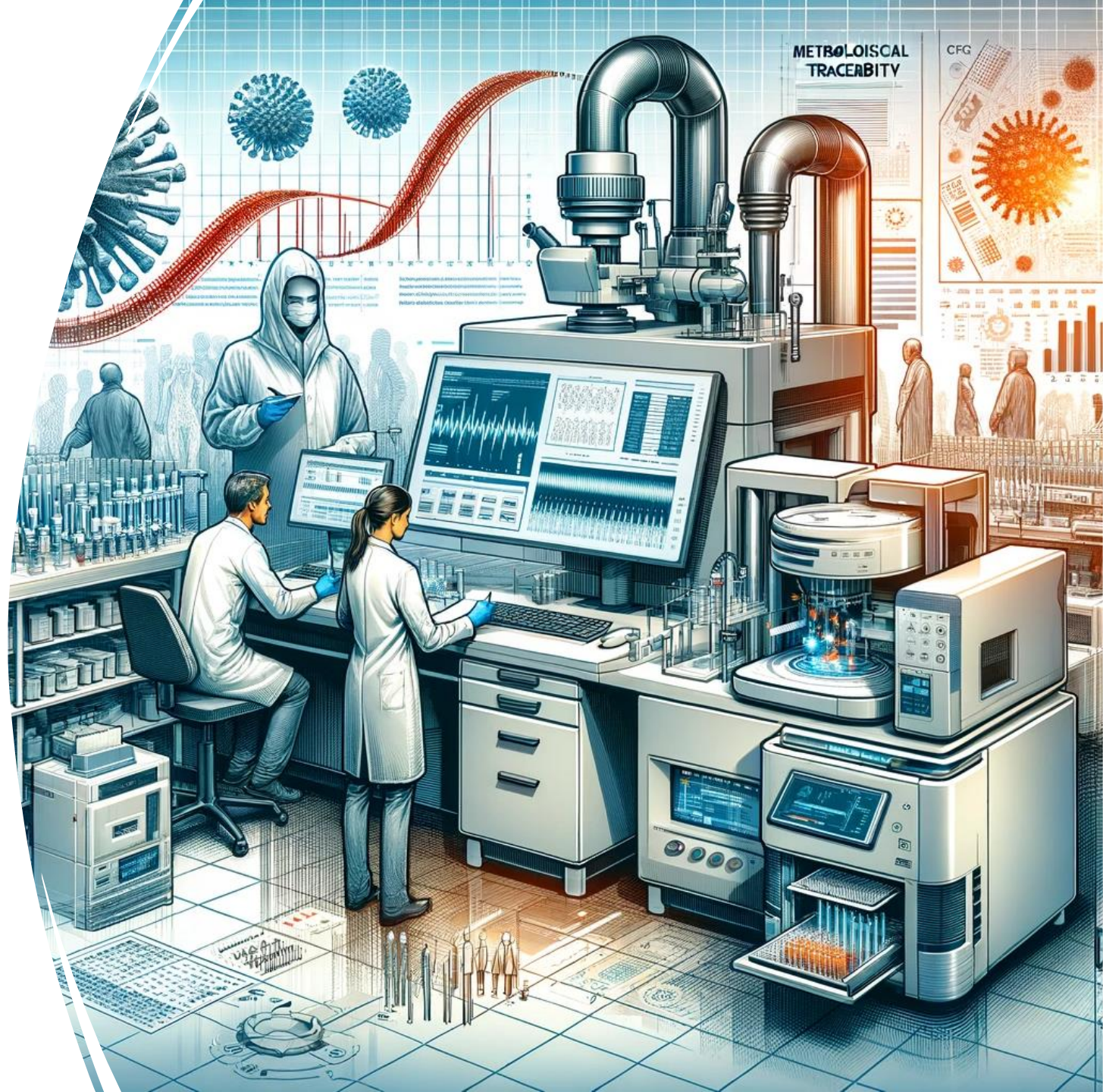


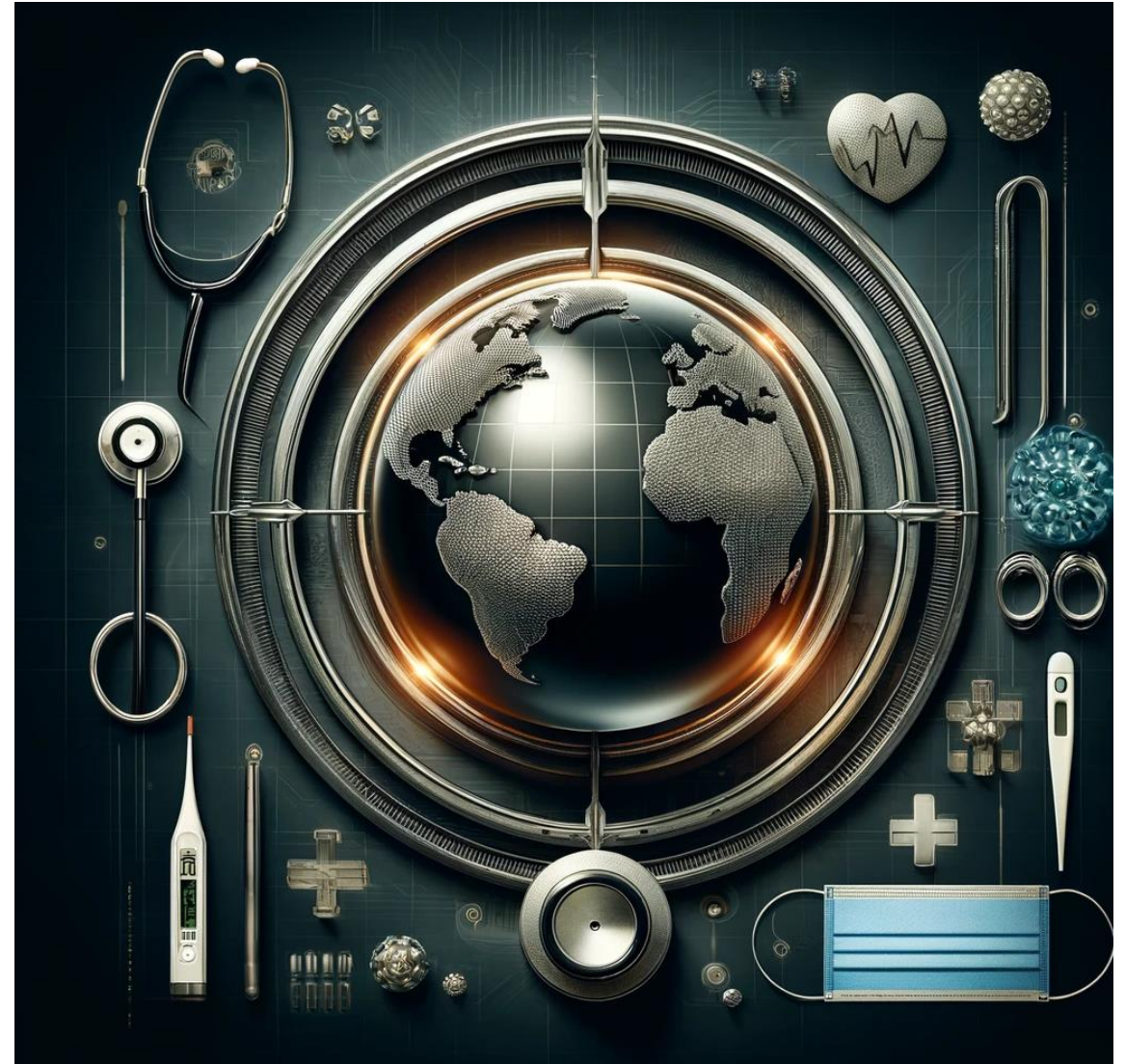
Metrología en la Era de COVID-19: Desafíos y Avances en la Detección desde el Laboratorio Clínico"

Dr. Jorge Hernández



PANDEMIA POR COVID-19

1. Adopción de la tecnología mRNA
2. Implementación de Dx. rápido y a gran escala
3. Expansión masiva de la telemedicina y salud digital
4. Automatización y uso de robótica en laboratorios
5. Colaboración y compartición de datos a nivel internacional
6. Inversión en investigación de enfermedades infecciosas
7. Uso extendido de tecnologías NGS
8. Refuerzo en la capacitación y desarrollo profesional en áreas relacionadas con enfermedades infecciosas

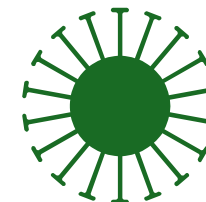
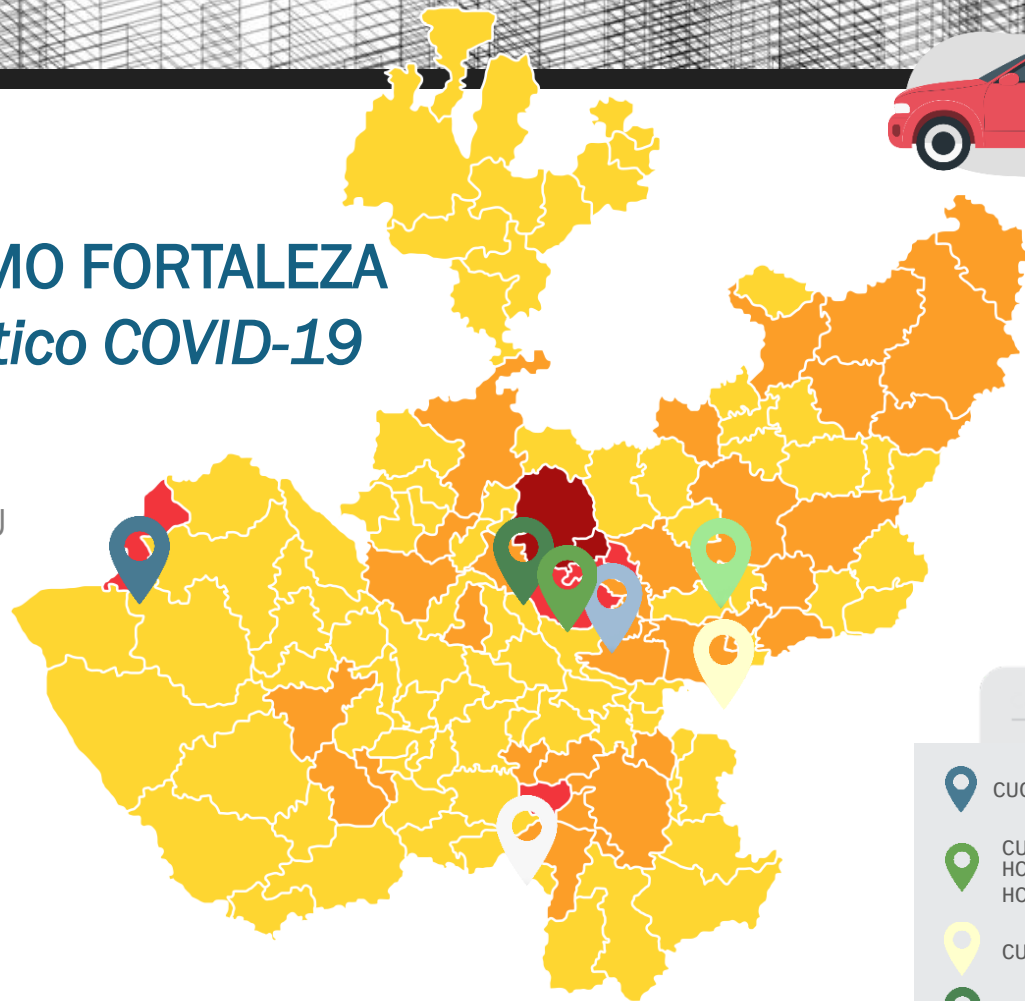


UNIVERSIDADES COMO FORTALEZA

Sistema de diagnóstico COVID-19

Expansión del
diagnóstico
molecular a los CU
del interior del
Estado de Jalisco

10
Laboratorios de
diagnóstico
molecular

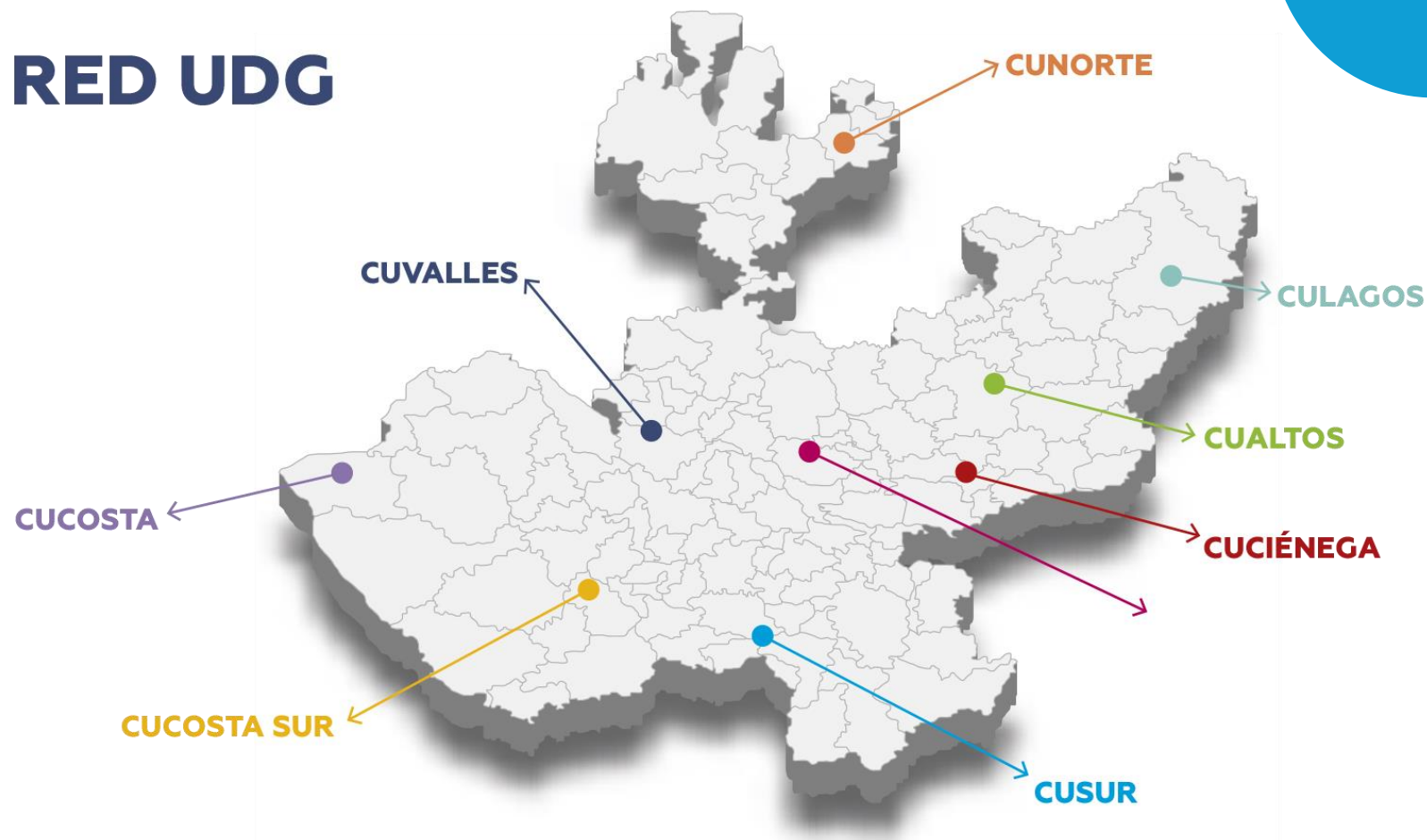


 CUCosta	 CUSur
 CUCS HCG - FAA HCG - JIM	 CUTonala
 CUCienega	 CUAltos
 CUCEI - ITRANS	 CUNorte

UNIVERSIDADES COMO FORTALEZA

Sistema de Vacunación

RED UDG



Más de
1.5 millones de
dosis aplicadas

PRUEBAS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19

COVID-19 Diagnostics In Context

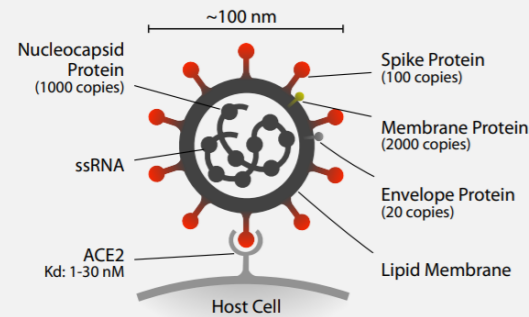
Ralph Weissleder, Hakho Lee, Jina Ko, Mikael J. Pittet

For updated version see [here](#)
Version v1.501 (12/22/2020)

[Science Transl Med. 2020; 12:eabc1931](#)



Viral composition



Clinical factors



Timing

- **Incubation:** ~5d after exposure (range 2-14d)
- **Symptoms:** ~12d after exposure (range 8-16d, or never)
- **Infectiousness:** before onset of symptoms
- **Seroconversion:** ~5-10d after symptom onset
- **Diagnosis of infection:** typically after onset of symptoms

Viral Concentrations ***

- Nasal (10^{6-9} RNA/swab)
- Throat (10^{4-8} RNA/swab)
- Sputum (10^{6-11} RNA/mL)
- Stool (10^{4-8} RNA/g)
- Blood (low levels)
- Urine (not detectable?)

Variables Affecting Disease Severity **

- Sex ($\delta > \text{♀}$)
- Age (Old > Young)
- Cardiovascular diseases, cancer, respiratory diseases, diabetes, others

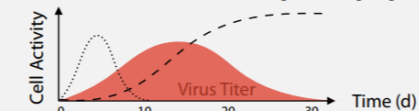
Impact

- Confirmed cases, outcomes, simulators, others: [JHU Covid Center](#); [MGH Simulator](#); [Our World In Data](#); [DIVOC](#)

Immune responses & outcomes

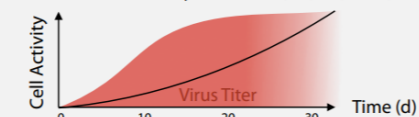
Good outcome ***

- Innate immune cells, type I interferon, others
- - - Adaptive immune cells (T cells, B cells and associated immunoglobulins [IgM, IgG, IgA])



Bad outcome ***

- Inflammatory cells (monocytes, neutrophils) and cytokine storm (IL-1, IL-6, TNF- α , others)



Performance comparison of different test types

For chance of infection at different pretest probabilities see [here](#)

FDA cleared tests:

Total	261	FDA-EUA NAT	175	LDT-EUA NAT	17	FDA-EUA Prot	69
-------	-----	-------------	-----	-------------	----	--------------	----

<https://csb.mgh.harvard.edu/covid>

PRUEBAS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19

Intended Use	Methods	Description	Operating Temperature	Analytical Sensitivity	Specificity	Assay time	Ref.
•Detecting viral RNA (N, E, Orf1ab) •COVID-19 molecular diagnostics, particularly at early stage	RT-qPCR	•Regular PCR •Gold standard	Thermal cycling	0.14 copy/μL	96%–100%	2–4 h	(Corman et al., 2020)
	ddPCR	•Droplet digital PCR •Highest sensitivity	Thermal cycling	0.02 copy/μL	94.9%	1 h	(Suo et al., 2020)
	RT-LAMP	•Isothermal •>4 pairs of primers	60°C–65°C	4.8 copy/μL	99%	15–60 min	(Zhang et al., 2020b)
	RT-RPA	•Isothermal •Using recombinase	37°C–42°C	0.2 copy/μL	NA	30 min	(Xia and Chen, 2020)
	RT-NEAR	•Isothermal •Using nicking endonuclease	55°C–59°C	0.13 copy/μL	100%	<15 min	(Abbott, 2020)
	DETECTR	•RT-LAMP (amplification) •CRISPR/Cas12 (detection)	62°C for RT-LAMP 37°C for LbCas12a	10 copy/μL	PPV: 95% NPV: 100%	30 min	(Broughton et al., 2020)
	STOP	•RT-LAMP (amplification) •CRISPR/Cas12 (detection)	60°C for RT-LAMP 60°C for AapCas12b	2 copy/μL	100%	70 min	(Joung et al., 2020)
•Detecting viral antigens •Potential for patient triaging	ELISA	•Immunoassay for virus •Lower sensitivity than PCR	Ambient	100 pg/mL	99.3%	3–5 h	(Freeman et al., 2020)
•Detecting antibodies developed by hosts •Applications in immunity check and serosurvey	RDT	•Immunoassay for IgG and IgM •Lateral flow device	Ambient	Qualitative	84.2%–100%	<15 min	(Liu et al., 2020c)
	ELISA	•Micro-well plate •Fluorescent or chromogenic	Ambient	100 pg/mL	67%–98.6%	3–5 h	(SinoBiological, 2020)
	Neutralization test	•Detecting active antibodies •Checking seroconversion	Ambient	0.22 copy/μL	100%	2–3 days	(Tan et al., 2020)



Evolución de la Medicina de Laboratorio

- **Organizacional:** Consolidación con la formación de redes de laboratorios automatizados e integrados.
- **Metodológica:** Enfoque sistemático para estudiar AN, proteínas y metabolitos intermedios.
- **Cultural:** Multidisciplinariedad, **Big Data**, Ciencias **ÓMICAS**.

Ejemplo de reto en cuantificación de AN

01



En área de seguridad de alimentos, los laboratorios de referencia nacionales y los laboratorios de control oficial en la Unión Europea utilizan métodos validados comunes para determinar la fracción de masa de los OGM en las muestras.



02

Diferencias de hasta 5-10 veces entre los resultados de los laboratorios



03

Esquemas de Evaluación de Calidad Externa, los resultados de los laboratorios participantes pueden variar en más de 100 veces.

Importancia de la Metrología

- Soluciones más precisas y de alto rendimiento, pero con **necesidad de Estandarización.**
- Rutas hacia la trazabilidad y las fuentes de incertidumbre a veces se pasan por alto en estas áreas aplicadas.
- Desconocimiento de la metrología como ciencia y su alcance en la mejora de la investigación básica y aplicada.



Normalización, trazabilidad y desafíos científicos

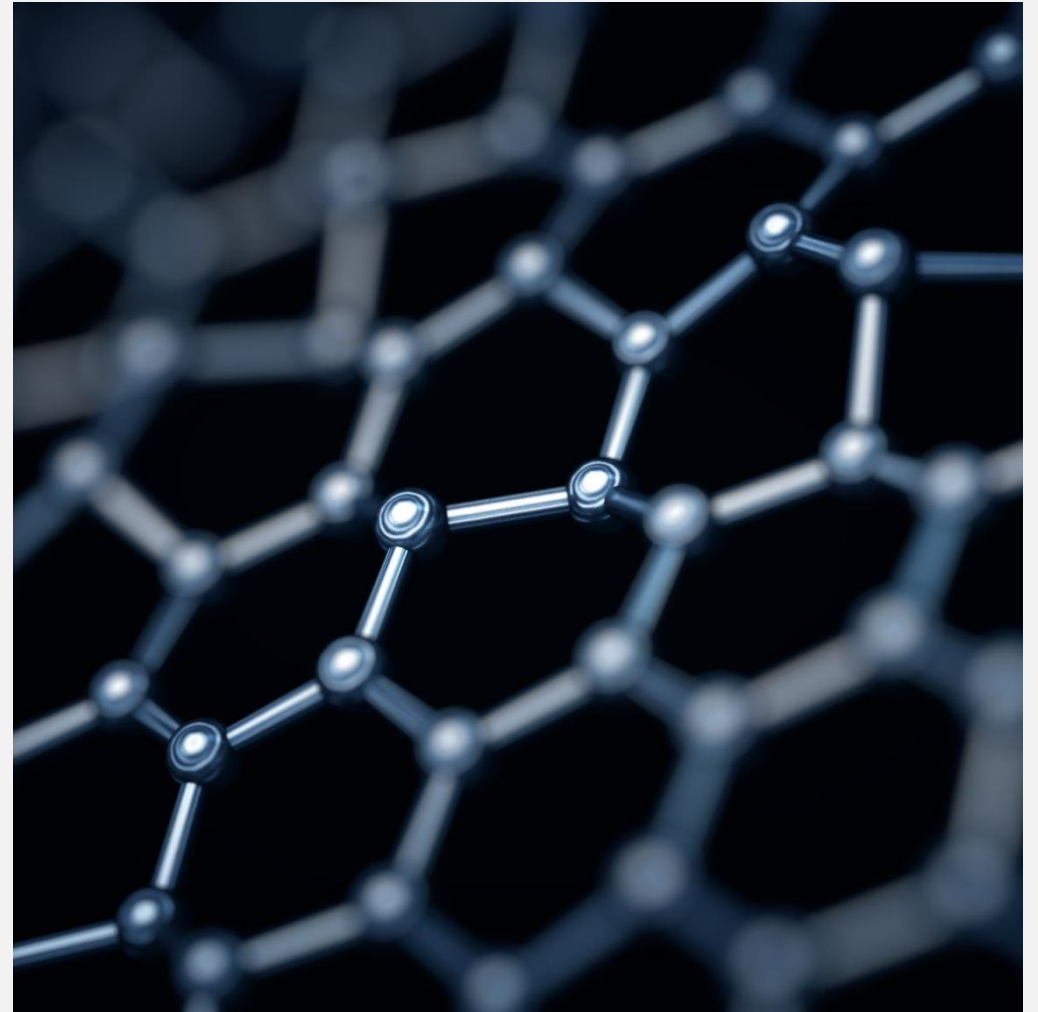
Implementación de análisis interlaboratorios para proporcionar evidencia de la validez y equivalencia internacional de los servicios de medición de ácidos nucleicos.

Detección de errores aleatorios y sistémicos

Especificaciones de desempeño analítico

Variabilidad biológica/estabilidad

Análisis de secuencias (nominales): La Colaboración Internacional de Bases de Datos de Secuencias de Nucleótidos (INSDC)-GenBank procura su estandarización



Laboratorio podrían ayudar a caracterizar mejor las fuentes de error de secuencia

Abreviatura	Descripción Corta
APMP	Programa de Metrología de Asia-Pacífico , es un grupo de Institutos Nacionales de Metrología (NMIs) de la región Asia-Pacífico dedicados a mejorar la capacidad metrológica regional a través del intercambio de experiencia y servicios técnicos entre los laboratorios miembros.
EMRP	Programa Europeo de Investigación en Metrología (2009-2013), permitió a los institutos de metrología europeos, organizaciones industriales y académicas colaborar en proyectos de investigación conjuntos dentro de campos especificados: industria, energía, ambiente, salud, nuevas tecnologías y unidades SI.
ERCC	El objetivo del Consorcio de Controles Externos de ARN es construir las herramientas de aseguramiento de la medición necesarias para apoyar mediciones reproducibles de expresión génica. Los socios del ERCC de la industria, gobierno y academia desarrollan controles de ARN y establecen métodos analíticos para llevar mediciones reproducibles de expresión génica a la práctica rutinaria de alta calidad.
	Grupo de Trabajo de Análisis de Ácidos Nucleicos del CCQM, dedicado a mejorar la comparabilidad global y la trazabilidad

Organismos internacionales relevantes de metrología y de normalización/armonización, asociaciones, organizaciones, consorcios y programas.

Abreviatura	Descripción Corta
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio , es una organización mundial no política para la química clínica y la medicina de laboratorio. Como tal, tiene una serie de roles que incluyen (1) establecimiento de estándares globales en colaboración con otras organizaciones internacionales, (2) apoyo a sus miembros a través de esfuerzos científicos y educativos, y (3) ofrecimiento de congresos, conferencias y reuniones enfocadas para que los especialistas en medicina de laboratorio se encuentren y presenten hallazgos originales y mejores prácticas.
ISO	Organización Internacional de Normalización , es una organización internacional independiente y no gubernamental que desarrolla y publica estándares internacionales.
JCTLM	Comité Conjunto para la Trazabilidad en Medicina de Laboratorio , es un consorcio internacional que promueve la estandarización global de los resultados de los exámenes de laboratorio clínico y proporciona información sobre materiales de referencia, métodos de medición de referencia y servicios disponibles en todo el mundo.
SoGAT	Estándar de Técnicas de Amplificación del Genoma , es un grupo de trabajo internacional dedicado a la estandarización de pruebas basadas en la

Organismos y organizaciones de normalización/armonización

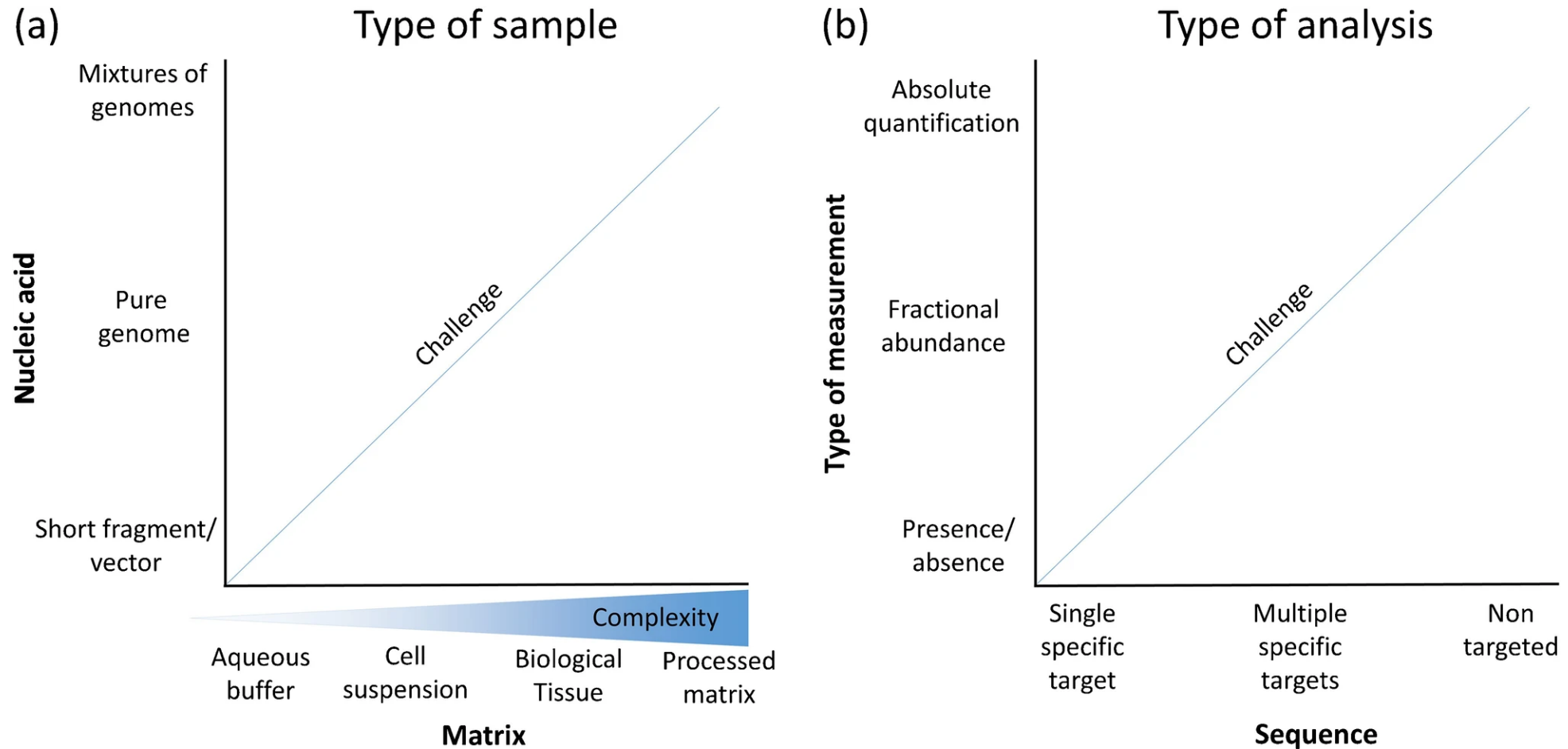
NAWG - CCQM: Planificación estratégica



- Grupo de Trabajo de Análisis de Ácidos Nucleicos (NAWG) del Comité Consultivo para la Cantidad de Sustancia: Metrología en Química y Biología (CCQM).
- Planeación 2021-2030
- Recomendamos que los laboratorios nacionales **colaboren con uniones científicas internacionales y organizaciones** para establecer una **infraestructura de medición internacional** adecuada que asegure la trazabilidad al SI en estas mediciones

Desafíos de metrología en AN

Complejidad del ácido nucleico (secuencia, tamaño, estructura secundaria, etc.)



El tipo más simple de mediciones sería la detección de la presencia o ausencia de un plásmido en una solución tamponada. Una medición mucho más compleja sería la identificación de todas las especies de ácidos nucleicos en una matriz de alimentos procesados, junto con la abundancia de cada una.

Contribución a la Incertidumbre

- **Pasos de Preparación:** Las mediciones pueden requerir pasos adicionales como:
 - **Purificación**
 - **Digestión de Ácidos Nucleicos**
 - **Adaptadores**
 - **Modificación (bisulfito)**
 - **Transcripción Inversa**
 - **Extracción (Purificación)**





Perspectivas

- Se requiere más grupos de trabajo nacionales e internacionales similares al NAWG con más énfasis a Dx.
- Necesidad de enfoques a otros sectores como la biotecnología industrial, CRISPR CAS-9; monitoreo de la biodiversidad ambiental.
- El apoyo metrológico a métodos "no dirigidos" es escaso.

CONCLUSIONES

La metrología analítica en materia de AN es necesaria para:

1. Aumentar la **precisión de la investigación** y, por ende, nuestro **entendimiento** de los sistemas biológicos que estudiamos
2. Traslación de hallazgos a pruebas robustas y reproducibles
3. Confianza de usuarios

Necesaria mayor vinculación entre Institutos nacionales de metrología, organismos internacionales, grupos de trabajo, universidades y usuarios





¡Gracias!

Dr. Jorge Hernández Bello
Jorge.hernandezbello@cucs.udg.mx

