

VALIDACIÓN CLÍNICA DE UN TEST SEROLÓGICO RÁPIDO SEMICUANTITATIVO PARA PACIENTES INFECTADOS DE COVID-19 Y DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN SANITARIA

J.G. Soto Campos¹, A. Cebolla Ramírez², I. Mendia Azkoaga², J.C. Alados Arboleda³, S. Pérez Cortés⁴, J.A. Córdoba⁴.

¹Unidad de Gestión Clínica de Neumología y Alergia. Hospital Universitario de Jerez. Cádiz, España.

²Biomedal S.L. Sevilla, España.

³Unidad de Gestión Clínica Infecciones de Hospital Universitario de Jerez. Cádiz, España.

⁴Unidad de Gestión Clínica de prevención, promoción y vigilancia de la Salud. Hospital Universitario de Jerez. Cádiz, España.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio era doble. Por un lado, se evaluó la validez diagnóstica de un método rápido semicuantitativo inmunocromatográfico de fluorescencia resuelta en el tiempo (LFIA-TRF) que determina niveles de IgM e IgG y, por otro lado, se realizó un estudio de seroprevalencia entre trabajadores sanitarios.

Métodos: Para la validación diagnóstica se analizó una muestra de voluntarios (n = 75) con el LFIA-TRF, a los que previamente se les había realizado la prueba de RT-PCR para confirmar o desmentir la posible infección por SARS-CoV-2. Finalmente, se seleccionó aleatoriamente una muestra de profesionales de salud directamente implicados en el cuidado de enfermos infectados por SARS-CoV-2 para determinación de IgM/IgG por LFIA-TRF.

Resultados: Los niveles de fluorescencia relativos considerados positivos oscilaron entre 0,85-707 U/L para IgG y 0,75 - 64,5 U/L para IgM. La sensibilidad fue del 100%, la especificidad del 95,4%, el valor predictivo positivo (VPP) del 76,9%, y el valor predictivo negativo (VPN) del 100%. De los 77 trabajadores sanitarios, 4 resultaron positivos en serología, el 5,2%, superando la seroprevalencia de la población de la comunidad.

Conclusiones: Los LFIA-TRF, sobre todo el resultado de la IgG, mostraron una buena sensibilidad y utilidad clínica, tanto para determinar el curso de la infección del SARS-CoV-2, como para realizar estudios de seroprevalencia.

Palabras clave: anticuerpo, COVID-19, SARS-CoV-2, prueba rápida, inmunoensayo de flujo lateral, serología.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was two-fold. On one hand, the diagnostic validity of a semiquantitative rapid time resolved fluorescence immunochromatography method (LFIA-TRF) to determine IgM and IgG levels was evaluated and, on the other hand, a seroprevalence study was carried out among healthcare workers.

Methods: To validate the diagnosis, a volunteer sample (n=75) was analyzed with LFIA-TRF after previously undergoing an RT-PCR test to confirm or rule out a possible SARS-CoV-2 infection. Finally, a sample of healthcare professionals directly involved in caring for patients infected with SARS-CoV-2 was randomly selected to determine IgM/IgG using LFIA-TRF.

Results: The relative fluorescence levels considered positive ranged from 0.85-707 U/L for IgG and 0.75-64.5 U/L for IgM. The sensitivity was 100%, the specificity 95.4%, the positive predictive value (PPV) 76.9% and the negative predictive value (NPV) 100%. Of the 77 healthcare workers, 4 had positive serology, with 5.2% exceeding the seroprevalence in the community population.

Conclusions: LFIA-TRF, especially the IgG result, showed good sensitivity and clinical utility both in determining the course of SARS-CoV-2 infection and to carry out seroprevalence studies.

Keywords: antibody, COVID-19, SARS-CoV-2, rapid test, lateral flow immunoassay, serology.

INTRODUCCIÓN

La COVID 19 es la enfermedad infecciosa causada por el coronavirus SARS-CoV-2. Tanto este nuevo virus como la enfermedad que provoca eran desconocidos antes de que estallara el brote en Wuhan (China) en diciembre de 2019¹. La rápida expansión de este virus por todo el mundo hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara una pandemia mundial el 11 de marzo del 2020.

La pandemia de la COVID-19 es un evento repentino¹⁻⁵, que está causando una carga económica dramática, comprometiendo la calidad de vida de la población

confinada y limitando los recursos de salud pública para atender a los pacientes más débiles.

Alrededor del 20% de los pacientes infectados requieren hospitalización y el 5%, cuidados intensivos con la consiguiente limitación de la disponibilidad de camas, atención médica y dispositivos de asistencia respiratoria. Hasta el 17 de mayo de 2020, se ha informado de más de 6,5 millones de casos de la enfermedad en más de 213 países y territorios en el mundo.

El diagnóstico oportuno y preciso es muy importante para la detección, la terapia de los pacientes y el seguimiento evolutivo de la enfermedad, incluso hasta

Recibido: 21.01.2021 Aceptado: 16.03.2021

Dra. Irati Mendia
irati.mendia@biomedal.com

después de la curación, sobre todo para el seguimiento de la inmunización de la población.

En la práctica clínica, el estándar de detección del SARS-CoV-2 es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR por sus siglas en inglés). Esta prueba se basa en la detección de varias regiones (al menos dos) genómicas virales del SARS-CoV-2 como el Gen E+ que codifica la proteína envoltante, el Gen N que codifica la proteína de la nucleocápside, o el gen ORF1ab que codifica proteínas con un papel vital en la patogenicidad del virus. Si la RT-PCR se ha convertido en "gold-standard" es gracias a que posibilita una detección temprana del virus, debido a que permite amplificar niveles bajos del mismo.

Sin embargo, el rendimiento de la RT-PCR depende en gran medida del ARN diana seleccionado y de los cebadores empleados, demostrando muchas veces un porcentaje no despreciable de falsos negativos⁶. Además, el diagnóstico mediante la detección de ácido nucleico tiene varias limitaciones, como tiempo y coste elevados, la necesidad de personal cualificado y equipos, o un fácil riesgo de contaminación, que tienen consecuencias serias en la gestión de enfermos. Frente a ellas las pruebas basadas en la inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA, *lateral-flow immunocromatography*) al realizarse cerca del paciente (*Point-of-Care*) y ser pruebas rápidas, pues el resultado se genera en unos 15 minutos, se han presentado como alternativa barata, rápida y que no requiere de equipamiento ni personal cualificado. Asimismo, supera las limitaciones para identificar infecciones pasadas, recuperadas y asintomáticas. Los LFIA pueden basarse en la detección de antígeno, proteínas virales, o anticuerpos.

Las pruebas LFIA de anticuerpos permiten detectar distintos tipos inmunoglobulinas (normalmente la IgM e IgG, debido a que son mayoritarias). Actualmente existen en el mercado español más de 60 kits con marcado CE que permiten detectar anticuerpos (IgA, IgM o IgG) frente a SARS-CoV-2.

La sensibilidad y especificidad clínica aportada por estos test suele depender del estadio de la enfermedad, yendo en aumento de la primera semana de infección a la tercera, permitiendo detectar infecciones desde el día 0 de la infección hasta el día 53⁷. Además, los valores de sensibilidad de los test de inmunocromatografía que recogen los fabricantes en su información comercial pueden no ser del todo fiables ya que la validación ha sido efectuada de forma apresurada por la necesidad urgente de métodos rápidos en la pandemia y con un número de muestras pequeño⁸.

Este tipo de inmunoensayos aúna la sencillez de los métodos rápidos con una alta sensibilidad, la trazabilidad y proporcionar además información sobre la clase y los niveles de respuesta inmunológica. Además, la

combinación de los métodos diagnósticos de flujo lateral cercanos al paciente (*Point of Care*) con un lector permite la interpretación y medición de la señal de estos inmunoensayos⁹.

El presente trabajo de investigación constituye un estudio de evaluación clínica de una prueba diagnóstica para determinar niveles de IgM o IgG anti-SARS-CoV-2, con tecnología fluorescente de tiempo resuelto de última generación; que combina una alta sensibilidad, con un amplio rango dinámico y la capacidad de registrar los resultados de forma que puedan permitir la trazabilidad de los mismos. Se compararon con el resultado de la detección de ARN viral mediante RT-PCR en pacientes afectados por COVID-19. También se pretendió ver la utilidad de estos test para detectar respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2 en profesionales de salud altamente expuestos a esta infección por sus condiciones laborales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional para confirmar la validez de una técnica serológica, y evaluar la utilidad de esta técnica para determinar la incidencia de profesionales que trabajan en contacto cercano con pacientes afectados por COVID-19 en el Hospital de Jerez. El número de voluntarios incluidos en este estudio fue delimitado por el número de test disponibles en el momento debido a limitaciones en la cantidad que podía facilitar el fabricante en aquellas circunstancias.

Se consideró como muestra poblacional a sujetos mayores de 18 años, que estuvieran trabajando o ingresados en el Hospital de Jerez durante marzo y abril 2020. Fue imprescindible obtener el consentimiento consciente de los sujetos para su inclusión en el estudio. El estudio se realizó de acuerdo con las pautas de *Good Clinical Practice* (International Conference of Harmonization) y la regulación local siendo aprobado por el Comité de Ética Independiente del Hospital Universitario de Jerez, Cádiz, España, bajo el código 0975-N-20.

2. Poblaciones de estudio

En una primera fase para la validación, se reclutaron, por un lado, voluntarios confirmados para COVID-19, tanto pacientes hospitalizados ($n = 10$) y no hospitalizados ($n = 3$) con confirmación virológica reciente de infección por SARS-CoV-2 por RT-PCR o sintomatología, y por otro lado, voluntarios que no mostraban síntomas previos y habían obtenido un resultado en RT-PCR de SARS-CoV-2 entre los 1 y 30 días previos a la realización del test serológico, este grupo también estaba dividido en una población sana ($n = 58$) y una enferma ($n = 4$) pero con otras patologías diferentes a la COVID-19. Los grupos control negativo ($n = 62$) y positivo ($n = 13$) son necesarios para la validación de una técnica; el grupo control negativo

es necesario descartar posibles reacciones cruzadas con inmunoglobulinas del mismo tipo.

En segundo lugar, el estudio continuó con una muestra aleatoria entre profesionales de la salud que trabajan con pacientes con COVID-19 de las unidades de Medicina Interna, Enfermedades Infecciosas y Neumología (n = 77).

3. Diagnóstico

Los registros médicos se revisaron entre marzo y abril de 2020. Los datos recopilados incluyeron: datos demográficos, historia clínica, que incluía comorbilidades, valores analíticos (ferritina, dímero D, RT-PCR del SARS-CoV-2, procalcitonina, AST, ASL, LDH, recuento celular sanguíneo).

3.1. Sintomatología

Los pacientes se consideran enfermos de COVID-19, bien cuando presentan un cuadro clínico compatible con infección respiratoria aguda (inicio súbito de cualquiera de los siguientes síntomas: tos, fiebre, disnea) de cualquier gravedad y en los 14 días previos había mantenido contacto con un enfermo por COVID-19 o había viajado a áreas con evidencia de transmisión comunitaria. Las áreas consideradas actualmente se pueden consultar en el siguiente enlace: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/areas.htm> (consultado el 1 de mayo del 2020). O bien, cuando se encontraban hospitalizadas por una infección respiratoria aguda con criterios de gravedad (neumonía, síndrome de distrés respiratorio agudo, fallo multiorgánico, shock séptico o ingreso en UCI) en la que se descartaron otras posibles etiologías infecciosas que justificaran el cuadro (resultados negativos para un panel de virus respiratorios, incluyendo gripe).

3.2. Prueba RT-PCR para SARS-CoV-2

El test de diagnóstico por RT-PCR utilizado se realizó en muestras de tracto respiratorio, según recomendaciones del Ministerio de Sanidad⁸. El kit empleado para la extracción fue MagCore (R) Viral Nucleic Acid Extraction kit (RBC Bioscience Corp, Belgium), y el test se realizó con VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit (Certest Bioetc SL, Zaragoza, España).

3.3. Prueba serológica

Los test serológicos se realizaron con el suero sanguíneo extraído a los voluntarios del estudio. Se analizaron dos test complementarios adquiridos por Biomedal S.L (Sevilla, España) al fabricante (Beijing Diagreat Biotechnologies Co. Beijing, China). Dichas pruebas de flujo lateral se ejecutaron de forma simultánea, detectando IgM e IgG por inmunofluorescencia de tiempo resuelto.

- Diagreat® (Beijing, China): 2019-nCoV IgM Antibody detection Kit, para la detección de anticuerpos IgM.
- Diagreat® (Beijing, China): 2019-nCoV IgG

Antibody detection Kit, para la detección de anticuerpos IgG.

Todos los test se ejecutaron en un mismo día por personal de laboratorio cualificado siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la lectura de los resultados es necesario acoplar el test a un lector, D10 Time-Resolved Immunofluorescence Analyzer (Diagreat, Beijing, China) cuyo resultado se indica en forma de unidades relativas (semicuantitativa), y considera valores superiores a 1 U/L de anticuerpo como positivo, para ambos anticuerpos, IgM e IgG, siendo la precisión del test de $1 \pm 0,2$ U/L.

4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como porcentajes, frecuencias y número de observaciones para las variables cualitativas y como medias con intervalo de confianza (IC 95%) o mediana con rango intercuartílico (IQR) para las cuantitativas. Para la evaluación de la validez de las pruebas serológicas se determinaron la sensibilidad y especificidad, y los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) de las mismas con respecto a los resultados de RT-PCR. Para la estimación de la seroprevalencia entre el personal sanitario del Hospital Universitario de Jerez se tuvieron en cuenta los valores obtenidos por los test LFIA-TRF y se calcularon tanto por separado frente a IgG e IgM, como de forma conjunta frente a IgG e IgM.

Los análisis de los valores diagnósticos se realizaron con el Epidat: programa para análisis epidemiológico de datos, Versión 4.2, julio 2016 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España). Para el resto de los análisis estadísticos se ha empleado el software IBM SPSS Statistics for Windows software, Version 23 (Armonk, NY, IBM Corp.). El software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA) fue usado para la creación de gráficas.

RESULTADOS

Valores diagnósticos del método LFIA-TRF

Para confirmar la funcionalidad de los test mostrada por los fabricantes se estudiaron muestras de suero de 13 voluntarios del grupo control positivo, tres de los cuales habían sido diagnosticados de COVID-19 debido a hallazgos epidemiológicos, clínicos, radiológicos (TAC) y analíticos a pesar de tener RT-PCR negativa, y el resto de los voluntarios, 77% (10/13) fue confirmado por RT-PCR positivo (**Tabla 1, Tabla 2**).

Tabla 1. Características de los voluntarios en los que se recogió muestras de COVID-19.

		Controles positivos	Personal Sanitario
Muestras		13	77
Sexo, % y n	Hombres	46 (6/13)	25% (19/77)
	Mujeres	54 (7/13)	75% (58/77)
Edad	Mediana	61	44
	RIC (P25-P75)	57-74	35-53
	Mínimo	39	25
	Máximo	83	64
Sintomatología, %	Moderada-	77% (10/13)	0,039
	Crítica	23% (3/13)	0
	Asintomáticos	0	0,861
RT-PCR, %	Positivos	77% (10/13)	3,9% (3/77)
IgM, U/L.	Mediana	1,35	0,22
	RIC (P25-P75)	0,5-10,91	0,16-0,29
	Mínimo	0,04	0
	Máximo	64,46	4,31
	% Positivos	62% (8/13)	2,6% (2/77)
IgG, U/L.	Mediana	16,67	0,21
	RIC (P25-P75)	1,12-45,93	0,15-0,29
	Mínimo	0,67	0
	Máximo	707,33	10,45
	% Positivos	77% (10/13)	5,2% (4/77)
IgM e IgG	% Positivos	77% (10/13)	5,2% (4/77)

RIC: rango intercuartílico; P25-P75: percentil 25-75; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real

Tabla 2. Resultados de clínica, RT-PCR y serología IgM/IgG para infección de SARS-CoV-2. Controles negativos n=4) y positivos (n=10).

Nº paciente	Cuadro clínico COVID-19 (Síntomas)	Días desde inicio de los síntomas hasta recogida muestra para RT-PCR	Resultado RT-PCR	Días desde el inicio de los síntomas hasta recogida muestra para LF-TRF	CoV-IgM [U/L]	CoV-IgG [U/L]
E1	SI	8	-	20	0,48	8,17#
E2	SI	5	+	21	0,98#	31#
E3	SI	12	+	32	0,75	0,88#
E4	SI	5	+	12	64,5#	707#
E5	SI	5	-	12	3,9#	23#
E6	SI	5	+	17	7,75	157#
E7	SI	10	+	17	15,1#	32,55#
E9	SI	7	+	14	14,1#	16,8#
E10	SI	13	-	20	1,72#	59,4#
S7	SI*	-3	+	-3	2,43#	0,26#
S17	SI	ND	+	34	10,45#	4,31#
S43	SI	ND	+	28	1,36#	0,04
S64	SI	5	+	31	0,85	0,27
E11	NO	NA	-	NA	0,32	0,71
E12	NO	NA	-	NA	0,42	0,7
E17	NO	NA	-	NA	0,79	0,72
E18	NO	2	-	6	0,4	0,74

NA: No aplicable. ND: No determinado. #: resultados positivos en serología de acuerdo con el fabricante (> 1 U/L). #: valores superiores a 0,85 U/L. *Repetida la prueba dos veces. E: pacientes, S: sanitarios.

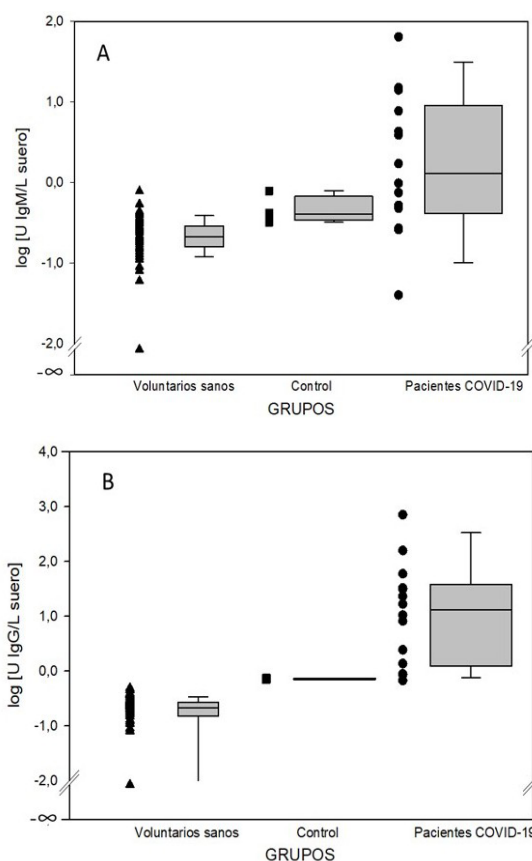
Las muestras para RT-PCR se recogieron a los 7,45 días del inicio de los síntomas, entre el 5º y el 13º día del inicio de enfermedad. Los falsos negativos en RT-PCR oscilan entre el 70 - 80 %¹⁰.

En cuanto a la IgM, 5/13 (38,4 %) fueron positivos. Sin embargo, para la IgG el 10/13 (77 %) serían positivos según el valor de corte indicado por el fabricante y 11/13 (92,3 %), si usáramos el valor de corte de 0,85 U/L. No se

detectó ningún caso de IgM positivo/IgG negativo. Por tanto, todos los casos positivos fueron o IgG positivo o IgM e IgG positivo.

Aunque el punto de corte escogido sugerido por el fabricante para ser positivo es de 1 U/L, posteriormente se observó que los valores negativos son consistentemente menores a 0,74 U/L para IgM. Para IgG el nivel negativo mostró una media de 0,25 U/L (IC 95% = 0,21 - 0,29). Observando que los test tienen una variabilidad de 1 ± 0,2 U/L, y que los resultados de los voluntarios que no han pasado la COVID-19 no rebasaron el límite de 0,74 U/L, se reconsideró el punto de corte superior a 0,85 U/L con lo cual en 12/13 (92,3 %) serían positivos, frente a 10/13 (77%) si se siguieran las indicaciones del fabricante (**Figura 1**). Curiosamente el único caso negativo en serología de los casos positivos con niveles bajos de IgM/IgG era un paciente tratado con quimioterapia, por lo que, si descartamos inmunodeprimidos y se consideran los niveles superiores a 0,85 como positivos, la sensibilidad de esta prueba serológica sería del 100% (12/12).

Figura 1. Concentración de anticuerpos A: IgM y B: IgG en los tres grupos del estudio. Se muestra el nivel de anticuerpos en base de logaritmo y en cajas y barras, coincidiendo con la mediana y los rangos intercuartílicos.



La recogida de muestras de suero para estos ensayos se hizo entre el día 12 y el 34 desde los inicios de los síntomas, con una mediana de 18,5 días. Los dos casos de voluntarios, con resultados negativos en IgM y positivos

en IgG, se produjeron cuando la recogida de muestra serológica se realizó a los 20 y 34 días de la aparición de los síntomas. Hubo cinco casos en los que se obtuvo una serología positiva con un resultado previo de RT-PCR negativo. En tres ocasiones, los voluntarios mostraron una sintomatología compatible con la COVID-19, la recogida de muestra para RT-PCR se les realizó en los 5, 8 y 13º días posteriores a la aparición de los síntomas. En los otros dos casos, una de las pruebas fue un falso positivo para serología, y, curiosamente, en el otro la manifestación de los síntomas cursó tres días después de la realización de la prueba serológica, y el resultado de la RT-PCR positiva se obtuvo una semana más tarde.

Para este mismo objetivo también se estudió a los datos de los controles negativos, había dos grupos de voluntarios, los sanos (n = 58), los cuales no habían tenido patologías previas, y los enfermos (n = 4), así denominados pues presentaban alguna patología previa (lesiones traumatológicas, cáncer de pulmón, apendicitis o leucemia con trasplante e infección pulmonar), pero ningún cuadro clínico compatible con la COVID-19. La importancia de los voluntarios enfermos radica en descartar la posible reacción cruzada con otras inmunoglobulinas generadas frente a otras patologías. Todos ellos (pacientes: E11, E12, E17 y E18) presentaron niveles elevados de anticuerpos, pero sin superar el límite de 1 U/L. Los valores negativos variaron entre 0,7 y 0,74 (U/L) para IgG y 0,4 y 0,79 para IgM.

Los valores diagnósticos obtenidos de esta prueba de LFIA-TRF tras un promedio de 18,5 días (rango intercuartílico = 16 - 29 días) desde la aparición de los síntomas, fueron los siguientes; una sensibilidad del 100% (IC 95%: 95 - 100%), una especificidad del 95,4% (IC 95% = 89,5 - 100%), así como un valor predictivo positivo (VPP) 76,9% (IC 95% = 50,17 - 100%) y un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (IC 95% = 99,19 - 100%).

Determinación de la prevalencia de COVID-19 en profesionales sanitarios por el método de LFIA-TRF

Una vez confirmada la funcionalidad del método para, al menos detectar el nivel de la RT-PCR (73 - 90% sensibilidad, 100% especificidad, dentro del rango propuesto por el fabricante), se aleatorizó una muestra entre los profesionales de la salud que permanecieron en contacto cercano con pacientes afectados por COVID-19. De esta manera, se recogió suero para los test serológicos en 77 profesionales cuyas características se enumeran en la **Tabla 1**. Tres de ellos habían enfermado previamente y tenían antecedentes de RT-PCR positiva en muestra nasofaríngea y habían cursado con sintomatología leve en domicilio. La mayoría (72/77 con resultado positivo falso) dio negativo en serología, confirmándose por RT-PCR negativa y ausencia de síntomas compatibles con COVID-19.

Los resultados negativos mostraron una mediana de 0,21 U/L (IC 95% = 0,15 - 0,29) para IgG, comprendiendo los resultados entre 0 y 0,49 U/L, y una mediana de 0,22 U/L (IC 95% = 0,16 - 0,29) para IgM, oscilando los resultados entre 0 y 0,78 U/L. Hubo un falso positivo de 2,3 U/L para IgM, este voluntario obtuvo dos resultados negativos en RT-PCR, uno previo y otro posterior al test de anticuerpos y nunca llegó a desarrollar síntomas, por ende, fue considerado falso positivo.

En este estudio de seroprevalencia se encontraron cuatro voluntarios con resultado positivo en la prueba serológica, de los cuales uno fue positivo para ambos anticuerpos, IgM e IgG, el resto solo positivaron para IgG considerando como punto de corte 0,85 U/L. Por tanto, la seroprevalencia para el COVID-19 entre los trabajadores sanitarios del Hospital de Jerez fue de un 5,2% (IC 95% = 0,12 - 10,26%; n = 77). De estos cuatro voluntarios, tres habían presentado previamente un cuadro clínico compatible con la COVID-19 y habían sido diagnosticados por RT-PCR; la prueba de LF-TRFIA se les realizó entre 28 y 34 días después de la aparición de los síntomas. El cuarto voluntario, uno de los casos IgG+/IgM-, fue personal sanitario que 8 días antes del test LF-TRFIA tuvo una RT-PCR negativa, sin sintomatología previa a la realización del test serológico, 3 días después de los resultados serológicos positivos presentó síntomas compatibles con COVID-19, y 7 días después la RT-PCR fue positiva confirmando infección por SARS-CoV-2.

DISCUSIÓN

La disponibilidad de un número de datos altos permitió determinar el valor basal relativo de IgG y ajustar el nivel de fluorescencia para considerar los valores positivos y conseguir unos parámetros diagnósticos elevados con el método de inmunofluorescencia con resolución temporal (LFIA-TRF). En la validación clínica se obtuvieron unos valores de sensibilidad del 100%, una especificidad del 95,4%, y una VPP del 76,9% y una VPN del 100%, tras un promedio de 18,5 días desde la aparición de los síntomas (**Tabla 3**). Estos datos diagnósticos son comparables con los de la RT-PCR teniendo en cuenta los tiempos desde el inicio de la infección registrados en este estudio. Asimismo, en nuestra experiencia las técnicas de inmunocromatografía con fluorescencia semicuantitativas son sensibles y específicas pudiendo aportar un mayor valor diagnóstico frente a otras pruebas de flujo lateral como se ha descrito recientemente¹⁴.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de cada método según los resultados acumulados confirmados respecto a la alta sospecha clínica de COVID-19 o RT-PCR positiva.

Técnica	Sensibilidad			Especificidad			Días desde inicio de síntomas hasta resultado positivo (mínimo-máximo)	Media de días tras el inicio de síntomas hasta resultado positivo
	n	Media (%)	IC95%	n	Media (%)	IC95%		
RT-PCR	15*	73,3*	47,6-99,1*	62	100	99,2-100	2 a 28	8,35
IgM	14	57,1	27,6-86,6	77	98,7	95,5-100	12 a 34	19,4
	13‡	61,5‡	31,3-91,8‡					
IgG	14	78,6	53,5-100	77	100	99,4-100	-3 a 34	19,4
	13‡	84,6‡	61,2-100‡					
	13‡,#	100‡,#	96,2-100,#					
IgM e IgG	14	78,6	53,5-100	77	98,7	95,5-100	-3 a 34	19,4
	13‡	84,6‡	61,2-100‡					
	13‡,#	100‡,#	96,2-					

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

*A un paciente COVID-19 se repite la prueba con 15 días de separación. La primera prueba es negativa y a los 15 días es positiva en RT-PCR.

‡ Se excluye un paciente tratado con quimioterapia (inmunodeprimido).

Estableciendo valor positivo para IgG a partir de 0,85 U/L.

Por otro lado, el estudio en el personal sanitario aleatorizado con alta exposición a enfermos de COVID-19 confirmó la utilidad del método no solo para en uso de la determinación de la seroprevalencia epidemiológica, sino también en el diagnóstico de la enfermedad pasada y/o en el transcurso, sea sintomática o asintomática. La detección de anticuerpos en el personal sanitario tiene una gran utilidad debido a que ayudará a identificar a aquellos profesionales que han desarrollado respuesta inmune y pueden tratar a pacientes infectados, minimizando el riesgo de propagar el virus a personal sanitario y a otros pacientes.

Además, la detección temprana de un profesional sanitario antes de tener síntomas son prometedores a la hora de aplicarlos al diagnóstico temprano. Sin embargo, se tienen que disponer de más resultados para confirmar que esta posibilidad se puede generalizar. Por contra, el método podría ser de baja utilidad en enfermos de COVID-19 que están inmunodeprimidos al no dar positivo en un caso de paciente infectado tratado con quimioterapia confirmado por PCR.

La dificultad técnica en el diagnóstico mediante PCR para la detección del SARS-CoV-2, debido al elevado tiempo en el que se suelen proporcionar los resultados, así como los casos de falsos negativos descritos^{6,10}, proporcionan a los test serológicos en formato de test de flujo lateral un método de diagnóstico complementario pero relevante para detectar casos de enfermedad pasada y/o en evolución sea sintomática o asintomática. Estos test ofrecen una alternativa sencilla y de fácil ejecución frente a los test de laboratorio, especialmente interesante para clínicas u hospitales comunitarios pequeños sin acceso a equipos de laboratorio de alta tecnología, ni personal con la experiencia para llevar a cabo pruebas de diagnóstico molecular como la PCR.

Los test serológicos detectan la presencia de los anticuerpos IgG, IgM o ambos u otros. Los anticuerpos aumentan tardíamente en el curso de la enfermedad. Los estudios muestran una duración media de la detección de

anticuerpos IgM COVID-19 de 5 - 7 días, mientras que la detección de IgG comienza a ser muy sensible alrededor de 14 días después del inicio de los síntomas^{6, 8, 11}. Sin embargo, resultados de varios laboratorios demuestran que es posible detectarlos en individuos desde los primeros días de la infección^{6, 7}. Los métodos de LFIA son más fáciles de desarrollar y ejecutar que las pruebas de diagnóstico molecular como la PCR y proporcionan resultados en solo 15 minutos. Además, en el caso de la LFIA-TRF, puede tener una sensibilidad potencialmente mayor, así como también cuantificar la intensidad de la señal lo que puede aportar información sobre el nivel de respuesta inmunitaria¹².

Desafortunadamente, las pruebas de inmunodiagnóstico inexactas pueden categorizar falsamente a las personas de dos maneras. La primera es que pueden etiquetar falsamente a las personas que han sido infectadas como negativas, y la segunda es que las personas que no han sido infectadas están falsamente etiquetadas como positivas. Ambos errores tienen graves consecuencias y afectarán los esfuerzos de control. Estas pruebas también necesitan distinguir con precisión entre infecciones pasadas por SARS-CoV-2 y las causadas por el conjunto conocido de seis coronavirus humanos. Cuatro de estos virus causan el resfriado común y circulan ampliamente en la población. Los dos restantes son los virus que causan el Síndrome Respiratorio del Medio Oriente (MERS) y el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). Las personas infectadas por cualquiera de estos virus pueden producir anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con los anticuerpos producidos en respuesta a la infección con SARS-CoV-2^{8, 11, 13}.

Los resultados de los test de seroprevalencia que ha realizado el Gobierno español reflejan una media de inmunización del 5% de la población, pero los resultados son variables en las distintas comunidades autónomas y provincias españolas. Por ejemplo, en el momento de la realización de nuestro estudio, sólo 21.082 personas, un 2,4% de la población de la provincia de Cádiz habían superado la infección del virus COVID-19 y desarrollado anticuerpos frente al coronavirus^{14, 15}. No obstante, en nuestra muestra de profesionales altamente expuestos al SARS-CoV-2 por su trabajo con pacientes infectados por la COVID-19, la prevalencia de inmunizados ha sido del 5,2%.

Otro aspecto importante es que la detección de IgM/IgG contra el SARS-CoV-2 puede ser útil en la confirmación diagnóstica ante la sospecha de COVID-19 y negatividad de la RT-PCR. En el presente estudio, esto sucedió en tres pacientes sintomáticos con RT-PCR negativa, prueba realizada tras 5, 8 y 13 días después de la aparición de los síntomas, y que sin embargo obtuvieron un resultado positivo en la prueba serológicas tras 12 y 20 días del inicio de los síntomas, confirmando su diagnóstico por COVID-19.

Las limitaciones de nuestro estudio pueden ser relativas a la detección de respuesta IgM. La IgG ha demostrado ser un anticuerpo más específico y más sensible que la IgM, no encontrándose ningún caso de COVID-19 que tuviese positiva la IgM y negativa la IgG.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la LFIA-TRF de determinación de niveles de IgG es altamente específica y sensible, mostrándose superior a la IgM, e incluso a la RT-PCR a la hora de identificar casos de COVID-19 en un amplio rango de tiempos tras la infección. Los datos indican que pudieran detectar algún caso de infección presintomática no identificado por RT-PCR en un principio. También el método serológico pudo confirmar el diagnóstico de COVID-19 en casos de RT-PCR negativa, pero con alta sospecha clínica.

Los estudios en los profesionales sanitarios de nuestro hospital indican que éstos tienen una tasa superior de prevalencia serológica de IgG para SARS-CoV-2, un 5,2%, frente a la media de la población de la provincia 2,5% en el momento de la realización de este estudio^{14,15}.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020; 395(10223): 470-473.
2. Zhang L, Liu Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. *J Med Virol*. 2020; 92(5): 479-90.
3. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Heal*. 2020; 25(3): 278-280.
4. Yu P, Zhu J, Zhang Z, Han Y. A Familial Cluster of Infection Associated With the 2019 Novel Coronavirus Indicating Possible Person-to-Person Transmission During the Incubation Period. *J Infect Dis*. 2020 11; 221(11): 1.757-1.761.
5. Habibzadeh P, Stoneman EK. The Novel Coronavirus: A Bird's Eye View. *Int J Occup Environ Med*. 2020; 11(2): 65-71.
6. Zhao J, Yuan Q, Wang H et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020; 71(16): 2.027-2.034.
7. Ejazi SA, Ghosh S, Ali N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. *Immunol Cell Biol*. 2021 ;99(1): 21-33.
8. Sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC: Recomendaciones Institucionales. Recomendaciones de SEIMC sobre el uso de las pruebas de detección de anticuerpos. España: 2020.
9. Yang J, Wang K, Xu H et al. Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review. *Talanta*. 2019 ;202: 96-110.
10. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O et al. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med*. 2020; 173(4): 262-267.
11. Guo L, Ren L, Yang S et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020; 71(15): 778-785.
12. Zherdev A V., Dzantiev BB. Ways to reach lower detection limits of lateral flow immunoassays. In: *Rapid Test—Advances in Design, Format and Diagnostic Applications*; Anfossi, L., Ed.; IntechOpen Limited: London, UK, 2018; p 9-43.
13. Stephen M. Hahn M.D. Coronavirus (COVID-19) Update: Serological Tests. FDA [Internet]. Publicado el 07 de abril del 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-serological-tests>.
14. Estudio ENE-COVID. Estudio nacional de Sero-Epidemiología de la Infección por SARS-CoV-2 en España. Instituto de Salud Carlos III [consultado 06 Jun 2020]. Disponible en: https://www.msccbs.gob.es/ciudadanos/ene-covid/docs/ESTUDIO_ENE-COVID19_SEGUNDA_RONDA_INFORME_PRELIMINAR.pdf
15. Estudio ENE-COVID. Estudio nacional de Sero-Epidemiología de la Infección por SARS-CoV-2 en España. Instituto de Salud Carlos III [consultado 07 Jul 2020]. Disponible en: https://www.msccbs.gob.es/ciudadanos/ene-covid/docs/ESTUDIO_ENE-COVID19_INFORME_FINAL.pdf fección LA, En PORSOV-. ESTUDIO ENE-COVID : INFORME FINAL. 2020;