



**De: Jefe del Servicio de Microbiología**

**Para: Gerencia/ Dirección Médica**

**Asunto: Preguntas frecuentes sobre la toma y diagnóstico del SARS-Cov-2**

**2ª Edición**

**Fecha: 27/04/2020**

### **Preguntas frecuentes del coronavirus y la toma de muestras y su diagnóstico**

**Autores del Informe:** Santiago Melón, Marta Elena Álvarez, Susana Rojo, Mercedes Rodríguez, Fernando Vázquez (Servicio de Microbiología del HUCA)

Ante las preguntas y dudas sobre la toma de muestras y las pruebas diagnósticos que nos hacen, elaboramos este documento de preguntas frecuentes para aclarar en lo posible dichas dudas.

**Se incorporan nuevas preguntas que se señalan en amarillo con respecto a la primera edición.**



## FASE PREANALÍTICA

### Toma de muestras

#### I. Muestras

1. ¿Qué muestras respiratorias se pueden utilizar para la toma?. Viene detalladas en la siguiente tabla.

2. ¿Cuáles son las mejores muestras para realizar la PCR?

Muestra	Sensibilidad	Incomodidad de la toma	Comentario	Referencia
Lavado o aspirado nasal	Las torundas floculadas en torundas nasofaríngeas son equiparables al lavado nasal	Igual de confortable que la toma nasofaríngea con torunda floculada	Patrón oro. Aunque es la muestra más efectiva es incomoda de hacer dada la dificultad técnica y de equipo. Riesgo de crear aerosoles	5, 8, 9
Torunda nasal	Menor sensibilidad que Torunda nasal a nivel de los cornetes Sensibilidad 89% versus 93% torunda nasofaríngea (no significativo)	Más confortables	Se comparó para la gripe	7
Torunda nasofaríngea	70-90% (variable 30%, 72%). Presenta 54 veces más alta carga viral que la orofaríngea. Igual de sensible que el aspirado nasofaríngeo Claramente superior a la toma orofaríngea	Menos confortable que la toma nasal	Causan tos con posible riesgo de diseminación de virus nosocomiales	1, 9
Torunda nasal a nivel de los cornetes	Válida pero algo menos que nasofaríngea	Más confortable la toma que la nasofaríngea	Estudiado en gripe	4
Torunda orofaríngea	Menos carga viral que muestras nasofaríngeas	Más confortable la toma que la nasofaríngea	Más posibilidades de aerosoles si se tose en el momento de la toma	9
Gárgaras	Igual de sensibles que orofaríngeas	-	Valor Ct mejor y más fáciles de tomar que orofaríngeas	10
Saliva	Igual que la toma nasofaríngea	Más confortable	Detecta mejor adenovirus y peor gripe y rinovirus	6
Espujo	Significativa mayor recuperación de coronavirus en espujo que en toma nasofaríngea	-	No tan estandarizado el método de extracción de ARN en espujo	2
Lavado broncoalveolar (LBA)/ Aspirado broncoalveolar	Mejor sensibilidad que toma nasofaríngea (81,5%)		Negativos también en LBA	3



### 3. ¿Es mejor un pool de muestras?

Mejora la sensibilidad si se cogen de varios sitios: lavado nasofaríngeo, torunda nasofaríngea y orofaríngea (11) y de nasofaríngea con orofaríngea (12). Si se hace un pool se debería usar una sola torunda, dado el desabastecimiento, y primero se recoge en orofarínge y después en nasal/ nasofaríngeo.

### 4. ¿Hay algún trabajo específicamente sobre el nuevo coronavirus?

Hay un trabajo publicado en JAMA (13a), que es una carta al Editor y con muy poca cantidad de muestras por lo que su valor es limitado, en el que se indica que la sensibilidad de la toma nasofaríngea o la toma nasal es superior a la toma orofaríngea. Si la PCR es negativa en un paciente con síntomas sería mejor realizar una toma del tracto respiratorio inferior si es posible.

Table. Detection Results of Clinical Specimens by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Specimens and values	Bronchoalveolar lavage fluid (n = 15)	Fibrobronchoscope brush biopsy (n = 13)	Sputum (n = 104)	Nasal swabs (n = 8)	Pharyngeal swabs (n = 398)	Feces (n = 153)	Blood (n = 307)	Urine (n = 72)
Positive test result, No. (%)	14 (93)	6 (46)	75 (72)	5 (63)	126 (32)	44 (29)	3 (1)	0
Cycle threshold, mean (SD)	31.1 (3.0)	33.8 (3.9)	31.1 (5.2)	24.3 (8.6)	32.1 (4.2)	31.4 (5.1)	34.6 (0.7)	ND
Range	26.4-36.2	26.9-36.8	18.4-38.8	16.9-38.4	20.8-38.6	22.3-38.4	34.1-35.4	
95% CI	28.9-33.2	29.8-37.9	29.3-33.0	13.7-35.0	31.2-33.1	29.4-33.5	0.0-36.4	

Abbreviation: ND, no data.

En otro estudio (13b) la muestra nasal mostró una sensibilidad del 89,2% y una especificidad del 100% respecto a la toma nasofaríngea. Por lo que estos autores, la recomiendan a pesar de ser algo menos sensible y más cómoda que la nasofaríngea.

Aunque la toma orofaríngea tiene menor sensibilidad puede ser una buena toma cuando los síntomas que predominan es la faringitis (13c).

En el caso de que no haya hisopos por el gran desabastecimiento se tendría que recurrir a auto toma de saliva en un recipiente (13c). Este método se podría usar para cribado epidemiológico y personas preocupadas que están asintomáticas y sin historia de exposición y quieren hacer el test para saber que no están infectadas (13c).

### 5. ¿Cómo se realiza la técnica de recogida de muestra nasal o nasofaríngea?

Se introduce el hisopo nasal o nasofaríngeo en la nariz hasta que topa con un obstáculo. (el cornete nasal inferior o la parte posterior de la cavidad nasofaríngea, respectivamente), se gira 5 veces y se retira (13b).

En el caso de la toma nasofaríngea debe insertarse profundamente en la cavidad nasal, esto producirá “lagrimeo” y el paciente retrocederá (esto significa que se ha llegado al sitio adecuado) (13c).

En el caso de la toma orofaríngea induce el reflejo de vómito, pero es variable este efecto (13c).

## II. Hisopos

### 6. ¿De que material son las torundas que utilizamos y que importancia tiene?

Las torundas comerciales son de varios materiales ej. nylon, rayón, algodón, poliéster, poliuretano, y alginato y con diferentes microestructuras: estructura apretada, de tejido, floculada o reticulada (14a).

Se utilizan para recoger muestras de superficies secas, como ambientales o de piel o nasales, etc y son a veces usadas pre- empapadas para incrementar la eficiencia (14b).

Pero hay muchas variables a considerar que pueden hacer variar su eficacia de recuperación: tamaño de la torunda, estructura o composición, y además de la matriz donde se utilice: superficies o muestras con mucina u otros elementos (13a)

### 7. ¿Son mejores las torundas floculadas frente a las no floculadas?

Los mejores hisopos son las torundas floculadas (son de nylon) frente a las no floculadas (algodón o rayón) (haciendo un símil para que se entienda las no floculadas son como un felpudo liso y las floculadas como un felpudo rugoso), las floculadas recuperan más microorganismos debido a la estructura de sus fibras.

Las floculadas detectan mas alta carga viral que las no floculadas (15, 16).

Las tomas con torunda floculada son equiparables a las muestras de lavados nasales que son el patrón oro (5).



### 8. ¿Se debe humedecer la torunda previamente en el medio de transporte?

Humedecer significa introducir la torunda, antes de hacer la toma, en el medio de transporte y quitar el líquido de la misma escurriéndolo por las paredes del tubo.

#### **Es un tema controvertido.**

Con las torundas no floculadas se aconsejaba humedecer con suero salino estéril (símil: es como si limpiamos con una bayeta seca o húmeda una superficie, la húmeda es más efectiva y por lo tanto al recoger la muestra hay más posibilidades de coger más celularidad).

Con las torundas floculadas, los fabricantes no recomiendan humedecerla previamente ya que recuperan más celularidad que las no floculadas.

Hay estudios realizados en la toma nasal de *S. aureus* en los que se encuentra que la torunda humedecida no mejora la recuperación (17).

Los estudios de uso de torundas pre-empapadas se han basado sobre todo en estudios sobre superficies inertes y con uso de bacterias como *S. aureus* (18).



Un estudio sobre virus respiratorios se vio que servía la torunda seca para diagnóstico molecular siempre que no hubiese retraso de la misma en llegar al laboratorio y no fuese de sitios lejanos (19). Mucha de la información se ha basado sin cuantificar la carga viral y su disminución según se hace en seco o pre-empapada.

**9. ¿Por qué el Servicio de Microbiología recomienda, si es posible, humedecer la torunda previamente?**

- A. Por ser un tema controvertido: a) material de las torundas, tamaño, microestructura; b) estudios contradictorios y en diferentes estructuras como superficies y con otros microorganismos
- B. Por necesitar el medio de transporte viral para realizar otras posibles determinaciones como el cultivo viral en la rutina de nuestro laboratorio, independientemente de la pandemia de coronavirus. Las muestras secas se aplican sólo a métodos moleculares.
- C. Por no poder asegurar el retraso de la muestra en llegar al laboratorio o de sitios no cercanos al mismo

**10. ¿Es adecuada la autotoma como se ha visto en tomas para gripe?**

La autotoma parece adecuado según un meta-análisis para el virus de la gripe (20).

*A recent meta-analysis showed a pooled sensitivity of 87% (95% CI, 80%-92%) and specificity of 99% (95% CI, 98%-100%) compared with professional-collected swabs in the diagnosis of influenza.*

**11. ¿Se pueden utilizar torundas no estériles?**

Dados los problemas de desabastecimiento de las torundas se puede dar la situación de que se tuviesen que utilizar torundas estériles o no estériles en paquetes no individuales. En este caso este tipo de torundas se usarían sólo para las tomas de coronavirus ya que para la detección por PCR al ser sondas específicas no interferirían con los resultados (esta situación ocurre por ej. en las PCR que se hacen para patógenos en heces donde pueden encontrarse multitud de microorganismos pero la especificidad de la PCR es muy alta con lo cual no habría interferencia en la detección de un patógeno específico). En este caso lo expuesto en la pregunta 8 tendría todavía más relevancia. No hay estudios que comparen los distintos tipos de hisopos.

**12. ¿Se puede usar otro medio de transporte que no sea el medio de virus (viral universal transport medium) (VTM) en caso de problemas de desabastecimiento?**

El medio habitual de transporte donde se inocula el hisopo es el medio de virus (VTM) pero actualmente hay un gran desabastecimiento. Idealmente la muestra se debe mantener refrigerada hasta que llegue al laboratorio pero en la situación de pandemia y la rapidez con que llega al laboratorio no sería imprescindible.

Se ha visto que se puede usar con seguridad: Salino estéril al 0.9%, salino estéril en tampón fosfato (sterile phosphate buffered saline) (PBS), o medio esencial mínimo (minimum essential media) (MEM) igual que el VTM ya que hay un 100% de acuerdo cuando de mantiene la muestra más de 7 días en nevera y congelada (21). Por lo tanto



en caso de desabastecimiento del VMT, y que el Servicio de Microbiología del HUCA no dispusiese para servir del medio VMT, los laboratorios de Microbiología podrían recurrir a estos medios sin problema.

### **Recomendaciones finales a la toma de la muestra:**

**Se debe realizar una toma nasofaríngea como muestra de elección** y si no es posible una muestra nasal u orofaríngea, sabiendo que hay diferencias en la sensibilidad de la PCR de cada una de ellas y la incomodidad de las mismas. Además, la dinámica del virus hace que **a partir de los 7 días de infección** por coronavirus hará que **las muestras respiratorias de vías bajas sean preferibles** (por mayor positividad) que de vías altas.

**No se aconseja realizar varias tomas en diferentes zonas anatómicas** en el mismo paciente (“pool” de muestras) dada la escasez de medios de transporte en estos momentos y la carga de trabajo e incomodidad para el paciente que esto supone.

**Se recomienda torundas floculadas y medio de transporte viral**, pero dada la escasez de hisopos con medio de transporte inevitablemente se ha de usar torundas no floculadas y medio de transporte viral preparado en nuestro Servicio que se está distribuyendo al resto de Laboratorios de Microbiología de los H. Comarcales. **En caso de que no haya lo anterior se podría usar como medio de transporte: Salino estéril al 0.9%, salino estéril en tampón fosfato (sterile phosphate buffered saline) (PBS), o medio esencial mínimo (minimum essential media) (MEM)**

Asimismo, **se recomienda humedecer la torunda previamente**, aunque es controvertido, ya que por una parte no está claro y además porque si no hay torundas floculadas, las no floculadas tienen un nivel de recuperación de celularidad menor y finalmente porque el personal que haga la toma no va a poder distinguir entre los dos tipos, al estar circulando tipos de torundas distintos y de casas comerciales distintas debido a la escasez, y de esta forma se simplifica las instrucciones de la toma.

**En el caso de que por cualquier causa justificada haya que recurrir a otro tipo de muestra que no sea el patrón oro, hisopos distintos a los recomendados o que no se pre-empape la torunda, debe tenerse en cuenta que la sensibilidad de la PCR puede ser menor y se debe repetir la toma para una nueva PCR o recurrir a muestras de vías bajas, si es posible, en el caso de una PCR negativa previa.**

**El uso de una torunda no estéril estaría justificado, si no se dispone de una torunda estéril, pero solo para el diagnóstico de SARS Cov-2.**

### **Bibliografía de referencia:**

1. Burk M et al. Viral Infection in Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-Analysis. Eur Respir Rev. 2016; 25: 178-88.
2. Jeong JH et al. Comparison of Sputum and Nasopharyngeal Swabs for Detection of Respiratory Viruses. J Med Virol. 2014; 86: 2122-7.



- 3 Lachant DJ et al. Nasopharyngeal Viral PCR in Immunosuppressed Patients and Its Association With Virus Detection in Bronchoalveolar Lavage by PCR. *Respirology*. 2017; 22: 1205-1211.
4. Frazee BW et al. Accuracy and Discomfort of Different Types of Intranasal Specimen Collection Methods for Molecular Influenza Testing in Emergency Department Patients. *Ann Emerg Med*. 2018; 71: 509-517.
5. Bebyle C et al. Comparison of Nasopharyngeal Flocked Swabs and Nasopharyngeal Wash Collection Methods for Respiratory Virus Detection in Hospitalized Children Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Virol Methods*. 2012; 185: 89-93.
6. Kim Y-G et al. Comparison between saliva and nasopharyngeal swab specimens for detection of respiratory viruses by multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2017; 55:226–233.
7. Irving SA et al. Comparison of Nasal and Nasopharyngeal Swabs for Influenza Detection in Adults. *Clin Med Res*. 2012; 10: 215-8.
8. Li L et al. Comparison among nasopharyngeal swab, nasal wash, and oropharyngeal swab for respiratory virus detection in adults with acute pharyngitis. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 281.
9. Hernes SS et al. A Comparison of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabbing for the Detection of Influenza Virus by Real-Time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32: 381-5.
10. Bennett S et al. Comparison of Gargle Samples and Throat Swab Samples for the Detection of Respiratory Pathogens. *J Virol Methods* 2017; 248: 83-86.
11. Lieberman D et al. Pooled Nasopharyngeal and Oropharyngeal Samples for the Identification of Respiratory Viruses in Adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29, 733-5.
12. Ek P et al. A Combination of Naso- And Oropharyngeal Swabs Improves the Diagnostic Yield of Respiratory Viruses in Adult Emergency Department Patients. *Infect Dis (Lond)*. 2019; 51: 241-248.
- 13a. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020; 20 March online.
- 13b. Péré, H. Nasal swab sampling for SARS-CoV-2: A convenient alternative in time of nasopharyngeal swab shortage. *J Clin Microbiol*. 2020. Posted Online 15 April 2020. doi:10.1128/JCM.00721-20.
- 13c. Tang, Y-W. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol*. 2020; Posted Online 3 April 2020. doi:10.1128/JCM.00512-20
- 14a. Panpradist N et al. Swab Sample Transfer for Point-Of-Care Diagnostics: Characterization of Swab Types and Manual Agitation Methods. *PLoS One*. 2014; 9: e105786.
- 14b. Landers TF, Hoet A, Wittum TE (2010) Swab type, moistening, and preenrichment for *Staphylococcus aureus* on environmental surfaces. *J Clin Microbiol* 48: 2235–2236.
15. Hernes SS et al. Swabbing for respiratory viral infections in older patients: a comparison of rayon and nylon flocked swabs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30:159–165.
16. Waris M, Osterback R, Lahti E, et al. Comparison of sampling methods for the detection of human rhinovirus RNA. *J Clin Virol*. 2013; 58:200–204.
17. Hagiya H et al. Is wet swab superior to dry swab as an intranasal screening test?. *J Intensive Care*. 2013; 1: 10.
18. Warnke P, et al. (2016) Utilizing Moist or Dry Swabs for the Sampling of Nasal MRSA Carriers? An In Vivo and In Vitro Study. *PLoS ONE* 11(9): e0163073.
19. Moore C et al. Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. *J Virological Methods*. 2008; 153: 84-9.
20. Seaman CP, et al. Self-collected compared with professional-collected swabbing in the diagnosis of influenza in symptomatic individuals: a meta-analysis and assessment of validity. *J Clin Virol*. 2019; 118:28-35.
21. Rodino KG. Evaluation of saline, phosphate buffered saline and minimum 1 essential medium as potential alternatives to viral transport media for SARS-CoV-2 testing. *J Clin Microbiol*. 2020, Online 30 March 2020. doi:10.1128/JCM.00590-20.



## Tests diagnósticos

### III. Aparatos, reactivos y personal

#### 13. ¿Hay suficientes aparatos y reactivos para realizar las pruebas diagnósticas?

Uno de los problemas que nos hemos encontrado a nivel mundial es la **escasez de reactivos** de todo tipo:

- **falta de material para la toma de la muestra** (hisopos y medio de transporte viral). El Servicio de Compras en el HUCA y los Servicios Centrales del SESPA han realizado un gran esfuerzo para aprovisionar de este material lo que ha dado a que a pesar de que el material habitual escasee se esté comprando otros hisopos y medio de transporte. Además, en el Servicio de Microbiología existe un stock de medio de virus que creemos es suficiente para abastecer a todas las Áreas sanitarias en estos momentos. Gracias a que nos hemos adelantado a este problema (con las partes implicadas citadas) podemos en estos momentos seguir haciendo los tests diagnósticos

- **falta de aparatos para realizar la PCR**. Aunque se ha nombrado en varios medios que esto es un problema podemos asegurar que hay suficientes aparatos en el Servicio de Microbiología para hacer frente a los tests que actualmente están entre 1000- 1200 al día. Además, en estos momentos el Hospital de Cabueñes, Hospital de Mieres, H. San Agustín de Avilés están realizando/ o en disposición de hacer también las PCR.

- **falta de reactivos para la PCR**. Este es un tema que ha sido acuciante debido a la escasez de los mismos. Afortunadamente no se ha llegado a producir el desabastecimiento por varios motivos: previsión y coordinación con el Servicio de Compras en el HUCA y los Servicios Centrales del SESPA con el Servicio de Microbiología, la existencia en la Sección de Virología de un stock dado el número de PCR que realiza anualmente y su conocimiento profundo de esta técnica con lo que se disponía de este conocimiento y la capacidad de poner en marcha otros aparatos de PCR de casas comerciales con los reactivos de PCR caseras, la evolución reciente del Servicio de Microbiología al incorporar métodos diagnósticos moleculares comerciales en otras Secciones del Servicio que ha supuesto tener varios aparatos que han dado una pequeña ayuda al disponer de algunos reactivos de estas casas. De todas maneras seguimos muy de cerca este tema para que las casas comerciales que nos suministran estos reactivos sigan haciéndolo dado que de algunos aparatos se ha llegado a tener pocos reactivos.

-**falta de fungible para la PCR**. Este es el tema que más nos preocupa actualmente dado que hay escasez también de material como puntas de pipetas que esperamos sigan sirviéndonos.

Otro de los aspectos a destacar es el **tema de personal** que gracias a la colaboración del Director del AGC de los Laboratorios del HUCA, y la Gerencia y Dirección Médica del





HUCA se ha podido tener para estar interrumpidamente las 24 h realizando el trabajo de secretaría (muchos de los problemas han venido por la fase preanalítica que están en vías de solución con los Servicios Informáticos del SESPA, Geslab etc.), TELs y facultativos ha supuesto que se haya podido hacer frente al ingente número de muestras recibidas. Por parte del Servicio se ha realizado un esfuerzo de derivar personal de otras secciones para apoyar este trabajo.

#### IV. PCR

##### 14. ¿Por qué se realiza una PCR para el diagnóstico?

Porque es el patrón oro y se realiza en la mayoría de hospitales del mundo con lo que hay experiencia en su uso e interpretación ya que es una técnica compleja que requiere un laboratorio equipado y personal entrenado.

##### 15. ¿Cómo se debe interpretar el resultado de una PCR? (European Centers of Disease Control- ECDC)

a. **¿En personas asintomáticas como se valora?.** Un valor de Ct >35 puede deberse a contaminación y debe confirmarse con una segunda diana. En nuestro laboratorio se usan 3 dianas.

b. **¿Los asintomáticos pueden tener una PCR positiva?.** Es posible tener una prueba positiva en asintomáticos

c. **¿Se debe repetir una PCR negativa?.** En algunos casos, las muestras de saliva/nasofarínge/ orofarínge puede en fases tempranas dar una PCR negativa (13c). Repetir después de 1-2 días y si negativo mejor del tracto respiratorio inferior. Esto es importante en el caso de un cuadro de neumonía viral, historia de exposición y/o hallazgos radiográficos. Además, en el caso de si va a tener impacto sobre la cuarentena y distanciamiento social.

En caso de negativos se debería investigar otros virus pero dado el volumen de muestras que se procesan esto es en estos momentos muy dificultoso.

d. **¿Cuál es la Persistencia del virus en muestras clínicas?.** Se ha visto hasta 22 días en tracto respiratorio y entre 2 semanas a >1 mes en heces. No ha sido probado la viabilidad en cultivo de virus. Algunos autores alertan de dar alta de pacientes con torunda oral y no comprobar en heces.

e. **¿Cuánto tiempo se consideran infecciosos y cuantos negativos necesitamos de PCR?.** Se sugiere que deja de ser infeccioso a los 7 días cuando es asintomático el paciente y 2 muestras negativas al menos >24 horas, ahora se considera que una sola PCR negativa es suficiente.

Wölfel R et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> (2020).



**f. ¿Cuánto tiempo puede permanecer positiva la PCR después de la infección aguda?.** Aunque puede permanecer positiva de 2 a 5 semanas, en publicaciones más recientes el tiempo es más corto.

**f. Infectividad de sangre, suero, orina.** Se aconsejan prácticas estándar de laboratorio y de precaución de su manejo sin más. En sangre o no hay o son viremias muy cortas y en orina no aparece.

Wölfel R et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> (2020).

13a. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. 2020; 20 March online.

## **16. ¿Por qué hay negativos y falsos negativos en la prueba de PCR?**

Hay que diferenciar entre un negativo que se produce cuando la carga viral es indetectable en la muestra y que se debe a la dinámica de infección del virus: en los primeros días está en vías respiratorias altas y a partir de los 7 días en vías bajas.

Otro aspecto son los falsos negativos debido a factores como:

- Error en la muestra de un paciente
- Toma inadecuada de la muestra: En nuestras muestras, alrededor de 15000, un 30% fueron tomas inadecuadas valorado con el control interno de la PCR, la betaglobina, que detecta la presencia o no de celularidad

## **17. ¿Cuántos negativos y falsos negativos se pueden esperar de la PCR?**

En China se ha visto que entre un 10-30%

## **18. ¿Cual es la diferencia entre sensibilidad analítica y sensibilidad clínica?**

**Sensibilidad analítica:** capacidad de un test de detectar un patógeno en una muestra clínica (13c)

**Sensibilidad clínica:** capacidad de un test para identificar el estado general de infección de un paciente. Este concepto depende de varios factores:

- a) Sitio de la toma de la muestra y método de recogida
- b) La carga (viral) en función de una localización anatómica, severidad de la infección y tiempo de estar asintomático
- c) Variabilidad de estos factores de un individuo a otro

## **19. ¿Qué valor tiene la carga viral?**

No será usado para indicar severidad o para monitorizar la repuesta terapéutica, sin embargo, valores de *Ct* bajos indican alta carga viral y pueden ser usada como indicativo de transmisibilidad (13c) como se ha puesto de manifiesto en:

Wölfel R et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> (2020).



## **20. ¿Qué es el test de curación y el test de infectividad? (13c)**

La monitorización de pacientes con resolución de la neumonía puede ser importante en términos de cuando cesar el aislamiento y el alta. Si se da de alta con virus viables puede infectar a otros. Por ello, la auto cuarentena hasta un mes puede ser aconsejable. Las muestras de nasofaríngeo y de orofaríngeo no son suficientes como test de curación o test de infectividad.

## **21. ¿Qué relevancia tiene el comentario en el informe de resultados de la PCR: “Baja celularidad”?**

Este comentario indica la buena o mala recogida de la muestra y es orientativo para explicar algunos resultados de PCR negativa. Es un indicador de calidad de la muestra.

**¿Qué actitud debe de tomar el personal que pide y realiza las tomas ante un resultado con “baja celularidad”?** Actualmente estamos restringiendo en lo posible este comentario en el informe de resultados a fin de que no se repita sistemáticamente una u varias PCR ya que en la mayoría de los casos se obtendrá el mismo resultado. Solo sería relevante repetirlo por ejemplo en una persona sintomática en la que si es posible se debería tomar de vías respiratorias bajas.

## **22. ¿Estamos haciendo el suficiente número de tests diagnósticos en Asturias?**

Este es un tema que ha salido repetidamente en los medios, en países que mejor han controlado la pandemia se esgrime como una de las razones el haber realizado tests masivos. Países como Corea del Sur o Alemania han sido de los que más han realizado pero por millón de habitantes el que más ha realizado es Noruega con unos 14000 por millón de habitantes. En Asturias llevamos unos 40000 por millón de habitantes y muy superior a la media en España que es mucho menor.

Por lo tanto, podemos decir que el Servicio de Salud con Vigilancia Epidemiológica han sido capaces de dar respuesta a este reto y estamos entre los sitios del mundo con más tests por habitante y llegando actualmente a sitios como Residencias geriátricas, profesionales sanitarios etc.

## **V. Tests rápidos de detección de antígenos**

### **23. ¿Sirven los tests rápidos que detectan antígeno en las muestras?**

En el posicionamiento de la SEIMC de estos tests se dice:

*“El elevado número de kits para detectar antígenos o anticuerpos hace que probablemente exista una elevada variabilidad en cuanto a indicadores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Por ello, la primera premisa sería **NO comprar un kit de detección de antígeno o anticuerpos sin antes evaluarlo y probarlo en una población que represente aquella en la que se va a utilizar en vida real**”.*



En este mismo documento de la SEIMC se dice sobre estos tests: “*si bien en el algoritmo que presentábamos en un documento previo (**Documento de posicionamiento de la SEIMC sobre el diagnóstico microbiológico de COVID-19**) y que se publicó el 23 de marzo se recogía la detección del antígeno como primer paso para detectar de una manera rápida la presencia del virus en muestras nasofaríngeas, lo condicionábamos a que tuviese una sensibilidad aceptable, entendiendo como aceptable superior al 70% y siempre en un contexto epidemiológico de elevada prevalencia. Hasta la actualidad las pruebas que se han realizado en España con estos kits de detección de antígeno basados en la inmunocromatografía (lateral-flow) presentan una **sensibilidad inferior a un 50%.***”

Dada la variabilidad de la carga viral en estos pacientes no detectan cargas bajas y además también hay variabilidad de la toma de la muestra por lo que tienen baja sensibilidad

## VI. Tests rápidos de detección de anticuerpos

### 24. ¿Sirven los tests rápidos que detectan anticuerpos en las muestras?

En el documento de la SEIMC se dice: “*Por otra parte, los **ensayos serológicos** no se usan de forma rutinaria para el diagnóstico de COVID-19 debido a que, en la fase precoz de la enfermedad, durante los primeros 5-6 días de iniciarse la sintomatología la respuesta inmunitaria es escasa, con un tiempo medio a los 11 días (<https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189>). La sensibilidad y especificidad de dichos métodos es también variable, variando en función del antígeno utilizado y del sistema de lectura utilizado [inmunocromatografía con oro coloidal o detección fluorimétrica versus enzimoimmunoensayo (ELISA o quimioluminiscencia)].*

Las principales aplicaciones de la detección de anticuerpos durante el COVID-19 serían:

- a) *Pacientes que acudan a urgencias o ingresen con más de cinco días desde del inicio de los síntomas.*
- b) *En casos con PCR repetidamente negativa en los que se hayan iniciado claramente los síntomas varios días antes. Es decir, para confirmar la infección cuando exista una sospecha de un falso negativo de la PCR.*
- c) *Detección de anticuerpos en personal sanitario que ayudarían a identificar a aquellos que ya están inmunes (presencia de IgGs) y puedan volver al trabajo para atender a pacientes infectados minimizando el riesgo de propagación del virus a colegas y otros pacientes.*
- d) *Para comprender la epidemiología del COVID-19, permitiendo también saber el papel que podrían haber tenido las infecciones asintomáticas.*
- e) *Definir exposición previa e identificar donantes humanos altamente reactivos para la generación de suero hiperinmune como aproximación terapéutica.*
- f) *Para trabajos de investigación (como posibles ensayos clínicos con plasma de pacientes inmunizados).*



g) *Para evaluación de la vacuna*”.

La FDA advierte de las limitaciones de los test serológicos, están solamente autorizados en la página Emergency Use Authorization (EUA), y el riesgo para pacientes y la comunidad si son usados solos en el diagnóstico. Estos test no han sido validados.

Personas con anticuerpos sugieren que se han recuperado o no están infectados actualmente con el virus y por tanto podrían ser capaces de reanudar el trabajo y las actividades de la vida diaria. Además, podrían cualificar a los donantes de sangre para elaborar plasma de la fase convalescente y usarlo como posible tratamiento en pacientes gravemente enfermos.

Por todo ello recomienda usarlos sabiendo sus limitaciones y sin usar solo para el diagnóstico, pero servirían para ver si la persona ha sido expuesta

FDA MedWatch: Use of Serological (Antibody) Tests for COVID-19-Letter to Health Care Providers

Las indicaciones en Nature:

- Ver si hay riesgo de infección
- Decisiones de alejamiento de distanciamiento y volver al trabajo
- Pasaporte inmunológico. Los test inmunológicos no miden anticuerpos neutralizantes por lo que no excluyen que no sean infectivos
- Diagnóstico de pacientes con síntomas y PCR negativos

Problemas “*No usar ningún test es mejor que usar un test malo*”:

- No asegura inmunidad ni tiempo a la reinfección debido a que no miden anticuerpos neutralizantes
- Ningún país los ha validado verdaderamente, se requieren cientos de muestras PCR positivas y negativas, y no están aprobados por la FDA
- Los test POC son peores, usan poca muestra de sangre pero dependerá de los estudios que se realicen para su validación.

Mallapaty S. Will antibody tests for the coronavirus really change everything?. Nature. 18 APRIL 2020. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-01115-z#ref-CR4>

Permite por tanto ver la carga de infección, el papel de las infecciones asintomáticas, el número reproductivo básico, y la mortalidad total.

Otro problema es la detección de la IgM ya que no es tan específica, y dado las semanas que requiere para que aparezca la respuesta de IgG no es probable que tenga un papel relevante en el manejo de casos excepto en diagnosticar/ confirmar casos tardíos o ver la inmunidad en profesionales cuando progresa el brote (13c).

**25. ¿Pueden dar reacción cruzada con otros coronavirus?**. Otro problema que pueden presentar los test serológicos es la reacción cruzada con coronavirus circulantes habituales en infecciones respiratorias como se ha visto en las previas situaciones epidémicas de SARS-Cov1 y MERS Cov.



Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls. Virus Research. 2014; 194: 175–183.

Despite the large number of assays developed in the aftermath of the outbreak of SARS- and MERS-CoV, serological differentiation of HCoV's remains challenging. Overall, it can be concluded that problems with cross-reactivity are more likely to arise with amore conserved antigen, and will often manifest as false positive results. Whether IF, ELISA or WB assays are the preferred screening tool depends on availability of molecular biological techniques, the exact study design as well as the number of samples. Compared to whole virus antigen, assays using recombinant proteins are in general more reliable and can be more easily standardized. Preferably, a recombinant serological assay should use an antigen which is highly immunogenic and provides epitopes specific for its virus species. In addition it is of importance that the protein is expressed in its natural conformation, i.e., displaying proper folding and gly-cosylation. As discussed above in case of coronaviruses only the S proteins combines all these features. Regardless of assay or antigen used, we recommend a thorough validation using a defined set of sera reactive with other HCoV's as well as a large number of negative serum samples from patients with other respiratory diseases. In any case, great care should be taken in selecting the most appropriate assay and the limitations of each assay should be considered when interpreting results.

De los test que hemos probado se incluye esta tabla con los resultados en los que a pesar de los pocos que nos han llegado se ve diferencia entre los tests comerciales.

Table with columns: Ref sistema, Fecha Serología, Fecha PCR, Dias desde la PCR positiva, and various assay results (Cinemas, Aseman, Hibandas, Peflex, Asturias, PALEX, MINISTERIO, TECL, Acufarma, ELISA, etc.). Includes a legend for interpretation (P, PD, D, N, L) and a note about antigen volume.

Tres de ellos (ALL Test, LAMBRA y Laccurate) parece que dan buenos resultados aunque no podemos sacar conclusiones debido al pequeño número de muestras analizadas. En Laccurate hemos detectado una menor especificidad en la detección de IgM que resolvimos repitiendo la prueba por una segunda técnica (sería bueno tener dos técnicas diferentes), en cuanto a la IgG da resultados muy claros.

26. ¿Están validados estos tests para sangre de pinchazo en el pulpejo del dedo?

Los datos que disponemos son validados en suero de los paciente por lo que faltan datos de su utilidad y siempre se deberán evaluar frente a la técnica de ELISA o quimioluminiscencia que son las más sensibles y fiables. En cualquier caso, no deberían ser los resultados muy diferentes a los realizados en suero.

27. ¿Es útil el algoritmo diagnóstico elaborado por el Centro de Majadahonda de empezar usando una prueba de anticuerpos?

En un escenario de 1000 tests diarios que realizamos, y con una sensibilidad máxima del 80% en nuestro caso, el número de positivos en las 1000 muestras sería del 10% en



estos momentos. Por lo tanto, quitaríamos sólo 80 muestras de no hacer la PCR. Ahora estamos ya en el 5% de positivos con lo que sería la mitad.

En cualquier caso, el uso de este test se enmarca en las actuaciones que se están poniendo en marcha desde la Consejería de Sanidad.

## 28. ¿Cómo se interpreta un test de anticuerpos?

Resultados Microbiológicos SARS CoV2			Significado Clínico
Detección Molecular (PCR)	Detección de Anticuerpos		
	IgM	IgG	
Indetectable	Negativo	Negativo	Negativo
Positivo	Negativo	Negativo	Período Ventana
Positivo	Positivo	Negativo	Estadio temprano de la infección
Positivo	Positivo	Positivo	Fase activa de la infección
Positivo	Negativo	Positivo	Fase final de la infección
Indetectable	Positivo	Negativo	No concluyente. Repetir PCR y anticuerpos
Indetectable	Negativo	Positivo	Infección pasada. Inmunidad
Indetectable	Positivo	Positivo	Confirmar curación con PCR

Nota: Una IgM positiva puede ser también un resultado inespecífico.

## 29. ¿Qué hacer en estos momentos en el HUCA?

### a. ¿Están validados los test de anticuerpos rápidos?

No, la FDA no ha validado ninguno

### b. ¿Están validados los test de anticuerpos en formato ELISA y quimioluminiscencia?

No, la FDA no ha validado ninguno

### c. ¿Se pueden usar entonces estos test en situación de pandemia?

Sí, la FDA en estas circunstancias lo permite

### d. ¿De las casas comerciales evaluadas con el ELISA/ Quimioluminiscencia, hay diferencias de sensibilidad entre ellas en los test de anticuerpos rápidos?

-La sensibilidad es un factor que es estimativo por nuestra parte ya que la FDA recomienda que se haga con cientos de muestras que sean PCR positivas y negativas, y en nuestro caso son unas pocas muestras. Por ello, nuestros datos son orientativos y no deberíamos hablar de sensibilidad de las muestras

-En la pregunta 25 damos datos de las que parecen mejores aunque la diferencia de sensibilidad puede no ser significativa



**e. ¿Qué sensibilidad, con los condicionantes expuestos, alcanzan estos test en comparación con el ELISA?**

En la pequeña muestra realizada y escogiendo el mejor test de anticuerpos rápido da una especificidad del 100% y una sensibilidad del 81,8% cuando se realiza con muestras con PCR positivas. En población asintomática esto puede ser menor.

**f. ¿Qué valoración se puede hacer del test del Ministerio que mide anticuerpos totales?**

Su teórica sensibilidad no parece inferior a los test de anticuerpos que detectan IgM e IgG

Como se observa en las fotografías presenta un inconveniente que es que la línea que aparece del positivo es mucho más tenue que algunos de los test que detectan separado IgG e IgM. Como indicamos anteriormente hay algunos que claramente son más fáciles de interpretar a simple vista por la banda más gruesa que aparece en el dispositivo.



**Figura 1** (de izquierda a derecha): Test realizado en sangre de dedo con Ac totales, Test en suero con el mismo reactivo del Ministerio y test en suero de otra casa comercial

**Figura 2** (de izquierda a derecha): Los mismos test pero vistos de lado (en el test del Ministerio se ve la banda muy tenue en comparación con la otra casa comercial)

**Figura 3:** Otra muestra en la que se sigue viendo tenue en el test de anticuerpos totales. Esto es crítico cuando haya pocos anticuerpos por lo que el personal debe extremar las precauciones al leerlo e interpretar como positivos los débiles y si es necesario leerlo de lado como se ve en la Figura 2.

**g. ¿Tienen ventajas los otros test rápidos que separan IgG e IgM?**

Claramente ayudan a establecer el momento de la resolución de la infección frente al de anticuerpos totales del Ministerio pero como se indica, la IgM presenta inespecificidad y en uno de los evaluados como se detalla en la pregunta 25 esto parece claro.





#### **h. ¿Por qué el Servicio de Microbiología recomienda disponer de sueros para estos pacientes?**

Como es conocido, es necesario disponer de sueros para realizar estudios de seroprevalencia ante infecciones como el coronavirus, enfermedades vacunables, etc y los laboratorios de Microbiología deben salvaguardar estas muestras durante al menos 5 años.

El suero se puede utilizar para evaluar estas técnicas y conocer el valor real en una situación real como la que estamos teniendo en estos momentos. Además, si hay cambio de proveedor el laboratorio evaluaría este nuevo test como se ha realizado con todos los que nos han llegado al laboratorio.

El suero se puede utilizar para realizar técnicas más sensibles como el ELISA y la Quimioluminiscencia

#### **i. ¿Cuál sería la mejor estrategia en estos momentos en el HUCA?**

En función de los resultados de “sensibilidad” y comentarios anteriores, y el uso que en algunos Servicios Clínicos se pretende hacer, propondríamos:

-Realizar el test rápido como un test de Point-of- Care (o a la cabecera del paciente) en zonas habilitadas para ello, por el personal de Enfermería, o quienes ellos designen, con la formación básica que se de a ese personal

-Este test se validaría, como hasta ahora, por el personal de enfermería al igual que se viene realizando y entraría en Geslab como test no informable al igual que viene ocurriendo actualmente con los test en la zona del parking. De esta forma Vigilancia Epidemiológica tendría los datos integrados de los test rápidos y ELISA si los hubiera como viene ocurriendo actualmente

-No realizar la extracción de sangre de rutina para serología, a menos que se indique para otro diagnóstico o que la interpretación del test sea dudosa y se quiera confirmar con el test rápido y el ELISA en suero en el Laboratorio de Microbiología. O en el caso de estudios de Seroprevalencia, como el estudio del Ministerio, o aquellos que quiera realizar Vigilancia Epidemiológica.

-Valorar la serología también por si en algunos profesionales o grupos de profesionales es interesante realizarlo, pero el dato de que <3% es seropositivo quiere decir que con el ELISA/Quimioluminiscencia en el mejor de los casos no llegaría a más del 5%

-Usar el test rápido del Ministerio hasta el fin de existencias y su sustitución por uno o varios de los que mejor salen evaluados en la comparativa en función también del coste. Este aspecto es importante ya que, aunque como indicamos no podemos hablar de sensibilidad, si se puede hablar de comodidad para la visualización del positivo por parte del observador.

-Reevaluar los circuitos de nuevo en función de lo anterior a fin de agilizar la entrada de pacientes y el trabajo de las Consultas.

#### **Recomendaciones finales a las pruebas diagnósticas:**

**Se debe realizar la PCR que es el patrón oro y repetir en caso de ser negativa y con sospecha de la infección.**



**Los tests diagnósticos de antígeno no tienen buena sensibilidad** y en un entorno de cada vez menos positivos en las muestras que nos llegan al laboratorio su utilidad sería todavía menor.

**Los tests diagnósticos de anticuerpos pueden ser útiles en las condiciones que se detallan más arriba** y pueden ayudar a definir positivos en el caso de pacientes ingresados con PCR repetida negativa. La llegada de **pruebas de ELISA hará que sea la prueba preferida para estudios poblacionales** ya que como la PCR se pueden hacer a la vez unas 96 muestras.

El esquema de trabajo propuesto en el HUCA, no quiere decir que sea trasposable a otros sitios. Se podría estudiar en otros sitios en función de personal, test diagnósticos, personal etc por lo que debe evaluarse en cada caso la conveniencia o no de este esquema de trabajo.

Se debe tener en cuenta también el **coste de los tests** que habrá que evaluar cuando pase la pandemia y la gestión realizada en Asturias con los kits que hemos realizado a un precio mucho más barato que en otras comunidades y como hemos indicado un número de test muy superior.

Finalmente incluimos la gráfica de la tendencia de muestras realizadas y positivos a lo largo de estos días:

