

RECOMENDACIONES INSTITUCIONALES

DOCUMENTO DE POSICIONAMIENTO DE LA SEIMC SOBRE EL DIAGNÓSTICO MICROBIÓLOGO DE COVID-19.

Estamos asistiendo a un espectacular incremento de casos de COVID-19. Un diagnóstico rápido de dichos casos a nivel hospitalario es relevante para identificar, aislar y tratar rápidamente a aquellos pacientes infectados con SARS-CoV-2; para limitar la transmisión del virus, así como para la descongestión de las urgencias. Para ello necesitamos pruebas rápidas con una elevada sensibilidad. También son necesarias estas pruebas para propiciar la incorporación de los profesionales sanitarios que han estado con COVID-19. En este documento pretendemos hacer un análisis de las ventajas y desventajas que presentan las pruebas rápidas de las que disponemos actualmente y la aplicación de las mismas en el ámbito hospitalario.

Actualmente los ensayos microbiológicos más utilizados son: 1. Pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos y 2. Pruebas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, dentro de éstas podemos diferenciar aquellas que detectan antígenos o las que detectan anticuerpos (IgM/IgG).

Detección de ácidos nucleicos

La detección de la presencia de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en la muestra del paciente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más útil para el diagnóstico de este proceso y por tanto debe ser considerada el procedimiento de elección y de referencia porque:

- Detecta la presencia del virus en muestras nasofaríngeas desde los primeros momentos de la infección. También pueden ser utilizadas otras muestras como el aspirado endotraqueal, broncoaspirado y el lavado broncoalveolar.
- Permite estudiar un gran número de pacientes por la posible automatización de los procedimientos
- Es más sensible y específica que los otros métodos hasta ahora disponibles
- Los laboratorios de Microbiología clínica disponen de la infraestructura necesaria para su realización

Procedimiento:

La OMS recomendó que se considerara un caso como probable cuando se detectaba la presencia de un gen del SARS-CoV-2 y que para establecer un caso como definitivo, se confirmara la detección de otro gen de este virus, por lo que la detección de dos genes en el mismo ensayo, acelera el resultado de caso confirmado.

En caso de realizarse la detección de los dos genes de forma secuencial, si hubiere escasez de reactivos y con objeto de aumentar la rapidez diagnóstica y teniendo en cuenta la elevada carga de enfermedad del proceso en nuestro medio, se debería hacer la prueba confirmatoria sólo cuando la situación clínica lo requiera o los resultados del primer estudio fuesen dudosos.

Errores diagnósticos: La interpretación de la PCR se debe hacer con prudencia dentro del contexto clínico sobretodo cuando esta es negativa.

Falsos negativos: Pueden aparecer falsos negativos en las siguientes circunstancias.

- Toma inadecuada de la muestra (frotis nasofaríngeo)
- Retraso en el transporte
- Error pre-analítico en el etiquetado de la muestra a lo largo del proceso
- Poca eliminación de virus por el paciente por el estadio del proceso o por la gravedad del mismo

Para evitar estos errores, se recomienda incidir en la formación continuada del personal sanitario implicado en la recogida, transporte y procesamiento de las muestras. Además, en caso de elevada sospecha clínica y resultado negativo de la PCR su interpretación debe hacerse con prudencia, y se recomienda repetir el estudio.

Falsos positivos:

- Error pre-analítico en el etiquetado de la muestra a lo largo del proceso
- Contaminación cruzada entre muestras durante el procesamiento

Para evitar estos errores, se recomienda la contratación de personal con experiencia en Microbiología molecular e incidir en la formación continuada del personal sanitario implicado en el procesamiento de las muestras.

Técnicas a emplear

Si la muestra (frotis nasofaríngeo) ha sido remitida al laboratorio en medio de transporte, esta debe ser inactivada con tampón de lisis antes de proceder a la extracción de los ácidos nucleicos. Existe la opción de enviar la muestra en el mismo tampón de lisis, por lo que ésta llegaría inactivada al laboratorio, evitando problemas de bioseguridad en el transporte.

El procedimiento de PCR consta de dos partes: 1) extracción de ácidos nucleicos y 2) reacción de amplificación. Lo ideal es que ambos procesos estén automatizados para disminuir errores y aumentar la rapidez diagnóstica de todo el proceso.

Los laboratorios de Microbiología clínica deben disponer de suficiente material fungible compatible con la infraestructura de la que se dispone en cada centro, con objeto de hacer un diagnóstico rápido y fiable.

Futuro próximo

En pocos días, se van a comercializar sistemas rápidos de PCR (menos de una hora) que permitirán el diagnóstico rápido y correcto de los pacientes. Los laboratorios deben tener acceso a dichas pruebas y disponer de los fungibles y aparatos necesarios para su puesta en marcha de forma inmediata. Algunas de estas pruebas ya tienen la aprobación de la FDA y se espera en un futuro inmediato el marcado CE.

Detección de antígenos

No existen muchos estudios publicados que demuestren los indicadores de sensibilidad y especificidad de la detección de antígeno de SARS-CoV-19 en frotis nasofaríngeo. Sin embargo, por los estudios descritos parece ser que la carga viral es superior en fosas nasales que en orofaringe y que en los primeros días de la infección la carga viral oscila entre 10^4 y 10^8 copias de ARN/ml. Este hecho sugeriría que la detección de Ag del SARS-CoV-19 en estas muestras podría presentar una buena sensibilidad si se dispone de un buen anticuerpo.

En un estudio en fase de publicación (medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.20032524>) los resultados mostraron que cuando la PCR tenía un Ct < 40 la sensibilidad era del 68%, la especificidad del 100%, el valor predictivo positivo del 100% y el valor predictivo negativo del 32%; mientras que cuando el Ct < 30 la sensibilidad era del 98% y especificidad del 100%.

Ventajas:

- Sensibilidad adecuada, que puede aumentarse si se acopla una detección fluorimétrica
- Rapidez, los ensayos de inmunocromatografía suelen generar resultados en unos 15-30 minutos.
- *Desventajas:*
- Difícil procesar muchas muestras en un corto periodo de tiempo.

Ensayos preliminares de las primeras pruebas disponibles en España en formato de inmunocromatografía con detección con oro coloidal indican una sensibilidad inferior al 30% y una especificidad del 100% en poblaciones que acuden a las urgencias de los hospitales en las que el porcentaje de positividad de la PCR es del 84% y de trabajadores sanitarios en las que el porcentaje de positividad es del 50%. Estos resultados impedirían su introducción en rutina. No obstante, existen formatos que requieren lectura fluorescente y que están pendientes de ser evaluados.

Detección de anticuerpos

Existen en el mercado internacional, y muy pronto estará en el nacional, pruebas de detección de anticuerpos IgM e IgG en sangre en la misma prueba en formato de inmunocromatografía (*lateral-flow*). Aunque existen pocas publicaciones, tanto la OMS como la FDA abogan por su utilización en el diagnóstico microbiológico de COVID-19. El ECDC no se ha pronunciado abiertamente, aunque aboga por su uso. En un estudio reciente (Li et al. J Med Virol. (2020) 27. doi: 10.1002/jmv.25727. [Epub ahead of print]) la sensibilidad y especificidad global de la prueba, fue del 88.6% y 90.6%. Los autores no ofrecieron valores predictivos positivos o negativos. El estudio fue multicéntrico (8 centros), incluyendo 307 pacientes positivos y 128 negativos con RT-PCR en nasofaríngeo. La obtención de la muestra de sangre para la detección de IgM/IgG se realizó entre el 8 y 33 día de la aparición de los síntomas. Los resultados fueron similares en suero y plasma de sangre venosa y en sangre periférica tomada en paralelo.

No se evaluó la detección de IgM/IgG en fase precoz de la aparición de los síntomas de COVID-19 (en los primeros 7 días) por lo que no existen evidencias suficientes para posicionar su detección como cribado frente a otras técnicas. En otros trabajos (Emerg Microbes Infect. (2020) 9:386 y Cold Spring Harbor Laboratory Press (2020) 16:1) los resultados son también difíciles de interpretar; el primero de ellos no dispone de información clínica, la determinación

de anticuerpos se hace mediante ELISA no mediante sistemas de inmunocromatografía como la mayoría de los ensayos comercializados. Encuentran que hay un incremento tanto de IgM como de IgG al quinto día, pero la primera determinación (tiempo 0) no es el día que empieza la sintomatología sino el día que se toma la primera muestra. Por ello, dado la incertidumbre de dichos ensayos deberían posicionarse como ensayo de aplicación en la fase de diagnóstico rápido en pacientes con un tiempo medio de evolución de los sistemas del COVID-19.

Ventajas:

- Rapidez, los ensayos de inmunocromatografía suelen generar resultados en unos 15-30 minutos.
- Podría complementar a los estudios de RT-PCR cuando estos son negativos en los pacientes con clínica de COVID-19 o debido a que por el curso de la enfermedad ya no existe carga viral apreciable en las muestras de vías respiratorias superiores y resulta un riesgo obtener muestras de tracto respiratorio inferior.
- Posible uso en suero y plasma de sangre venosa y sangre periférica (incluso por punción capilar).

Desventajas:

- Insuficiente sensibilidad y especificidad
- Dinámica de respuesta IgM e IgG incierta y variable en el curso de la enfermedad que hace que un resultado negativo de IgM y de IgG no excluya que el paciente esté infectado por SARS-CoV-2. Especialmente en pacientes inmunodeprimidos.
- Dificultad para posicionar su determinación como técnica cribado frente a RT-PCR o detección de antígeno
- Difícil procesar muchas muestras en un corto periodo de tiempo.

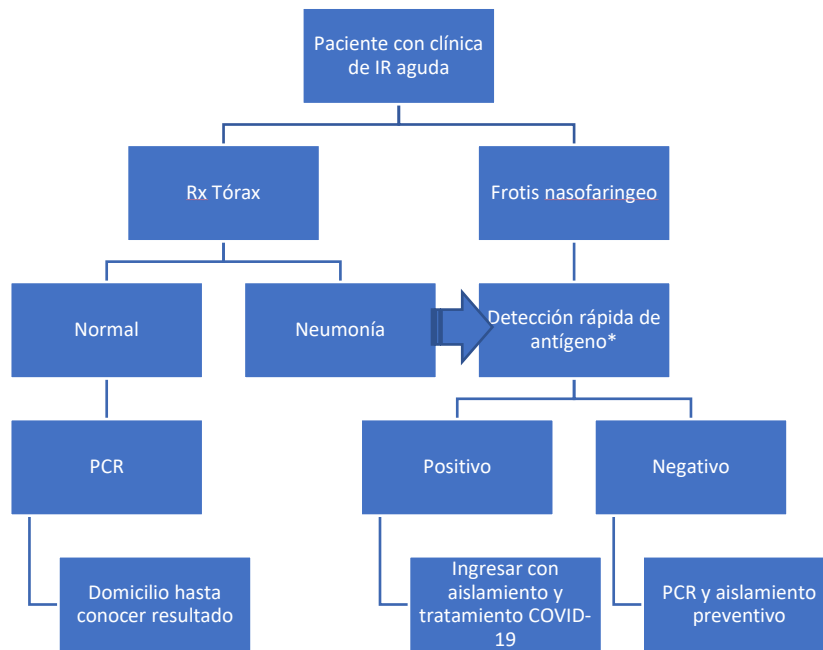
Aplicación de las técnicas citadas

A nivel hospitalario las muestras que recibimos se pueden estratificar en dos tipos de poblaciones: 1) Pacientes en urgencias con infección respiratoria aguda y 2) Personal sanitario en contacto con los pacientes. Dado la escasez de material (escobillones, pruebas diagnósticas, etc.), en esta última población solo se debería hacer cuando la persona presente sintomatología y de forma prioritaria para favorecer su reincorporación al trabajo.

Un aspecto importante a tener en cuenta es la buena obtención de la muestra nasofaríngea pues de ello depende un diagnóstico microbiológico correcto. Entre las pruebas rápidas, la detección de IgM/IgG presenta una serie de desventajas como hemos comentado anteriormente por lo que su aplicación puede ser limitada y debe ser complementaria a la RT-PCR. Mientras que la detección de antígeno podría tener una aplicación en aquellos casos que se desea un diagnóstico rápido, sobretodo porque presenta un valor predictivo positivo elevado. Aunque posteriormente se debería hacer PCR si la detección de antígeno fuese negativa y existe una alta sospecha de COVID-19. Actualmente la PCR sigue siendo la prueba de elección para el procesamiento de un elevado número de muestras.

La detección de ARN o la detección de antígeno de SARS-CoV-2 basada en RT-PCR o en inmunocromatografía, respectivamente en muestras respiratorias proporcionan un diagnóstico específico en la fase inicial del brote. No obstante, queda por dilucidar el papel que debe tener la detección de antígeno en ausencia de una prueba comercial con elevada sensibilidad.

Otro aspecto a considerar es el de las muestras de pacientes que permanecen en sus domicilios o aquellos que viven en centros socio sanitarios. Respecto a los primeros, y en especial los que se encuentran asintomáticos o con una clínica respiratoria leve el abordaje diagnóstico puede no contemplar necesariamente la realización de un test molecular o de respuesta rápida atendiendo además al confinamiento propio del paciente. Aunque no hay una solución clara al respecto, el uso de pruebas basadas en la detección de antígenos virales concomitante o no a la detección inmunocromatográfica de anticuerpos frente al virus (IgG o IgM) se postula como una solución pragmática, una vez comprobado que dichos ensayos tienen valores de sensibilidad y especificidad adecuados. Respecto a pacientes ingresados en centros socio sanitarios es importante conocer que pacientes están infectados con SARS-CoV-2 con la mayor celeridad, considerando, por un lado, que es la población más vulnerable y por otro lado, la rápida diseminación del virus en estas ubicaciones. Ello obliga a detectar con prontitud y fiabilidad aquellos portadores del virus. Posiblemente el uso de un test molecular se postula como la mejor solución para estos casos.



Algoritmo diagnóstico recomendable para centros hospitalarios.

*La prueba rápida del antígeno tendría sentido con un test que tuviese una sensibilidad aceptable.

Autores:

Grupo de expertos SEIMC para el análisis del diagnóstico microbiológico del COVID-19.