notificados a la OMS han fallecido (2).

En pacientes con síntomas típicos, un antecedente de viaje en países afectados, de contacto directo o indirecto con dromedarios (inclusive el consumo de sus productos crudos o poco cocinados) o de visita a una instalación de salud en los 2–14 días antecedentes al inicio de las síntomas debe instar a los trabajadores de salud en sospechar una infección por MERS-CoV, a evaluar y de ser necesario reforzar a las medidas de prevención y control de infecciones, y a iniciar la toma de muestra y respuesta según las pautas nacionales. Sin embargo, la confirmación de un caso sospechoso de infección con el MERS-CoV sólo puede ser realizada mediante pruebas de laboratorio. Otros patógenos respiratorios virales (incluyendo, pero no limitado a influenza, Virus Sincitial Respiratorio, SARS-CoV-2 y otros coronavirus) y bacterianos (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Legionella pneumophila*) deben ser igualmente considerados dentro del algoritmo diagnóstico.

¹ Las siguientes recomendaciones han sido adaptadas a partir del documento de la OMS: Laboratory testing for Middle East respiratory syndrome coronavirus – revised (1) y están sujetas a modificaciones posteriores en función de los avances en el conocimiento sobre la enfermedad y el agente etiológico.

Frente a un paciente sospechoso o confirmado de MERS, es esencial que el personal y las autoridades de salud tomen oportunamente medidas de prevención y control de infecciones indicadas para el entorno de atención en salud (3). Si bien la transmisión zoonótica del MERS-CoV por contacto directo o indirecto con dromedarios infectados ha sido la más frecuente, la transmisión de persona a persona es posible y ha conllevado a extensos brotes en establecimientos de salud de Arabia Saudí, los Emiratos Árabes Unidos y la República de Corea (2). Por ejemplo, la transmisión que se originó de un paciente procedente de la península arábiga causó en 2015 en la República de Corea un extenso brote en el cual se infectaron 186 personas (39 fallecidos) en 16 establecimientos de salud (4, 5). Más del 80% de los casos se vincularon epidemiológicamente a cinco eventos de superpropagación (“superspreading events”) en establecimientos de salud. Orientaciones actualizadas en octubre de 2019 sobre la prevención y control de infecciones durante la atención sanitaria de casos probables o confirmados de infección por MERS-CoV se pueden encontrar en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/187922> (3). Fuera de los entornos de atención en salud, no se ha documentado una transmisión sostenida de persona a persona en ningún lugar del mundo.

La OPS publica estas Directrices consciente que las capacidades nacionales de seguimiento y confirmación por laboratorio es un elemento esencial en una investigación y respuesta a casos sospechosos de MERS. El contexto y las consideraciones generales reportadas en esta sección destacan a la vez la necesidad de enmarcar las acciones de laboratorio en una respuesta multidisciplinaria e integrada. La OMS actualiza en permanencia una caja de herramienta que recopila productos e instrumentos para la gestión de brotes de MERS y se puede encontrar en <https://www.who.int/emergencies/outbreak-toolkit/disease-outbreak-toolboxes/mers-outbreak-toolbox> (6).

Toma de muestras y envío adecuado

Toma de muestras

Las muestras deben ser tomadas por personal capacitado y teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad, incluyendo el uso de los equipos de protección personal adecuados para las precauciones estándar, de contacto y de transmisión aérea. En particular, el personal debe hacer estricto uso de la higiene de manos, bata, respirador (N95 o FFP2), protección para los ojos (gafas) o faciales (protector facial), y guantes.

Muestras respiratorias

Si bien la probabilidad de detección es alta durante los primeros 7 días tras el inicio de síntomas, el material genético viral ha sido detectado en muestras del tracto respiratorio inferior hasta 14 días después del inicio del cuadro agudo.

Dado que la carga viral más alta ha sido demostrada en el tracto respiratorio inferior, las muestras recomendadas incluyen esputo, lavado broncoalveolar y aspirado traqueal (cuando sea posible, principalmente en pacientes hospitalizados y según criterio médico). Sin embargo, las muestras del tracto respiratorio superior también son útiles para el diagnóstico, cuando aquellas del tracto inferior no estén disponibles. Para el muestreo del tracto respiratorio superior, se recomienda en general tomar un hisopado nasofaríngeo combinado con un hisopado orofaríngeo (los hisopos deben ser transportados en el mismo tubo con medio de transporte viral).

Aunque no se recomienda el muestreo de contactos asintomáticos en forma rutinaria, si se considera necesario de acuerdo con las guías nacionales, las muestras del tracto respiratorio superior (hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos) se prefieren para la toma.

En general, se deben usar hisopos flocados hechos con materiales sintéticos (incluyendo nylon, Dacron o poliéster); se deben evitar los hisopos de algodón. Los protocolos para la producción casera de medios de transporte viral están disponibles previa solicitud a la OPS (laboratoryresponse@paho.org). Además, si el medio de transporte no está disponible, podría usarse solución salina estéril o solución estabilizadora de ácidos nucleicos (p. ej., *DNA/RNA shield*) (ver abajo para consideraciones de transporte de muestra).

Muestras de suero

Las muestras de suero para determinación de anticuerpos pueden ser tomadas para complementar el diagnóstico y eventualmente como parte de los procesos de vigilancia (ver sección *Pruebas serológicas*). Sin embargo, se debe asegurar la toma de muestras pareadas con al menos una semana de diferencia entre la primera (tomada en fase aguda) y la segunda. Una muestra única podría tener valor diagnóstico sólo si ha sido tomada como mínimo 14 días después de iniciados los síntomas.

Envío de muestras

Las muestras respiratorias deben ser conservadas en refrigeración (4-8 °C) y enviadas al laboratorio donde serán procesadas dentro de las primeras 24-72 horas después de la toma. Si no se pueden enviar las muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -70 °C (o menos) hasta que se envíen (garantizando que se mantenga la cadena de frío).

El envío de muestras sospechosas debe cumplir con las reglamentaciones nacionales y utilizar, como mínimo, un sistema de triple empaque básico (7). Además, los envíos a laboratorios de referencia o centros colaboradores fuera del país deben cumplir con todas las normas internacionales para **Sustancias Biológicas de Categoría B** (7).

Ensayos de laboratorio

Bioseguridad

Las muestras deben ser procesadas y manipuladas únicamente por profesionales entrenados después de una evaluación local del riesgo considerando todas las indicaciones de bioseguridad y equipo de protección personal apropiado para virus respiratorios en general, y para MERS-CoV en particular (1, 8). El aislamiento o cultivo viral no se recomienda para diagnóstico rutinario y solo debería ser realizado en instalaciones con un nivel de contención (BSL) 3 o 4.

Métodos moleculares

La confirmación rutinaria de los casos de MERS se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real con confirmación por secuenciación nucleotídica cuando sea necesario, y según disponibilidad (ver *Algoritmo para detección molecular*).

Extracción de ARN

El ARN se puede extraer de las muestras mencionadas anteriormente utilizando cualquier protocolo estándar o estuche de extracción. Adicionalmente, las muestras de esputo requieren una etapa de licuefacción antes de la extracción de ARN. En general, la etapa de lisis de la muestra en la extracción de ARN inactiva los virus que puedan estar presentes. En el caso de MERS-CoV, la inactivación se ha verificado para algunos protocolos y estuches comerciales (9). Por lo tanto, las muestras después de la lisis se consideran generalmente como no infecciosas.

Algoritmo para detección molecular de MERS-CoV

La confirmación de un caso de infección por MERS-CoV se basa en:

- la detección por RT-PCR de al menos dos regiones del genoma, o
- la amplificación de un blanco genético seguido de secuenciación nucleotídica de un segmento genético diferente.

Existen tres protocolos publicados para la detección molecular de MERS-CoV. Las pruebas actualmente descritas son un ensayo dirigido la región adyacente (*upstream* en inglés) al gen de la proteína E (upE) (10) y ensayos dirigidos al marco de lectura abierto 1b (ORF 1b) (10) y al marco de lectura abierto 1a (ORF 1a) (11). El ensayo upE se considera altamente sensible y se recomienda para el tamizaje. El ensayo ORF 1a se considera igualmente sensible al ensayo upE mientras que el ensayo ORF 1b se considera menos sensible. Los ensayos ORF 1a o ORF 1b se puede usar para confirmación (Figura 1).

También se ha descrito un algoritmo alternativo que incluye dos ensayos de RT-PCR dirigidos al gen de la proteína de la nucleocápside (N2 y N3) del MERS-CoV. El ensayo N2 se puede para tamizaje junto con el ensayo upE, mientras que el ensayo N3 se puede usar para confirmación (12, 13). Hasta la fecha, estos ensayos de RT-PCR no han mostrado reactividad cruzada con otros virus respiratorios, incluidos los demás coronavirus humanos, y han sido apropiados para detectar todas las cepas conocidas de MERS-CoV tanto en humanos como en dromedarios y camélidos.

Se han publicado varios métodos para la secuenciación del MERS-CoV (11).

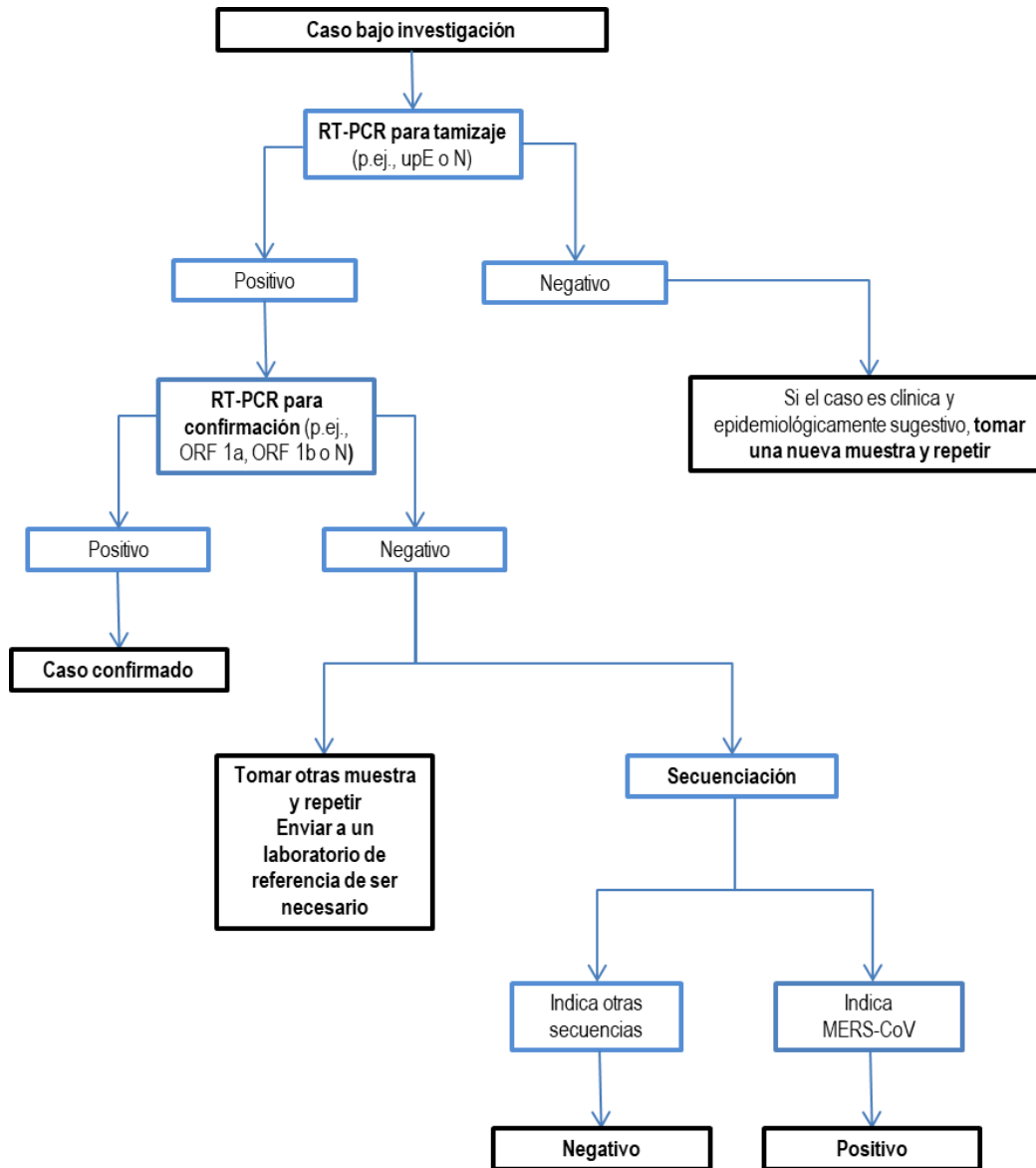


Figura 1. Algoritmo de laboratorio para casos bajo investigación para MERS. Adaptado del algoritmo de la OMS (1).

Pruebas serológicas para determinación de anticuerpos

Diferentes pruebas y plataformas han sido desarrolladas y publicadas para la detección de anticuerpos dirigidos a MERS-CoV, incluyendo ELISA, inmunofluorescencia (IF), microarreglos de proteínas y neutralización. Sin embargo, las pruebas serológicas requieren de una cuidadosa interpretación y su realización se indica sólo bajo tres circunstancias:

1) Para definir un caso de MERS-CoV que debe ser reportado bajo el Reglamento Sanitario Internacional:

Si no es posible acceder a métodos moleculares, un caso puede ser **confirmado** por serología, únicamente si se tiene evidencia de **seroconversión** en muestras pareadas usando una prueba de tamizaje (p. ej., ELISA, IF) y que esta se confirma con una prueba específica de neutralización. Las muestras pareadas consisten en una muestra tomada durante de fase aguda y una segunda muestra tomada al menos 14 días después de la primera. Para la confirmación se requiere evidencia de aumento de los títulos de anticuerpos neutralizantes de 4 veces o más.

El paciente sintomático con una muestra única con un resultado positivo en pruebas de tamizaje y de neutralización se considera **probable** (o sospechoso, dependiendo de las definiciones de caso del sistema de vigilancia).

2) Como parte de la investigación de un brote:

Cuando se realizan investigaciones de brotes o contactos de casos confirmados de MERS, la serología puede proporcionar información útil adicional. Se recomienda recolectar muestras de suero de los contactos lo antes posible después del contacto y recolectar una segunda muestra de suero 3 a 4 semanas después del último contacto. Los sueros pueden analizarse mediante una prueba serológica de tamizaje (p. ej., ELISA o IF) y los resultados positivos de la detección necesitan confirmación con pruebas de neutralización. En caso sintomáticos, también se deben recolectar muestras respiratorias apropiadas para pruebas moleculares.

3) Para encuestas serológicas en una población o investigaciones de exposición previa:

Por lo general, en las encuestas serológicas sólo se cuenta con una muestra única por persona. Por esto, la interpretación será la misma que para los contactos asintomáticos de los casos mencionados anteriormente. Es decir, un resultado positivo con una prueba de tamizaje (p. ej., ELISA o IF) más un resultado positivo en un ensayo de neutralización indica un caso probable. Con una sola muestra no es posible determinar el momento de la infección.

Reactivos

OPS/OMS recomienda la implementación de los protocolos de referencia descritos en la sección *Algoritmo para detección molecular de MERS-CoV*. Ya que los iniciadores y sondas para las pruebas de referencia de RT-PCR para MERS-CoV se encuentran publicados (10-13) los laboratorios pueden solicitar la síntesis a sus proveedores respectivos. Los controles positivos para los ensayos de RT-PCR específicos de upE y ORF 1a se pueden solicitar en el portal del Archivo Europeo de Virus: <https://www.european-virus-archive.com/search/node/MERS-CoV>.

Varios estuches comerciales para detección de MERS-CoV por RT-PCR se encuentran disponibles. **OPS/OMS no recomienda el uso de ningún producto en particular y exhorta a los países y laboratorios a realizar sus propias verificaciones/validaciones para la selección de estuches comerciales de acuerdo a sus circunstancias y pertinencia.**

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Laboratory testing for Middle East respiratory syndrome coronavirus – revised. Interim guidance (revised). 15 January 2018. Ginebra: OMS; 2018. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-259952> [solamente disponible en inglés a la fecha de publicación de estas directrices]
2. Organización Mundial de la Salud. Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). 5 de agosto de 2022. Ginebra, OMS; 2022. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))
3. Organización Mundial de la Salud. Prevención y control de infecciones durante la atención sanitaria de casos probables o confirmados de infección por el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). Updated October 2019. Ginebra, OMS; 2019 Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/174652> [la actualización de octubre 2019 no está disponible en español a la fecha de publicación de estas directrices]
4. Korea Centers for Disease Control and Prevention. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus outbreak in the Republic of Korea, 2015. *Osong Public Health Res Perspect.* 2015; 6(4): 269–278. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588443/>
5. Cho SY, Kang JM, Ha YE, Park GE, Lee JY, Ko JH, Lee JY, Kim JM, Kang CI, Jo IJ, Ryu JG, Choi JR, Kim S, Huh HJ, Ki CS, Kang ES, Peck KR, Dhong HJ, Song JH, Chung DR, Kim YJ. MERS-CoV outbreak following a single patient exposure in an emergency room in South Korea: an epidemiological outbreak study. *Lancet.* 2016; 388(10048):994–1001. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159268/>
6. Organización Mundial de la Salud. Middle East Respiratory Syndrome Outbreak Toolbox. Updated July 2022. Ginebra, OMS; 2022. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/outbreak-toolkit/disease-outbreak-toolboxes/mers-outbreak-toolbox> [solamente disponible en inglés a la fecha de publicación de estas directrices]
7. Organización Mundial de la Salud. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022 applicable as from 1 January 2021. 25 February 2021. Ginebra: OMS; 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720> [la actualización del 2021 no está disponible en español a la fecha de publicación de estas directrices]
8. Organización Mundial de la Salud. Laboratory biosafety manual, 4th edition. 21 December 2020. Ginebra: OMS; 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311> [la cuarta edición no está disponible en español a la fecha de publicación de estas directrices]
9. Kumar *et al.* Inactivation and safety testing of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol Methods.* 2015; 223: 13-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4555185/>
10. Corman *et al.* Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance* 2012; 17:20285. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>
11. Corman *et al.* Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Eurosurveillance.* 2012; 17:20334. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>
12. Lu *et al.* Real-time reverse transcription-PCR assay panel for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 2014 52(1): 67-75. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911421/>
13. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE. UU. Novel Coronavirus 2012 Real-Time RT-PCR Assay. Atlanta: CDC; 2014. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/85951/download>