

INFORME SOBRE ESTRATEGIA DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DEL COVID-19 (Actualización)

Madrid 19 de abril de 2020

Estrategia diagnóstica actual. La técnica de PCR

El diagnóstico microbiológico del COVID-19 se ha basado hasta ahora en todo el mundo, en la detección del material genético (**ARN**) **viral del SARS-CoV-2** mediante técnicas de **PCR** (siglas de Reacción en Cadena de la Polimerasa), en muestras respiratorias (**exudado nasofaríngeo** principalmente) de pacientes con síntomas compatibles (*Procedimiento de actuación frente a la enfermedad por SARS-CoV-2. Ministerio de Sanidad*). La PCR es una técnica muy sensible y específica, que se realiza en los laboratorios de microbiología para el diagnóstico de muchas infecciones (*Documento de posicionamiento de la SEIMC sobre el diagnóstico microbiológico de COVID-19*). Por estos motivos, **actualmente la PCR es la técnica diagnóstica de referencia**.

Según los datos recopilados en las últimas semanas, los hospitales y centros sanitarios españoles están realizando al menos **15.000 PCRs al día** desde el comienzo de la pandemia. Según los datos recopilados y notificados al Ministerio de Sanidad por las CCAA, en la semana del 23 al 29 de marzo se hicieron entre **22.000-25.000 PCRs diarias** en los hospitales españoles, cifra que se mantuvo en la semana del 30 de marzo. Las compañías de diagnóstico están distribuyendo semanalmente más de 300.000 reacciones de PCR en los centros sanitarios españoles desde el 20 de marzo de 2020. Tras el aumento de capacidades de los centros sanitarios españoles, las últimas cifras recogidas (semana 13-19 abril) indican que en España se realizan todos los días **entre 30.000 y 50.000 PCRs**.

El número de determinaciones diarias **no implica que se analicen todos esos nuevos casos** sospechosos cada día, ya que también se incluyen PCRs de seguimiento, de alta de enfermos y repeticiones por resultados no concluyentes.

La realización de un número tan elevado de determinaciones conlleva la necesidad de **suministrar de manera continuada no sólo los kits de PCR**, sino otros muchos materiales necesarios como **torundas** y medios de transporte para la toma de muestras, soluciones de inactivación, reactivos de **extracción** y diferentes tipos de material **plástico**. Las determinaciones analíticas con PCR tienen que ser realizadas por personal experimentado y suelen necesitar varias horas hasta obtener resultados.

No obstante, se están tomando medidas para poder **aumentar estas capacidades** de análisis de muestras por PCR. Estas medidas son:

1. **Validación clínica de kits de PCR** comerciales desarrollados por empresas **españolas**. Hasta la fecha se han validado kits de cuatro compañías españolas (GENOMICA, VIRCELL, CERTEST y GENETIC PCR SOLUTIONS) y se ha localizado otra empresa española con una técnica ya validada (PROGENIE MOLECULAR). Estas empresas están produciendo 80.000 reacciones de PCR semanales y sus capacidades máximas se calculan en 675.000 reacciones semanales. Además hay kits de otras compañías españolas en fases finales de diseño que serán validados por el ISCIII en próximas semanas.

2. Validación clínica de **reactivos de extracción** de empresas españolas (empresas VIRCELL, CANVAX y MASTER DIAGNOSTICA en proceso de validación en el ISCIII).
3. Desarrollo de procedimientos de PCR que ahorren pasos en el procesamiento de muestras, **evitando el paso de la extracción** de ácidos nucleicos. No se han obtenido resultados satisfactorios con ninguno de los protocolos ensayados ya que se inhibe un porcentaje relevante de PCRs. **Las técnicas sin extracción sólo deben usarse como último recurso en situaciones en las que no haya otra solución.**
4. **Capacitación de centros de investigación y universidades, y de centros veterinarios o militares**, como laboratorios de apoyo de análisis de muestras clínicas con COVID-19 coordinados por la autoridades sanitarias de cada CCAA. Hasta la fecha **19** centros ya están en activo. Otros centros están en fases avanzadas de capacitación y podrían activarse en próximas fechas.
5. **Aumento de la automatización de las técnicas de PCR.** Se está en contacto con empresas que suministran reactivos en formato automatizado (los llamados robots o plataformas) para que incrementen la producción de reactivos en este formato y, de esta forma, aumentar la realización de tests. Las compañías que tienen esta capacidad son multinacionales (Roche, Abbot, Thermofisher entre otras). Hasta la fecha se ha conseguido que **17 hospitales españoles puedan empezar a trabajar con robots** COBAS 6800 de Roche, aunque la cantidad de suministros que llegan en este formato es aún limitada (3000 PCRs al día). Por otro lado, por iniciativa de varias empresas e investigadores, el ISCIII ha recibido la donación de **4 robots Opentrons**. Estos han sido empleados en los hospitales de La Paz de Madrid, Clinic de Barcelona y Vall d'Hebrón de Barcelona, y el último en el propio ISCIII. Estos robots se están poniendo en funcionamiento y tienen la capacidad máxima de realizar 2400 PCRs al día cada uno.

Por las razones expuestas en los párrafos precedentes, la estrategia diagnóstica principal debe ser **aumentar significativamente las capacidades para realizar más análisis de PCR**, ya que permite detectar y descartar casos con gran fiabilidad. Además continúa siendo el criterio definitivo de curación (PCR negativa) y, por el momento, es la única forma de asegurar que una persona no es contagiosa.

Test rápidos de detección del COVID-19. ¿Qué son?

Hasta la fecha se han comercializado un total de **114 técnicas en la UE** para detectar el COVID-19 que no están basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, **13 antigénicas y 101 de anticuerpos**. La mayor parte utilizan el formato de test rápido de detección basándose en la técnica de **inmunocromatografía** de difusión (lateral-flow) marcada con oro coloidal en pequeños kits para hacer las determinaciones individualmente. También existen dos modalidades de inmunocromatografía, las que **detectan antígenos y las de anticuerpos**, siendo estas últimas las más comunes (90% de las comercializadas). Las pruebas rápidas de detección del COVID-19 permiten obtener resultados en 15 minutos y tienen un formato que el personal sanitario puede realizar con facilidad.

Los **antígenos** son componentes del virus, generalmente proteínas, y suelen detectarse en los primeros días de infección cuando el virus se encuentra en las vías respiratorias altas. Las técnicas de **anticuerpos** detectan la respuesta inmune de los pacientes y aumentan según

avanza la infección, por lo son detectables más tardíamente, cuando la infección está más avanzada.

Todas estas técnicas rápidas para el **diagnóstico del COVID-19** han obtenido las diferentes **certificaciones** necesarias para ser utilizadas como técnicas de diagnóstico clínico, incluyendo el marcado CE, que obliga a realizar estudios de **validación clínica**. En estos estudios de validación se han utilizado como resultados de referencia los obtenidos por PCR. Con estos resultados como comparador, los fabricantes de casi todas las técnicas rápidas declaran en su documentación unos porcentajes de sensibilidad por **encima del 80% y los de especificidad superan el 95%**.

Fiabilidad de las técnicas rápidas de COVID-19

En este momento **no se dispone de experiencia** a nivel internacional que pueda resultar de utilidad para la toma de decisiones con respecto a la utilización de técnicas de diagnóstico rápido. En China y Corea del Sur no se utilizaron masivamente, ya que se estaba desarrollando en los momentos más críticos de la pandemia. En ambos países, la estrategia de diagnóstico microbiológico que se desplegó, se sustentó en **la realización de PCR, la técnica de referencia**. En China en un elevado número de casos moderados y graves, el diagnóstico se sustentó en datos clínicos y radiológicos, considerándose que ante la alta prevalencia no era imprescindible la confirmación microbiológica. En Corea se utilizó un sistema de obtención de muestras rápido (“drive-throug”) pero la muestras se analizaron utilizando PCR.

Apenas existen **publicaciones** científicas que avalen su utilización. Los estudios publicadas en revistas médicas reportan datos que indican que alrededor de un 50-60% de los enfermos tienen anticuerpos detectables en la primera semana de infección, ascendiendo a más del 90% tras unos 10 días de infección y a casi el 100% tras dos semanas del contagio. Sobre las técnicas de antígenos hay menos información.

Estudios de fiabilidad de las técnicas rápidas de detección del COVID

Las técnicas rápidas también tienen **limitaciones** por lo que se ha observado cuando se han desarrollado para otras infecciones. Las técnicas de detección de antígenos disponibles para otras infecciones respiratorias virales (gripe, adenovirus, etc.) tienen una **sensibilidad variable** (40-60 % en muchos casos), y suelen ser más útiles en las primeras fases de la infección, cuando pueden detectarse proteínas y otros componentes virales en muestras respiratorias de pacientes con síntomas catarrales. Las de detección de anticuerpos son más útiles en fases más avanzadas de la enfermedad, cuando se generan en el cuerpo humano anticuerpos como respuesta a la infección. Los fabricantes de técnicas de anticuerpos indican que pueden realizarse con sangre, suero o plasma y en algunos casos utilizando la digitopunción.

Por ello, el Instituto de Salud Carlos III y varios hospitales del SNS están realizando **estudios de fiabilidad de las técnicas diagnósticas rápidas de COVID-19** que han llegado a España adquiridas o donadas al Ministerio de Sanidad y las CCAA.

Hasta la fecha se han realizado estudios de fiabilidad con **seis técnicas rápidas** de COVID-19.

Los resultados más significativos se resumen a continuación:

1. Todas las técnicas evaluadas tienen **licencia para diagnóstico clínico**, marcado CE y sensibilidad >83% y especificidad >95%, según estudios presentados por fabricantes
2. Se han evaluado hasta ahora **dos** técnicas de detección de **antígenos** y **4** de **anticuerpos**.
3. Los estudios de fiabilidad se realizan:
 - a. Antígenos: en muestras respiratorias de pacientes con síntomas de COVID-19. Se toman dos hisopos y con uno se hace la determinación de antígeno y con el otro la PCR.
 - b. Anticuerpos: muestras sanguíneas con PCR COVID-19 positiva y controles negativos con sueros conservados y extraídos antes del 8 de diciembre de 2019.
4. Las determinaciones de anticuerpos pueden realizarse por **venopunción** o por **digitopunción** con resultados de **concordancia es elevada en algunas técnicas**. Aunque hay comunicaciones de algunos hospitales de que la **sensibilidad por digitopunción puede ser inferior** que con muestras de sangre por venopunción o de suero.
5. La **tabla 1** muestra los resultados más destacados de los estudios de fiabilidad:

TABLA 1. Resumen de resultados (S: Sensibilidad, ESP: Especificidad)

| TÉCNICA | FABRICANTE | DATOS SEGUN MARCADO CE | ESTUDIO DE FIABILIDAD | DATOS SOBRE ESTUDIO FIABILIDAD |
|--|--|---|---|---|
| 2019-nCoV Ag GICA Rapid Test REF: YRLG22202025 | SHENZHEN BIOEASY BIOTECHNOLOGY CO LTD | 83% S, 100% ESP | S: 25% ESP: 100% | Estudio ISCIII N=48 pacientes |
| 2019-nCoV Ag Test Fluorescence IC Assay REF: YRLF04401025 | SHENZHEN BIOEASY BIOTECHNOLOGY CO LTD | 92% S, 100% ESP | S: 58% ESP: 97% | Estudio Hospital Clínico Madrid, G Marañón y La Paz N=121 pacientes |
| COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette REF: GCCOV- 402a | ZHEJIANG ORIENT GENE BIOTECH | 88% S, 97% ESP (distingue IgM/IgG) | S: 58% ESP: 100% (S=85% en pacientes con >10 días de evolución) (SUERO) | Estudio Hospital de Toledo e ISCIII N=250 pacientes |
| 2019-nCoV IgG/IgM Rapid Test Cassette REF: INCP-402 | HANGZHOU ALL TEST BIOTECH CO LTD | 100% S, 97% ESP (distingue IgM/IgG) | S: 56,5% ESP: 100% (S >75% en pacientes con >7 días de evolución) (SUERO) | Estudio Hospital Clínico de Madrid y Ramón y Cajal N=119 pacientes |

| | | | | |
|--|---------------------------------------|--|--|---|
| SARS-CoV-2 Antibody Test REF: W1 95 | GUANGZHOU WONDFO BIOTECH CO LTD | 100% S, 90% ESP (Ac totales) | S: 66,3% ESP: 100% (S >75-80% en pacientes con >7 días de evolución) (SUERO) | Estudio la Princesa, Ramón y Cajal, Gregorio Marañón, Hospital de Toledo y Hospital Clínico de Madrid N=386 pacientes |
| SGTi flex COVID 19 IgM/IgG REF: COVT02SE | SUGENTECH INC | 94% S, 96% ESP (distingue IgM/IgG) | S: 74% ESP: 90% (S=94% en pacientes con >10 días de evolución) (SUERO) | Estudio Hospital de la Princesa y Hospital Clínico de Madrid N=200 pacientes |

6. Con estos datos el **valor predictivo positivo de todas las técnicas rápidas es >95%**.

Además en la última semana se han empezado a realizar **estudios en pacientes recuperados**, principalmente **personal sanitario** diagnosticado por PCR, que ha superado la enfermedad y se está **reincorporando a su puesto de trabajo**.

En estos estudios se ha realizado toma de muestras por **venopunción y por digitopunción, y analizado sangre total y suero**

La **tabla 2** muestra resultados de estudios realizado en sangre total y suero con las técnicas de anticuerpo, y comparando venopunción con digitopunción

TABLA 2. Resumen de resultados en pacientes recuperados y comparaciones venopunción vs digitopunción. (S: Sensibilidad, ESP: Especificidad)

| TÉCNICA | FABRICANTE | DATOS SEGUN MARCADO CE | ESTUDIO DE FIABILIDAD | DATOS SOBRE ESTUDIO FIABILIDAD |
|--|------------------------------------|--|--|--|
| COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette REF: GCCOV- 402a | ZHEJIANG ORIENT GENE BIOTECH | 88% S, 97% ESP (distingue IgM/IgG) Sangre/suero/plas ma. El fabricante recomienda digitopunción | S en SUERO: 85,5% ESP en SUERO: 98.1% S en SANGRE: 82,1% ESP en SANGRE: 99% S en DIGITOPUNCIÓN: 82,1% ESP en DIGITOPUNCIÓN: 99% | 150 pacientes Estudio ISCIII 56 pacientes Hospital Clínico de Madrid 56 pacientes Hospital Clínico de Madrid |

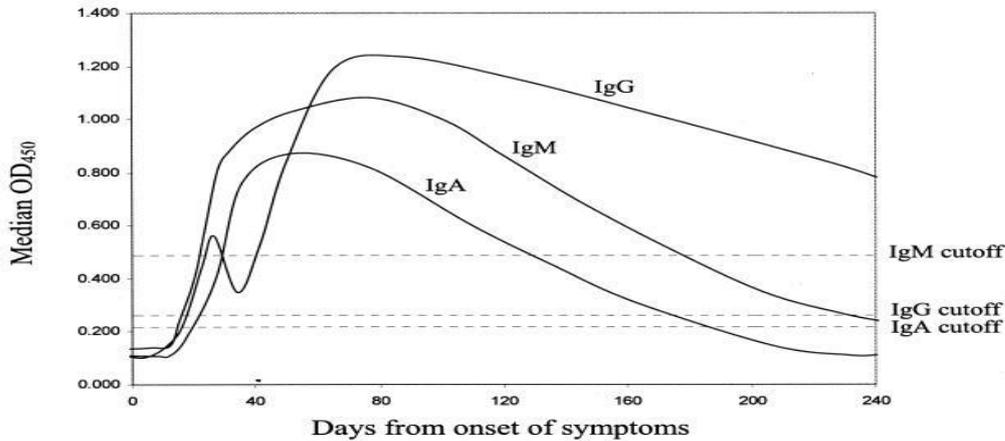
| | | | | |
|---|---|---|--|---|
| SARS-CoV-2 Antibody Test REF: W1 95 | GUANGZHOU WONFO BIOTECH CO LTD | 100% S, 90% ESP (Ac totales) Sangre/suero/plas ma. | S en SUERO: 77,8% ESP en SUERO: 95% S en SANGRE: 84,5% ESP en SANGRE: 100% S en DIGITOPUNCIÓN: 61,5% ESP en DIGITOPUNCIÓN: 100% | 45 pacientes Hospital Gregorio Marañón 97 pacientes Hospital Clínico de Madrid 52 pacientes Hospital Gregorio Marañón y Hospital Clínico de Madrid |
| 2019-nCoV IgG/IgM Rapid Test Cassette REF: INCP- 402 | HANGZHOU ALL TEST BIOTECH CO LTD | 100% S, 97% ESP (distingue IgM/IgG) Sangre/suero/plas ma. El fabricante recomienda digitopunción | S en SUERO: 86% ESP en SUERO: 85% S en DIGITOPUNCIÓN: 74% ESP en DIGITOPUNCIÓN: 95% | 56 pacientes Hospital Ramón y Cajal y Gregorio Marañón 47 pacientes Hospital Gregorio Marañón |

Interpretación de estos resultados

- La sensibilidad de los tests de **antígenos podría ser inferior** a la de anticuerpos, sobre todo en fases avanzadas de la infección, lo que es similar a lo observado en otras infecciones virales, donde los test de antígenos son de utilidad diagnóstica limitada.
- Las técnicas de detección de **antígeno** deben hacerse en no más de 30 minutos desde que se toma la muestra, por lo que deberían situarse en formato point-of-care (POC) en servicios de urgencia, lo que **resulta complicado en muchos centros sanitarios**.
- En lo que se refiere a las técnicas de **detección de anticuerpos**, ya sean IgM e IgG por separado o de detección de anticuerpos totales debe indicarse:
 - Aunque la sensibilidad en nuestro medio es inferior a la reportada previamente, la pruebas rápidas **detectan con rapidez un porcentaje significativo** de casos.
 - Esta sensibilidad media más baja se debe a que gran parte de los enfermos con un resultado negativo **no habrán producido anticuerpos** con un título suficiente para ser detectado.
 - En pacientes que llevan **más de 7 días de evolución** de COVID-19, la sensibilidad de la detección de anticuerpos **asciende a más de 75%**.
- La **detección** de anticuerpos IgM, IgG o anticuerpos totales en paciente con **síntomas compatibles con COVID-19 debe considerarse diagnóstico** de infección, sobre todo en situaciones de alta prevalencia de la infección.
- En cuanto al significado de **detectar una inmunoglobulina u otra** debe indicarse, que la cinética de producción de anticuerpos frente al COVID-19 no se conoce suficientemente. Los datos recogidos en los estudios de fiabilidad muestran que un 40% de los enfermos sintomáticos tienen IgG detectable, y que hasta un 70% de los pacientes recuperados asintomáticos mantienen IgM detectable. Los estudios realizados con el coronavirus SARS-1 probaron que los periodos de producción de inmunoglobulinas se solapan y se

mantienen en el tiempo (ver figura 1) (Woo et al. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11: 665–668)

FIGURA 1. Perfil de IgG, IgM, and IgA en pacientes con neumonía por SARS-CoV.



6. Hasta que no se dispongan de test **serológicos cuantitativos** (ELISA, inmuno-ensayos) suficientemente fiables no se podrá analizar la cinética de las diferentes inmunoglobulinas en respuesta a la infección COVID-19. Se han localizado 8 de estas técnicas que se están evaluando en el Centro Nacional de Microbiología. Hay otras muchas en desarrollo, de las que se espera tener un prototipo en pocas semanas.
7. En **pacientes recuperados**, todos los tests rápidos evaluados presentan una sensibilidad en suero y sangre total **alrededor del 80%**. Los datos que hay sobre **la digitopunción indican que su sensibilidad puede ser inferior** en algunos casos y para algunas técnicas.

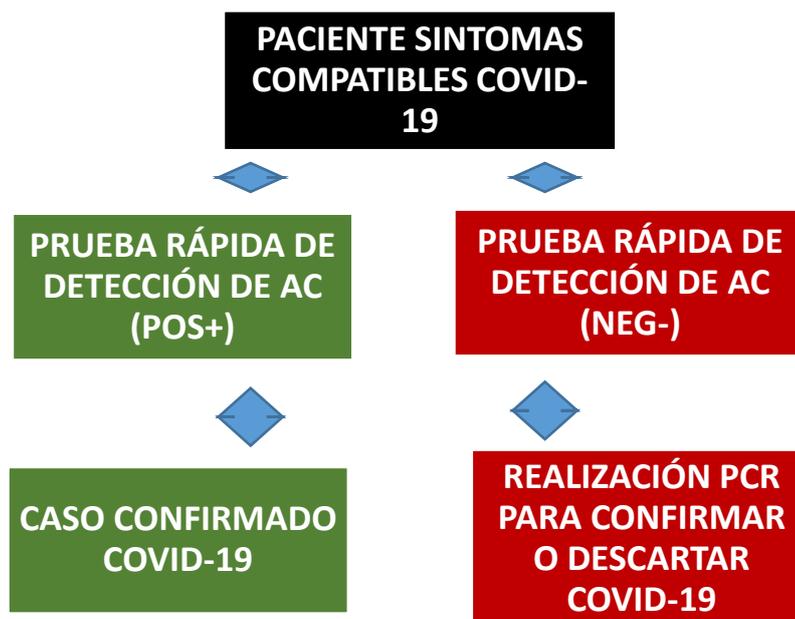
Propuesta de estrategia

Tras lo expuesto en los apartados anteriores se propone lo siguiente:

1. La realización de **PCRs debe considerarse el pilar fundamental** de la estrategia. Deben aumentarse las capacidades:
 - a. **Mantener e incrementar** la distribución de reactivos en los **centros sanitarios españoles**, priorizando en estos momentos la obtención de más reactivos de extracción y aumentando progresivamente la distribución de reacciones de PCR.
 - b. Se debe aumentar la **automatización en el proceso de realización de PCRs**, obteniendo reactivos en este formato y poniendo en funcionamiento los robots y plataformas disponibles.
 - c. Se debe **incrementar** el número de **centros** universitarios, de investigación, veterinarios, militares o de cualquier otra clase, **con capacidad** para realizar análisis de PCR y apoyar al Sistema Nacional de Salud, siempre en coordinación con las **autoridades sanitarias de cada CCAA y supervisados por los servicios de microbiología clínica**. Esta capacitación sólo podrá ser eficaz si se aumenta la consecución total de reactivos de extracción y de PCR, ya que de otro modo, su puesta en marcha podría detraer reactivos de los centros sanitarios.

2. Las técnicas **rápidas de detección de anticuerpos**, aquellas con sensibilidad alrededor del 60% o superior, podrían emplearse como **prueba de cribado rápido** en pacientes **sintomáticos** en áreas/centros/situaciones de alta prevalencia de COVID-19:
 - a. Un resultado **positivo** de anticuerpos totales, IgM o IgG **confirmaría** la infección.
 - b. Los resultados **negativos** habría que confirmarlos realizando **PCR** en muestras respiratorias del paciente.
 - c. Esta estrategia reduciría el número total de PCR diarias a realizar en los hospitales en las situaciones de alta prevalencia.
 - d. Las técnicas de detección de anticuerpos pueden realizarse en los laboratorios de microbiología, tras recoger la muestra en unidades de extracción de sangre, sin alterar el funcionamiento hospitalario habitual. Se pueden utilizar muestras de sangre, suero o plasma. Varios fabricantes recomiendan hacer la prueba inmediatamente después de la extracción de la muestra.
 - e. En la Figura 2 se muestra una propuesta de algoritmo diagnóstico en los pacientes sintomáticos compatibles con COVID-19.

FIGURA 2. Propuesta de algoritmo diagnóstico en PACIENTES SINTOMÁTICOS



3. Utilizando estas técnicas con una sensibilidad media del 60%, **el porcentaje de PCRs que podrían no hacerse tras obtener un resultado positivo con la técnica rápida sería significativo** y dependería de la frecuencia de COVID-19 en la población:
 - a. Los hospitales de las CCAA con mayor número de casos están comunicando resultados positivos de PCR entre 50-80% de los casos sospechosos de COVID-19 analizados diariamente.
 - b. Con una sensibilidad de la técnica rápida de detección de anticuerpos alrededor del 60% **se ahorrarían un 36-48% de PCRs cada día**, en estos escenarios de alta prevalencia.

- c. En pacientes con enfermedad **más evolucionada**, donde la sensibilidad de la detección de anticuerpos **supera el 75%**, se podría reducir un 60% la necesidad de PCR.
 - d. En poblaciones en las que la frecuencia de la enfermedad es inferior, como **CCAA con menor prevalencia**, grupos de personas aisladas en **residencias de ancianos, personal de servicios esenciales y sanitarios**, la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos sería inferior y la PCR seguiría jugando un papel fundamental.
 - e. Además las técnicas rápidas de detección de anticuerpos podrían tener un uso adicional que es ayudar **a confirmar casos compatibles con COVID-19 con resultados de PCR repetidamente negativos**.
4. Las técnicas de detección de **anticuerpos tienen además** otro papel, que es poder detectar anticuerpos en población que ya ha superado la enfermedad. Para estos usos se recomienda utilizar **técnicas que distinguen entre IgM e IgG**, ya que aportarían más información sobre el perfil de anticuerpos en la población general. Estos usos son:
- a. Detectar personas supuestamente **inmunes** que podrían reiniciar sus labores profesionales.
 - b. Pacientes **recuperados** a los que se les puede extraer **plasma** para tratamiento de nuevos casos.
 - c. Estudios de **seroprevalencia**.
 - d. Estudios de respuesta **vacunal**, cuando existan estas vacunas.
 - e. Apoyo en **ensayos clínicos de profilaxis** que necesiten conocer la presencia de anticuerpos y no introducir sesgos en la evaluación de la pauta profiláctica. En este caso también podría utilizarse la detección de anticuerpos totales.
5. Por último, las técnicas de detección de **antígeno** podrían emplearse en aquellos casos que superen el 60% de sensibilidad y sólo en aquellos centros que tengan la posibilidad de crear POCs sin alterar el funcionamiento del hospital.

INFORME EMITIDO POR

Prof. Manuel Cuenca Estrella

Subdirector General del ISCIII