

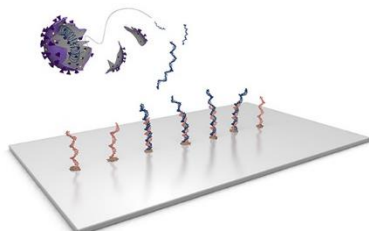
El informe solicitado por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación al GTM pretende conocer cuáles son los métodos de diagnóstico para la infección COVID-19, su validez, su interpretación y la posible comparación entre ellas. Tras una revisión de las técnicas disponibles y su intercomparación, se enuncian las principales conclusiones y se enumeran una serie de recomendaciones para el futuro inmediato.

Informe del GTM¹ sobre la validez e interpretación de las pruebas de diagnóstico para SARS-CoV-2

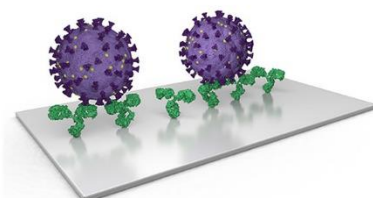
El objetivo principal de este informe es hacer una breve descripción y revisión de los diferentes sistemas y métodos de diagnóstico disponibles actualmente para la infección COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2. En términos generales, los métodos de detección se clasifican en dos estrategias directas y una estrategia indirecta, todas ellas bien diferenciadas y cada una con sus ventajas y limitaciones (ver Figura 1):

- 1) Detección del material genético del virus.
- 2) Detección de antígenos virales.
- 3) Detección indirecta de la infección mediante los anticuerpos generados en el organismo huésped infectado (pruebas serológicas).

1. Detección genética



2. Detección antígenos virales



3. Detección anticuerpos serológicos

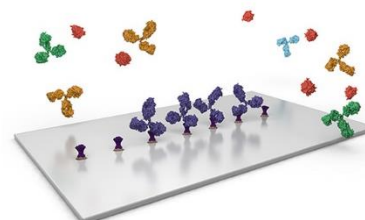


Figura 1. Métodos de detección y diagnóstico

¹ El Grupo de Trabajo Multidisciplinar (GTM) asesora y apoya al Ministerio de Ciencia e Innovación en materias científicas relacionadas con el COVID-19 y sus consecuencias futuras. El [GTM](#) está compuesto por: José M. Ordovás (Presidente), Mariano Esteban, Rocío García-Retamero, Beatriz González López-Valcárcel, Alfonso Gordaliza, Marco Inzitari, Pedro Jordano, Itziar de Lecuona, Laura M. Lechuga, Ramón López de Mántaras, José Molero, Agustín Portela, Diego Puga, José Javier Ramasco, Francisco Sánchez-Madrid y Alfonso Valencia. Enric Banda actúa como observador, y Maria Sol Serrano Alonso como secretaria. Todos los componentes del GTM colaboran de forma desinteresada con el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Introducción

La COVID-19, enfermedad producida por el virus SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo severo), perteneciente a la familia de coronavirus y al género betacoronavirus, de los que siete miembros infectan a humanos, fue declarada en fase de pandemia por la OMS (Organización Mundial de la Salud) el 11 de marzo de 2020 (1,2). Desde el inicio de la enfermedad, la colaboración científica a escala mundial ha sido ejemplar, permitiendo el clonaje y la secuenciación del genoma viral de ARN en un tiempo muy reducido (aparición del virus en noviembre/diciembre de 2019 y publicada la secuencia de 30.000 nucleótidos el 10 de enero de 2020). Esto se ha traducido en el rápido desarrollo de ensayos basados en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de los ácidos nucleicos virales (genoma viral o ARN replicativo, exclusivo de este virus). Esta estrategia de detección y elección del ARN genómico (estrategia de tipo 1 entre las enunciadas arriba) se ha convertido en la técnica de diagnóstico preferente utilizada en la clínica y a nivel epidemiológico por todos los países del mundo.

Las técnicas PCR están muy bien establecidas y presentan una elevada especificidad y sensibilidad. La detección de ácidos nucleicos virales permite saber si hay presencia de estos elementos del virus en un momento concreto, aunque no indica en qué momento de la infección nos hallamos, o si se trata de restos virales que ya no son infecciosos. Existe otro tipo de prueba PCR para la detección de ARN subgenómico viral, que sí es indicativa de multiplicación activa, pero es menos sensible que la del genoma viral, ya que depende de la fase infecciosa en la que se encuentre la multiplicación del virus, y por tanto, es menos utilizada.

Por otro lado, la generación de distintos tipos de anticuerpos (denominados también inmunoglobulinas) por parte del sistema inmunitario es una respuesta conocida que sigue una secuencia temporal y ayuda a identificar el momento del proceso infeccioso en que se encuentra el paciente. Por ello, se han desarrollado pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, lo cual permite la identificación de individuos que han sido huésped del virus, inclusive cuando estos han sido asintomáticos durante la infección. Es la estrategia 3 de las enunciadas al principio.

Las pruebas serológicas son cruciales por dos motivos: primero porque complementan la eficacia diagnóstica de la PCR, cuya sensibilidad no alcanza el 100% (3-5) y, en segundo lugar, porque “acota” temporalmente, de forma bastante fidedigna, el momento de la infección o la convalecencia en que se encuentra el sujeto infectado.

Por tanto, la combinación de ambas técnicas, detección de ácidos nucleicos y anticuerpos permite conocer si hay virus presente (PCR positiva) y si la infección está en etapas iniciales o bien ya ha transcurrido un cierto tiempo desde el comienzo de la misma. Por otro lado, la cuantificación e identificación de los tipos de anticuerpos

producidos permiten caracterizar la respuesta generada por el paciente frente a la enfermedad. Así, la detección y cuantificación de los distintos tipos de anticuerpos denominados inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina G (IgG), en respuesta a diferentes antígenos virales, permiten establecer el estadio de la enfermedad en que se encuentra el paciente. Estos estudios también son útiles para el seguimiento de la duración de la protección y memoria inmunológica, así como para identificar posibles donantes para la preparación de plasma de sujetos convalecientes con fines terapéuticos. En este sentido, existen numerosos tipos de pruebas que se han optimizado para detectar IgG, IgM e IgA frente a diferentes proteínas del virus SARS-CoV-2 (6,7). Conviene mencionar que con el tiempo, en personas que han pasado la infección, la cantidad de anticuerpos circulantes disminuye, pudiendo ocurrir que un sujeto que haya pasado la infección y tuviera anticuerpos circulantes en un momento dado se comporte como seronegativo en un momento temporal posterior.

A continuación se hace un análisis conciso de las tres técnicas de detección disponibles: ácidos nucleicos virales, antígenos virales y anticuerpos anti-virus, desarrolladas frente al SARS-CoV-2; diferentes variantes de estas técnicas diagnósticas ya están disponibles a nivel comercial.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2

1. Detección del virus por técnicas moleculares²

Los análisis con fines diagnósticos de COVID-19 basados en ácidos nucleicos ofrecen la detección del genoma vírico SARS-CoV-2 de forma directa y se considera el **método más sensible y temprano** de detección de una infección COVID-19. Previamente a la realización de las técnicas específicas de detección, hay que llevar a cabo la extracción y conversión del ARN viral a ADN mediante una reacción de transcripción reversa (RT). Se han desarrollado dos métodos principales, el RT-qPCR y el RT-LAMP. En ambos métodos es necesario que tanto la toma de la muestra como el manejo de la técnica se realicen en condiciones adecuadas de bioseguridad.

Generalmente, [la muestra a analizar con estos métodos es de dos tipos](#): 1) raspado con hisopo de la mucosa naso-faríngea u oro-faríngea; 2) muestra de saliva. El hisopo nasofaríngeo es la prueba de referencia ya que SARS-CoV-2 es detectable en dichas localizaciones anatómicas durante varias semanas después de la aparición de los síntomas (8-10). La sensibilidad de detección en saliva es similar o mayor (11,12) pero desde el punto de vista de bioseguridad tiene la ventaja de que el mismo paciente puede donar la muestra en un tubo. Se ha descrito que SARS-CoV-2 a menudo permanece en

² Con contribución de José María Bautista (Universidad Complutense de Madrid) y Marcos López Hoyos (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander).

saliva más tiempo que en la mucosa nasofaríngea (8), pero también que muestras nasofaríngeas positivas resultan negativas en saliva del mismo paciente (13,14). Otras muestras donde se han detectado ácidos nucleicos virales son el lavado bronco-alveolar, la lágrima, el suero, la orina y las heces, pero el riesgo inherente a su obtención en unos casos y la baja sensibilidad en otros hacen que estas muestras no sean utilizadas de manera habitual para el diagnóstico. En general, cuando se comparan los resultados de varios estudios que usan diferentes tipos de muestras se hace difícil recomendar un tipo de muestra específico dados los distintos contextos clínicos y la variabilidad de los métodos de extracción de ARN, de la PCR con el uso de diversos equipos y, sobre todo, de la calidad de la muestra (10). Por último, en situaciones de falta de reactivos y/o número de muestras muy elevado, que dificultan la realización del número adecuado de pruebas individuales, se ha planteado la realización de determinaciones en mezclas (*pools*) de muestras de varios pacientes como paso inicial. Se ha demostrado que utilizando esta aproximación la sensibilidad se mantiene con mezclas de hasta 8 pacientes (15).

La detección del ARN vírico mediante **RT-qPCR** ha sido la prueba de elección para la detección del virus SARS-CoV-2 debido a su alta sensibilidad. Esta técnica precisa de reactivos adecuados, que incluyen oligonucleótidos para la amplificación de genes virales y genes control humanos, las correspondientes sondas fluorescentes para la detección, y enzimas de retrotranscripción del ARN y de polimerización de ADN. Hay varios métodos descritos que han demostrado una alta sensibilidad y especificidad como el ensayo standard de RT-qPCR para SARS-CoV-2 (9,16,17). El protocolo de los CDC de los Estados Unidos utiliza cebadores que se dirigen al gen viral N, mientras que los del CDC de China utilizan cebadores que coinciden tanto con el gen N como con la región ORF1ab; los cebadores del Hospital Charité de Berlin se dirigen a los genes E, N y RdRp; los de los HKU de Corea del Sur a N y ORF1b-nsp14; y los del Instituto Pasteur (Francia) a RdRp IP2 y RdRp IP4 (16). Estos protocolos tienen en cuenta las zonas del genoma vírico más adecuadas para ser amplificadas de forma específica para este virus, con el fin de evitar falsos positivos por otros coronavirus. Estos métodos o variantes, que incluyen reactivos adecuados junto con controles positivos de amplificación, se comercializan en formato de kits por muchas compañías nacionales e internacionales ([ver Anexos 1 y 2](#)), y que utilizada por muchos laboratorios durante la pandemia, han demostrado poseer adecuada sensibilidad y especificidad adaptada en general a la mayoría de equipos de qPCR disponibles, aunque en algunos casos requieran de una calibración específica de algún marcador utilizado. Por último, se están comercializando pruebas diagnósticas que detectan simultáneamente al ARN del SARS-CoV-2 y el de otros virus respiratorios, como es el caso del sistema Xpert Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV (cepheid.com), que combina en una sola prueba SARS-CoV-2, gripe A y B y virus respiratorio sincitial (Xpert Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV). En estas pruebas de diagnóstico hay que considerar que se han detectado 7 tipos de coronavirus humanos, siendo los más peligrosos SARS-CoV-1 que apareció entre 2002-2003, MERS-CoV en 2012 y SARS-CoV-2 en 2019/2020, por lo que las pruebas tienen que diferenciar claramente los distintos tipos de virus.

El impacto de la pandemia a escala mundial ha provocado, en determinados momentos, el desabastecimiento de kits y reactivos en muchos laboratorios. Así, el desarrollo de herramientas propias para diagnóstico mediante qPCR y mediante la tecnología de amplificación isotérmica **RT-LAMP** “*Reverse Transcription Loop-mediated isothermal Amplification*” (LAMP), ha demostrado ser posible en algunos laboratorios, particularmente los de investigación que han colaborado con el diagnóstico de la población. Esta prueba amplifica el gen N de forma combinada con un método de detección colorimétrico. Actualmente está en fase de ensayos clínicos y validación, y aunque su sensibilidad puede ser algo menor que la RT-PCR, en algún caso llega al 100% con una especificidad del 98,7% (18).

El método de RT-qPCR tarda varias horas en completarse y requiere técnicos especializados, materiales como kits de extracción de ARN que podrían escasear, y equipos de extracción de RNA y de qPCR relativamente costosos y escasos. En estos momentos, dadas las alternativas de métodos que se han publicado (revisado en 19) se considera que es posible tener preparados en los laboratorios nacionales sistemas alternativos altamente eficaces basados en diseños o implementación de protocolos de pruebas ya optimizadas de COVID-19, que permitan una alta disponibilidad, con precisión y velocidad suficiente para pruebas generalizadas de COVID-19.

Además, se están desarrollando técnicas moleculares adicionales basadas en el **sistema CRISPR**, con alta sensibilidad. Actualmente hay tan solo un kit aprobado que emplea este sistema (<https://www.360dx.com/coronavirus-test-tracker-launched-covid-19-tests>) comercializado por Sherlock Biosciences, Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 kit (*Emergency Use Authorization*, EUA 5/6/2020), que utiliza *primers* específicos de N y Orf 1ab de SARS-CoV-2. La lectura se realiza en tiras reactivas (tipo *lateral flow*) con un tampón de detección.

Por último, se puede llevar a cabo la **secuenciación directa del virus** para determinar la secuencia genética del virus SARS-CoV-2 de un paciente determinado. Si bien su uso no está indicado para el diagnóstico de rutina, es de utilidad en la vigilancia epidemiológica de la Covid-19, permitiendo crear árboles filogenéticos que ayudan a estudiar la evolución y también a la detección de nuevas mutaciones, que pudieran tener implicación clínica en cuanto a la patogenicidad del virus. El grupo Illumina recibió el 9 de junio la aprobación (EUA) para comercializar el primer test de secuenciación NGS (*Next Generation Sequencing*).

Ver **Anexos 1 y 2** para una relación detallada de las pruebas diagnósticas comerciales y el estudio comparativo de sus características.

2.- Detección de antígenos virales

En este caso, la detección no es del material genético contenido en el interior del virión sino de proteínas virales presentes en el **virus entero**, en virus fragmentados y, a veces, como restos de células muertas por la infección. Generalmente, esta estrategia se basa en la detección de las proteínas estructurales (que son las que se encuentran en el virión) ya sean proteínas que se encuentran en la superficie externa, como sería la **proteína S**, o bien proteínas internas, como sería la **proteína N**, cuya detección sólo es posible en viriones rotos o en restos de células infectadas. La detección de estas proteínas virales se realiza mediante el uso de anticuerpos específicos, que se unen a estas proteínas (S o N) y permiten capturar virus enteros o sus fragmentos.

Esta técnica permite la detección del virus directamente en las muestras de pacientes (fluidos nasofaríngeos, saliva, etc.) sin necesidad de complicados pretratamientos de la muestra, por lo que sería la técnica más atractiva para un diagnóstico masivo de la población, sin necesidad de llevarse a cabo en laboratorios centralizados ni por personal experto. Estas pruebas rápidas de detección de antígenos están muy desarrolladas para otras patologías, utilizando el formato de inmunoensayo en tiras (*lateral flow*).

Desafortunadamente, los intentos de extrapolar esta tecnología de inmunoensayo en tiras al diagnóstico del SARS-CoV-2 no han dado sus frutos y está todavía en una fase de desarrollo. Existen al menos dos kits comercializados (<https://www.360dx.com/coronavirus-test-tracker-launched-covid-19-tests>):

- ArcDia internacional. MariPOC COVID-19 test. (CE mark 5/2020). Sensibilidad 88%, Especificidad 100%; Muestras nasofaríngeas.
- Quidel. Sofia 2 SARS Antigen FIS (EUA 5/8/2020)

También se han descrito otros (para una comparativa de sensibilidad y especificidad, véase <https://finddx.shinyapps.io/COVID19DxDxData/>):

- Biocredit Covid-19Ag
- Bioeasy 2019-nCov-Ag Fluorescence Rapid test kit (time resolved fluorescence)
- Bioeasy 2019-Novel coronavirus (2019-nCov) Ag GICA rapid test
- COVID19 Ag Respir.Strip
- SARS-Cov-2 antigen fluorescence rapid detection kit.

Sin embargo, las informaciones de las que se dispone para todas estas pruebas rápidas de antígenos son sumamente limitadas, incluso en las páginas webs de las empresas que las comercializan o desarrollan, por lo que este tipo de pruebas prácticamente solo se están usando en entornos de investigación.

Por otra parte, se están desarrollando dispositivos biosensores para detectar viriones completos, inmovilizando anticuerpos específicos frente a los antígenos del virus en la superficie del sensor. Usando la tecnología de biosensores, se puede conseguir una elevada **sensibilidad** así como proporcionar **valores cuantitativos**, es decir se puede determinar la carga viral en la muestra (especialmente útil para seguir la evolución de la enfermedad), todo ello con un reducido tiempo de análisis (15 minutos). Diversos laboratorios a nivel nacional, europeo e internacional están intentando adaptar sus tecnologías biosensoras previamente desarrolladas para el análisis directo del SARS-CoV-2, pero de momento no hay ninguna comercializada.

Ver **Anexos 1 y 2** para una relación detallada de las pruebas diagnósticas comerciales y el estudio comparativo de sus características.

Consideraciones sobre las pruebas de detección de virus por técnicas moleculares

En general, se puede considerar que el RT-qPCR de SARS-CoV-2, atendiendo a todas las publicaciones (revisadas en 17 y 19) y a la experiencia de uno de los grupos asesores de la UCM (> 25.000 muestras analizadas), tiene >98% de seguridad y fiabilidad diagnóstica. El contexto clínico y epidemiológico de cada caso puede ayudar notablemente en la interpretación del diagnóstico final; así como en aquellos casos dudosos lo haría la repetición de un nuevo ensayo con una nueva muestra para confirmar los resultados.

Se puede considerar que los sistemas de detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR son muy específicos y muy sensibles, llegando a obtener, en relación con curvas patrón adecuadas, una **carga viral mínima** de detección de 5-20 partículas virales (dependiendo del método y de la calidad de la muestra).

Hay que tener en cuenta que en el caso de las RT-PCR cualitativas (en las que se obtiene un resultado positivo o negativo), la alta sensibilidad de la prueba no permite distinguir entre muestras con alta carga de genoma viral de aquellas con cargas virales mínimas o restos de ARN viral no replicativo en las mucosas de los pacientes. En este sentido la detección del genoma viral no es predictivo de si el paciente está en la fase activa de la enfermedad con elevadas cargas virales y alto potencial de transmisión del virus, o si se trata de pacientes que ya no tienen enfermedad clínica, con mínima carga viral (o solo restos de RNA viral) y que no son contagiosos. Si bien esta situación se puede clarificar utilizando técnicas de PCR cuantitativa (RT-qPCR), que permiten cuantificar la carga viral. Esta técnica, si además se combina con análisis serológicos, puede ayudar a distinguir por ejemplo entre pacientes asintomáticos con altas cargas virales que estén diseminando el virus, de aquellos que ya están en la fase final de la infección con cargas virales muy bajas, y con muy bajo nivel de contagiosidad. Por otra parte, la calidad de la muestra puede provocar casos de falsos negativos al no contener virus o poseer una cantidad importante de inhibidores de las reacciones enzimáticas.

Aunque un cierto número de hospitales en España cuentan con robots (Opentron) que automatizan el procedimiento hasta tener las placas de PCR cuantitativa preparadas para introducir en el termociclador, quizás uno de los factores más limitantes en el análisis de grandes volúmenes de muestras sea la escasez de equipos de extracción automatizada de ARN en muchos laboratorios. Ello ha conducido a que se desarrollen métodos de RT-PCR directamente de muestras biológicas (19), aunque estos no alcanzan siempre las altas sensibilidades de una extracción previa de ARN.

3.- Detección de anticuerpos frente al virus.³

En este caso se estudian los anticuerpos, generados frente al virus, en muestras de sangre, suero, plasma o saliva. Entre los antígenos virales, que se emplean con dicho fin, son la proteína *Spike* (o sus subunidades: S1 y el fragmento que incluye el “*receptor binding site*”, RBD) y la proteína de la nucleocápsida (N) (20-27). Habitualmente las pruebas detectan bien anticuerpos totales o los diferentes isotipos IgM, IgG e IgA. Conceptualmente, las IgMs suelen aparecer entre los días 5-7 tras la infección, mientras que los de tipo IgG aparecen a las dos semanas tras la infección, con un valor máximo a día 21. Los de tipo IgA tienen una cinética de aparición similar a la IgM, pero puede detectarse durante más tiempo.

Sin embargo, una de las características de la infección por el SARS-CoV-2 es que los anticuerpos IgM, e IgG pueden ser detectados tanto de forma secuencial como simultáneamente (20). En la mayoría de las ocasiones los anticuerpos IgM, IgG e IgA son detectados simultáneamente en sangre de personas infectadas por el SARS-CoV-2. En cuanto al momento y duración de la seroconversión (cambio de IgM a IgG), este depende sobre todo del tiempo transcurrido tras la infección, de su gravedad y del antígeno utilizado para la determinación, pudiendo detectarse la presencia de IgM en ocasiones hasta dos meses tras el comienzo de los síntomas.

³ Con contribución de África González (Universidad de Vigo), Eva Martínez-Cáceres (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona), Jorge Carrillo (IrsiCaixa, Badalona) y Marcos López Hoyos (Hospital Marqués de Valdecilla, Santander)

APARICIÓN DE LOS ANTICUERPOS IgM e IgG

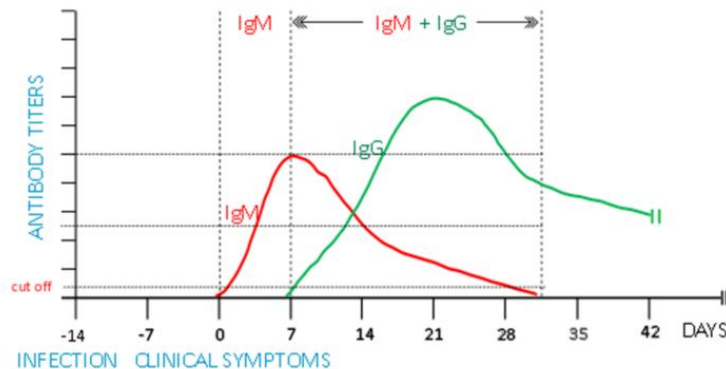


Figura 2. Cinética de aparición de los anticuerpos de tipo IgM e IgG

Las pruebas que se emplean para la detección de anticuerpos anti-SARS-Cov-2 incluyen:

3.1. Test rápido (lateral flow).

Es muy rápido (minutos) y requiere tan solo una gota de sangre. Es cualitativo, por lo que no detecta cantidad, sino solo presencia o ausencia de anticuerpos. Facilita el diagnóstico de infección, y es útil para estudios de sero-prevalencia masivos. Sin embargo, suelen mostrar una baja sensibilidad en los primeros días tras la aparición de los síntomas, por lo que se debe de tener cautela con los resultados negativos. La sensibilidad se incrementa con el tiempo tras la infección. La detección aislada de IgM positiva, sin cambio de isotipo a IgG en los días posteriores, puede deberse a **falsos positivos**, asociados a esta técnica.

Hay una gran variedad de pruebas comerciales (al menos 89 test de diagnóstico rápido), uno de ellos con lector. ([Anexo 2](#))

3.2. Técnica de ELISA.

Es una técnica muy sensible y permite identificar los isotipos de anticuerpos y semi-cuantificar (por falta de estándares internacionales) sus títulos. Requiere del uso de equipos especializados con instrumental específico, por lo que el tiempo de análisis es de aproximadamente 2 horas. Puede usarse para la detección de anticuerpos en cualquier fluido corporal, pero en su uso más habitual se emplea suero o plasma.

Hay varios kits comerciales y también desarrollos propios por parte de Hospitales y centros de investigación.

3.3. Técnica de inmunoquimioluminiscencia y variantes (con micropartículas, electroquimioluminiscencia).

Emplea suero o plasma. Al igual que el ELISA es una técnica muy sensible, pero requiere equipos especializados y es de larga duración. Son las pruebas que se están empleando actualmente en los laboratorios centralizados de los hospitales.

3.4. Dispositivos Biosensores

Es una técnica que aporta una elevada sensibilidad, reproducibilidad y, de manera especialmente interesante en el caso de las pruebas serológicas, una respuesta cuantitativa, lo que permitiría el seguimiento de los niveles de anticuerpos y, por tanto, de la evolución de la enfermedad. Esta técnica permite un análisis directo en muestras de suero de los pacientes sin necesidad de pretratamiento ni de amplificación de la señal y pueden incorporarse en formato portátil tipo “POC” (*point-of-care*) para su utilización en cualquier emplazamiento. Estas tecnologías se emplean en laboratorios de investigación y aún no está comercializadas.

Ver Anexos 1 y 2 para una relación detallada de las pruebas diagnósticas comerciales y el estudio comparativo de sus características.

Consideraciones sobre las pruebas serológicas

A continuación, se detalla la problemática asociada a la aplicación de estas pruebas.

- 1.- Diferente sensibilidad/especificidad de los distintos ensayos, y por tanto con diferentes porcentajes de resultados de falsos positivos o falsos negativos. Hay varios ensayos disponibles, pero aún faltan estudios comparativos (22).
- 2.- Los antígenos empleados son diferentes y en ocasiones no se indican en las pruebas (proteína S, N, RBD, etc). Habitualmente los empleados en los auto-analizadores de quimioluminiscencia van dirigidos frente a la proteína N.
- 3.- Posible reacción cruzada con anticuerpos frente a otros coronavirus (28-29).
- 4.- Aportan información diferencial en función de las distintas fases de la enfermedad. Es importante discriminar entre etapa temprana (día 1-7 tras infección), intermedia (8-14 días) y tardía (> 14 días) tras el inicio de la enfermedad. La sensibilidad en sujetos que han tenido PCR positiva y con más de 22 días de seguimiento es superior al 95%.
- 5.- Interpretación errónea de los datos. Es frecuente asociar presencia de anticuerpos IgM a presencia viral, sin tener en cuenta que anticuerpos tipo IgM específicos frente al virus podrían permanecer en sangre hasta dos meses tras la infección inicial.
- 6.- Algunas pruebas detectan anticuerpos totales, otros IgM/IgG, y otros los diferentes isotipos (IgA, IgG, IgM) o combinaciones.
- 7.- No hay material de referencia internacional, por lo que se establece un *cut-off* de positividad mediante el empleo de sueros de positividad conocida, o bien se emplean diluciones de los sueros de los pacientes para hacer una estimación más cuantitativa. Hay enormes dificultades para comparar los resultados ofrecidos por distintos autores y centros, y por tanto, hay controversias entre los distintos artículos publicados.

Principales conclusiones

La rápida extensión del contagio por SARS-CoV-2 ha mostrado la importancia de disponer de pruebas diagnósticas y seguimiento sensibles y específicas, que puedan identificar de manera fiable a los pacientes infectados por el virus, así como a aquellos que han generado protección frente al mismo, tanto si han padecido los síntomas de la COVID-19 como si han sido asintomáticos.

El primer diagnóstico con sospecha de infección se realiza por identificación de los ácidos nucleicos virales. La técnica recomendada es la PCR en muestras de fosas nasales/garganta, que es una técnica muy sensible y específica, e indica la existencia de infección activa en el paciente. Se ha descrito que la cantidad de partículas virales (carga viral) detectables mediante PCR es máxima dentro de los primeros 7 días de la infección, si bien los ácidos nucleicos virales pueden ser detectados también en fases posteriores. Un porcentaje variable de pacientes puede dar resultados negativos aun estando infectados, debido a distintos factores asociados con la dinámica de la carga viral y con la obtención y procesamiento de la muestra. Por ello, es recomendable la combinación con pruebas serológicas, así como la realización de PCR seriadas en caso de clínica compatible.

Las pruebas serológicas para la determinación de distintos tipos de anticuerpos (IgG, IgA, IgM) permiten además la identificación de individuos que han sido hospedadores del virus aun cuando ya no tienen una infección activa, incluyendo pacientes asintomáticos. Las técnicas recomendadas son ELISA (Enzimoimmunoensayo) o CLIA (Quimioluminiscencia), por sus altos niveles de sensibilidad y especificidad. Las pruebas serológicas son cruciales por tres motivos: en primer lugar, como se ha comentado, complementan la eficacia diagnóstica de la PCR; en segundo lugar, proporcionan información valiosa para aproximar temporalmente el momento de la enfermedad en la que se encuentra el sujeto (IgM e IgA: detectados fundamentalmente en etapas tempranas de la infección; IgG: detectados a partir de la segunda semana de infección); por último, permiten la realización de estudios de prevalencia de la enfermedad en la población o en colectivos de interés.

Es por tanto crítico el empleo de pruebas diagnósticas de elevada fiabilidad, que haya sido demostrada en ensayos bien controlados con un número suficientemente elevado de muestras analizadas.

Otro aspecto importante reside en la necesidad de analizar en detalle datos contrastados procedentes de estudios poblacionales realizados en un número significativo de pacientes y con seguimiento en el tiempo (como el llevado a cabo recientemente por el ISCIII), especialmente en relación con el estado inmunológico de la población general y del personal sanitario y servicios esenciales en particular, para poder tomar decisiones adecuadas en la planificación de medidas de cara a nuevos brotes de la enfermedad.

Recomendaciones

- Llevar a cabo pruebas diagnósticas en individuos sintomáticos y en todos los contactos directos de pacientes con infección activa, diagnosticada mediante PCR. Realizar pruebas conjuntas de PCR (ácidos nucleicos virales) y serológicas (respuesta de anticuerpos), para aumentar la potencia diagnóstica de los test PCR y tener un mapa global de la prevalencia de la infección y de la presencia de inmunidad protectora en la población general y en sectores de especial interés.
- Emplear pruebas PCR y serológicas (ELISA/CLIA) con sensibilidad y especificidad probadas por encima del 95%.
- Es imprescindible la estandarización de pruebas (tipo y fiabilidad diagnóstica) en todo el territorio nacional, para poder llevar a cabo estudios epidemiológicos con datos homogéneos.
- Extremar la cautela en la interpretación de los test rápidos serológicos por sus bajos niveles de sensibilidad, así como con la de la detección de diferentes tipos de anticuerpos (IgM, IgA e IgG) en el curso de las diversas fases de la infección y respuesta inmune.
- Invertir en la investigación de nuevos métodos y pruebas inequívocas de diagnóstico, cuya disponibilidad constituye un cuello de botella en el control de la pandemia. Es prioritaria la inversión en investigación y desarrollo de estas pruebas a escala nacional, para evitar el desabastecimiento producido por la dependencia de reactivos procedentes de otros países en fases críticas.
- Necesidad de reforzar la adquisición de reactivos y equipos necesarios para diagnóstico y seguimiento, ante la eventual llegada de subsecuentes olas de la enfermedad.
- Potenciar la investigación de formas adicionales de inmunidad no detectables en las pruebas serológicas (como la inmunidad celular), así como el desarrollo de pruebas analíticas para su adecuada evaluación, para mejorar la eficacia diagnóstica y obtener datos más cercanos a la realidad sobre el grado de protección de la población.

Bibliografía

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-33.
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of V. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-44
3. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta.* 2020;505:172-5.

4. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis*. 2020.
5. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020.
6. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med*. 2020.
7. Bryant JE, Azman AS, Ferrari MJ, Arnold BF, Boni MF, Boum Y, et al. Serology for SARS-CoV-2: Apprehensions, opportunities, and the path forward. *Sci Immunol*. 2020;5(47).
8. Wölfel et al. (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*; doi:10.1038/s41586-020-2196-x
9. Centers for Disease Control and Prevention (2020) CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. CDC, Atlanta (<https://www.fda.gov/media/134922/download>).
10. Lombardi et al. (2020). Characteristics of 1,573 healthcare workers who underwent nasopharyngeal swab for SARS-CoV-2 in Milano, Lombardy, Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2020; S1198-743X(20) 30354-2. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.013
11. Williams et al. (2020). Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*; doi: 10.1128/JCM.00776-20
12. Wyllie, et al. (2020). Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. medRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835>
13. Lu, et al. (2020). Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. medRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.20092338.t>
14. Santosh, et al (2020). A review of salivary diagnostics and its potential implication in detection of Covid-19. *Cureus*, 12(4).
15. Be-Ami, R., et al. Large-scale implementation of pooled RNA-extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.17.20069062v2>
16. Corman, et al. (2020) Diagnostic Detection of Wuhan Coronavirus 2019 by Real-Time RT-PCR; World Health Organization: Geneva, 2020. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>
17. Udagama et al. (2020) Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano*. doi:10.1021/acsnano.0c02624
18. Baek Y H et al., (2020). *Emm Microb Infect* doi: 10.1080/22221751.2020.1756698
19. Esbin et al., (2020) Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA* 2020. 26: 771-783. doi: 10.1261/rna.076232.120.
20. Long, Q. X., et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature medicine*, 1-4 (2020)
21. Petherick, A. Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet* 395 (10230): 1101-1102 (2020)
22. Van Elslande, J., et al., Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun. IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.023> (2020)
23. Callow, KA. Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. *J Hyg (Lond)*. 95(1):173-189 (1985)
24. Hou, H., et al. "Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019." *Clinical & translational immunology* vol. 9,5 e01136. (2020)
25. Fafi-Kremer, S., et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *medRxiv* 2020.05.19.20101832 (2020)
26. Robbiani, D.F., et al. Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2 Infection in Convalescent Individuals. *bioRxiv* 2020.05.13.092619(2020)
27. Ng, D., et al. SARS-CoV-2 seroprevalence and neutralizing activity in donor and patient blood from the San Francisco Bay Area. *medRxiv* 2020.05.19.20107482 (2020).
28. Chan, K-H., et al. Cross reactive antibodies in convalescent SARS patient's sera against emerging novel human coronavirus EMC (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. *J Infection* 67(2) 130-140 (2013)
29. Huibin Lv, et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *bioRxiv* 2020.03.15.993097 (2020)

Validez e interpretación de las pruebas de diagnóstico para SARS-CoV-2
(ANEXOS)

ANEXO 1

Aplicación que compara los distintos test diagnósticos en relación a su sensibilidad y especificidad, las muestras analizadas, y los artículos en los que está basado

<https://finddx.shinyapps.io/COVID19DxDData/>

ANEXO 2

Test comercializados para diagnóstico.

<https://www.360dx.com/coronavirus-test-tracker-launched-covid-19-tests>

Ultima actualización: 19 de Junio 2020.

En esta web se comparan distintos test serológicos

(<https://covidtestingproject.org/>) y publicado

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.25.20074856v1.full.pdf>