

- REVISTA DE -

MEDICINA DE LABORATORIO

ISSN (versión papel): 2660-7484

ISSN (versión electrónica): 2660-7638

Vol. 3 Núm. 1 | enero-abril 2022 | Págs. 1-41

Editorial

- ¿Puede el mercado del diagnóstico *in vitro* vivir ajeno a los mecanismos científicos? 1
E. Rodríguez Borja

Originales

- Efecto de los inhibidores de la aromatasa en ciclos de estimulación de la ovulación en un programa de criopreservación de la fertilidad femenina 3
C. J. Rodríguez, M. C. Gonzalvo, A. Clavero, N. Morales, E. Fernández, N. Sarasquete, M. J. Lupiáñez, A. Muñoz, B. Romero, R. Sánchez, J. A. Castilla
- Diseño de un protocolo de actuación para la detección de células neoplásicas no hematológicas en líquidos biológicos por citometría de flujo 12
S. Fernández Landázuri, L. Thomlimson Alonso, C. E. Royo, S. Gutiérrez Orio, I. de Miguel Alonso, T. Zudaire Fuertes, A. Fontán Abad, T. Navajas Jalón, M. P. Sanz Izquierdo

Artículos Especiales

- Utilidad y manejo de las pruebas de detección de infección activa (PDIA) 21
D. Pineda Tenor, M. S. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero, L. Criado Gómez, E. Prada de Medio, E. Rodríguez Borja, V. Cámara Hernández
- Usefulness and management of active infection detection tests (AIDTs) 25
D. Pineda Tenor, M. S. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero, L. Criado Gómez, E. Prada de Medio, E. Rodríguez Borja, V. Cámara Hernández

Casos Clínicos

- Seminal fluid anaphylaxis. A rare clinical condition 29
M. S. Carvalho Fernandes, R. A. Fernandes, C. Lopes
- Síndrome inflamatorio en niño de 11 años asociado a la infección por SARS-CoV-2 31
B. Nafría Jiménez

Imágenes/Infografías

- Identificación casual de *Enterobius vermicularis* en el sedimento de orina 36
M. Zárata, R. Rubio-Sánchez, E. Lepe-Balsalobre
- Cristales de colesterol en líquido pericárdico 38
M. Ormazabal Monterrubio, R. García Sardina, P. J. Espinosa Prados

Carta al Director

- En recuerdo de Santiago Martínez del Olmo 40
R. Calafell

©AEBM-ML (2022)
©AEFA (2022)
©Arán Ediciones, S.L. (2022)

La *Revista de Medicina de Laboratorio* es una revista open access, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de open access. La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas

Esta revista se publica bajo la licencia CC BY-NC-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)



ISSN electrónico: 2660-7638
ISSN papel: 2660-7484
Publicación cuatrimestral
Depósito legal: M-14367-2022

Edición y administración:



Arán Ediciones, S.L.
Castelló, 128, 1.º
Tel. +34 91 745 17 29
28006 Madrid (España)

Suscripciones:

Tarifa de suscripción anual (España):

Profesionales 95 € + IVA - Instituciones 120 € + IVA

Tarifa de suscripción anual (internacional):

250 € + IVA

Aran Ediciones, S.L.
Castelló, 128, 1.º - 28006 Madrid (España) - Teléfono: +34 91 745 17 29
Correo electrónico: suscripc@grupoaran.com

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.

Equipo Directivo

DIRECTOR

Dr. Enrique Rodríguez Borja
(Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia)
enrobor@gmail.com

EDITORA JEFE

Dra. M^a del Rosario Caro Narrós
(Complejo Asistencial de Segovia, Segovia)
rcaro@saludcastillayleon.es

EDITORES

Dra. Montserrat González Estecha
(Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid)
montse@cmpx.net

Dr. Joan Batista Castellví
(Consultor Senior en Medicina de Laboratorio,
Tarragona)
jbatista@tinet.cat

Editores Asociados

Díaz-Flores Estévez, Felicitas
(Complejo Hospitalario Universitario de Canarias. San
Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife)
fdiazflo@ull.edu.es/fdiaest@gobiernodecanarias.org

Gil Ruiz, María Teresa
(Hospital General Nuestra Señora del Prado
de Talavera de la Reina, Toledo)
tgruiz@sescam.jccm.es

Kabaroglu, Ceyda
(Department of Clinical Biochemistry. School of
Medicine. Ege University. Izmir, Turkey)
ckabaroglu@gmail.com

Laserna Mendieta, Emilio
(Unidad de Investigación del Hospital General
de Tomelloso, Ciudad Real. Instituto
de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario
de La Princesa, Madrid)
ejlaserna@gmail.com

López Gómez, Juan Manuel
(Hospital Univ. de Badajoz, Badajoz)
lopezhospi@gmail.com

Martínez Triguero, María Luisa
(Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia)
martinez_mlutri@gva.es

Pérez García, Lourdes
Laboratorio de Análisis Clínicos.
Complejo Asistencial de Palencia. Palencia

Pineda Tenor, Daniel
(Hospital de Antequera. Área de Gestión Sanitaria
Norte de Málaga)
dpinedatenor@gmail.com

Villalta Robles, Victoria
(Complejo Asistencial de Segovia. Segovia)
villaltarobles@gmail.com

Consejo Asesor

Rui Manuel Amaro Pinto
Profesor en la Facultad de Farmacia.
Universidad de Lisboa. Portugal

Adela Castañeda de la Mata
Especialista en Hematología y Hemoterapia.
Hospital Universitario de Fuenlabrada.
Fuenlabrada, Madrid. España

Gilbert C. Faure
MD, PhD. Laboratoire d'Immunologie.
Faculté de Médecine.
Université Lorraine and CHU Nancy. France

Jesús Miguel García-Foncillas
Director, Translational Oncology Division.
Research Institute FJD-UAM. Madrid, España

Montserrat González Estecha
Jefe de Servicio de Bioquímica Clínica.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
Madrid, España

Juan Miguel Guerrero Montávez
Jefe de Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital
Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. Catedrático
vinculado a la Universidad de Sevilla. Sevilla, España

Gustav Kovac
Slovak Medical University: Institute of Chemistry,
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.
Bratislava, Slovak Republic

Vesna Kusec
MD PhD. University Hospital Centre Zagreb. Clinical
Institute of Laboratory Diagnosis Zagreb. Croatia

Juan Ernesto del Llano-Señaris
Presidente de la Fundación Gaspar Casal.
Madrid, España

Franklin Marques
Profesor de la Facultad de Farmacia. Universidad
de Porto. Laboratorio de Bioquímica. Porto, Portugal

Luis Nogueira Martins
Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa.
Lisboa, Portugal

Leverton Ortiz Cáceres
Jefe del Laboratorio Clínico. Hospital de la Serena.
Chile

Wytze Pier Oosterhuis
Zuyderland Medical Center. Heerlen/Sittard.
The Netherlands

M.^a del Carmen Pasquel
Directora General Revista DIV/RIA/IFCC.
Asesora Regional de la Fundación Wiener. Ecuador

Patrick Twomey
Professor. Consultant Chemical Pathologist.
Head of Department/Laboratory Director for Clinical
Chemistry. St. Vincent's University Hospital.
Dublin, Ireland

Roberto Verna
MD PhD. Professor Faculty of Medicine.
Sapienza University of Rome. President of World
Association of Societies of Pathology and
Laboratory Medicine. President of World Pathology
Foundation. Rome, Italy



Santiago Prieto Menchero

**Presidente de la Asociación Española
de Biopatología Médica-Medicina de Laboratorio (AEBM-ML)**



Antonio Rider Pérez

**Presidente de la Asociación Española
del Laboratorio Clínico**





- REVISTA DE - MEDICINA DE LABORATORIO

www.revistamedicinadelaboratorio.es

Vol. 3 Núm. 1 | enero-abril 2022

Sumario

Editorial

- ¿Puede el mercado del diagnóstico *in vitro* vivir ajeno a los mecanismos científicos? 1
E. Rodríguez Borja

Originales

- Efecto de los inhibidores de la aromataasa en ciclos de estimulación de la ovulación en un programa de criopreservación de la fertilidad femenina 3
C. J. Rodríguez, M. C. Gonzalvo, A. Clavero, N. Morales, E. Fernández, N. Sarasquete, M. J. Lupiáñez, A. Muñoz, B. Romero, R. Sánchez, J. A. Castilla
- Diseño de un protocolo de actuación para la detección de células neoplásicas no hematológicas en líquidos biológicos por citometría de flujo 12
S. Fernández Landázuri, L. Thomlimson Alonso, C. E. Royo, S. Gutiérrez Orio, I. de Miguel Alonso, T. Zudaire Fuertes, A. Fontán Abad, T. Navajas Jalón, M. P. Sanz Izquierdo

Artículo Especial

- Utilidad y manejo de las pruebas de detección de infección activa (PDIA) 21
D. Pineda Tenor, M. S. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero, L. Criado Gómez, E. Prada de Medio, E. Rodríguez Borja, V. Cámara Hernández

Casos Clínicos

- Anafilaxia del líquido seminal: una afección clínica poco común 29
M. S. Carvalho Fernandes, R. A. Fernandes, C. Lopes
- Síndrome inflamatorio en niño de 11 años asociado a la infección por SARS-CoV-2 31
B. Nafría Jiménez

Imágenes/Infografías

- Identificación casual de *Enterobius vermicularis* en el sedimento de orina 36
M. Zárate, R. Rubio-Sánchez, E. Lepe-Balsalobre
- Cristales de colesterol en líquido pericárdico 38
M. Ormazabal Monterrubio, R. García Sardina, P. J. Espinosa Prados

Carta al Director

- En recuerdo de Santiago Martínez del Olmo 40
R. Calafell



- REVISTA DE -
**MEDICINA DE
LABORATORIO**

www.revistamedicinadelaboratorio.es

Vol. 3 No. 1 | January-April 2022

Summary

Editorial

Can the *in vitro* diagnostics market live apart from scientific mechanisms? 1
E. Rodríguez Borja

Originals

Effect of aromatase inhibitors on ovulation stimulation cycles in a female
fertility cryopreservation program 3
*C. J Rodríguez., M. C. Gonzalvo, A. Clavero, N. Morales, E. Fernández, N. Sarasquete,
M. J. Lupiáñez, A. Muñoz, B. Romero, R. Sánchez, J. A. Castilla*

Design of an action protocol for the detection of non-hematological neoplastic
cells in biological fluid by flow cytometry 12
*S. Fernández Landázuri, L. Thomlimson Alonso, C. E. Royo, S. Gutiérrez Orío, I. de Miguel
Alonso, T. Zudaire Fuertes, A. Fontán Abad, T. Navajas Jalón, M. P. Sanz Izquierdo*

Special Article

Usefulness and management of active infection detection tests (AIDTs) 25
*D. Pineda Tenor, M. S. Pacheco Delgado, S. Prieto Menchero, L. Criado Gómez,
E. Prada de Medio, E. Rodríguez Borja, V. Cámara Hernández*

Case Reports

Seminal fluid anaphylaxis. A rare clinical condition 29
M. S. Carvalho Fernandes, R. A. Fernandes, C. Lopes

Inflammatory syndrome in an 11-year-old child associated with SARS-CoV-2 ... 31
B. Nafría Jiménez

Images/Inphographics

Casual identification of *Enterobius vermicularis* in urine sediment 36
M. Zárate, R. Rubio-Sánchez, E. Lepe-Balsalobre

Cholesterol crystals in pericardial fluid 38
M. Ormazabal Monterrubio, R. García Sardina, P. J. Espinosa Prados

Letter to the Editor

In memory of Santiago Martínez del Olmo 40
R. Calafell



¿Puede el mercado del diagnóstico *in vitro* vivir ajeno a los mecanismos científicos?

Can the in vitro diagnostics market live apart from scientific mechanisms?

A simple vista la respuesta puede parecer bastante obvia, pero la reciente sentencia de culpabilidad por fraude y conspiración a Elizabeth Holmes, fundadora y directora ejecutiva (CEO) de la empresa norteamericana de diagnóstico *in vitro* (DIV) *Theranos*, hace que tengamos que detenernos y realizar un honesto ejercicio de autocrítica como profesionales de la medicina de laboratorio.

Para aquellos que no conozcan del todo el caso *Theranos*, intentaremos resumirlo de la mejor manera posible. En 2003, Elizabeth Holmes, con apenas 19 años, abandona la Universidad de Stanford para fundar su propia compañía, *Theranos* (un acrónimo de *Therapy* y *Diagnosis*), basada en la revolucionaria idea de fabricar un sistema de análisis de sangre que puede determinar múltiples analitos con apenas unos microlitros de sangre digital del paciente y a un menor coste que el resto de tecnologías existentes.

En apenas unos años *Theranos* recauda más de 700 millones de dólares por medio de fondos de inversión de capital riesgo y capitales privados y alcanza una valoración de diez mil millones de dólares en su apogeo, durante 2013 y 2014. Elizabeth Holmes pasa a ser una superestrella en Silicon Valley, portada de múltiples revistas, como *Forbes* y *Fortune*, y la mujer multimillonaria más joven del mundo hecha a sí misma. Y todo ello con un prototipo de analizador (*Edison*) del que apenas se sabe nada y bajo un secretismo total. Ya en febrero de 2015, el profesor John Ioannidis denuncia en *JAMA* este hecho y alerta de la ausencia de una revisión por pares de la información que publica la empresa (1).

En octubre de 2015, declaraciones de exempleados al periodista de *The Wall Street Journal* John Carreyrou revelan que *Theranos* utiliza parcialmente tecnología "tradicional" de otras empresas rivales de DIV para analizar

sus muestras y, lo que es más grave, denuncian los serios problemas de exactitud del dispositivo Edison, que solo se emplea en un rango limitado de magnitudes (una veintena) de las 200 ofertadas inicialmente. Obviamente, para emplear otra tecnología es preciso tener un volumen suficiente de muestra, por lo que el fantasma de la "dilución de la muestra original" siembra dudas sobre la precisión de las medidas realizadas. ¿Cómo mide lo que dice que mide *Theranos*? También ese mes de octubre, la FDA prohíbe el uso de la plataforma Edison para DIV. Walgreens, la segunda cadena de farmacias de EE. UU. y que había alcanzado un acuerdo con *Theranos* para ofrecer análisis sanguíneos directamente al consumidor, cancela su colaboración de manera súbita, y con ello, un preacuerdo de 350 millones de dólares. Cada vez afloran más y más ejemplos de pacientes que denuncian una importante inexactitud entre los resultados obtenidos por *Theranos* y los obtenidos por laboratorios convencionales.

La puntilla llega en enero de 2016, cuando los Centers for Medicare and Medicaid Services (agencia gubernamental norteamericana pública), tras una inspección previa del laboratorio de la empresa en California, declara que este constituye un "peligro inmediato a la seguridad del paciente". Se detectan importantes fallos en el control de calidad de las pruebas analizadas que implican a test tan relevantes como el tiempo de protrombina en pacientes anticoagulados, fallos en los protocolos de punción (como todos sabemos, la punción digital, si no se realiza con la suficiente profundidad, puede estar altamente contaminada con fluido intersticial y no ser representativa de la sangre venosa), fallos en el almacenamiento, personal no cualificado en el área analítica y fallos en la comunicación de valores o de resultados críticos.

Al fin, en marzo de 2016, *The Journal of Clinical Investigation* publica el primer trabajo comparativo (no autorizado por la empresa) de *Theranos* frente a otros laboratorios que arroja unas conclusiones demoledoras (2). Las magnitudes medidas en *Theranos* están fuera de rango de normalidad 1,6 veces más que las de dos laboratorios "tradicionales": de 22 magnitudes, 15 (68 %) muestran una variabilidad interlaboratorios significativa. Tan solo en el perfil lipídico se observan discrepancias de entre el 7 y el 13 %, en las que *Theranos* infraestima los valores de los pacientes, con las consecuencias que ello puede comportar.

En agosto de 2016, la American Association for Clinical Chemistry (AACC) invita a Elizabeth Holmes a su reunión anual para que los asistentes puedan formularle sus preguntas en una sesión plenaria, lo que constituyó un desafortunado ejercicio de favoritismo. La sensación que subyació en aquel encuentro es que los congresistas la dejaron salir viva del evento. No solo escapó a las tímidas críticas de los presentes, sino que presentó un nuevo dispositivo POCT (*MiniLab*) sin ningún tipo de dato o información adicional sobre su rendimiento (3).

Pero poco duraría esta tranquilidad. Tras un 2017 plagado de denuncias y de acuerdos judiciales para la empresa, al año siguiente Holmes sería acusada de fraude por un tribunal federal. En un tortuoso proceso de más de tres años, la sentencia se dio a conocer en enero de 2022. Aunque declarada culpable a la espera de sentencia por cuatro cargos de fraude que pueden costarle hasta veinte años de prisión, Holmes fue paradójicamente absuelta de todos los cargos relacionados con los pacientes que se sometieron a las pruebas de *Theranos*.

Este caso pone de manifiesto los tremendos agujeros que tienen muchos procesos y diligencias en el sector de la regulación del DIV que permiten que una tecnología apenas probada y contrastada pudiera ponerse al servicio de los pacientes. Si bien es cierto que, desafortunadamente, la pandemia por la COVID y sus emergencias sanitarias nos han corroborado de nuevo este hecho a la hora de ver cómo se ha autorizado cualquier test antigénico que cayera en las manos de las autoridades sanitarias sin importar su nivel de desempeño.

Por otra parte, este asunto pone de relieve el extraño silencio que durante todo ese tiempo mantuvieron el resto de grandes compañías dedicadas a la tecnología DIV, que en ningún momento se cuestionaron la fiabilidad o mostraron desconfianza alguna ante el proyecto *Theranos*, y si tenían sus dudas, no se transmitieron a sus clientes. El secretismo empresarial es necesario hasta cierto punto cuando se trata de desarrollar aspectos novedosos, pero también facilita la aparición del fraude. Aquellas características básicas de estas nue-

vas tecnologías deberían estar a la disposición de la comunidad científica y de las entidades reguladoras antes de su comercialización. Pero el mutismo que más duele es el de buena parte de la profesión, que apenas exigió a los responsables de la compañía los estudios pertinentes que confirmaran la excelencia de la tecnología, salvo honrosas excepciones, como las de Diamandis E y cols. en una serie de artículos publicados en *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (CCLM) (4). Es más, destacados miembros de la AACC formaron parte del consejo de expertos de la empresa y hasta una revista del prestigio de *Clinical Chemistry* (órgano de expresión de esta sociedad) se negó sistemáticamente a publicar estudio alguno sobre *Theranos*.

La profesionalidad implica también velar por el cumplimiento de una correcta praxis. Tal vez esa sea la mejor enseñanza que podemos llevarnos de todo este bochornoso caso, que no es otra que desarrollar como profesionales un sentido crítico que nos permita, desde un sano escepticismo, no glorificar aquellas disrupciones tecnológicas de las que no conocemos sus principios básicos. Debemos exigir transparencia a las compañías de DIV y velar para que la información suministrada haya pasado un proceso de revisión por pares. En suma, el mercado de DIV no puede vivir ajeno a los mecanismos de la ciencia que, aunque lentos en ocasiones, son más que necesarios. Desde la humildad, *Revista de Medicina de Laboratorio* siempre servirá a este propósito y así nos gustaría expresarlo a nuestros lectores.

P. D.: Recomendamos encarecidamente la lectura del libro del periodista John Carreyrou *Mala sangre: secretos y mentiras en una startup de Silicon Valley*.

Enrique Rodríguez Borja
Director de *Medicina de Laboratorio*

BIBLIOGRAFÍA

1. Ioannidis JPA. Stealth Research: Is Biomedical Innovation Happening Outside the Peer-Reviewed Literature? *JAMA* 2015;313(7):663-4. DOI: 10.1001/jama.2014.17662
2. Kidd BA, Hoffman G, Zimmerman N, et al. Evaluation of direct-to-consumer low-volume lab tests in healthy adults [published correction appears in *J Clin Invest*. 2016 Jul 1;126(7):2773]. *J Clin Invest* 2016;126(5):1734-44. DOI: 10.1172/JCI86318
3. AEBM-ML. Toma de postura de la AEBM-ML con relación a la epidemia de CoV-2-SARS. Disponible en: <https://www.aebm.org/noticias/de-la-asociacion/754-toma-de-postura-de-la-aebm-ml-con-relación-a-la-epidemia-de-cov-2-sars.html>
4. Diamandis EP, Lackner KJ, Plebani M. *Theranos revisited: the trial and lessons learned*. *Clin Chem Lab Med* 2021;60(1):4-6. DOI: 10.1515/cclm-2021-0994



Original

Efecto de los inhibidores de la aromatasa en ciclos de estimulación de la ovulación en un programa de criopreservación de la fertilidad femenina

Effect of aromatase inhibitors on ovulation stimulation cycles in a female fertility cryopreservation program

Carmen Julia Rodríguez¹, M.^a Carmen Gonzalvo^{1,2}, Ana Clavero^{1,2}, Noelia Morales^{1,2}, Elena Fernández¹, Noelia Sarasquete¹, María José Lupiáñez¹, Alejandra Muñoz¹, Bárbara Romero¹, Rocío Sánchez¹, José Antonio Castilla¹⁻³

¹Unidad de Reproducción Humana. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. ²Instituto Biosanitario (IBS). ³CEIFER Biobanco. NextClinics. Granada

Recibido: 26/10/2021
Aceptado: 26/01/2022

Correspondencia: M.^a Carmen Gonzalvo. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Av. de las Fuerzas Armadas, 2. 18014 Granada
e-mail: mariac.gonzalvo.sspa@juntadeandalucia.es

Palabras clave:

Criopreservación de la fertilidad.
Letrozole. Cáncer de mama. Estimulación ovárica.

RESUMEN

Introducción: el incremento de la incidencia del cáncer de mama y de la supervivencia de las pacientes ha llevado a un aumento de la demanda de criopreservación de la fertilidad femenina. Para aumentar la seguridad de estos programas se ha propuesto el uso de fármacos inhibidores de la aromatasa (IA), que disminuyen los altos niveles de estrógenos que se alcanzan con la estimulación ovárica.

Material y métodos: con el fin de valorar el efecto de los inhibidores de la aromatasa sobre el número y la calidad de los ovocitos obtenidos en ciclos de estimulación ovárica en 112 mujeres de programas de criopreservación de la fertilidad, se realizó un estudio observacional de cohortes retrospectivo entre 2009 y 2020. Se comparó un grupo de 59 mujeres que recibieron inhibidor de la aromatasa en el protocolo de estimulación de la ovulación con otro grupo de 53 mujeres que no lo recibieron.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00109

Rodríguez CJ, Gonzalvo MC, Clavero A, Morales N, Fernández E, Sarasquete N, Lupiáñez MJ, Muñoz A, Romero B, Sánchez R, Castilla JA. Efecto de los inhibidores de la aromatasa en ciclos de estimulación de la ovulación en un programa de criopreservación de la fertilidad femenina. Rev Med Lab 2022;3(1):3-11

Resultados: los resultados obtenidos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el porcentaje de ciclos cancelados (6,8 % frente a 9,4 %), en el número de días de estimulación ($11,0 \pm 2,1$ días frente a $11,6 \pm 1,9$ días), en el número de ovocitos totales ($10 \pm 6,4$ ovocitos frente a $10 \pm 8,9$ ovocitos) ni en el número de ovocitos maduros metafase II (MII) ($8 \pm 5,1$ MII frente a $8,3 \pm 7,2$ MII). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de estradiol sérico ($66,1 \pm 51,3$ pg/mL frente a $280,7 \pm 272,8$ pg/mL, $p < 0,001$) y en la dosis de FSH por número de ovocitos obtenidos ($307 \pm 318,7$ UI frente a $574,9 \pm 796,6$ UI, $p < 0,05$). Ambas resultaron ser menores al administrar letrozole.

Conclusión: incluir letrozole en los protocolos de criopreservación de la fertilidad femenina permite llegar a resultados similares a los que no lo incluyen en cuanto a cantidad y calidad ovocitaria, lo que aumenta la seguridad de dichos tratamientos en estas mujeres al reducir la concentración sérica media de estradiol.

Keywords:

Fertility cryopreservation. Letrozole.
Breast cancer. Ovarian stimulation.

ABSTRACT

Introduction: nowadays the increasing incidence of breast cancer and survival rates of breast cancer patients has led to an increment in the demand for female fertility cryopreservation programs. To increase the safety of these programs, it has been proposed to use aromatase inhibitor (AI) medications, which decrease the high levels of estrogen that are reached during ovulation stimulation.

Material and methods: to assess the effect of aromatase inhibitors on the number and quality of oocytes obtained in ovarian stimulation cycles of women in fertility cryopreservation programs, a retrospective observational cohort study was performed with a sample of 112 women between 2009 and 2020. We compared a group of 59 women who received an aromatase inhibitor in the ovulation stimulation protocol against another group of 53 women which did not receive an aromatase inhibitor.

Results: results obtained indicate that there are no statistically significant differences between the two groups in the percentage of cancelled cycles (6.8 % vs. 9.4 %), in the number of days of stimulation ($11.0 \pm 2,1$ days vs. 11.6 ± 1.9 days), in the total number of oocytes (10 ± 6.4 oocytes vs. 10 ± 8.9 oocytes) nor the number of MII (8 ± 5.1 MII vs. 8.3 ± 7.2 MII). On the other hand, we found statistically significant differences in the serum estradiol concentration (66.1 ± 51.3 pg/mL vs. 280.7 ± 272.8 pg/mL, $p < 0.001$) and the FSH dose per number of oocytes obtained (307 ± 318.7 UI vs. 574.9 ± 796.6 UI, $p < 0.05$); both of them were significantly lower when letrozole was administered.

Conclusion: therefore this study concluded that the inclusion of letrozole in female fertility cryopreservation protocols in women with breast cancer allows similar results to protocol not including letrozole in terms of oocyte quantity and quality, increasing the safety of such treatments in these women by reducing the mean serum concentration of estradiol.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la incidencia de cáncer en mujeres jóvenes, unido a las crecientes tasas de supervivencia de estas pacientes y a los grandes avances en las técnicas de reproducción humana asistida (TRHA) (1,2), han llevado al desarrollo de programas de criopreserva-

ción de la fertilidad en estas mujeres. Debido a que los tratamientos gonadotóxicos que van a recibir pueden afectar a su reserva ovárica (3), es conveniente criopreservar ovocitos antes de recibir dichos tratamientos.

La criopreservación de ovocitos maduros es una técnica relativamente nueva que dota a las mujeres de autonomía reproductiva, es decir, la mujer podrá procrear

en el futuro, como mujer sola o con la pareja elegida, utilizando los ovocitos criopreservados antes de recibir tratamiento gonadotóxico. Además, permite ampliar el potencial de fertilidad, ya que la calidad de los ovocitos disminuye con la edad (4). Estudios recientes muestran que la tasa de éxito y la eficiencia de la vitrificación de ovocitos son comparables a los resultados obtenidos con ovocitos frescos (2).

Para llevar a cabo la criopreservación, estas mujeres deben someterse a una estimulación ovárica, lo que provoca un notable aumento de los niveles de estradiol (E2) (5). Este aumento puede provocar la proliferación celular en cáncer de mama, ya que en torno al 75 % de estos tumores son sensibles a los estrógenos (6). Por este motivo se han modificado algunos de los protocolos de estimulación ovárica para incluir la administración de inhibidores de la aromatasa (IA), que disminuyen los niveles de estradiol. El protocolo más usado es el del letrozole (7), que se une de forma competitiva al grupo hemo del citocromo P450 de la aromatasa y bloquea la conversión de andrógenos C-19 en estrógenos C-18, lo que produce una disminución en la síntesis de estrógenos en todos los tejidos donde está presente. Este fármaco se ha utilizado principalmente en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama sensible a estrógenos, pero en la actualidad está usándose con frecuencia en mujeres premenopáusicas con infertilidad por su capacidad para mejorar la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) para inducir la ovulación (8). No obstante, su administración podría afectar a la cantidad y a la calidad de ovocitos a criopreservar según diversos autores (9), aunque otros autores no han descrito esta relación negativa (10-12). Tras su uso no se ha observado un aumento en la incidencia de recidiva (5) ni tampoco de malformaciones fetales (13-16).

El objetivo del estudio es determinar el efecto de los inhibidores de la aromatasa sobre el número y la calidad de los ovocitos obtenidos tras la estimulación de la ovulación en mujeres de un programa de criopreservación de la fertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio no experimental analítico observacional de cohortes retrospectivo. La cohorte está formada por mujeres con edades de entre 18 y 40 años que por diversas patologías o tratamientos verán afectada su capacidad reproductiva. Los datos necesarios para realizar este estudio han sido anonimizados y fue aprobado por el CEIM/CEI Provincial de Granada con fecha 24 de febrero de 2021.

Población de estudio

La población del estudio fueron todas las mujeres incluidas en el programa de criopreservación de la fertilidad

entre los años 2009 y 2020 de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada que cumplían los criterios de aceptación y de rechazo en este tipo de programas establecidos por la Guía de Reproducción Humana Asistida del Sistema Sanitario Público de Andalucía. En total se incluyeron 112 mujeres divididas en dos grupos: uno (59 mujeres) que incluía la administración de un inhibidor de la aromatasa en el protocolo de estimulación de la ovulación por padecer una patología estrógeno dependiente y otro (53 mujeres) que no incluía el fármaco inhibidor de la aromatasa en el protocolo de estimulación ovárica.

Criterios de aceptación en el programa de criopreservación femenina

- Edad entre 16 y 40 años y plena capacidad de obrar.
- No existencia de esterilización voluntaria.
- Consentimiento informado firmado para someterse a la criopreservación de la fertilidad.
- Pacientes con posible riesgo de pérdida de su capacidad reproductiva asociada a procesos patológicos con riesgo acreditado de fallo ovárico prematuro.
- Mujeres con posible riesgo de pérdida de su capacidad reproductiva asociada a exposición a tratamientos gametotóxicos.

Criterios de rechazo en el programa de criopreservación femenina:

- Situación clínica que desaconseje la hiperestimulación o que oriente a otras opciones terapéuticas (congelación de tejido ovárico de carácter experimental y maduración *in vitro* de ovocitos).
- Evidencia de mala reserva ovárica.
- Enfermedad genética hereditaria.
- Mujer sin menarquia.
- Imposibilidad de exploración ginecológica.
- Contraindicación ginecológica u oncológica para realizar tratamiento, exploraciones y ecografías vaginales.
- Ovarios inaccesibles.
- Enfermedades infecciosas activas: virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana (VHI).
- Ausencia de informe de facultativo responsable justificando la inclusión en el programa de preservación de la fertilidad.
- Tratamiento oncológico ya iniciado. Se valorará individualmente en casos de tratamiento inmunosupresor iniciado en enfermedades autoinmunes sistémicas.

Variables analizadas en la población de estudio

Las variables que se analizaron de cada paciente fueron: edad, enfermedad causante del tratamiento gonadotóxico, protocolo de estimulación ovocitaria, protocolo de frenación y protocolo de desencadenamiento de la ovulación. También se consideraron los días de estimulación, las unidades de FSH utilizadas, el valor del estradiol y la progesterona séricos el día del desencadenamiento de la ovulación.

En cuanto a las variables del laboratorio, analizamos el número de ovocitos obtenidos de cada paciente, el número de ovocitos maduros, el número de ovocitos vitrificados y los distintos dimorfismos que estaban presentes en los ovocitos.

Protocolos de trabajo

Protocolo de estimulación con letrozole

Se administró 5 mg/día de letrozole a partir del segundo día del ciclo y a partir del cuarto día se inició el tratamiento con FSH. Cuando en los controles ecográficos se observó un folículo de 14 mm de diámetro medio o el estradiol (E2) en sangre fue > 250 pg/mL, se añadió una dosis de antagonista diaria de 0,25 mg hasta el fin de la estimulación para evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). La ovulación se desencadenó con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Tras la punción, se mantuvo el letrozole hasta que el E2 sérico fue < 50 pg/mL para evitar el pico de estrógenos tras la supresión. En los tres ciclos en los que no se utilizó antagonista, la ovulación se desencadenó con la gonadotropina coriónica humana (hCG).

Protocolo de estimulación sin letrozole

A partir del primer día del ciclo se administró FSH. En el resto del ciclo se procedió como en el protocolo con letrozole. En los dos ciclos en los que no se utilizó antagonista, la ovulación se desencadenó con hCG.

Punción folicular

A las 36 horas del desencadenamiento de la ovulación con hCG o agonista de la GnRH, se llevó a cabo el proceso de punción folicular. Las pacientes fueron anestesiadas localmente y se realizó la punción de los folículos ováricos. Se aspiró el contenido en tubos de recogida de líquido folicular (Becton Dickinson Labware®, Nueva Jersey, Estados Unidos) con un sistema de vacío a 150 mmHg de presión. Los tubos que contenían el líquido folicular llegaron al laboratorio de fecundación *in vitro* (FIV). Allí, los embriólogos buscaron mediante estereomicroscopía los complejos cú-

mulo-ovocito en dicho líquido y cortaron la granulosa que los ovocitos presentaban a su alrededor, dejando unos complejos cúmulo-ovocitos más pequeños. A continuación, se pasaron a una placa con medio MOPS Vitrolife® (MOPS Science Scandinavia, Gotemburgo, Suecia) y de ahí se depositaron en un medio de cultivo de maduración IVF Vitrolife® (IVF Science Scandinavia, Gotemburgo, Suecia) hasta el momento de la decumulación antes del proceso de vitrificación. Para decumular se realizó un proceso químico en el que se introdujo el complejo cúmulo-ovocito en una solución de 80 UI/mL de hialuronidasa (HYASE®, IVF Science Scandinavia, Gotemburgo, Suecia) y un proceso mecánico en el que se les hizo pasar por capilares de 125 µm.

La valoración del estado madurativo de los ovocitos (maduro en metafase II o inmaduro en metafase I o profase I) se realizó en un microscopio invertido. Los ovocitos maduros se clasificaron en alguno de estos grupos según su característica morfológica predominante:

- Citoplasma granuloso (clúster severo): granulosis centralizada.
- Acumulo de retículo endoplásmico liso.
- Espacio perivitelino con restos citoplásmicos.
- Amorfos/alteraciones en zona pelúcida y en el espacio perivitelino.
- Vacuolas.
- Otras anomalías: macroóvulos, ovocitos con más de un corpúsculo polar o corpúsculo polar gigante o presencia de cuerpos necróticos.

Vitrificación ovocitaria

Para el proceso de vitrificación en sí se utilizaron los medios de equilibrado y de vitrificación que contienen etilenglicol y 1,2-propanodiol en medio HTF (*human tubal fluid*) en concentraciones crecientes como crioprotectores permeables y sacarosa como no permeables (Origio, Dinamarca). El dispositivo de almacenamiento fue Cryoleaf (McGill Cryoleaf, Origio, Dinamarca). Los ovocitos se vitrificaron de dos en dos y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196 °C en bombonas de almacenamiento (Air Liquide, Francia).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio se realizó mediante los paquetes estadísticos SPSS (IBM, versión 27.0) y MedCalc (MedCalc *software*, versión 20.022). Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y relativas (porcentajes). Las variables cuantitativas se describieron mediante la media, desviación estándar, mínimo y máximo. La normalidad de las variables cuantitativas se determinó por el test de Shapiro-Wilk. Se rechazó la hipótesis de normalidad por debajo de un $p < 0,05$. Todas las variables cuantitativas siguieron una distribución normal. Para la comparación de variables cua-

litativas entre los grupos de pacientes se utilizó el test de χ^2 , y en caso de no cumplirse las condiciones de validez, el test de Fisher. En caso de encontrarse significación estadística, se calculó la *odds ratio* y su intervalo de confianza al 95 % como medida del efecto. Para la comparación de medias entre los dos grupos de pacientes establecidos, se realizó en primer lugar el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas. Si dicho test resultaba significativo, se realizaba el test de Welch, y si el test de Levene resultaba no significativo, se calculaba la t de Student. En caso de encontrar significación se calculó la diferencia entre medias y su intervalo de confianza al 95 % como medida del efecto. Se consideró un nivel de significación en los test de contraste de hipótesis de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Respecto a las características clínicas de las pacientes (Tabla I), observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, mayores en el grupo al que se le administra letrozole ($28 \pm 5,9$ años frente a $32 \pm 4,3$ años; $p < 0,001$).

En cuanto a la indicación de la criopreservación de la fertilidad, podemos diferenciar dos causas principales: el cáncer de mama y otras indicaciones (tumores ováricos, linfomas, sarcomas, otros tumores, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades). Vemos que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a dicha indicación: el cáncer de mama es más frecuente en el grupo que recibe letrozole, mientras que en el grupo que no recibe este fármaco otras indicaciones son más frecuentes (OR: 1309; $p < 0,001$).

En una descripción detallada de las indicaciones de la criopreservación de la fertilidad (Tabla II), podemos ver que en el 100 % de las mujeres del grupo que recibe letrozole la indicación es por cáncer de mama, mientras que en el grupo que no recibe letrozole solo en un 7,5 % de las pacientes la indicación es por cáncer de mama. La indicación más frecuente es por tumores ováricos (35,8 %), seguida de linfomas (26,4 %).

	Letrozole no (n = 53)	Letrozole sí (n = 59)
Cáncer de mama	7,5 % (4)	100 % (59)
Tumores ováricos	35,8 % (19)	
Cáncer de ovario	17 % (9)	
Teratoma	18,9 % (10)	
Linfomas	26,4 % (14)	
Linfoma de Hodking	20,8 % (11)	
Linfoma no Hodking	5,7 % (3)	
Sarcomas	11,3 % (6)	
Osteosarcoma	5,7 % (3)	
Rabdomiosarcoma	3,8 % (2)	
Sarcoma sinovial	1,9 % (1)	
Otros tumores	3,8 % (2)	
Ependimoma	1,9 % (1)	
Melanoma	1,9 % (1)	
Enfermedades autoinmunes	5,7 % (3)	
Enfermedad de Addison	3,8 % (2)	
Dermatopolimiositis	1,9 % (1)	
Otras enfermedades	9,4 (5)	
Granulomatosis de Wegener	1,9 % (1)	
Histiocitosis	1,9 % (1)	
Endometrioma	1,9 % (1)	
Otras	3,8 % (2)	
Total (n = 112)	47,3 % (53)	52,7 % (59)

	Letrozole no (n = 53)	Letrozole sí (n = 59)	Diferencia (medias)	OR (IC 95 %)	p
Edad	$28 \pm 5,9$ (18-37)	$32 \pm 4,3$ (23-40)	$4 \pm 0,97$ (2,1-5,9)		$< 0,001$
Indicación					
Cáncer de mama	7,5 % (4)	100 %		1309 (68,8-24910,5)	$< 0,001$
Otras	92,5 % (49)	0			

Diferencia: diferencia absoluta entre medias.

Respecto a la cancelación del ciclo de estimulación (Tabla III), podemos observar que hay un mayor porcentaje de cancelación en el grupo que no recibe letrozole (9,4 %) que en el grupo que sí lo recibe (6,8 %), pero sin que existan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0,61$).

Analizando las variables de estimulación (Tabla IV), podemos ver que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en el número de días de estimulación ($11,6 \pm 1,9$ días frente a $11,0 \pm 2,1$ días, $p = 0,15$) ni en la concentración de progesterona alcanzada el día que se administra la hCG ($3 \pm 6,5$ ng/mL frente a $2,4 \pm 3,1$ ng/mL; $p = 0,8$), aunque ambas medias son menores en el grupo que recibe letrozole.

	Letrozole no (n = 53)	Letrozole sí (n = 59)	OR (IC 95 %)	p
Punción folicular	90,6 % (48)	93,2 % (55)	1,4 (0,4-5,6)	0,61
Ciclos cancelados	9,4 % (5)	6,8 % (4)		

Respecto al protocolo de inducción y al tipo de gonadotropinas utilizadas, tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que recibe letrozole y el que no. Por otro lado, con respecto a las unidades de FSH administradas ($2523,8 \pm 681,9$ UI frente a $2155,6 \pm 855,2$ UI; $p < 0,05$) y a la concentración de estradiol sérico alcanzada el día que se administra la hCG a las pacientes ($2129,1 \pm 1296,7$ pg/mL frente a $576,5 \pm 454,0$ pg/mL; $p < 0,001$), observamos que en el grupo que recibe letrozole son significativamente inferiores que en el grupo que no se trató con letrozole.

Si analizamos los resultados de las variables de laboratorio (Tabla V), vemos que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias resultantes para el número de ovocitos obtenidos ($10 \pm 8,9$ frente a $10 \pm 6,4$; $p = 1$), el número de ovocitos maduros ($8,3 \pm 7,2$ frente a $8 \pm 5,1$; $p = 0,8$), la tasa de ovocitos maduros ($84,4 \% \pm 17$ frente a $82,4 \pm 19,6$; $p = 0,6$) y el número de ovocitos vitrificados ($8,3 \pm 7,2$ frente a $7,4 \pm 5,2$; $p = 0,46$).

Sin embargo, vemos que sí existen diferencias estadísticamente significativas en la dosis necesaria de FSH por número de ovocitos obtenidos ($574,9 \pm 796,6$ UI frente a $307,8 \pm 318,7$ UI; $p < 0,05$), medida que representa la sensibilidad ovárica a la FSH, y que es menor en el grupo al que se le administra letrozole.

	Letrozole no (n = 53)	Letrozole sí (n = 59)	Diferencia (medias)	OR (IC 95 %)	p
Días de estimulación	$11,6 \pm 1,9$ (8 -19)	$11,0 \pm 2,1$ (3-16)	$0,6 \pm 0,4$ (0,2-1,4)		0,15
Unidades de FSH (UI)	$2523,8 \pm 681,9$ (1450-3600)	$2155,6 \pm 855,2$ (225-4800)	$368,2 \pm 166,7$ (36,9-699,5)		< 0,05
Estradiol en el día del desencadenamiento de la ovulación (pg/mL)	$2129,1 \pm 1296,7$ (42-5767)	$576,5 \pm 454,0$ (40-2498)	$1552,6 \pm 219,9$ (1113,5-1991,7)		< 0,001
Progesterona (ng/mL)	$3 \pm 6,5$ (0,3-19,1)	$2,4 \pm 3,1$ (0,6-9)	$0,6 \pm 2,7$ (-5,2-6,4)		0,8
Protocolo de frenación					
Agonista	3,8 % (2)	5,1 % (3)			
Antagonista	96,2 % (51)	94,9 % (56)		0,7 (0,1-4,6)	0,74
Tipo DE FSH					
Recombinante	90,6 % (48)	93,2 % (55)			
Urinaría	9,4 % (5)	6,8 % (4)		1,4 (0,4-5,6)	0,61

Diferencia: diferencia absoluta entre medias; UI: unidades internacionales; FSH: hormona foliculo estimulante; hCG: gonadotropina coriónica humana.

También existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de estradiol por número de ovocitos obtenidos ($280,7 \pm 272,8$ pg/mL frente a $66,1 \pm 51,3$ pg/mL; $p < 0,001$) y en la concentración de estradiol por tasa de ovocitos maduros ($2668,3 \pm 1599,7$ pg/mL frente a $751,1 \pm 558,9$ pg/mL; $p < 0,001$). Ambas medias son menores en el grupo que recibe letrozole.

Para la valoración del estado madurativo de los ovocitos se clasificaron en distintos grupos según su característica morfológica predominante. El porcentaje de dimorfismos en ovocitos maduros fue similar en los dos grupos de estudio (del 15,8 % en el grupo sin letrozole y del 12 % en el grupo que se trató con letrozole; $p = 0,11$). Tampoco se observan estadísticamente significativas en la distribución de los dimorfismos entre ambos grupos (Tabla VI).

Tabla V.
Variables de laboratorio

	Letrozole no (n = 53)	Letrozole sí (n = 59)	Diferencia (IC 95 %)	p
Número de ovocitos obtenidos	10 ± 8,9 (0-46)	10 ± 6,4 (0-26)	0 ± 1,5 (-3,0-3,0)	1
Número de ovocitos maduros (MII)	8,3 ± 7,2 (0-34)	8 ± 5,1 (0-20)	0,3 ± 1,2 (-2,1-2,7)	0,8
Porcentaje de ovocitos maduros	84,4 ± 17 (42,9-100)	82,4 ± 19,6 (0-100)	2 ± 3,8 (-5,5-9,5)	0,6
Número de ovocitos vitrificados	8,3 ± 7,2 (0-34)	7,4 ± 5,2 (0-20)	0,9 ± 1,2 (-1,5-3,3)	0,46
Unidades FSH administradas (UI) / Número de ovocitos	574,9 ± 796,6 (39,1-3525)	307,8 ± 318,7 (63,2-2100)	267,2 ± 112,5 (44,2-490,2)	< 0,05
Estradiol / Número de ovocitos (pg/mL)	280,7 ± 272,8 (44-1141)	66,1 ± 51,3 (15-312)	214,6 ± 44,7 (125,3-303,9)	< 0,001
Estradiol / porcentaje de ovocitos maduros (pg/mL)	2668,3 ± 1599,7 (661-6411)	751,1 ± 558,9 (140-2495)	1917,2 ± 280,9 (1355,6-2478,8)	< 0,001

UI: unidades internacionales.

Tabla VI.
Calidad ovocitaria

	Letrozole no	Letrozole sí	OR (IC 95 %)	p
Total ovocitos maduros	399	441	1,37 (0,93-2,03)	0,11
Total dimorfismos	15,8 % (63/399)	12 % (53/441)		
Acúmulos de retículo endoplásmico liso	12,7 % (8/63)	7,5 % (4/53)		
Espacio perivitelino con restos citoplásmicos / debris	3,2 % (2/63)	5,7 % (3/53)		
Amorfos / alteraciones en zona pelúcida y en espacio perivitelino	23,8 % (15/63)	11,3 % (6/53)		
Vacuolas	15,9 % (10/63)	20,8 % (11/53)		
Anormal	15,9 % (10/63)	13,2 % (7/53)		

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que la administración de inhibidores de la aromatasa no afecta a la cantidad ni a la calidad de los ovocitos obtenidos tras la estimulación de la ovulación en mujeres sometidas a criopreservación de la fertilidad. Además, el uso de letrozole aumenta la seguridad de la técnica en mujeres jóvenes con cáncer de mama, pues el aumento de los niveles de estradiol asociado a dichos protocolos será mucho menor. Gran parte de las mujeres que participan en estos programas tiene neoplasias estrógeno-dependientes.

La mayor edad observada en el grupo al que se le administra letrozole puede estar relacionada con una mayor edad media de aparición de cáncer de mama frente a las otras patologías que se incluyen en este estudio. Este resultado concuerda con lo observado por otros autores (17). Sin embargo, no coincide con los datos obtenidos en otros estudios (9-12), que no observan diferencias estadísticamente significativas en la edad entre ambos grupos. Dicha discrepancia probablemente se deba a que la población de estudio de estos autores son mujeres con cáncer de mama y el uso o no de letrozole se basa en el tipo de cáncer, de forma que las mujeres con cáncer de mama estrógeno-sensible se incluyen en el grupo al que se le administra letrozole, mientras que aquellas con cáncer no sensible a estrógenos, en el grupo que no incluye letrozole.

El porcentaje de ciclos cancelados no se ve afectado por la utilización del letrozole, tal y como demostró Domingo et al. (9) y demuestran nuestros resultados. Sin embargo, es de destacar que el porcentaje observado de cancelación en nuestro estudio (8 %) es inferior al reportado en el último Registro Nacional de Actividad-Registro SEF del Ministerio de Sanidad, que es del 11,6 % en mujeres de programas de FIV (18). Esta menor tasa de cancelación creemos que se debe a que el objetivo de un ciclo de estimulación de la ovulación en un programa de criopreservación de la fertilidad es ofrecer la posibilidad de tener un embarazo en el futuro y, con frecuencia, no hay tiempo para realizar una segunda estimulación antes de recibir los tratamientos gonadotóxicos. Por eso, se tiende a continuar con la estimulación de la ovulación y no cancelarla, aunque se vea que la paciente está teniendo una baja respuesta.

De acuerdo con otros autores (10-12) no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos respecto al número de días de estimulación. Sin embargo, Domingo et al. (9) sí observaron ciclos de estimulación más largos cuando se administró letrozole. Esta discrepancia podría deberse a una mayor frecuencia de pacientes portadoras de variantes patogénicas en el gen *BRCA1/2* en el grupo tratado con letrozole, ya que en estas pacientes se ha asociado con una menor respuesta a la estimulación de la ovulación (19).

Los resultados obtenidos respecto a la dosis total de FSH necesaria para la estimulación indican que esta es significativamente menor en el grupo al que se le administra letrozole. Esta diferencia puede deberse a que,

al inhibir la aromatasa, se acumulan andrógenos a nivel folicular y estos pueden aumentar la sensibilidad folicular a la FSH (20) debido a que aumentan la expresión del receptor de dicha FSH (21). Por otro lado, al reducirse la síntesis de estrógenos se frena la retroalimentación negativa estrogénica, lo que aumenta la secreción endógena de FSH (20). Esta hipótesis vendría avalada por el hecho de que la relación entre las unidades de FSH administradas y el número ovocitos obtenidos es inferior en el grupo del letrozole. Este parámetro es un indicador de la sensibilidad folicular a la FSH (21). Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por algunos autores (11), aunque contrastan con los resultados de otros estudios (9,10,12), pero, como hemos comentado, estas diferencias pueden deberse a que son poblaciones diferentes.

Una de las variables más importantes en este estudio es la concentración de estradiol sérico alcanzada el día que se desencadena la ovulación. Como consecuencia de la utilización de un inhibidor de la aromatasa, hemos visto que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que incluye letrozole y el que no: la media de esta concentración es casi cuatro veces menor al utilizar letrozole. Estos resultados son similares a los obtenidos en los principales estudios realizados sobre el uso de letrozole en cáncer de mama (9-12).

En cuanto a la cantidad y a la calidad ovocitaria (número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos maduros, tasa de ovocitos maduros y porcentaje de dimorfismos en ovocitos maduros), en nuestro estudio no observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo al que se le administra letrozole y el grupo al que no. Por tanto, según los resultados, y de acuerdo con algunos autores (10-12), el uso de letrozole no afecta negativamente a dichos parámetros. Sin embargo, diversos autores concluyeron que letrozole sí podría perjudicar a la cantidad, aunque no a la madurez ovocitaria (9). Además, Bercarie et al. (22) observaron un incremento en los dimorfismos ovocitarios tras el tratamiento con letrozole en ciclos de estimulación desencadenados con agonistas de la GnRH. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con diferencias en los protocolos usados, ya que el desencadenamiento de la ovulación con hCG o antagonistas de GnRH en ciclos con letrozole conlleva diferencias en marcadores bioquímicos, foliculares y expresión de genes en células de la granulosa (23). En nuestro estudio, en más del 95 % de los ciclos se desencadenó la ovulación con antagonistas de la GnRH. Cuando se han realizado estudios multivariantes sobre este punto ajustando por diferentes variables, los resultados obtenidos coinciden con los observados aquí (24), por lo que puede concluirse que el letrozole no afecta ni al número ni a la calidad de los ovocitos obtenidos en pacientes sometidos a estimulación de la ovulación en programas de criopreservación de la fertilidad femenina (25).

Dentro de las limitaciones del estudio, debemos tener en cuenta que todas las pacientes que recibieron letrozole tenían cáncer de mama, por lo que las dife-

rencias observadas entre los grupos del estudio podrían deberse al cáncer de mama en sí y no al efecto del letrozole, aunque creemos que esto es improbable si se tiene en cuenta el efecto del letrozole en otras situaciones clínicas (8). Por otra parte, los resultados de cualquier tratamiento de estimulación de la ovulación dependen de la edad de las pacientes, por lo que los resultados suelen estratificarse según la edad de las pacientes. En este estudio esto no se ha realizado debido a la limitación de edad considerada en los criterios de aceptación puestos por la Guía de TRHA del Sistema Andaluz de Salud (SAS).

CONCLUSIONES

Con este trabajo se demuestra que añadir al tratamiento de estimulación ovárica un inhibidor de la aromatasa como el letrozole permite disminuir la concentración media de estradiol sérico hasta casi cuatro veces en comparación con las pacientes que no son tratadas con un inhibidor de la aromatasa. Esto aumenta la seguridad de dichos tratamientos, principalmente en mujeres con cáncer de mama estrógeno-dependiente.

También se ha comprobado que el uso del letrozole no afecta significativamente a la cantidad ni a la calidad de los ovocitos obtenidos y tampoco aumenta el número de días necesarios para llevar a cabo la estimulación ovárica, por lo que no produciría demora en caso de ser necesaria la administración posterior de tratamiento de quimio o de radioterapia.

BIBLIOGRAFÍA

- De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 2014;384:1302-10.
- Rajabi Z, Aliakbari F, Yazdekstani H. Female fertility preservation, clinical and experimental options. *J Reproduction Infertil* 2018;19:125.
- Winship AL, Stringer JM, Liew SH, Hutt KJ. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Hum Reprod Update* 2018;24:119-34.
- Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Díaz-García C, Sánchez Serano M, Tryde Schmidt K, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013;99(6):1503-13. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.030
- Kim J, Turan V, Oktay K. Long-term safety of letrozole and gonadotropin stimulation for fertility preservation in women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:1364-71.
- Cóppola F, Nader J, Aguirre R. Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev Médica del Uruguay* 2005;(21)1.
- Rodgers RJ, Reid GD, Koch J, Deans R, Ledger WL, Friedlander M, et al. The safety and efficacy of controlled ovarian hyperstimulation for fertility preservation in women with early breast cancer: a systematic review. *Hum Reprod* 2017;32:1033-45.
- Rose BI, Brown SE. A review of the physiology behind letrozole applications in infertility: are current protocols optimal? *J Assist Reprod Genet* 2020;37:2093-104.
- Domingo J, Guillén V, Ayllón Y, Martínez M, Muñoz E, Pellicer A, et al. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients is diminished even before oncological treatment. *Fertil Steril* 2012;97:930-4.
- Checa Vizcaíno MA, Corchado AR, Cuadri ME, Comadran MG, Brassesco M, Carreras R. The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women. *Reprod Biomed Online* 2012;24:606-10.
- Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, Oktem O, Safro B, Cil A, et al. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3885-90.
- Quinn M, Cakmak H, Letourneau J, Cedars M, Rosen M. Titration of letrozole to maintain low estradiol (e2) levels during fertility preservation cycles for estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients does not impact ovarian response or mature oocyte yield. *Fertil Steril* 2016;106:55.e127.
- Forman R, Gill S, Moretti M, Tulandi T, Koren G, Casper R. Fetal safety of letrozole and clomiphene citrate for ovulation induction. *J Obstet Gynaecol Can* 2007;29:668-71.
- Legro RS, Brzyski RG, Diamond MP, Coutifaris C, Schlaff WD, Casson P, et al. Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Eng J Med* 2014;371:119-29.
- Sharma S, Ghosh S, Singh S, Chakravarty A, Ganesh A, Rajani S, et al. Congenital malformations among babies born following letrozole or Clomiphene for infertility treatment. *PLoS* 2014;9:e108219.
- Tulandi T, Martin J, Al-Fadhli R, Kabli N, Forman R, Hitkari J, et al. Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2006;85:1761-5.
- Druckemiller S, Goldman KN, Labella PA, Fino ME, Bazzocchi A, Noyes N. Successful Oocyte Cryopreservation in Reproductive-Aged Cancer Survivors. *Obstetrics & Gynecology* 2016;127:474-80.
- Cuevas I, Prados F, Pons I, de-Andrés M, Sánchez-Castro L, Lafuente R, et al. Registro Nacional de Actividad-Registro de la Sociedad Española de Fertilidad de fecundación *in vitro* e inyección espermática intracitoplasmática. Años 2016 y 2017. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica (ASEBIR)* 2020;7:5-15.
- Oktay K, Kim JY, Barad D, Babayed SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 2010;28:240-4.
- Mitwally MFM, Casper RF. Aromatase Inhibition Reduces the Dose of Gonadotropin Required for Controlled Ovarian Hyperstimulation. *JSGI* 2004;11:406-15.
- Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and Follicle-Stimulating Hormone Interactions in Primate Ovarian Follicle Development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2951-6.
- Bercaire LMN, Cavagna M, Donadio NF, Rocha AR, Portela R, Alves VR, et al. The impact of letrozole administration on oocyte morphology in breast cancer patients undergoing fertility preservation. *JBRA Assist Reprod* 2020;24:257-64.
- Goldrat O, Van Den Steen G, González-Merino E, Dechène J, Gervy C, Delbaere A, et al. Letrozole-associated controlled ovarian hyperstimulation in breast cancer patients versus conventional controlled ovarian hyperstimulation in infertile patients: assessment of oocyte quality related biomarkers. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17:3.
- Huber M, Hadziosmanovic N, Berglund L, Holte J. Using the ovarian sensitivity index to define poor, normal, and high response after controlled ovarian hyperstimulation in the long gonadotropin-releasing hormone-agonist protocol: suggestions for a new principle to solve an old problem. *Fertility and Sterility* 2013;100:1270-6.
- Ben-Haroush A, Wertheimer A, Klochendler E, Sapir O, Shufaro Y, Oron G. Effect of letrozole added to gonadotropins in controlled ovarian stimulation protocols on the yield and maturity of retrieved oocytes. *Gynecol Endocrinol* 2019;35:324-7.



Original

Diseño de un protocolo de actuación para la detección de células neoplásicas no hematológicas en líquidos biológicos por citometría de flujo

Design of an action protocol for the detection of non-hematological neoplastic cells in biological fluid by flow cytometry

Sara Fernández-Landázuri, Leticia Thomlimson Alonso, Cristina Elvira Royo, Silvia Gutiérrez Orio, Isabel de Miguel Alonso, Tamara Zudaire Fuertes, Adrián Fontán Abad, Tamara Navajas Jalón, María Pilar Sanz Izquierdo

Hospital San Pedro. Logroño

Recibido: 14/11/2021
Aceptado: 22/04/2021

Correspondencia: Sara Fernández-Landázuri. Hospital San Pedro. C/ Piqueras, 98. 26006 Logroño
e-mail: sflandazuri@riojasalud.es

Palabras clave:

Neoplasias no hematológicas. Derrames.
Citometría de flujo. Inmunocitoquímica.
EpCAM.

RESUMEN

Introducción: los tumores metastásicos pueden provocar derrames pleurales y ascíticos. El objetivo de este trabajo es evaluar el rendimiento de la citometría de flujo como herramienta diagnóstica en la detección de células epiteliales neoplásicas a través de la expresión de la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM).

Métodos: se realizó la observación citológica y el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo en 33 líquidos pleurales o ascíticos (22 y 11, respectivamente) que presentaban un aumento de la celularidad en el estudio inicial. Se estudiaron variables demográficas y referentes a los resultados de los líquidos (recuento, bioquímica, citología e inmunofenotipo), se analizaron la sensibilidad, la especificidad, la eficiencia diagnóstica, el valor predictivo positivo y el negativo en los grupos de malignidad (sí/no) y se calculó la capacidad de discriminar entre malignidad o no de la expresión de EpCAM mediante el empleo de curvas ROC.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00112

Fernández-Landázuri S, Thomlimson Alonso L, Royo CE, Gutiérrez Orio S, de Miguel Alonso I, Zudaire Fuertes T, Fontán Abad A, Navajas Jalón T, Sanz Izquierdo MP. Diseño de un protocolo de actuación para la detección de células neoplásicas no hematológicas en líquidos biológicos por citometría de flujo. Rev Med Lab 2022;3(1):12-20

Resultados: el nivel de expresión de la molécula EpCAM es superior en la población oncológica respecto a la población sin afectación tumoral: 6,52 % frente al 0,25 % del total celular ($p = 0,003$); 40,1 % frente al 1,37 % ($p = 0,03$) sobre la población no leucocitaria (CD45/CD14).

Conclusiones: la citometría de flujo permite identificar y caracterizar células neoplásicas no hematológicas. La citometría de flujo puede utilizarse como una prueba de cribado y de apoyo en la observación citológica y el estudio inmunocitoquímico.

Keywords:

Nonhematopoietic neoplasms. Effusion. Flow cytometry. Immunocytochemistry. EpCAM.

ABSTRACT

Introduction: metastatic tumors can cause pleural and ascitic effusions. The objective of this work is to evaluate the performance of flow cytometry as a diagnostic tool in the detection of neoplastic epithelial cells, through the expression of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM).

Methods: cytological observation and immunophenotype study by flow cytometry were performed in 33 pleural or ascitic fluids (22 and 11, respectively) that presented increased cellularity in the initial study. Demographic variables and references to fluid results (count, biochemistry, cytology, immunophenotyping) were studied, sensitivity, specificity, diagnostic efficiency, positive and negative predictive value in the malignancy groups (yes/no) were analyzed, and the ability to discriminate between malignancy or not of EpCAM expression by using ROC curves.

Results: the level of expression of the EpCAM molecule is higher in the oncological population with respect to the population without tumor involvement: 6.52 % versus 0.25 % of the total cell ($p = 0.003$); 40.1 % versus 1.37 % ($p = 0.03$) on the non-leukocyte population (CD45/CD14).

Conclusions: flow cytometry allows the identification and characterization of non-hematological neoplastic cells. The response time of flow cytometry is shorter than the immunocytochemical study, so it can be used as a screening test and to support the observation of cytology and the immunocytochemical study.

INTRODUCCIÓN

El manejo de los derrames pleurales y ascíticos supone un desafío para el laboratorio clínico debido al impacto de los resultados en la práctica clínica. El acúmulo de líquido en las cavidades se debe al aumento de la permeabilidad capilar o a la presión hidrostática, al descenso de la presión coloidosmótica o a la obstrucción del drenaje linfático (1). Atendiendo a los criterios propuestos por el Dr. Light en 1972, pueden clasificarse en trasudados o exudados (2). Los tumores metastásicos causan frecuentemente exudados. Suponen el 15-35 % de los derrames pleurales y el 10 % de los ascíticos (3,4). Las células neoplásicas más predominantes en los derrames pleurales son las que se derivan de las neoplasias de pulmón y de mama, mientras que en los derrames ascíticos son las correspondientes a las neoplasias del tracto gastrointestinal y del ovario (5). Se estima que el derrame es la primera manifestación de la enfermedad o de su recurrencia. Afecta al 40 % de los pacientes. Asimismo, el desarrollo de derrames se asocia a una peor pronóstico (6,7).

La invasión del tejido pleural o ascítico por células malignas puede detectarse en la biopsia o en la citología del líquido biológico. Actualmente, el estudio inmunocitoquímico es una técnica de referencia en el diagnóstico de derrames malignos. Sin embargo, no está exento de limitaciones derivadas de la sensibilidad de la técnica, de la experiencia de los evaluadores, de la calidad de la preparación, del tipo histológico de la neoplasia maligna o del tiempo de respuesta (8,9). El empleo de nuevas técnicas diagnósticas puede aportar valor añadido al proceso asistencial del paciente. En este contexto se encuentra la citometría de flujo (CMF). Se trata de una técnica necesaria y consolidada en el diagnóstico de neoplasias hematológicas, incluso para la detección de bajos niveles de expresión, como en la enfermedad mínima residual (10), y su uso está siendo prometedor en neoplasias no hematológicas (11).

Entre los biomarcadores investigados en la literatura, destaca la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). Esta molécula se expresa en células epiteliales normales. Su expresión es superior en la mayoría de las neoplasias epiteliales y está ausente en células

hematopoyéticas y mesoteliales (12). Esta diferencia en la expresión de EpCAM es la que ayuda a caracterizar las células neoplásicas de las células mesoteliales en los casos en los que la citología no es capaz. La evidencia científica correlaciona la formación de metástasis con el nivel de expresión de EpCAM. Sin embargo, el resultado clínico es complejo y puede variar dependiendo no solo del origen del tumor, sino de su estadio de progresión (13). La sensibilidad y la especificidad de la inmunocitoquímica y de la CMF para analizar la expresión de EpCAM son similares, aunque dos ventajas de la CMF son el tiempo de respuesta en la emisión del resultado y el número de células analizadas (hasta un millón de células por CMF frente a 100 o 200 por citología) (14,15).

La CMF es una tecnología con potencial para el diagnóstico en la detección de células epiteliales neoplásicas. Sin embargo, no es común encontrarla en la práctica clínica. El objetivo de este trabajo es analizar el papel de la CMF en la caracterización de células neoplásicas no hematológicas en los derrames pleurales y ascíticos y su posible implantación en el protocolo de análisis de los derrames.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en el que se evaluaron los resultados de los líquidos pleurales y ascíticos recibidos entre marzo y junio de 2021. Se diseñó de acuerdo a la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de investigación de nuestro centro.

Criterios de inclusión: líquidos de pacientes con más de 18 años de edad atendidos en urgencias, hospitalización o consultas externas y que presentaban un aumento de la celularidad definida como la presencia de al menos uno de los siguientes criterios (16,17):

1. Más de 250 leucocitos/ μ L.
2. Más de 5 células de alta fluorescencia (HF-BF) / 100 leucocitos.
3. Más de 67 HF-BF / μ L en pleurales.
4. Más de 17 HF-BF / μ L en ascíticos.

Criterios de exclusión: líquidos de pacientes con menos de 18 años de edad y líquidos de lavado broncoalveolar o peritoneal. Se excluyeron los lavados bronqueoalveolares y peritoneales, ya que, al contener epitelio normal, expresan la molécula EpCAM y, como consecuencia, no es posible diferenciar entre las células epiteliales normales y las neoplásicas (11).

Protocolo de actuación

Los líquidos pleurales y ascíticos se recogieron y se procesaron en el laboratorio de urgencias de nuestro centro hospitalario, que atiende a una población de 320 000 habitantes.

El líquido pleural se obtiene por toracocentesis y el ascítico, por paracentesis. Ambos se recogieron en tu-

bos cónicos de polipropileno sin anticoagulante. Para valorar la utilidad de la CMF se amplió este estudio a todos los que cumplieran criterios de inclusión según celularidad (Fig. 1).

Diseño del estudio

De los líquidos incluidos en el estudio se recogieron y se analizaron las siguientes variables:

- Variables demográficas del paciente y del proceso asistencial: edad, sexo y fecha de extracción del líquido.
- Variables macroscópicas y bioquímicas: turbidez y color del líquido, resultado de proteínas y lactato deshidrogenasa (LDH) del líquido biológico y del suero realizados en el analizador Cobas 6000 (Roche Diagnostics). En aquellos pacientes a los que se les realizó la determinación de proteínas y LDH en suero en las 24 horas anteriores o posteriores a la obtención del líquido biológico se calculó el ratio para categorizar el líquido como exudado o trasudado según los criterios de Light (2). Se consideró exudado si cumplía al menos uno de los siguientes:
 - Relación proteínas del líquido / suero, superior a 0,5.
 - Relación LDH líquido / suero, superior a 0,5.
 - Valor de LDH líquido superior a dos tercios de LDH en suero.

- Recuento celular. Se realizó en el analizador XN-1000 (Sysmex). Se recogieron los resultados de los siguientes parámetros: leucocitos/ μ L (número absoluto), hematíes/ μ L (número absoluto), leucocitos mononucleares (porcentaje), leucocitos polimorfonucleares (porcentaje), células de alta fluorescencia (HF-BF)/ μ L (número absoluto), células HF-BF/ 100 leucocitos y eosinófilos (porcentaje).
- Estudio citológico. Se realizó tras la centrifugación y la tinción de May-Grünwald Giemsa.

Se consideraron valores normales en líquidos pleurales: macrófagos: 65-80 %; linfocitos: 2-30 %; células mesoteliales: 0-2 % y neutrófilos: < 1 %. Se consideraron valores normales en líquidos ascíticos: macrófagos y linfocitos: 60-80 % y eosinófilos: 0-7 %.

Las características de atipia celular se basaron en monomorfismo, gran tamaño, intensa basofilia, alta relación núcleo/citoplasma, contorno nuclear irregular, cromatina laxa e inmadura, presencia de múltiples y prominentes nucléolos, vacuolación polarizada en el citoplasma, mitosis anómala, tendencia a formar nidos o sincitios al perder la individualidad celular, células en anillo de sello y signos de canibalismo. Se realizó el recuento de células atípicas en 100 células nucleadas (5), que se clasificaron en tres categorías:

1. Ausencia de células atípicas y de células mesoteliales.
2. Presencia de células mesoteliales o de macrófagos.

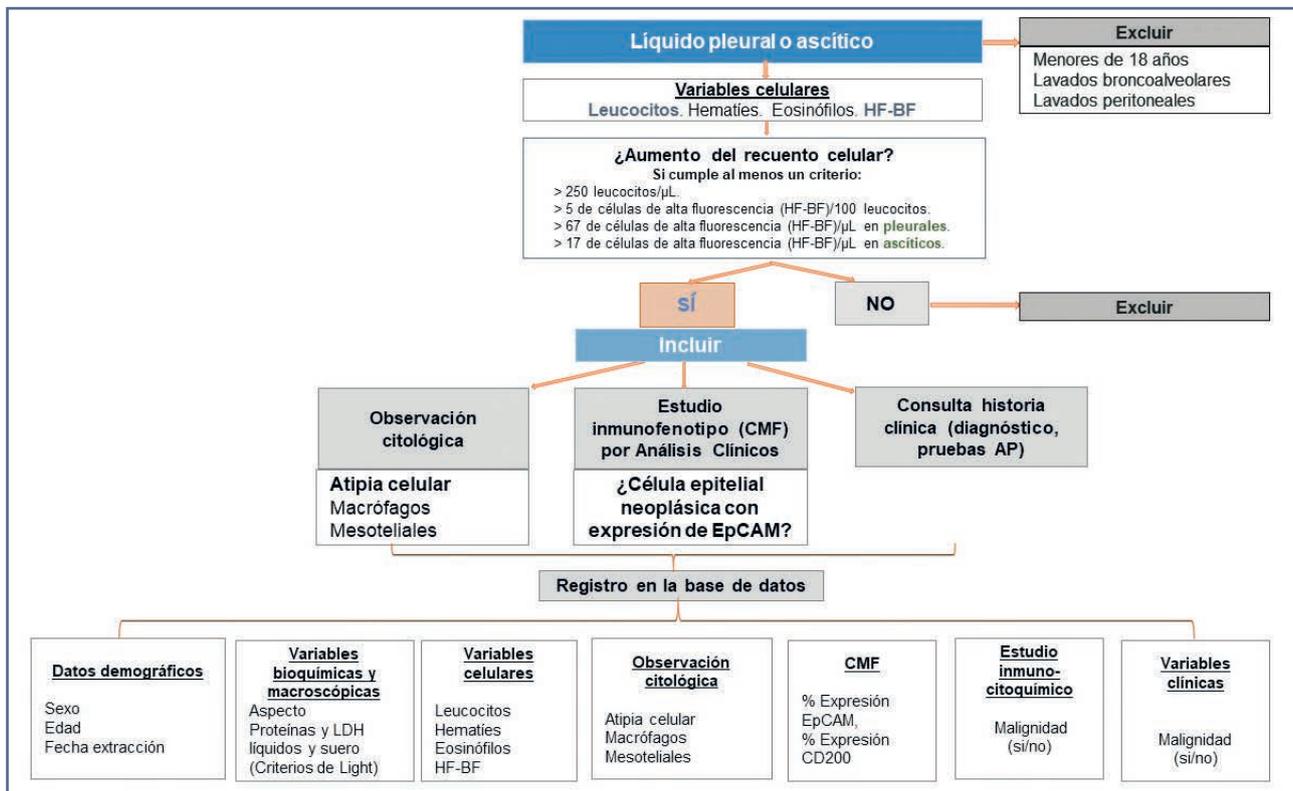


Figura 1 – Diseño del estudio prospectivo para la óptima caracterización de los derrames pleurales y ascíticos. AP: anatomía patológica; CMF: citometría de flujo; HF-BF: células de alta fluorescencia. LDH: lactato-deshidrogenasa.

3. Presencia de células atípicas.

— CMF: los líquidos pleurales y ascíticos que se recogieron en el laboratorio de urgencias en horario de 8:00 a 14:00 de lunes a viernes se procesaron en el mismo día por el laboratorio de CMF. Fuera de dicho horario se almacenaron refrigerados hasta su procesamiento. En aquellas situaciones en las que no pudieron procesarse antes de las 48 horas posteriores a la extracción se conservaron refrigerados con Transfix™ (1000 μL de líquido con 200 μL de Transfix™).

Se mezclaron 100 μL del líquido a estudio con los anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes para la detección de los antígenos. Los anticuerpos empleados fueron: CD71-FITC (clon: YDJ1.2.2), CD14-PC5.5 (clon: RMO52), CD200-PC7 (clon OX-104), CD326 (EpCAM)-APC (clon: VU1D9), CD20-PC (clon: B9E9) y CD45-KrO (clon: J33) (Beckman Coulter). Tras una incubación de 15 minutos a oscuras, se lisaron las células con 500 μL de *lysing solution* (Optilase) durante 10 minutos y se lavaron con 3 mL de solución PBA (solución de tampón fosfato salino con albúmina). Se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 200 μL de tampón fosfato salino (PBS). Se analizaron en el citómetro de flujo Navios EX (Beckman Coulter) usando el *software* de análisis Kaluza (Beckman Coulter).

La estrategia de análisis empleada para detectar células neoplásicas no hematológicas en los derrames se basó en la propuesta por Pillai y Acosta (11,15). Inicialmente se realizó la selección (gateo) de la población empleando el escatergrama con los parámetros de dispersión de luz, que reflejan tamaño frente a complejidad (FSC frente a SSC), y se eliminaron los dobletes celulares a través del escatergrama FSC lineal de altura y de amplitud (Fig. 2). Sobre los singletes se seleccionaron las células no hematológicas, caracterizadas por la ausencia de expresión de los marcadores celulares CD45 y CD14. En esa población celular no leucocitaria se determinaron la expresión de la molécula EpCAM y CD200 para discernir entre células epiteliales neoplásicas y mesoteliales. Adicionalmente, se valoró la expresión de CD71. El CD20 se empleó para definir mejor la población leucocitaria (marcador linfocitario) en la población excluida del análisis.

Para valorar la positividad de este biomarcador se utilizó el punto de corte del 2 % de las células que expresaban EpCAM en la población no leucocitaria (CD45/CD14-) propuesto por Sahu (18). Adicionalmente, se calculó el punto de corte, que obtuvo mejor resultado en nuestro estudio a través de las curvas ROC.

— Estudio inmunocitoquímico, así como resultado positivo o negativo para malignidad en la citología y fecha de emisión de informe en aquellos casos en los que se solicitó por el médico peticionario.

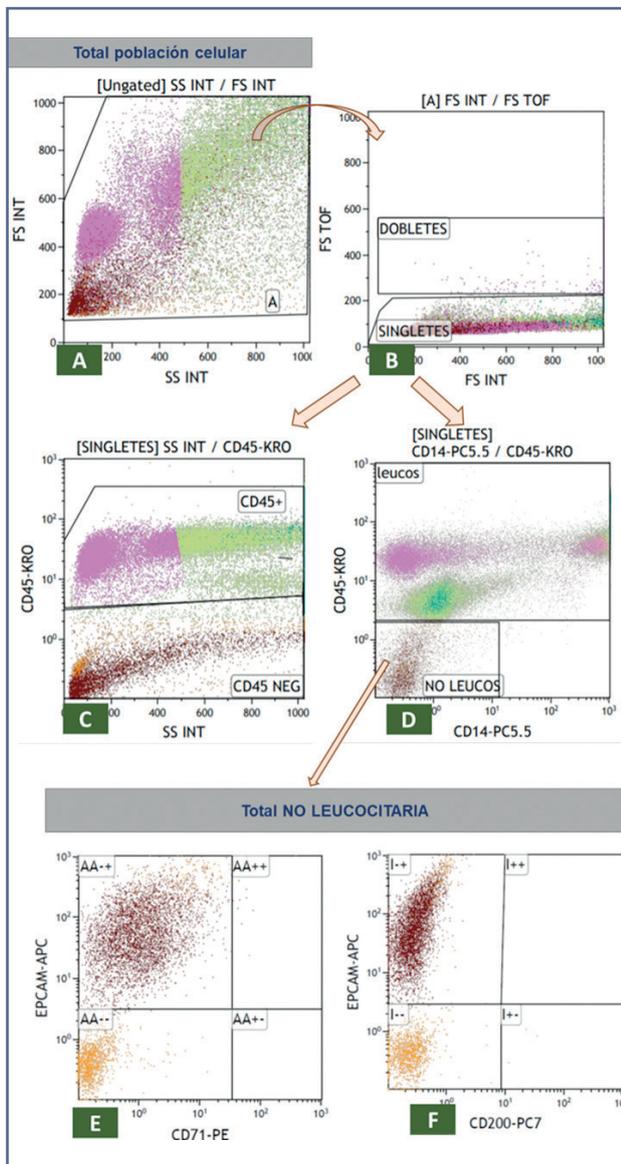


Figura 2 – Caracterización celular por citometría de flujo. A. Total de la población celular analizada por el citómetro. B. Eliminación de agregados celulares y selección de los singletes. C. Distribución celular en función de la expresión de CD45 en la población de singletes. D. Selección de la población no leucocitaria (CD45/CD14). E. Caracterización de células epiteliales neoplásicas en la población no leucocitaria a través de la expresión de EpCAM junto a la de CD71. F. Discriminación de células epiteliales neoplásicas (EpCAM⁺) y células mesoteliales (CD200⁺) en la población no leucocitaria.

- Variables clínicas: diagnóstico del paciente.
- Variable de malignidad. Se definió resultado positivo para malignidad por la presencia de neoplasia detectada por estudio inmunocitoquímico o pruebas de imagen: tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada (TC).

Estudio estadístico

Las variables estudiadas cuantitativas (edad, leucocitos, hematies, leucocitos mononucleares, leucocitos polimorfonucleares, HF-BF/ μL , HF-BF/100 leucocitos, eosinófilos y expresión de EpCAM) se exploraron con la prueba de conformidad de Shapiro-Wilk. Se calcularon indicadores de tendencia central (mediana) y de dispersión (percentiles) para las variables no paramétricas.

Se calculó la sensibilidad, la especificidad, la eficiencia diagnóstica (ED) y el valor predictivo positivo (VPP) y el negativo (VPN) para las variables cuantitativas *recuento celular leucocitario* ($n.^{\circ}/\mu\text{L}$), *células de alta fluorescencia* ($n.^{\circ}/\mu\text{L}$, $n.^{\circ}/100$ leucocitos) y *células no leucocitarias (CD45/CD14) con expresión de EpCAM* (%) en los grupos de diagnóstico final de malignidad (sí/no). Se definió ED como el porcentaje de personas clasificadas correctamente en la prueba como enfermas (presencia de malignidad) o sanas (ausencia de malignidad). Se compararon los dos grupos (sí/no malignidad) mediante U de Mann-Whitney para variables no paramétricas. Se consideró estadísticamente significativa $p < 0,001$.

Se calculó la sensibilidad, la especificidad, VPP, VPN y ED para las variables cualitativas, presencia de exudado (sí/no), células atípicas en citología (sí/no), resultado del inmunofenotipo (ausencia/presencia EpCAM) y el resultado del estudio inmunocitoquímico (positivo/negativo) para los grupos de diagnóstico final de malignidad (sí/no). Se calculó también la razón de proporciones.

Se calculó la capacidad discriminadora de la expresión de EpCAM para discriminar malignidad (sí/no) a través de curvas ROC. Se comparó el punto de corte obtenido en nuestro estudio con el establecido por Sahu (2 % de células que expresaban EpCAM en la población no leucocitaria) (18).

Los datos se recogieron y se analizaron en el programa estadístico IMB SPSS Statistics versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

RESULTADOS

En el periodo establecido se solicitó el recuento celular a 97 líquidos pleurales y a 92 ascíticos de 76 y 44 pacientes, respectivamente. Se seleccionaron, según los criterios de inclusión, 33 líquidos (22 pleurales y 11 ascíticos) pertenecientes a 33 pacientes a cargo de los siguientes servicios: neumología (12), medicina interna (7), digestivo (6), cirugía torácica (5), oncología (1), unidad de cuidados intensivos (1) y ginecología (1). La mediana de edad fue de 70 años (rango intercuartílico: 65-82,5) y el 58 % eran mujeres. La población se clasificó en dos categorías en función de si existía afectación neoplásica o no. Entre los pacientes a los que se les solicitó el líquido pleural, 12 presentaron afectación tumoral,

mientras que en la población a estudio con líquidos ascíticos únicamente 3 pacientes tuvieron diagnóstico de neoplasia. El 53 % de los diagnósticos de neoplasia se establecieron en el proceso asistencial en el que se obtuvo el líquido biológico.

La valoración del aspecto macroscópico en función del diagnóstico final (sí/no malignidad) no proporcionó suficiente información para tipificarlo. En cuanto a la solicitud de pruebas bioquímicas en suero con el objetivo de ayudar en la clasificación de exudado o trasudado, se solicitó en el 73 % de los líquidos y tan solo en el 12 % de los casos se detalló esta información explícitamente en las historias clínicas. En nuestra cohorte, los criterios de Light (exudado/trasudado) no muestran una buena concordancia con el diagnóstico final (sí/no malignidad), $\chi^2 = 0,657$.

Atendiendo al recuento celular, excepto en los valores de células HF-BF, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los pacientes oncológicos presentaron cifras más elevadas (media: 341 células HF-BF/ μ L; media: 43 células HF-BF/100 leucocitos) con respecto a los pacientes sin afectación tumoral (media: 108 células HF-BF / μ L [p = 0,024]; media: 10 células HF-BF / 100 leucocitos [p < 0,001]).

El 88 % de los diagnósticos de malignidad se basaron en dichos resultados de la inmunocitoquímica, considerada como técnica de referencia; el resto se estableció por pruebas de imagen. El estudio citológico alcanzó una sensibilidad del 73,3 %. La sensibilidad que se obtuvo por CMF fue superior, sobre todo cuando se combinaron (Tabla I). La sensibilidad de la CMF empleando el punto de corte del 2 % propuesto por Sahu (18) de las células que expresaban EpCAM en la población no leucocitaria (CD45-/CD14-) (18) fue del 80 % y empleando el punto de corte de 0,98 %, que obtuvimos mediante curva ROC, fue del 93,3 % (Fig. 3). La pue-

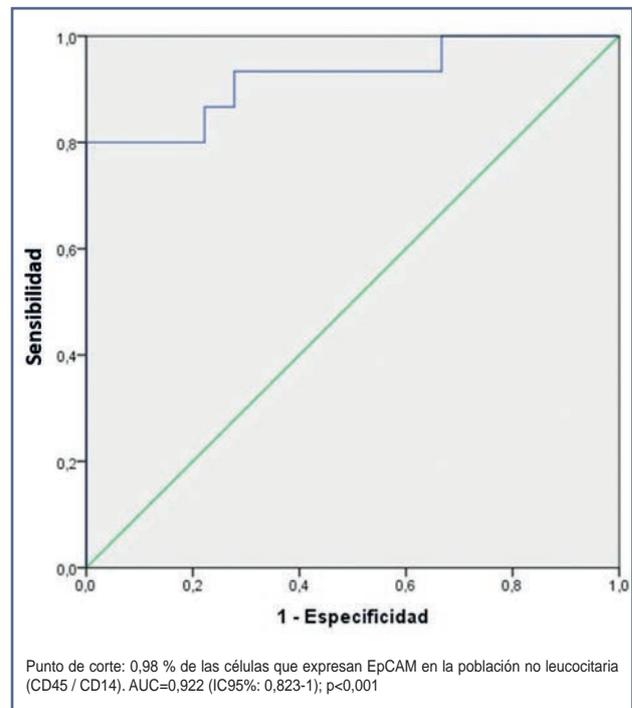


Figura 3 – Curva ROC de la expresión de EPCAM en población no leucocitaria por inmunofenotipo. Punto de corte: 0,98 % de las células que expresaron EpCAM en la población no leucocitaria (CD45-/CD14-). AUC = 0,922 (IC 95 %: 0,823-1); p < 0,001.

ba diagnóstica que obtuvo mayor VPP, seguida de la inmunocitoquímica, fue el inmunofenotipo empleando como punto de corte el 2 % de células con expresión de EpCAM en la población no leucocitaria (CD45-/CD14-).

Tabla I.						
Características de las pruebas diagnósticas para diferenciar malignidad de no malignidad						
	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ED (%)	Tiempo de respuesta (días)
Citología	73,3	81,2	78,6	76,5	77,4	1
CMF*	80,0	83,3	80,0	83,3	81,8	1 (1-3)
CMF†	93,3	72,2	73,7	92,9	81,8	1 (1-3)
Observación citológica + CMF*	86,7	72,2	72,2	86,7	78,8	1 (1-3)
Observación citológica + CMF†	93,3	61,1	66,7	91,7	75,7	1 (1-3)
IC	91,7	100,0	100,0	94,4	96,5	4 (1-10)

*CMF: citometría de flujo empleando el punto de corte del 2 % de expresión de EpCAM en células no leucocitarias (CD45-/CD14-). †CMF: citometría de flujo empleando el punto de corte de 0,98 % de expresión de EpCAM en células no leucocitarias (CD45-/CD14-). IC: inmunocitoquímica. E: especificidad. S: sensibilidad. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. ED: eficiencia diagnóstica.

El estudio inmunocitoquímico mostró tiempos de respuesta más dilatados que la observación citológica y la CMF (4 días de media frente a 1 día, respectivamente). El nivel de expresión de la molécula EpCAM fue superior en la población oncológica respecto a la población sin afectación tumoral: 6,52 % frente al 0,25 % del total celular ($p = 0,003$) y 40,1 % frente al 1,37 % sobre la población no leucocitaria ($p = 0,03$).

En la tabla II se recogen los datos más relevantes de los pacientes analizados.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los derrames pleurales o ascíticos suelen ser manifestaciones clínicas frecuentes provocadas por la infiltración tumoral, incluso pueden aparecer como primera expresión del daño tumoral. De hecho, en nuestra población, los tumores metastásicos representaron el 15 % de los derrames pleurales y el 9 % de los derrames peritoneales, datos ligeramente inferiores a los reportados en la literatura (15-35 % pleurales y 10 % ascíticos) (3,4). En nuestro estudio, el 53 % de los diagnósticos de neoplasia se establecieron en el proceso asistencial en el que se realizó el estudio del líquido biológico.

La observación citológica del líquido pleural y ascítico es una prueba útil y necesaria en la caracterización celular, aunque tiene como desventaja que puede estar influenciada por el grado de entrenamiento del evaluador (19). El rendimiento diagnóstico de esta prueba, en la cohorte estudiada, aumenta cuando se combina con la CMF para la detección de una posible afectación tumoral.

En condiciones normales los líquidos pleurales y ascíticos no presentan células epiteliales, por lo que la expresión de EpCAM en este tipo de muestras se atribuyó a celularidad tumoral. En nuestro trabajo, la valoración de la expresión de dicho biomarcador se atribuye a células epiteliales neoplásicas, tal y como apuntan otros autores (13). A pesar de que la ED de la CMF resultó igual, independientemente de si empleábamos nuestro punto de corte de 0,98 o el de 2 % (18) de células que expresan EpCAM en la población no leucocitaria (CD45/CD14⁻), se considera más apropiado emplear el punto de corte de 2 % al haber obtenido con él mayor VPP.

La expresión del EpCAM por CMF aporta valor añadido al acto clínico al utilizarla como una prueba de cribado que ayude a los servicios de anatomía patológica (AP) en la priorización de aquellos pacientes con sospecha clínica y analítica de neoplasia. Adicionalmente a la mejora en el tiempo de respuesta, la CMF permite analizar mayor número de células que la observación de la citología y la inmunocitoquímica. Sin embargo, no puede obviarse que pueden aparecer resultados discrepantes entre la CMF y la inmunocitoquímica derivados de la pérdida de expresión de EpCAM que se produce en determina-

dos tumores epiteliales mal diferenciados (20). Otros aspectos limitantes de la CMF son la falta de estandarización en el punto de corte para fijar la positividad y la información que se recoge en el informe del laboratorio. De hecho, los trabajos publicados suelen reportar el porcentaje de eventos adquiridos con expresión CD45/EpCAM⁺ del total celular, lo que remarca el carácter cualitativo del resultado (14,21). En este trabajo han intentado solventarse estas limitaciones mediante la comparación del punto de corte fijado por Sahu del 2 % de expresión de EpCAM en la población CD45/CD14⁻ y del de 0,98 % obtenido en nuestro estudio por curvas ROC. Por otro lado, se considera apropiado informar del resultado obtenido del inmunofenotipo de forma cualitativa y cuantitativa empleando comentarios del siguiente tipo: "Se detecta la presencia de células epiteliales que expresan la molécula EpCAM en un [X %] de la población no leucocitaria (CD45/CD14⁻). Los resultados sugieren un posible origen neoplásico. Se recomienda establecer el diagnóstico por anatomía patológica o pruebas de imagen".

Entre las limitaciones del estudio se encuentra el tamaño muestral, el impacto en las distintas condiciones de conservación de la muestra y la falta de solicitud de pruebas bioquímicas (proteínas y LDH) en suero para la clasificación de exudado y trasudado según los criterios de Light.

La realización del inmunofenotipo basado en la expresión del EpCAM en la población no leucocitaria (CD45/CD14⁻) ha permitido identificar y caracterizar células neoplásicas no hematológicas en un tiempo de respuesta menor al obtenido por inmunocitoquímica.

Dada la información que aporta el empleo de CMF, puesta de relevancia en este estudio, se propone que, en aquellos líquidos con recuento celular elevado según los criterios de inclusión descritos en este estudio, y en los que la observación citológica no sea concluyente respecto a la caracterización celular o se tenga la sospecha de infiltración tumoral por tumor sólido, se solicite el inmunofenotipo al laboratorio de CMF (Fig. 4). Se prevé que esta propuesta pueda reducir los tiempos de respuesta globales por parte de AP, dato que se analizará tras la implantación del protocolo en nuestro servicio.

Este trabajo destaca el papel de liderazgo del laboratorio clínico en la implantación de herramientas o de estrategias diagnósticas que mejoren los protocolos actuales de análisis de líquidos ascíticos y pleurales y que permitan establecer un resultado lo más precoz posible. Esto puede ser beneficioso para alcanzar un diagnóstico temprano, teniendo en cuenta que muchos pacientes con derrames pleurales y ascíticos tienen un desenlace mortal a corto plazo. El establecimiento de algoritmos consensuados con los servicios peticionarios e implicados, como AP y hematología, aumenta la capacidad del laboratorio en el diagnóstico de los líquidos biológicos.

Tabla II.
Características de los pacientes analizados

ID	Tipo	Edad	Sexo	Observación citológica	CMF	IC	Diagnóstico final
1	P	78	M	Células atípicas	43,38	1	Carcinoma de células pequeñas broncopulmonares
2	P	89	H	No células atípicas	0,00	0	Traumatismo torácico
3	A	84	H	No células atípicas	0,00	0	Insuficiencia cardiaca
4	A	84	M	Células atípicas	16,00		Carcinomatosis peritoneal de un carcinoma de ovario
5	P	86	H	No células atípicas	0,56	0	Neumonía basal derecha
6	P	84	H	Mesoteliales	0,04	0	Disnea. Enfermedad de Waldenström
7	P	69	M	No células atípicas Linfoide	0,18	0	Neumonía bilateral
8	P	72	M	Células atípicas	71,42	1	Carcinoma no microcítico de pulmón
9	P	69	H	Células atípicas	73,54	1	Adenocarcinoma de pulmón
10	A	65	H	Macrófagos	0,45	0	Cirrosis hepática de origen enólico
11	P	66	M	Macrófagos y mesoteliales	1,05	0	Adenocarcinoma ductal de páncreas
12	P	75	H	Macrófagos y mesoteliales	1,77	0	Insuficiencia cardiaca Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
13	A	66	M	Macrófagos	1,52	0	Cirrosis hepática de origen enólico
14	P	65	M	No valorable	0,02	0	Disnea
15	A	67	H	Macrófagos	0,04	0	Hepatopatía crónica en fase cirrosis
16	A	68	H	Macrófagos y mesoteliales	0,00	0	Descompensación hidrópica con ascitis refractaria
17	P	52	M	Células atípicas	62,59	1	Adenocarcinoma intestinal
18	P	52	H	No valorable	0,01	0	Tuberculosis pleural
19	A	81	H	Macrófagos y mesoteliales	3,63	0	Ascitis secundaria a hipertensión portal
20	A	37	M	Macrófagos	2,66	--	Hiperestimulación ovárica grave
21	A	58	H	Macrófagos y mesoteliales	0,36	0	Cirrosis hepática de origen enólico
22	P	70	H	Células atípicas	81,08	1	Adenocarcinoma de pulmón
23	A	61	M	Células atípicas	77,13	1	Carcinomatosis peritoneal de origen ginecológico
24	P	85	H	Células atípicas	62,22	1	Adenocarcinoma de pulmón
25	P	61	M	Macrófagos y mesoteliales	0,89	0	Adenocarcinoma de colon
26	P	88	H	Células atípicas	15,15	1	Carcinomatosis pleural
27	A	58	H	Células atípicas	1,65	1	Carcinomatosis peritoneal de origen ginecológico
28	P	73	M	Linfoide	0,05	1	Infiltración pleural por proliferación linfoide
29	P	76	H	Macrófagos	0,91	0	Pleuropericarditis aguda
30	P	71	H	Células atípicas	32,98	1	Adenocarcinoma de pulmón
31	P	91	H	No células atípicas	11,46	0	Insuficiencia cardiaca
32	P	68	M	Células atípicas	64,81	--	Carcinomatosis pleural por carcinoma de mama
33	P	75	M	Células atípicas	22,78	--	Carcinomatosis pleural

Tipo: A: ascítico; P: pleural. Sexo: M: mujer; H: hombre. CMF: citometría de flujo (expresión de células epiteliales neoplásicas, CD45-/EpCAM+). IC: inmunocitoquímica (0: negativa para malignidad; 1: positiva para malignidad; --: sin inmunocitoquímica del líquido obtenido).

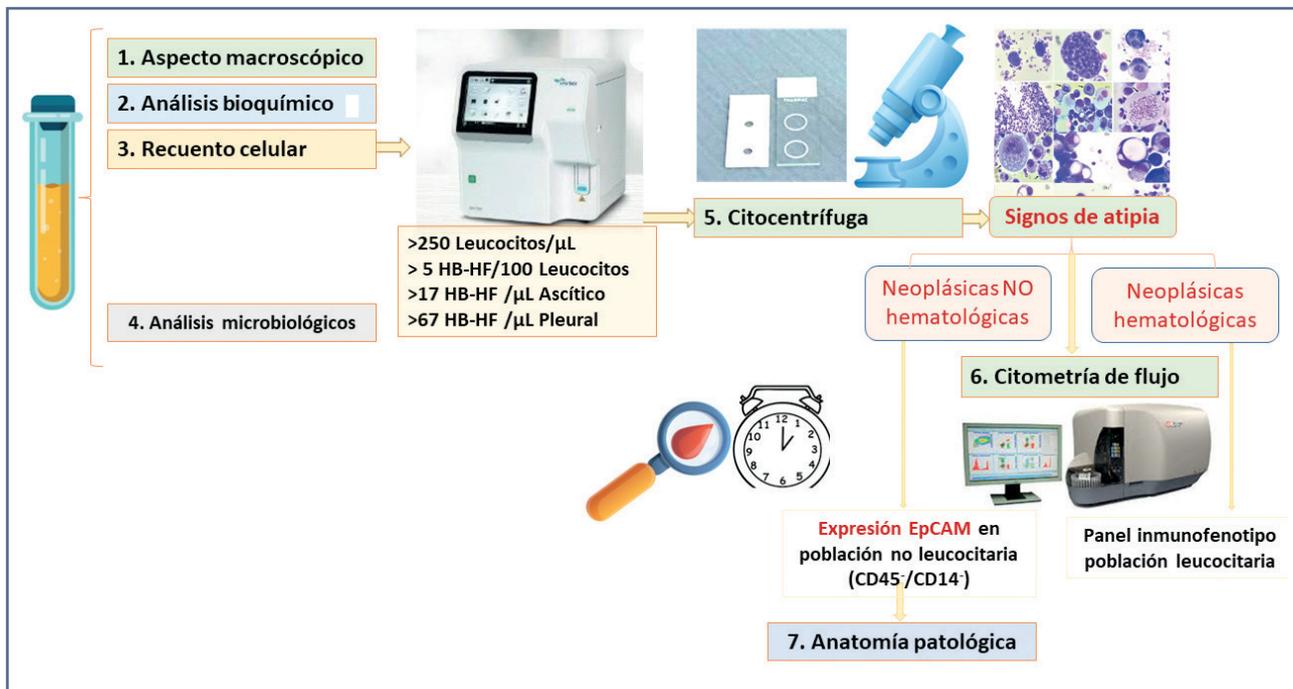


Figura 4 – Esquema de trabajo para el análisis de líquidos pleurales y ascíticos.

BIBLIOGRAFÍA

- González Hernández Á. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 3.ª ed. Madrid: Elsevier; 2019.
- Light RW. Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudates and Exudates. *Ann Intern Med* 1972;77(4):507.
- Villena Garrido V, Cases Viedma E, Fernández Villar A, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Porcel Pérez JM, et al. Recommendations of Diagnosis and Treatment of Pleural Effusion. Update. *Arch Bronconeumol Engl Ed* 2014;50(6):235-49.
- Becker G, Galandí D, Blum HE. Malignant ascites: Systematic review and guideline for treatment. *Eur J Cancer* 2006;42(5):589-97.
- Merino A. Manual de citología de sangre periférica y líquidos biológicos. 2.ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2019.
- Fentiman IS, Millis R, Sexton S, Hayward JL. Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer* 1981;47(8):2087-92.
- Mishra EK, Muruganandan S, Clark A, Bhatnagar R, Maskell N, Lee YCG, et al. Breathlessness Predicts Survival in Patients With Malignant Pleural Effusions. *Chest* 2021;160(1):351-7.
- Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Arch Bronconeumol* 2014;50(5):161-5.
- Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking A. Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 1999;20(6):350-7.
- Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730-41.
- Pillai V, Dorfman DM. Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. *Acta Cytol* 2016;60(4):336-43.
- Sarrach S, Huang Y, Niedermeyer S, Hachmeister M, Fischer L, Gille S, et al. Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Sci Rep* 2018;8(1):1801.
- Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 2006;94(1):128-35.
- Dorwal P, Moore H, Stewart P, Harrison B, Monaghan J. CD326 (Ep-CAM) testing by flow cytometric BerEP4 antibody is a useful and rapid adjunct to histopathology: CD326 BY FLOW CYTOMETRY. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94(3):536-41.
- Wong-Arteta J, Rey M, Aragón L, Gil-Rodríguez E, Bujanda L. The utility of flow cytometry in the diagnostic work up of malignant effusions due to nonhematopoietic neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom* 2020;98(6):504-15.
- Wong-Arteta J, Gil-Rodríguez E, Cabezón-Vicente R, Bereciartua-Urbieta E, Bujanda L. High fluorescence cell count in pleural fluids for malignant effusion screening. *Clin Chim Acta* 2019;499:115-7.
- Wong-Arteta J, Merino A, Torrente S, Banales JM, Bujanda L. High fluorescence cell count in ascitic body fluids for carcinomatosis screening. *Clin Chem Lab Med CCLM* 2018;56(11):272-4.
- Sahu S, Gupta P, Susheilia S, Gautam U, Dey P. Application of multicolour flow cytometry in the detection of metastatic carcinoma in serous effusions: Special emphasis in atypical cytology. *Cytopathology* 2021;32(2):169-79.
- Kundu R, Handa U, Mohan H. Role of DNA flow cytometry and immunocytochemical analysis in diagnosis of malignant effusions. *Diagn Cytopathol* 2012;40(10):887-92.
- Pillai V, Cibas ES, Dorfman DM. A Simplified Flow Cytometric Immunophenotyping Procedure for the Diagnosis of Effusions Caused by Epithelial Malignancies. *Am J Clin Pathol* 2013;139(5):672-81.
- Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. Ep-CAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011;64(5):415-20.



Artículo Especial

Utilidad y manejo de las pruebas de detección de infección activa (PDIA)

Usefulness and management of active infection diagnostic tests (AIDTs)

Daniel Pineda Tenor¹, María S. Pacheco Delgado², Santiago Prieto Menchero³, Laura Criado Gómez⁴, Enrique Prada de Medio⁵, Enrique Rodríguez Borja⁶, Verónica Cámara Hernández⁷

¹Unidad de Gestión Clínica de Laboratorio. Hospital de Antequera. Antequera, Málaga. Área de Gestión Sanitaria Norte de Málaga (AGSNM). Junta Directiva de la Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia (CCGSE) de la AEBM-ML. Madrid. ²Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid. Junta Directiva de la Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Comité de Informe de Laboratorio de la AEBM-ML. Madrid. ³Servicio de Laboratorio Clínico. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid. Junta Directiva de la Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia (CCGSE) de la AEBM-ML. Comité de Informe de Laboratorio de la AEBM-ML. Madrid. ⁴Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Móstoles. Móstoles, Madrid. Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia (CCGSE) de la AEBM-ML. Madrid. ⁵Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Virgen de la Luz. Cuenca. Junta Directiva de la Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia (CCGSE) de la AEBM-ML. Madrid. ⁶Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia. Junta Directiva de la Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Comité de Informe de Laboratorio de la AEBM-ML. Madrid. ⁷Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Getafe. Getafe, Madrid. Junta Directiva de la Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio AEBM-ML. Madrid

Recibido: 15/02/2022
Aceptado: 15/02/2022

Correspondencia: Daniel Pineda Tenor. Unidad de Gestión Clínica de Laboratorio. Hospital de Antequera. Avenida Poeta Muñoz Rojas, s/n. 29200 Antequera, Málaga
e-mail: daniel.pineda.sspa@juntadeandalucia.es

Se envía artículo solicitado en el seno de la junta directiva de la Sociedad Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio (AEBM-ML) para dar respuesta a las múltiples dudas planteadas por socios y profesionales ante el uso correcto de las pruebas de detección de infección activa COVID-19. El artículo ha sido realizado por el Comité de Calidad, Gestión, Segu-

ridad y Evidencia, el Comité de Informe de Laboratorio y miembros de la propia Junta.

Con el objetivo de facilitar su lectura, el trabajo se presenta en formato de infografía.

Palabras clave: COVID-19. SARS-CoV-2. RT-PCR. Prueba rápida de detección de antígeno. Diagnóstico. Cribado.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00120

Pineda Tenor D, Pacheco Delgado MS, Prieto Menchero S, Criado Gómez L, Prada de Medio E, Rodríguez Borja E, Cámara Hernández V. Utilidad y manejo de las pruebas de detección de infección activa (PDIA). Rev Med Lab 2022;3(1):21-24



D Pineda Tenor^{1,2}, M Pacheco Delgado^{1,3}, S Prieto Menchero^{1,3}, L Criado Gómez², E Prada de Medio^{1,2}, E Rodríguez Borja^{1,3}, V Cámara Hernández¹.
1. Junta directiva AEBM-ML; 2. Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia; 3. Comité de Informe de Laboratorio

Documento de la AEBM-ML
Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio
Versión 1
Fecha: 23 de Enero de 2022

¿Qué tipos de test permiten detectar infección activa de SARS-CoV-2?

La estrategia diagnóstica de la COVID-19 (CORonaVirus Disease 2019) se realiza actualmente en base a pruebas para la detección de infección activa (PDIA) del virus SARS-CoV-2, las cuales incluyen test moleculares y test rápidos de detección de antígenos:

1 Técnicas moleculares. Amplificación de ácidos nucleicos

Detección de ARN viral mediante técnicas de amplificación de ácido nucleico (*Nucleid acid amplification test - NAAT*), que incluyen la TMA (*Transcription mediated amplification*), la RT-LAMP (*Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification*) y la RT-PCR (*Reverse Transcripción Polymerase Chain Reaction*). Esta última constituye la prueba de referencia, dada su elevada sensibilidad y especificidad. Las dianas de amplificación más frecuentes incluyen en los genes E (envuelta), S (espícula), N (nucleocápside) y marco abierto de lectura (ORF) 1ab.

Sus resultados se proporcionan como umbral de ciclo de positividad (*cycle threshold - Ct*). La amplificación del material genético de la muestra tiene lugar de forma exponencial a lo largo de un número de ciclos que se repiten de forma secuencial. El Ct indica el número de ciclos en los que la señal fluorescente sobrepasa el umbral de detección. Este valor constituye una medida semicuantitativa que está inversamente relacionada con las copias de ARN presente en la muestra, por lo que permite estimar de forma indirecta la carga viral del paciente.

Sensibilidad y especificidad de la RT-PCR en relación al Ct

RT-PCR Ct	Estudios Bibliografía	Muestras	casos	Sensibilidad media % (IC 95%)	Especificidad media RT-PCR % (IC 95%)
Global	32	4.537	1.973	95,5 (91,5-97,7)	98,8 (98,3-99,2)
Ct ≤ 30	6	204	204	100 (98,2-100)	-
Ct > 30	6	149	149	95,6 (55,7-99,7)	-

Dinnes et al. Cochrane Library. 2021; 3(3)

La RT-PCR puede ser considerada la técnica de elección para determinar infección activa, debido a que presenta la mayor sensibilidad y especificidad. Resultados positivos pueden ser observados días antes del establecimiento de los síntomas, y están presentes durante todo el curso de la enfermedad. Su elevada complejidad metodológica requiere laboratorios especializados y personal cualificado, suponiendo además tiempos de procesamiento largos y emisión de resultados 12-72 horas tras su solicitud. Cabe destacar que la detección de ARN viral no supone necesariamente la presencia de virus infeccioso en las muestras clínicas. De la misma forma, debido a la amplia distribución de la variante Omicron y a la actual pauta de vacunación es posible encontrar individuos portadores de SARS-CoV-2 que no padecen la enfermedad.

2 Test Rápidos de Detección de Antígenos

Sensibilidad de los test de antígenos en relación a la Ct de la RT-PCR

RT-PCR Ct	Estudios bibliografía	Muestras	Casos	Sensibilidad media test de antígeno % (IC 95%)
Ct ≤ 25	36	2.613	2.632	94,5 (91,0-96,7)
Ct > 25	36	2.632	2.632	40,7 (31,8-50,3)
Ct > 33/32	15	346	346	8,9 (3,3-21,7)

Test rápidos de detección de Antígenos (*Rapid Antigen Diagnostic Test, RADT*). Detección mediante técnicas inmunocromatográficas de flujo lateral de antígeno viral, siendo los más frecuentes la proteína N (nucleocápside) o S (espícula). Sus resultados son cualitativos (presencia o ausencia de antígeno), con una ventana de detección, una sensibilidad y una especificidad inferior a la aportada por la RT-PCR. Su principal ventaja es la rapidez de la prueba, que puede ser realizada en 15-30 minutos.



La OMS recomienda que los test de antígenos presenten una sensibilidad ≥ 80 % y una especificidad ≥ 97 %.

Dinnes et al. Cochrane Library. 2021; 3(3)

Los datos de sensibilidad y especificidad proporcionados por los fabricantes suelen ser obtenidos en condiciones de detección ideales, no ajustadas a la realidad clínica. El empleo de test de antígenos posee una capacidad de detección adecuada en pacientes con elevada carga viral. La positividad en función del valor Ct de RT-PCR es variable dependiendo de los estudios y test empleados, considerándose adecuado en pacientes con Ct ≤ 25. La especificidad de estos test suele ser muy elevada con independencia de la carga viral. Dada su facilidad de análisis y su rápido tiempo de respuesta, es especialmente útil en cribados iniciales (siendo recomendable la realización de RT-PCR en pacientes negativos con alta sospecha) y en aquellos casos en los que no se encuentre disponible la posibilidad de realización de RT-PCR o su tiempo de respuesta sea superior a 36 horas.

¿Cómo se relacionan los resultados de estos test?

Relación entre valor de Ct de la RT-PCR, la carga viral, la positividad del RADT y crecimiento en cultivo celular



El valor de Ct obtenido en una RT-PCR no debe ser utilizado como cuantificación de la carga viral. Sin embargo, se ha descrito que existe una relación inversa entre el Ct y la carga viral, así como la probabilidad de recuperación de virus infeccioso en cultivo celular.

La detección de ARN viral no supone necesariamente la presencia de virus infeccioso en una muestra clínica.

El valor de Ct obtenidos en una RT-PCR se encuentra relacionado con la capacidad de crecimiento viral en cultivo celular, que se considera indicador de su capacidad infectiva. La presencia o no de sintomatología no afecta a esta capacidad de crecimiento. Si bien existe variabilidad en la bibliografía, se considera que un valor Ct de 34 equivale a unas 10⁶ partículas virales en 10 mL de una muestra nasofaríngea o de saliva. En este punto, no se observa crecimiento en cultivo celular. Se requieren cargas virales elevadas, de 10⁵-10⁶ para positividad en detección de test de antígeno.



Info-COVID-19 | Utilidad y manejo de las Pruebas de Detección de Infección Activa (PDIA)

2/3

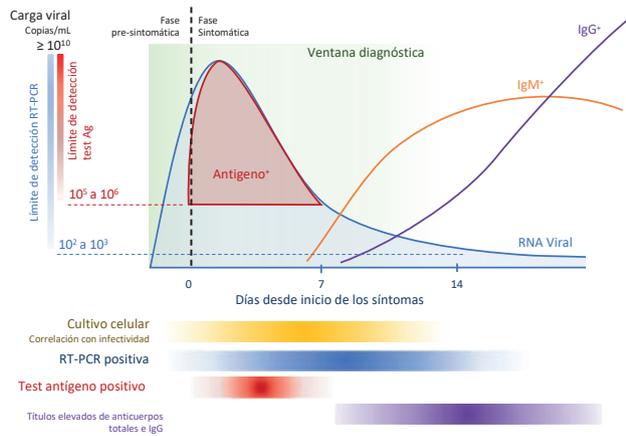
D Pineda Tenor^{1,2}, M Pacheco Delgado^{1,3}, S Prieto Menchero^{1,3}, L Criado Gómez², E Prada de Medio^{1,2}, E Rodríguez Borja^{1,3}, V Cámara Hernández¹.

1. Junta directiva AEBM-ML; 2. Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia; 3. Comité de Informe de Laboratorio

Documento de la AEBM-ML
Asociación Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio
Versión 1
Fecha: 23 de Enero de 2022

¿Cuándo es útil aplicar los test que permiten detectar infección activa de SARS-CoV-2?

Línea temporal para el adecuado uso de diferentes test diagnósticos y respuesta del paciente



Drain et al. N Eng J Med 2022;386(3) y Peeling et al. Lancet December 20 2021

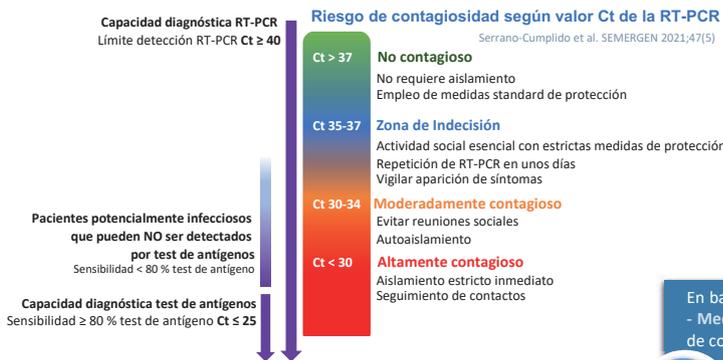
Los tiempos de positividad de los diferentes test presentados en la presente gráfica corresponden a situaciones generales, pero están sujetos a variación. Es posible encontrar pacientes persistentes con Ct de RT-PCR detectables durante varias semanas tras resolución de los síntomas, así como test de antígenos positivos más allá de la primera semana tras el establecimiento de los síntomas.

La interpretación del Ct de la RT-PCR presenta limitaciones, tales como el no expresarse con valores lineales, la dependencia de su valor en función del tipo y calidad de la toma (condiciones preanalíticas incorrectas pueden derivar en falsos negativos) y la existencia de variabilidad intra e inter-prueba. Además, la RT-PCR detecta presencia de ARN viral, pero no su viabilidad. Por tanto, su interpretación debe ser realizada en el contexto clínico/epidemiológico del paciente.

La interpretación del resultado de los test rápidos de antígenos debe ser realizada con cautela. Resultados falsos negativos pueden tener lugar si la toma de muestra es inadecuada, así como si se evalúan fuera de su ventana de detección. Resultados falsos positivos son frecuentes si la realización analítica del test es incorrecta, empleando otras sustancias diluyentes (agua, zumo...) en lugar del buffer destinado a tamponar el pH durante la unión del antígeno.

Tal y como ha sido descrito anteriormente, la capacidad de contagiosidad de un paciente depende de su carga viral, que es proporcional a la capacidad de recuperación de virus infeccioso e inversamente proporcional a los Ct de la RT-PCR. En cualquier caso, la transmisibilidad es un fenómeno complejo sin técnicas validadas para su medición.

La Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN) ha publicado una revisión según la cual un valor de Ct ≥ 37 se asocia a cargas virales lo suficientemente bajas como para considerar al paciente como no contagioso, mientras que pacientes con Ct inferiores a 30 presentan un riesgo elevado de contagiosidad por hallarse asociados a alta carga viral.



La correcta interpretación de este esquema de riesgo requiere considerar la situación clínica/epidemiológica del paciente, ya que valores elevados de Ct pueden ser observados en pacientes con infección en vías de resolución, pero también en los momentos iniciales de la misma.

Los valores de Ct son además variables, pues son dependientes de las condiciones preanalíticas (pueden dar lugar a Ct erróneamente elevados) y de las características de las plataformas analíticas y los métodos empleados para su detección (diferencias de varios ciclos entre distintos sistemas de evaluación).

1 Los síntomas de la COVID-19 aparecen de 2 a 14 días tras la exposición, con una media de 3 a 5 días tras la infección. Se ha descrito que en el 1% de los pacientes los síntomas pueden aparecer a partir del día 14, existiendo adicionalmente pacientes asintomáticos.

2 La RT-PCR es capaz de detectar presencia del virus **unos 3 días antes del establecimiento de la sintomatología**, una vez que se alcanza un nivel de carga viral superior a los 10^2 - 10^3 copias/mL, **y se mantiene positiva durante todo el curso de la infección**. La carga viral es máxima antes de la manifestación de los síntomas y durante los primeros 3-5 días, decayendo hasta hacerse indetectable (la duración media de replicación es de unos 17 días, pudiendo prolongarse en el tiempo).

3 Los **test rápidos de antígenos** pueden ser positivos uno o dos días antes del establecimiento de los síntomas, aunque se ha descrito que estos presentan una adecuada sensibilidad diagnóstica dentro de la **primera semana tras la instauración de la sintomatología**. Se requieren cargas virales superiores de 10^5 - 10^6 para su detección.

Relación entre sintomatología y positividad de test de antígenos

Días desde inicio de los síntomas	Estudios bibliografía	Muestras	casos	Sensibilidad media test de antígeno % (IC 95 %)
Semana 1	26	5.769	2.320	78,3 (71,1-84,1)
Semana 2	22	1.581	692	51,0 (40,8-61,0)
Asintomáticos	12	1.581	295	58,1 (40,2-74,1)

Dinnes et al. Cochrane Library. 2021; 3(3)

4 Los **test serológicos de anticuerpos** pueden ser positivos durante la infección aguda y tras la resolución de la misma, asociándose a presencia única de IgG a infección pasada o vacunación. En cualquier caso, **no se consideran útiles para determinar infección activa**, sino herramientas para evaluar el estado epidemiológico del paciente.

¿Es posible estratificar el riesgo de contagiosidad en base a estos test?

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) indica sin embargo que **la utilización del Ct para inferir contagiosidad del paciente puede ser inadecuada**, debido a que este valor es dependiente tanto de las condiciones preanalíticas (tipo de muestra y medio de transporte, calidad de la muestra, condiciones de almacenamiento, tiempo de vortexado) como de las características analíticas del proceso (método y condiciones de extracción, plataforma empleada para amplificación y detección de ARN viral, dianas, técnicas de amplificación, fluoróforos que marcan las sondas, líneas base de los canales y ciclos del experimento).

En base a la evidencia disponible, la Sociedad Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio (AEBM-ML) recomienda que la evaluación del riesgo de contagiosidad en base a los PDIA debe considerar que:

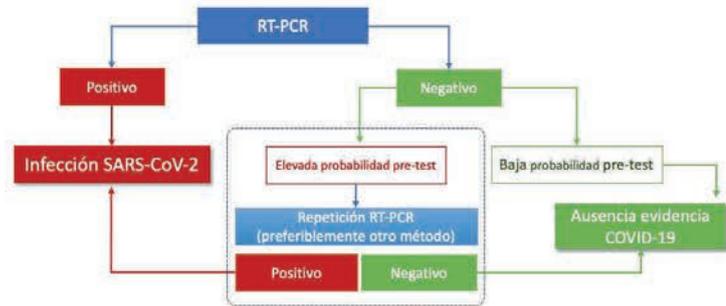
1 Los pacientes con resultados RT-PCR Ct < 30 o resultado positivo en test rápido de antígeno presentan riesgo de contagiosidad. La asignación de nivel de riesgo presenta sin embargo limitaciones.

2 Resultados RT-PCR Ct ≥ 30 o resultados negativos en test rápido de antígeno no permiten descartar la contagiosidad y debe valorarse en el contexto clínico/epidemiológico del paciente.

¿Cómo se aplican los test que permiten detectar infección activa de SARS-CoV-2?

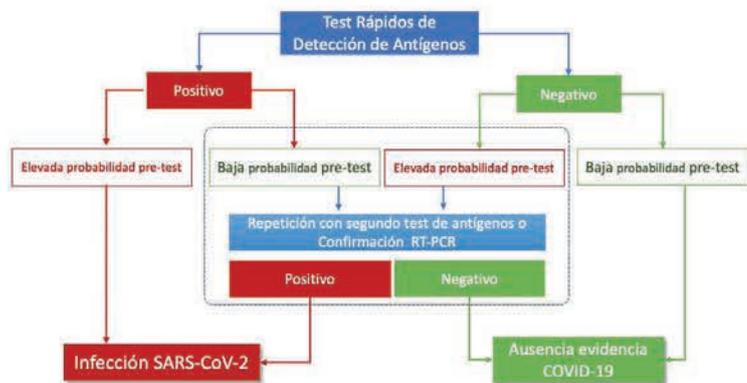
1 RT-PCR

- Se considera la **técnica de referencia** debido a su elevada sensibilidad y especificidad.
- Un **resultado positivo puede ser evaluado en base a su Ct**, pues este valor orienta sobre el momento de la infección y el riesgo de contagiosidad.
- Un **resultado negativo**, en presencia de elevada probabilidad pre-test, no descarta la infección, pues puede ser consecuencia de una inadecuada toma, transporte o conservación de la muestra, así como de errores puntuales en la fase analítica. De la misma forma, la evaluación puede haber sido realizada en momentos iniciales de la infección, con carga viral aún indetectable. En ambos casos, se recomienda su repetición mediante una segunda RT-PCR, a ser posible, mediante método diferente.



2 Test Rápidos de Detección de Antígenos

- Menos sensibles y específicos que la RT-PCR. Sin embargo, dada su **facilidad de manejo y rapidez de resultados** son útiles en aquellas circunstancias en las que las técnicas moleculares no estén disponibles, sus tiempos de respuesta sean superiores a 36 horas o se requiere realizar de forma inmediata un cribado en grupo de riesgo.
- Un **resultado positivo indica infección activa de SARS-CoV-2 con elevada especificidad**. Es necesario considerar sin embargo que la actuación preanalítica ha de ser adecuada, pues el empleo de sustancias que alteren el pH o el uso de buffers incorrectos o en mal estado pueden generar falsos positivos. Si la probabilidad pre-test es baja, es posible repetir un segundo test de antígeno o confirmar mediante técnica molecular.
- Un **resultado negativo ha de ser interpretado en el contexto clínico/epidemiológico del paciente**. Es posible que pacientes COVID-19, contagiosos o no, ofrezcan resultados negativos debido a concentraciones por debajo del límite de detección del test (asociado a cargas virales bajas). De la misma forma, la correcta toma de muestra es esencial para asegurar la fiabilidad de los resultados. En casos de probabilidad pre-test elevada, se recomienda confirmación del resultado mediante repetición de test de antígeno o preferiblemente mediante técnica molecular.



Se considera que la **probabilidad pre-test es elevada** cuando:

- Existen evidencias clínicas de infección, ya sean sintomatológicas o por resultados de pruebas de laboratorio o imagen
- El paciente ha tenido un contacto estrecho con alta probabilidad de contagio

Se considera que la **probabilidad pre-test es baja** cuando:

- El paciente es asintomático o carece de clínica sugestiva
- El paciente no presenta contacto estrecho o sus contactos son de bajo riesgo (baja exposición, medidas de prevención adecuadas, espacios abiertos, individuos vacunados)

Bibliografía

- Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based test for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Cochrane database Syst Rev [Internet] 2021;3(3).
- Greub G, Caruana G, Schweitzer M, Imperiali M, Muigg V, Risch M, et al. Multicenter Technical Validation of 30 Rapid Antigen test for the Detection of SARS-CoV-2 (VALIDATE). Microorganisms [Internet] 2021;9(12):2589.
- Serrano-Cumplido A, Ruiz Garcia A, Segura-Fragoso A, Olmo-Quintana V, Micó Pérez RM, Barquilla-García A, et al. Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19. Semergen [Internet] 2021;47(5):337-41.
- Drain PK. Rapid Diagnostic Testing for SARS-CoV-2. Solomon CG, editor. N Engl J Med [Internet] 2022;386(3):264-72.
- Oba J, Taniguchi H, Sato M, Takamatsu R, Morikawa S, Nakagawa T, et al. RT-PCR Screening test for SARS-CoV-2 with Saliva Samples in Asymptomatic People: Strategy to Maintain Social and Economic Activities while Reducing the Risk of Spreading the Virus. Keio J Med [Internet] 2021;70(2):35-43.
- Scheiblaue H, Filomena A, Nitsche A, Puyskens A, Corman VM, Drosten C, et al. Comparative sensitivity evaluation for 122 CE-marked rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen, Germany, September 2020 to April 2021. Euro Surveill 2021;26(44):2100441.
- Peeling RW, Heymann DL, Teo Y-Y, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. Lancet 2021;20:S0140-6736(21)02346-1.
- Ministerio de Sanidad. Instituto de Salud Carlos III. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19. Actualizado a 22 de Diciembre de 2021. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos.htm>
- Observaciones SEIMC en relación con la interpretación de la Ct-PCR de SARS-CoV-2. <https://www.seimc.org>
- Posicionamiento de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (SEIMC) ante la situación actual (7 de febrero 2022) de la pandemia de COVID-19 en España. <https://www.seimc.org>



Special Article

Usefulness and management of active infection detection tests (AIDTs)

Utilidad y manejo de las pruebas de detección de infección activa (PDIA)

Daniel Pineda Tenor¹, María S. Pacheco Delgado², Santiago Prieto Menchero³, Laura Criado Gómez⁴, Enrique Prada de Medio⁵, Enrique Rodríguez Borja⁶, Verónica Cámara Hernández⁷

¹Laboratory Clinical Management Unit. Hospital de Antequera. Antequera, Málaga. Spain. Área de Gestión Sanitaria Norte de Málaga (AGSNM). Board of Directors, Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Quality, Management, Safety, and Evidence Committee (CCGSE), AEBM-ML. Madrid, Spain. ²Clinical Laboratory Department. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid. Spain. Board of Directors, Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Laboratory Reporting Committee, AEBM-ML. Madrid, Spain. ³Clinical Laboratory Department. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid. Spain. Board of Directors, Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Quality, Management, Safety, and Evidence Committee (CCGSE), AEBM-ML. Laboratory Reporting Committee, AEBM-ML. Madrid, Spain. ⁴Clinical Laboratory Department. Hospital Universitario de Móstoles. Móstoles, Madrid. Spain. Quality, Management, Safety, and Evidence Committee (CCGSE), AEBM-ML. Madrid, Spain. ⁵Clinical Laboratory Department. Hospital Virgen de la Luz. Cuenca, Spain. Board of Directors, Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Quality, Management, Safety, and Evidence Committee (CCGSE), AEBM-ML. Laboratory Reporting Committee, AEBM-ML. Madrid, Spain. ⁶Clinical Laboratory Department. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia, Spain. Board of Directors, Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Laboratory Reporting Committee, AEBM-ML. Madrid, Spain. ⁷Clinical Laboratory Department. Hospital Universitario de Getafe. Getafe, Madrid. Spain. Board of Directors, Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio AEBM-ML. Madrid, Spain

Received: 15/02/2022
Accepted: 15/02/2022

Correspondence: Daniel Pineda Tenor. Laboratory Clinical Management Unit. Hospital de Antequera. Avenida Poeta Muñoz Rojas, s/n. 29200 Antequera. Málaga, Spain
e-mail: daniel.pineda.sspa@juntadeandalucia.es

We submit an article requested within the board of directors of the *Sociedad Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio* (AEBM-ML) to answer multiple concerns reported by members and other professionals regarding the right usage of active infection detection tests for Covid-19. The article was written by the Quality, Management, Safety, and Evi-

dence Committee, the Laboratory Reporting Committee, and Board members.

In order to facilitate reading, the paper is *submitted in infographic format*.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. RT-PCR. Rapid antigen detection test. Diagnosis. Screening.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

DOI: 10.20960/revmedlab.00123

Pineda Tenor D, Pacheco Delgado MS, Prieto Menchero S, Criado Gómez L, Prada de Medio E, Rodríguez Borja E, Cámara Hernández V. Usefulness and management of active infection detection tests (AIDTs). Rev Med Lab 2022;3(1):25-28



D Pineda Tenor^{1,2}, M Pacheco Delgado^{1,3}, S Prieto Menchero^{1,3}, L Criado Gómez², E Prada de Medio^{1,2}, E Rodríguez Borja^{1,3}, V Cámara Hernández¹.

1, Board of Directors AEBM-ML; 2, Quality, Management, Safety, and Evidence Committee; 3, Laboratory Reporting Committee

AEBM-ML Information Guide
Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio
Version 1
Date: January, 23rd 2022

What types of tests may be used to detect active infection with SARS-CoV-2?

The diagnostic approach to **COVID-19** (COroNaVIrus Disease 2019) is currently based on active infection detection tests (AIDTs) for SARS-CoV-2, and include both molecular tests and rapid antigen detection tests:

1 Molecular techniques. Nucleic acid amplification

Viral RNA detection using nucleic acid amplification tests (NAATs), which include TMA (Transcription-Mediated Amplification), RT-LAMP (Reverse Transcriptase - Loop-Mediated Isothermal Amplification), and **RT-PCR** (Reverse Transcripción Polymerase Chain Reaction). The **latter represents the reference test given its high sensitivity and specificity**. Most common gene amplification targets include E (envelope), S (spike), N (nucleocapsid), and ORF (open reading frame) 1ab.

Results are provided as a positivity cycle threshold (Ct).

A sample's genetic material amplification is exponential over a number of cycles that repeat sequentially. A Ct indicates the number of cycles where the fluorescent signal crosses the threshold of detection. This value represents a semi-quantitative measure that is inversely related to RNA copies in the sample, hence it provides an indirect estimation of viral load.

Sensitivity and specificity of RT-PCR as related to Ct

RT-PCR Ct	Study references	Samples	Cases	Mean sensitivity, % (95 % CI)	Mean specificity of RT-PCR, % (95 % CI)
Global	r	4,537	1,973	95.5 (91.5-97.7)	98.8 (98.3-99.2)
Ct ≤ 30	6	204	204	100 (98.2-100)	-
Ct > 30	6	149	149	95.6 (55.7-99.7)	-

Dimnes et al. Cochrane Library. 2021; 3(3)

RT-PCR may be considered the technique of choice to identify active infection as it offers the highest sensitivity and specificity. Positive results may be seen days before symptom onset, and persist throughout the course of disease. Its high methodological complexity requires specialist laboratories and qualified personnel, and involves long processing times with results being reported 12-72 hours after the test was requested. Notably, detection of viral RNA does not necessarily entail the presence of infectious viruses in clinical samples. Similarly, given the wide spread of the Omicron variant and current vaccination schedule, healthy SARS-CoV-2 carriers may also be found.

Rapid Antigen Detection Tests

Sensitivity of antigen tests as related to RT-PCR Ct

RT-PCR Ct	Study references	Samples	Cases	Mean sensitivity of antigen test, % (95 % CI)
Ct ≤ 25	36	2,613	2,632	94.5 (91.0-96.7)
Ct > 25	36	2,632	2,632	40.7 (31.8-50.3)
Ct > 33/32	15	346	346	8.9 (3.3-21.7)

Dimnes et al. Cochrane Library. 2021; 3(3)

Rapid antigen detection tests (**RADT**). Detection using lateral flow immunochromatographic assays, with most common targets being protein N (nucleocapsid) or S (spike). **Results are qualitative (presence or absence of antigen)** with inferior **detection window, sensitivity, and specificity when compared to RT-PCR**. Its primary advantage is test speed, as it can be performed within 15-30 minutes.

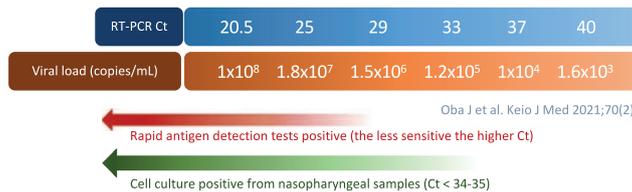


The WHO recommends that antigen tests display a sensitivity ≥ 80 % and specificity ≥ 97 %.

Sensitivity and specificity data as supplied by the manufacturers are usually obtained under ideal rather than actual clinical conditions. Antigen tests have an adequate detection capacity in patients **with higher viral loads. Positivity as related to RT-PCR Ct value is variable according to the various studies and tests, and is deemed to be adequate in patients with Ct ≤ 25**. Test specificity is usually very high regardless of viral load. Given their ease of use and shorter response times these tests are particularly useful for initial screenings (with RT-PCR being recommended for high-suspicion, negative patients) and in cases where RT-PCR is unavailable or has response times longer than 36 hours.

How do the results of these tests relate?

Relationship between RT-PCR Ct, viral load, RADT positivity, and growth in cell culture



A RT-PCR Ct value should not be used for viral load quantification. However, an inverse relationship has been reported between Ct and viral load, as well as with the probability of infectious virus recovery in cell cultures.

Viral RNA detection does not necessarily entail the presence of infectious viruses in a clinical sample.

A RT-PCR Ct value is related to viral growth capacity in a cell culture, which is considered an indicator of infectious capacity. The presence or absence of symptoms does not affect such growth capacity.

Although variability may be found in the literature, a Ct value of 34 is deemed to be equivalent to approximately 10⁶ viral particles in 10 mL of either a nasopharyngeal or saliva sample. Here no viral growth in cell culture may be observed. Higher viral loads of 10⁵-10⁶ are required for positivity in an antigen detection test.



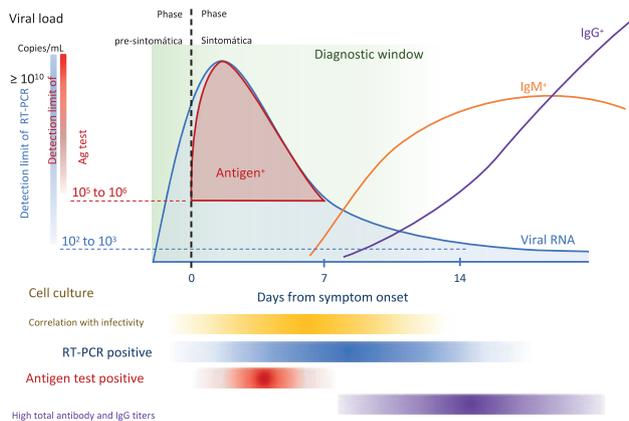
D Pineda Tenor^{1,2}, M Pacheco Delgado^{1,3}, S Prieto Menchero^{1,3}, L Criado Gómez², E Prada de Medio^{1,2}, E Rodríguez Borja^{1,3}, V Cámara Hernández¹.

¹, Board of Directors AEBM-ML; ², Quality, Management, Safety, and Evidence Committee; ³, Laboratory Reporting Committee

AEBM-ML Information Guide
Asociación Española de Biopatología Médica – Medicina de Laboratorio
Version 1
Date: January, 23rd 2022

When is it useful to administer tests for detecting active infection with SARS-CoV-2?

Timeline for the proper use of different diagnostic tests and patient response



Drain et al. N Eng J Med 2022;386(3) y Peeling et al. Lancet December 20 2021

The times to positivity for the various tests included in the graph above correspond to general conditions but may vary. Patients may be found with RT-PCR Ct's detectable for several weeks after symptom clearance, as well as antigen tests that remain positive beyond the first week after symptom recovery.

Interpreting RT-PCR Ct has limitations including expression with non-linear values, dependence on sample collection type and quality (wrong pre-analytical conditions may result in false negative results), and presence of intratest or intertest variability. Furthermore, RT-PCR detects the presence of viral RNA but not its viability. Therefore, interpretation must fit the patient's clinical/epidemiological context.

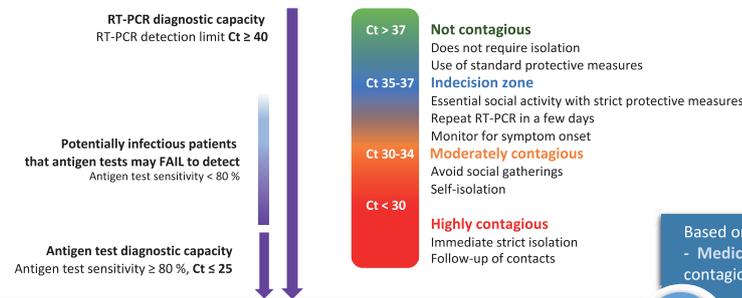
Any interpretation of rapid antigen test results must be cautious. False negative results may occur when sample collection is inadequate or assessment lies outside the detection window. False positive results are common when testing is flawed by using other diluents (water, juice...) rather than the appropriate pH buffer during antigen binding.

As was described above, a patient's contagiousness depends on viral load, which is proportional to infectious virus recovery and inversely proportional to RT-PCR Ct. Anyway, transmissibility is a complex phenomenon with no validated techniques to measure it.

The **Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN)** has published a review according to which a Ct ≥ 37 is associated with viral loads low enough for patients to be deemed not contagious, whereas patients with Ct lower than 30 have a high contagiousness risk because of association with high viral loads.

Contagion risk according to RT-PCR Ct value

Serrano-Cumplido et al. SEMERGEN 2021;47(5)



However, the **Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)** points out that **using Ct to infer patient contagiousness may be inappropriate**, since this value is dependent upon both preanalytical conditions (sample type and means of transportation, sample quality, storage conditions, vortex time) and analytical process characteristics (extraction method and conditions, platform used for viral RNA amplification and detection, targets, amplification techniques, probe fluorophores, channel baselines, and experiment cycles).

Based on the available evidence, the **Sociedad Española de Biopatología Médica - Medicina de Laboratorio (AEBM-ML)** recommends that any assessment of contagiousness risk based on AIDTs should consider the following:

1 Patients with RT-PCR Ct < 30 or positive results in a rapid antigen test may be contagious. Assigning a risk level has however limitations.

2 RT-PCR Ct ≥ 30 or negative results in a rapid antigen test do not rule out contagiousness and should be evaluated within the patient's clinical/epidemiological context.

A correct interpretation of this risk diagram requires consideration of the patient's clinical/epidemiological context since high Ct values may be seen in patients with infection in the process of being resolved and also early in the course of infection. Furthermore, Ct values are variables as they depend on pre-analytical conditions (which may result in erroneously high Ct values), analysis platform characteristics, and detection methods (differences in cycles between different assessment systems).

1 COVID-19 symptoms develop at 2 to 14 days after exposure, with a mean of 3 to 5 days after infection. It has been reported that in 1 % of patients symptoms may develop after day 14, while asymptomatic individuals also exist.

2 RT-PCR is able to identify the virus at **around 3 days before symptom onset**, once viral load exceeds 10^2 - 10^3 copies/mL, and remains positive throughout the course of infection. Viral load peaks before symptom onset, within the first 3-5 days, and then decreases to become eventually undetectable (mean replication time is around 17 days, and may become longer over time).

3 **Rapid antigen tests** may be positive one or two days prior to symptom onset, and have been reported to display adequate diagnostic sensitivity within the **first week after symptom onset**. Detection requires viral loads greater than 10^5 - 10^6 copies/mL.

Relationship between symptoms and antigen test positivity

Days from symptom onset	Study references	Samples	Cases	Mean sensitivity of antigen test, % (95 % CI)
Week 1	26	5,769	2,320	78.3 (71.1-84.1)
Week 2	22	1,581	692	51.0 (40.8-61.0)
Symptom-free	12	1,581	295	58.1 (40.2-74.1)

Dinnes et al. Cochrane Library, 2021; 3(3)

4 **Antibody serology tests** may be positive during acute infection and after infection resolution, and are associated with presence of only IgG against past infection or vaccination. At any rate, **they are not considered useful to identify active infection** but rather as tools to evaluate a patient's epidemiological status.

Is it possible to stratify contagiousness risk based on these tests?

Case Report**Seminal fluid anaphylaxis. A rare clinical condition***Anafilaxia del líquido seminal: una afección clínica poco común**Marta Sofia Carvalho Fernandes¹, Rosa Anita Fernandes², Cristina Lopes²*Serviço de ¹Patologia Clínica and ²Unidade de Imunoloregologia. Unidade Local de Saúde de Matosinhos (ULSM). Hospital Pedro Hispano (EPE). Matosinhos, Portugal**Received:** 30/09/2021**Accepted:** 21/11/2021**Correspondence:** Marta Sofia Carvalho Fernandes. Serviço de Patologia Clínica. Unidade Local de Saúde de Matosinhos (ULSM). Hospital Pedro Hispano. Rua Dr. Eduardo Torres, 4464-513. Senhora da Hora. Matosinhos, Portugal
e-mail: martascf23@gmail.com**CASE REPORT**

A 27-year-old female was referred to our department for complaints of generalized urticaria, chest tightness, dyspnea and hypotension following sexual intercourse.

For 3 years, the patient has experienced similar reactions with previous partners and as a result, now carries an epinephrine auto injector. The patient avoids systemic reactions by practicing abstinence and the use of latex condoms.

The patient denied having localized symptoms, history of food or drug allergies but did report a positive skin *prick* test that tests to dogs.

Our institution conducted a female skin prick test using the partner's seminal fluid (SF) supernatant. A fresh semen sample that was requested from the male partner, was centrifuged at Clinical Pathology laboratory, at 387 G for 15 minutes to separate the spermatozoa from the supernatant, which was used for immediate testing. The male partner also served as negative control for skin tests to exclude false-positive irritant reactions in the female patient. The results were observed 15 minutes later (Fig. 1).



Figure 1 – Male (left) and female (right). Skin Prick Test using partner's SF

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

DOI: 10.20960/revmedlab.00104

Carvalho Fernandes MS, Fernandes RA, Lopes C. Seminal fluid anaphylaxis. A rare clinical condition. Rev Med Lab 2022;3(1):29-30

Male: S-SF. wheal: 0 mm; flare: 0 mm; CN: negative, control: 0 mm (saline solution); Hist: positive control. Wheal: 6 mm; flare: 12 mm (histamine solution).

Female: S-partner's SF. Wheal: 6 mm; flare: 12 mm; CN: negative control, 0 mm (saline solution). Hist: positive control. Wheal: 6 mm. Flare: 12 mm (histamine solution).

Consequently, the diagnosis was confirmed by the patient's significant positive reaction to the male partner's supernatant SF which resulted in a 6 mm diameter wheal with a surrounding flare (positive control histamine 6 mm) and negative result to saline solution (negative control). He had a negative result and, had a positive reaction to histamine.

Additionally, other complementary serologic tests were requested. A sample of total peripheral blood from the female patient was collected to a serum gel separator tube 4.9 ml (Sarstedt S-Monovette®, German). After a centrifugation (2754 G for 10 min), the serum was removed and stored in a micro sample tube adequately at -20 °C. Then a specific serum IgE antibodies to the SF proteins using immunoCap assay (Phadia®, Sweden) and a molecular *Canis familiaris* allergen 5 (Can f 5), were performed.

The patient displayed a negative result to IgE antibodies to the SF proteins (< 10 KU/L) and a significant sensitization to dog allergen Can f 5 (22.4 KU/L), a protein homologous to human prostate specific antigen (PSA).

To prevent subsequent reactions, condom usage and epinephrine auto injector was suggested.

Finally, the couple was referred to a fertility clinic to help in the management of artificial insemination due to the high risk of anaphylaxis with the alternative method of intravaginal graded desensitization to dilutions of SF.

DISCUSSION

Less than 90 cases of human SF allergy have been reported worldwide (1). It affects young women with serious impact on their relationships. Misdiagnosis and the socially delicate nature, results in uncertainty regarding their prevalence (1-3).

A variety of reactions have been reported ranging from vulvar or vaginal pain, pruritus, dermal reactions to systemic allergic reactions including anaphylaxis or both (1,4). In most of the cases the signs and symptoms began within the first 30 minutes following ejaculation and after a first episode of sexual intercourse (1,3).

The PSA was identified as the major allergen. Some data suggests the existence of cross-reactivity between the human PSA and a dog allergen prostatic kallikrein.

This protein is found in dog urine, a component of dog hair and epithelia, now known as Can f 5, suggesting a possible link to her SF allergy (6,7).

In this case, female skin prick testing was conducted using the partner's SF with a positive result to confirm the clinical suspicion of SF anaphylaxis. Serologic testing, a specific serum IgE assay to the SF result negative, but this test is rarely positive and has not been clinically validated. A positive test result to Can f 5 (a protein homologous to human PSA) is a suitable molecular marker to dog allergy (1).

General preventative measures include condom usage, abstinence, prophylactic premedication, intravaginal or subcutaneous SF desensitization (1).

As the presented female has a life-threatening systemic reaction to SF and wishes to conceive, the use of washed spermatozoa in artificial insemination was recommended (1,3).

POINTS TO REMIND:

- Despite being a rare clinical condition, SF anaphylaxis is a hardship on couples that are affected by it.
- Caused by IgE mediated sensitization to human SF proteins during or after coitus.
- Symptomatology ranges from local pruritus to serious, life-threatening systemic reactions.
- By way of cross-reactivity, it is possible that women with pre-existing dog allergy might react more severely to human SF.
- There is a need to raise awareness of this condition which will help with the stress and concerns that patients may have. Early detection will enable providers to direct appropriate treatment.

REFERENCES

1. Bernstein DI. Allergic reactions to seminal plasma. Up to date 2019.
2. Wolthers OD. A five-year follow-up of human seminal plasma allergy in an 18-year-old woman. *Case Rep Med* 2012;257246.
3. Lema VM. Allergy to human seminal plasma: Case report and literature review. *Women's Health & Gynecology* 2017;3(3).
4. Puerta-Suárez J, Cardona-Maya W. Alergia al plasma seminal humano: ¿mito o realidad? *Rev Chil Ginecol* 2013;78(3):193-200.
5. Herrero Gil D, Garcés Sotillos M, Bartolomé B, Fuentes Cuesta M, Manzanedo Ortega L, Pérez Giménez R, et al. Hipersensibilidad al fluido seminal humano. *Alergol Inmunol Clin* 2000;16:308-328.
6. Basagaña M, Bartolome B, Pastor-Vargas C, Mattsson L, Lidholm J, Labrador-Horrillo M. Involvement of Can f 5 in a case of human seminal plasma allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;159(2):143-6.
7. Mattsson L, Lundgren T, Everberg H, Larsson H, Lidholm J. Prostatic kallikrein: A new major dog allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(2):3628.



Caso Clínico

Síndrome inflamatorio en niño de 11 años asociado a la infección por SARS-CoV-2

Inflammatory syndrome in an 11-year-old child associated with SARS-CoV-2

Beatriz Nafría Jiménez

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián

Recibido: 21/10/2021
Aceptado: 11/12/2021

Correspondencia: Beatriz Nafría Jiménez. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Donostia. Begiristain Doktoorea Pasealekua, 107. 20014 San Sebastián
e-mail: bea.nafria.95@gmail.com

CASO CLÍNICO

Se presenta el caso de un niño de 11 años que acudió al servicio de urgencias pediátricas después de tener fiebre de más de 38 °C durante 3 días, con manchas maculopapulosas en las extremidades inferiores, cefalea migrañosa y diarrea abundante. Como antecedentes personales, destacaba un ligero sobrepeso (62 kg) y que había estado en contacto estrecho con un caso confirmado de COVID-19 hacía 8 días. En el momento del ingreso, en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en exudado nasofaríngeo para la detección de infección activa por SARS-CoV-2 (Real Time PCR, Bio-Rad®) no se detectó RNA.

A su llegada, presenta palidez cutánea y alguna lesión petequial aislada en el tronco y lesiones eritematosas en las piernas. En la exploración física se percibe un quejido respiratorio intermitente, con una frecuencia respiratoria de 20 rpm, SatO₂ del 99 %, una frecuencia cardíaca de 80 lpm y tensión arterial de 128/60 mmHg. En la analítica sanguínea al ingreso destacaba la elevación de marcadores inflamatorios, enzimas cardíacas,

dímero-D y pruebas de función renal y hepática. Asimismo, presentaba una disminución de sodio, albúmina, linfopenia y trombopenia (Tabla I).

Como pruebas complementarias se realizó un electrocardiograma (ECG), que mostró un ritmo sinusal a 92 lpm (en límites normales para la edad), intervalo PR variable sin llegar a bloqueo auriculoventricular (BAV) y sin otras alteraciones cardíacas destacables (sin ritmo nodal). La radiografía de tórax tampoco reveló anomalías. En cuanto a la detección de infección por virus respiratorios (SARS-CoV-2, virus respiratorio sincitial e influenza A y B), los resultados de las PCR a partir del hisopo nasofaríngeo fueron, de nuevo, no detectables. No obstante, se realizó un análisis de anticuerpos totales (por quimioluminiscencia [CLIA], LIAISON®) para SARS-CoV-2 anti-N, anti-S e IgG resultando positivos, con serología IgM negativos. Con probabilidad, este perfil serológico es compatible con un estado de convalecencia pos-COVID reciente debido a la variabilidad de la cinética viral en los diferentes estados evolutivos de la infección. El hemocultivo y el urocultivo fueron negativos. Se descartaron otras causas infecciosas concomitantes.

Conflicto de intereses: la autora declara no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00108

Nafría Jiménez B. Síndrome inflamatorio en niño de 11 años asociado a la infección por SARS-CoV-2. Rev Med Lab 2022;3(1):31-35

Tabla I.

Resultados de las pruebas de laboratorio al ingreso

	Resultado	Valores de referencia (VR)
Bioquímica*		
Glucosa, mg/dL	100	70-110
Creatinina, mg/dL	1,15	0,48-0,82
Sodio, mEq/L	132	135-145
Cloro, mEq/L	95	93-110
Potasio, mEq/L	2,6	3,1-5,1
Proteínas totales, g/dL	6,6	6,6-8,7
Albumina, g/dL	3,5	3,7-5,1
Calcio, mg/dL	8,9	8,8-10,8
Bilirrubina total, mg/dL	0,5	0-1,1
AST, U/L	71	0-46
ALT, U/L	62	0-39
LDH, U/L	275	120-300
PCR, mg/L	282	0-5
Ferritina, ng/mL	1103	20-200
IL-6, pg/mL	152	0-7
PCT, ng/mL	6,56	< 0,5
VSG, mm	64	0-20
NT-ProBNP, pg/mL	568	0-300
Troponina T, ng/L	9	0-14
Hemograma [†]		
Hematíes, $\times 10^6$ μ L	3,69	3,9-5,2
Hemoglobina, g/dL	11,2	11-15
Hematocrito, (%)	30,7	34-45
VCM, fL	83,2	76-95
HCM, pg	30,4	25-32
CHCM, g/dL	36,5	31-37
Plaquetas, $\times 10^3$ μ L	71	180-500
Leucocitos, $\times 10^3$ / μ L	4,92	4,5-13,5
Neutrófilos, $\times 10^3$ / μ L (%)	3,62 (73,6)	1,7-8,0 (31-67)
Linfocitos, $\times 10^3$ / μ L (%)	0,52 (10,6)	1,5-6,5 (22-51)
Monocitos, $\times 10^3$ / μ L (%)	0,73 (14,8)	0,1-0,9 (1,5-9,0)

(Continúa en la columna siguiente)

Tabla I (cont.)

Resultados de las pruebas de laboratorio al ingreso

	Resultado	Valores de referencia (VR)
Eosinófilos, $\times 10^3$ / μ L (%)	0,03 (0,5)	0,0-0,7 (0,5-5,5)
Basófilos, $\times 10^3$ / μ L (%)	0,01 (0,2)	0,0-0,2 (0-1,8)
Hemostasia [‡]		
TP, (%)	90	70-140
INR	1,1	0,8-1,2
TTPA, s	40	24-36
TTPA ratio	1,38	0,8-1,2
Dímero-D, ng/mL	910	1-500
Fibrinógeno, mg/dL	667	200-400

*Bioquímica sérica (COBAS c702 Roche®, Barcelona, España). [†]Hemograma (SYSMEX XN-9100 Roche®, Barcelona, España). [‡]Hemostasia (STA R Max®-System Stago®, Barcelona, España). AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleucina-6; PCT: procalcitonina; VSG: velocidad de sedimentación globular; NT-ProBNP: fragmento amino terminal del péptido natriurético B; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media eritrocitaria; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media; TP: tiempo de protrombina; INR: ratio internacional normalizada; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada.

En vista del cuadro clínico, de los resultados anteriores y como contacto con un caso COVID-19 positivo, se diagnostica al paciente de SIM-PedS e ingresa en la UCI pediátrica.

DISCUSIÓN

Desde que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la pandemia por el nuevo Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2) el 11 de marzo de 2020, millones de personas se han infectado y han fallecido en todo el mundo; en España, ha sido la causa de más de 86000 muertes (1).

Durante este tiempo, se han tomado diversas medidas preventivas (restricción de la movilidad, utilización de mascarillas, límites de aforos, distancia de seguridad, etc.) y se ha trabajado a un ritmo sin precedentes para desarrollar vacunas seguras y eficaces con el objetivo de lograr la mayor inmunización de rebaño (de RNA mensajero, como las de Pfizer/BioNTech® y Moderna®, o de vectores virales, como las de Oxford/Astrazeneca® y Janssen/Johnson&Johnson®) (1,2). Gracias a todas estas estrategias, las tasas de contagio y de mortalidad debido a la enfermedad por coronavi-

rus 2019 (COVID-19) han disminuido significativamente y en los pacientes pediátricos aún son menores.

En nuestro país, hasta ahora, la seroprevalencia en individuos menores a 18 años es inferior al 4 %. De forma general se ha descrito en la población pediátrica un curso clínico asintomático o más leve en comparación con los adultos (3). No obstante, ha aparecido un número creciente de casos en los que los niños que se han infectado desarrollan un síndrome inflamatorio sistémico de expresividad variable que puede evolucionar de forma grave, con miocarditis, *shock* cardiogénico y que precise el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Por consenso entre diferentes sociedades científicas, este síndrome se denomina "síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico asociado a SARS-CoV-2" (SIM-PedS)" (3,4).

A diferencia de la COVID-19 del adulto, que presenta síntomas respiratorios, el SIM-PedS se manifiesta típicamente con daño multiorgánico, de forma progresiva, y afecta predominantemente al sistema cardiovascular (4). De acuerdo con la definición publicada por la OMS, se caracteriza en niños y en adolescentes (de 0 a 19 años de edad) por la aparición de fiebre (más de 3 días) con al menos dos de los siguientes hallazgos: 1) erupción cutánea o conjuntivitis bilateral no purulenta o signos de inflamación mucocutánea; 2) hipotensión o *shock*; 3) cualquier evidencia de disfunción cardíaca junto con el aumento de los niveles de troponina y NT-proBNP; 4) cualquier evidencia de coagulopatía; 5) problemas gastrointestinales agudos; 6) aumento de marcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva, y 7) sin otra causa microbiana obvia de inflamación y evidencia de una infección por SARS-CoV-2 (5,6). Además, cabe destacar que la mayoría de estos pacientes tiene anticuerpos IgG positivos frente al SARS-CoV-2, con la PCR ya negativa; es decir, unos hallazgos de laboratorio cuya interpretación refleja una infección pasada (inmune).

Algunos de estos rasgos clínicos y analíticos son similares a los observados en la enfermedad reumatólogica pediátrica de Kawasaki (KD, síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos que cursa con una vasculitis de la infancia que puede causar aneurismas de la arteria coronaria), el síndrome de *shock* tóxico estafilocócico o síndromes de activación macrofágica. Sin embargo, existen características distintas, como la epidemiología, la edad de inicio, que puede afectar a niños mayores y adolescentes, síntomas gastrointestinales, disfunción cardíaca predominante y niveles extremadamente elevados de biomarcadores inflamatorios, como la hiperferritinemia (7).

Aunque este cuadro clínico afortunadamente no es muy frecuente, dadas las complicaciones que pueden desencadenarse, el papel del laboratorio clínico es de vital importancia para proporcionar parámetros capaces de discriminar entre casos graves y leves de la manera más precoz posible.

A nivel del laboratorio, de los datos conocidos hasta el momento, incluido el paciente actual, se ha obtenido

que los hallazgos característicos consisten en linfopenia y trombocitopenia, además de elevaciones en las enzimas hepáticas, creatinina, procalcitonina, marcadores inflamatorios (PCR, IL-6 y ferritina), marcadores cardíacos (troponina y pro-BNP) y estudios de coagulación (dímero-D y fibrinógeno) (8). Además, todos los pacientes con sospecha de SIM-PedS deben someterse a un ecocardiograma para evaluar la función cardíaca, cuyas lesiones se deben tanto a la invasión directa del virus, que conduce a la muerte de los cardiomiocitos, como a la lesión miocárdica indirecta por la activación de cascadas inflamatorias, hipoxemia o trastornos metabólicos (5).

Aunque aún son necesarias más investigaciones sobre la fisiopatología, algunos estudios han explicado condiciones de la respuesta inmune exacerbada, tormenta de citoquinas, hiperinflamación, daño vascular y cambio epitelial reactivo, lo que podría contribuir a los resultados de los biomarcadores de inflamación. En cuanto a la cinética viral, de acuerdo con la evidencia existente, la sensibilidad de detección de IgM y de IgG aumenta en el curso de la infección (es superior al 90 % en la segunda semana tras el inicio de los síntomas), mientras que los resultados de la PCR se van negativizando (el porcentaje de positivos es de aproximadamente el 90 % entre los días 8 y 14 y del 70 % entre los días 15 y 29 tras inicio de los síntomas) (9). A su vez, el SIM-PedS se presenta con mayor frecuencia 3-4 semanas después de la infección inicial y la mayoría de pacientes presenta serología IgG positiva, lo que sugiere una desregulación inmunitaria desencadenada por el virus SARS-CoV-2 más que un efecto patogénico viral directo (6,9).

Con respecto al tratamiento, dadas algunas similitudes con la KD, la mayoría de los pacientes con SIM-PedS se tratan con inmunoglobulina intravenosa (IGIV, tratamiento estándar para la KD). Además, los hallazgos de miocarditis en muchos pacientes con SIM-PedS también apoyan el tratamiento con IGIV, dado su uso en la práctica clínica para la miocarditis viral. El inicio de antibióticos de amplio espectro también es apropiado porque la presentación clínica dificulta la exclusión de la infección bacteriana; sin embargo, el tratamiento antibiótico debe interrumpirse una vez que se haya excluido la infección, con la normalización de los parámetros analíticos y la mejoría clínica del paciente (10). Las características de la tormenta de citoquinas conllevan el uso de dexametasona o de metilprednisolona para suprimir la respuesta inmune y el hallazgo concurrente frecuente de una presentación similar a un *shock* grave en estos pacientes alienta al uso de glucocorticoides (9,10). Además, en casos graves o refractarios, pueden usarse los inhibidores de IL-1 (anakinra) e IL-6 (tocilizumab).

En nuestro caso, con el ingreso del paciente en la UCI se inició el tratamiento con IGIV y metilprednisolona. Además, ante la elevación de reactantes de fase aguda y el cuadro clínico presentado se decidió administrar cefotaxima (antibioterapia empírica), que se mantuvo

durante 7 días a 130 mg/kg al día. A nivel respiratorio, inicialmente requirió soporte con cánulas nasales a 1,5 L/min para mantener SatO_2 en rango. El episodio se resolvió en dos días. Conforme se estabiliza, presenta una mejoría progresiva de la pancitopenia, con la práctica normalización de la cifra de plaquetas y el incremento de linfocitos, junto con el descenso del dímero D y de los parámetros de inflamación y de marcadores cardiacos (Fig. 1). Hemodinámicamente se mantuvo estable, con tendencia a la bradicardia sinusal intermitente (40-50 lpm), pero en los ECG de control no se objetivaron alteraciones ni imágenes de BAV.

Afortunadamente, tras 4 días de ingreso en UCI, ante la estabilidad clínica y la mejoría de los marcadores informados por el laboratorio, se decidió su traslado a planta, donde se administró una segunda dosis de IGIV y se completaron 7 días del tratamiento con corticoides. En todo momento se mantuvo afebril. Tras comprobar la ausencia de alteraciones cardiacas en la ecocardiografía, fue dado de alta con buen estado general.

Generalmente, una vez los marcadores inflamatorios, los cardiacos y el resto de parámetros analíticos del laboratorio se han normalizado, los niños se mantienen afebriles, normotensos, no requieren soporte respira-

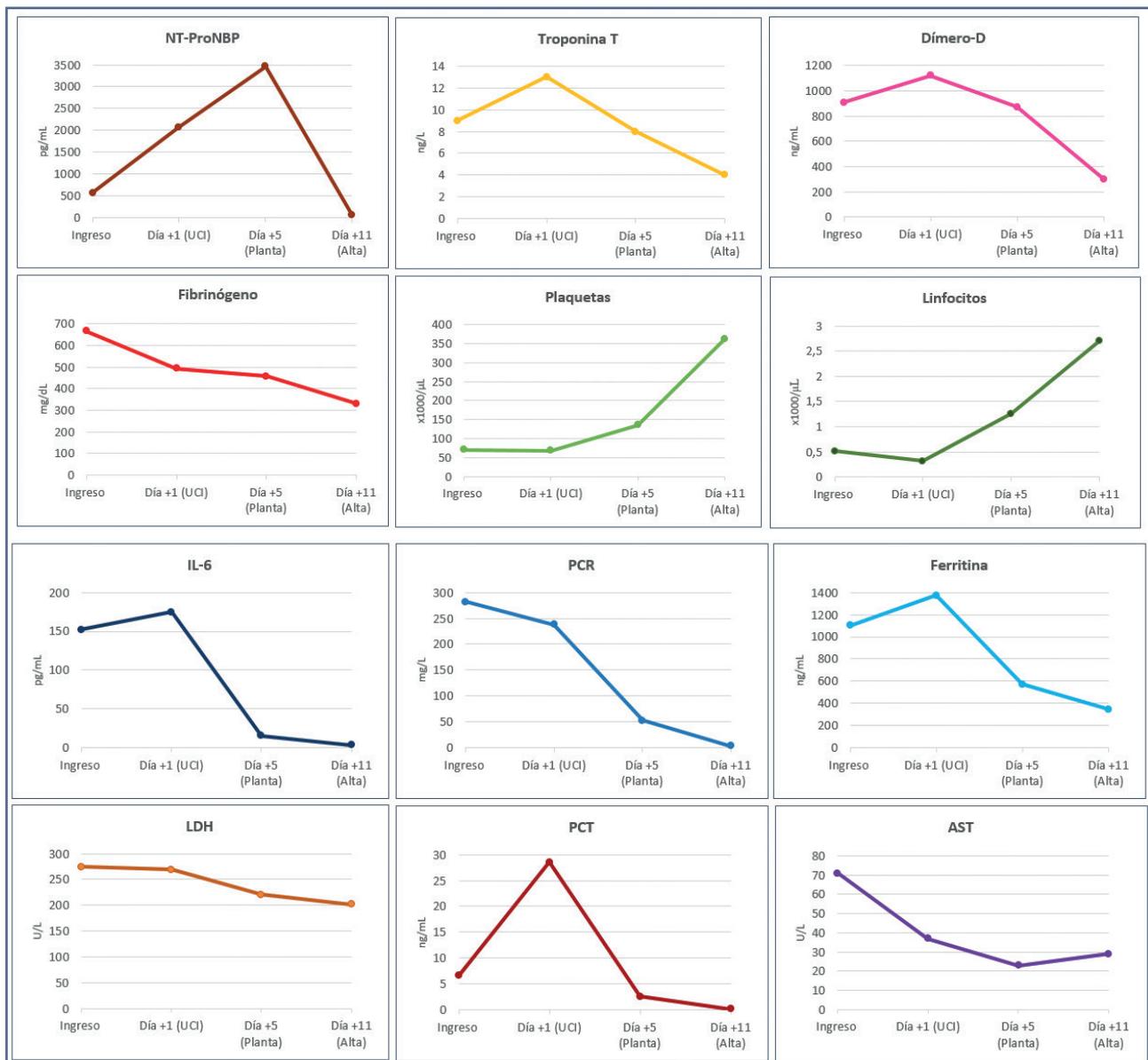


Figura 1 — Evolución del estudio de biomarcadores del paciente. Evolución de los hallazgos más característicos de los marcadores inflamatorios y cardiacos y de los estudios de coagulación y de los parámetros hematológicos. Se representan los niveles de los parámetros en cuatro puntos temporales: al ingreso, en el primer día ingresado en UCI, en el quinto día de ingreso (que es su primer día tras pasar de la UCI a planta) y en el último día de ingreso total antes de ser dado de alta.

torio y pueden ser dados de alta (7). No obstante, el seguimiento cercano es muy importante, ya que la evolución del SIM-PedS aún no está del todo clara y las posibles secuelas a largo plazo aún están por determinar. Por todo ello, un diagnóstico precoz, un abordaje multidisciplinar y la instauración de medidas terapéuticas adecuadas son fundamentales para mejorar el pronóstico de este subconjunto de pacientes pediátricos.

PUNTOS A RECORDAR:

- El SIM-PedS es una consecuencia de una respuesta exacerbada del sistema inmunológico que se caracteriza por hiperinflamación y tormenta de citoquinas, incluida la liberación masiva de mediadores inflamatorios, lo que podría demostrarse en parte por los biomarcadores del laboratorio.
- Aunque no es muy frecuente, el SIM-PedS es un diagnóstico crítico a considerar en cualquier niño con fiebre, evidencia de inflamación y disfunción orgánica.
- Se recomienda la realización de un hemograma, bioquímica sanguínea (con estudio de biomarcadores de infección en inflamación), gasometría con lactato y coagulación (incluyendo dímero-D). Asimismo, deben descartarse otras causas infecciosas potencialmente causantes del cuadro clínico, por lo que se recomienda hemocultivo, PCR en aspirado y lavado nasal para patógenos respiratorios y despistaje de otras infecciones según clínica.
- Debido a que la afectación miocárdica es el sello distintivo de un estado hiperinflamatorio y juega un papel importante en la progresión de la enfermedad, los marcadores cardíacos (incluidos troponina, pro-BNP y AST) deben monitorizarse para el manejo y la predicción del pronóstico del SIM-PedS.
- En la estabilización inicial y en el tratamiento de los pacientes con SIM-PedS, tanto los glucocorticoides como la inmunoglobulina intravenosa se consideran las modalidades de primera línea más comunes para el tratamiento inmunomodulador, pues reducen la respuesta inflamatoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Informes de situación de la COVID-19 [Internet]. Paho.org [citado el 22 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/informes-situacion-covid-19>
2. CDC. Vacunas contra el COVID-19 [Internet]. Cdc.gov. 2021 [citado el 22 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/index.html>
3. Sánchez-Oro R, Fatahi Bandpey ML, García Martínez E, Edo Prades MÁ, Alonso Muñoz EM. Clinical and radiological findings for the new multisystem inflammatory syndrome in children associated with COVID-19. *Radiologia (Engl Ed)* 2021;63:334-44.
4. Caro-Patón GL, de Azagra-Garde AM, García-Salido A, Cabrero-Hernández M, Tamariz A, Nieto-Moro M. Shock and myocardial injury in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection: What we know. Case series and review of the literature. *J Intensive Care Med* 2021;36:392-403. DOI: 10.1177/0885066620969350
5. Zhao Y, Yin L, Patel J, Tang L, Huang Y. The inflammatory markers of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and adolescents associated with COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol* 2021;93:4358-69. DOI: 10.1002/jmv.26951
6. Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, Collins JP, Newhams MM, Son MBF, et al. Multisystem Inflammatory Syndrome in U.S. Children and Adolescents. *N Engl J Med* 2020;383:334-46. DOI: 10.1056/NEJMoa2021680
7. Cabrero-Hernández M, García-Salido A, Leoz-Gordillo I, Alonso-Cadenas JA, Gochi-Valdovinos A, González Brabin A, et al. Severe SARS-CoV-2 infection in children with suspected acute abdomen: A case series from a tertiary hospital in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2020;39:e195-8. DOI: 10.1097/INF.0000000000002777
8. Rodríguez-Smith JJ, Verweyen EL, Clay GM, Esteban YM, de Loizaga SR, Baker EJ, et al. Inflammatory biomarkers in COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children, Kawasaki disease, and macrophage activation syndrome: a cohort study. *Lancet Rheumatol* 2021;3:e574-84. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00139-9
9. García-Salido A, Antón J, Martínez-Pajares JD, Giralt García G, Gómez Cortés B, Tagarro A, et al. Documento español de consenso sobre diagnóstico, estabilización y tratamiento del síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico vinculado a SARS-CoV-2 (SIM-PedS). *An Pediatr (Engl Ed)* 2021;94:116.e1-116.e11. DOI: 10.1016/j.anpedi.2020.09.005
10. Son MBF, Murray N, Friedman K, Young CC, Newhams MM, Feldstein LR, et al. Multisystem inflammatory syndrome in children - initial therapy and outcomes. *N Engl J Med* 2021;385:23-34. DOI: 10.1056/NEJMoa2102605

Imagen / Infografía**Identificación casual de *Enterobius vermicularis*
en el sedimento de orina*****Casual identification of Enterobius vermicularis in urine sediment*****Mariagracia Zárate, Ricardo Rubio-Sánchez, Esperanza Lepe-Balsalobre**

UGC Laboratorio Clínico. Hospital Universitario Virgen de Valme. Área de Gestión Sanitaria Sur de Sevilla. Sevilla

Recibido: 09/01/2022
Aceptado: 26/01/2022**Correspondencia:** Ricardo Rubio-Sánchez. UGC Laboratorio Clínico. Hospital Universitario Virgen de Valme. Área de Gestión Sanitaria Sur de Sevilla. Ctra. de Cádiz, km. 548,9. 41014 Sevilla
e-mail: ricubsan@gmail.com

Se expone el caso de una paciente de 7 años, sin antecedentes personales de interés, que acude al Servicio de Urgencias por dolor y prurito en la zona perineal; la paciente no presenta disuria ni orinas colúricas. En el examen físico se detecta una hiperemia vulvovaginal, sin signos de sobreinfección, y una escasa secreción vaginal blanquecina. Ante la sospecha de infección del tracto urinario se solicita análisis sistemático de orina, sedimento y cultivo urinario. En la tira reactiva de la orina destaca la presencia de 500 leucocitos/ μ L, siendo los nitritos negativos. La paciente es dada de alta con una sospecha diagnóstica de vulvovaginitis y tratamiento con cefixima a la espera del resto de resultados. En el sedimento urinario destaca la presencia de elementos formes con forma ovalada, incoloras y con una doble membrana, sugestivas de ser huevos de *Enterobius vermicularis* (1) (Fig. 1). Se confirma el hallazgo con el Laboratorio de Microbiología y se modifica el tratamiento a mebendazol. El urocultivo, tras dos días, resulta negativo.

Enterobius vermicularis es un nematodo que se distribuye ampliamente por todo el intestino grueso y es el responsable de la enfermedad intestinal enterobia-

**Figura 1** — Huevos de *Enterobius vermicularis* en la muestra de orina.**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00113

Zárate M, Rubio-Sánchez R, Lepe-Balsalobre E. Identificación casual de *Enterobius vermicularis* en el sedimento de orina. Rev Med Lab 2022;3(1):36-37

sis, infección muy común en pacientes pediátricos. La hembra grávida es quien migra fuera del ano, generalmente por la noche, y deposita los huevos en la región perianal, desde donde pueden contaminar la orina (2,3). Este caso muestra la importancia de la visualización del sedimento urinario y la correcta identificación de todos sus elementos. El tamaño de los huevos de *Enterobius vermicularis* es de aproximadamente 55 mm × 26 mm y, aunque es difícil confundirlos con las células habitualmente observadas en el sedimento, un observador poco experimentado podría confundirlos con algún artefacto, como por ejemplo granos de polen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kang W-H, Jee S-C. Enterobius vermicularis (Pinworm) Infection. N Engl J Med 2019;381(1):e1. DOI: 10.1056/NEJMicm1811156
2. Medina AF, Mellado MJ, García M, Piñero R, Martín P. Parasitosis intestinales. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica, 2008. Disponible en: <http://www.enfermeriaaps.com/portal/wp-content/uploads/2013/02/Parasitosis-intestinales.-AEP-2012.pdf>
3. Rawla P, Sharma S. Enterobius Vermicularis. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536974/>



Imagen / Infografía

Cristales de colesterol en líquido pericárdico

Cholesterol crystals in pericardial fluid

Maialen Ormazabal Monterrubio, Romina García Sardina, Pedro José Espinosa Prados

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander

Recibido: 25/11/2021
Aceptado: 26/01/2022

Correspondencia: Maialen Ormazabal Monterrubio. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Avenida Valdecilla, s/n. 39008 Santander
e-mail: maialen.ormazabal@scsalud.es

La pericarditis por cristales de colesterol es una forma infrecuente de enfermedad pericárdica caracterizada por la presencia de numerosos cristales de colesterol en el líquido pericárdico. En raras ocasiones se manifiesta como pericarditis constrictiva o taponamiento cardiaco, como en nuestro caso, lo que representa una urgencia cardiológica que requiere tratamiento inmediato (1). Puede ser idiopática o asociarse a diferentes enfermedades sistémicas, como la artritis reumatoide, entre otras (2). El diagnóstico de estas pericarditis solo puede hacerse por pericardiocentesis y examen del líquido pericárdico (3).

Paciente varón de 43 años, fumador de 15 cigarros al día y consumidor esporádico de alcohol. Ingresado en el 2017 por artritis reumatoide activa con una pericarditis aguda con derrame pericárdico (4), en segui-

miento desde entonces en consultas de cardiología. En noviembre del 2021 se le realizó una ecocardiografía en la que se observó un taponamiento cardiaco sobre una pericarditis efusiva constructiva de base en contexto de artritis reumatoide seropositiva, por lo que se decidió realizar una pericardiocentesis evacuando el líquido pericárdico, con lo que mejoró la clínica del paciente, como la disnea de esfuerzo y los edemas en las extremidades inferiores (5).

El líquido pericárdico que nos llegó al laboratorio mostraba un color amarillo/dorado, en el que observamos abundantes estructuras cristalinas que correspondían a cristales de colesterol (Fig. 1). La figura pertenece al estudio de este líquido por microscopio óptico de luz visible y luz polarizada con compensador rojo a 400 aumentos.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00114

Ormazabal Monterrubio M, García Sardina R, Espinosa Prados PJ. Cristales de colesterol en líquido pericárdico. Rev Med Lab 2022;3(1):38-39

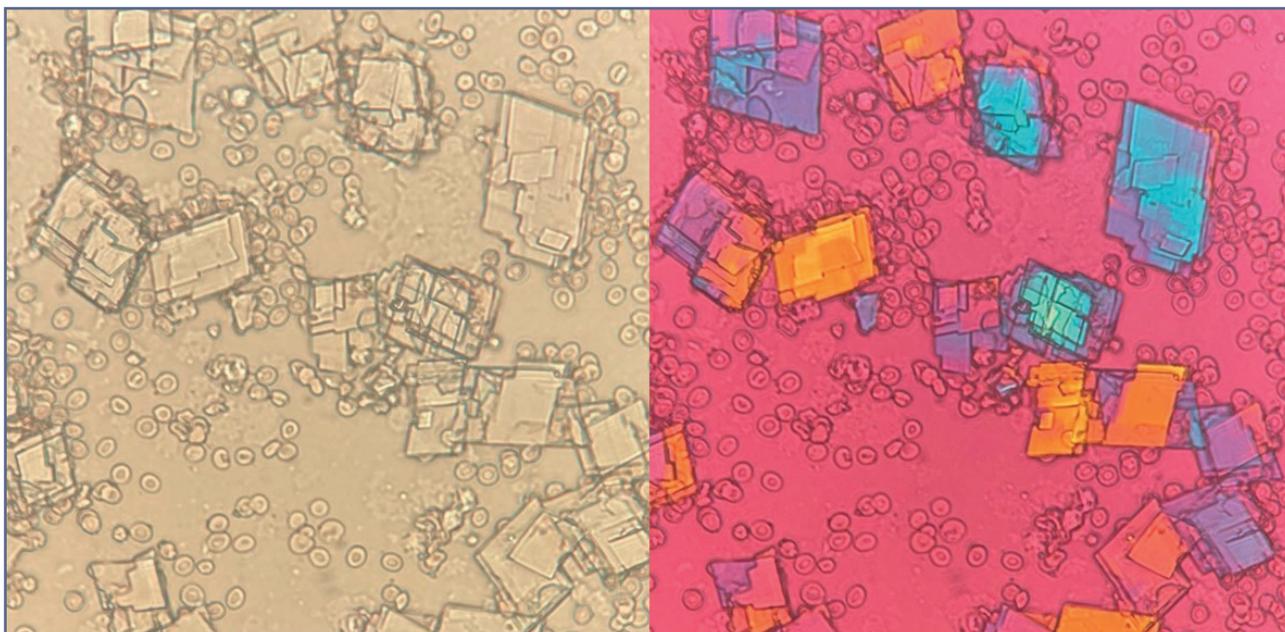


Figura 1 – Cristales de colesterol en líquido pericárdico (izquierda, luz visible; derecha, luz polarizada).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ortiz I, Ramos M, Clavellina J, Martínez C, Soto P, Calderón M. Pericarditis por cristales de colesterol en un paciente con artritis reumatoide. Archivos de Cardiología; 2014.
2. Jiménez A, Montes PM, Vitoria Y, Rodrigo D, Subinas J, Barretxea JI. Pericarditis con cristales de colesterol. Rev Esp Cardiol 2001;54:1119-20.
3. Barcin C, Yalcinkaya E, Kabul HK. Cholesterol pericarditis associated with rheumatoid arthritis: A rare cause of pericardial effusion. Int J Cardiol 2013;166(3).
4. Conforti A, Di Cola I, Pavlych V, Ruscitti P, Berardicurti O, Ursini F, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev 2021;20(2):102735. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102735
5. Edroso PE, Rodríguez A, Salvador JM. Pericarditis idiopática por cristales de colesterol. Med Intens 2019;43(8):519-20.



En recuerdo de Santiago Martínez del Olmo

In memory of Santiago Martínez del Olmo

El pasado 13 de marzo de 2022 falleció nuestro compañero y amigo Santiago Martínez del Olmo. Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid y especialista en análisis clínicos fundó en 1975, junto a su inseparable compañero Rafael, los Laboratorios Toledo y en 1996, el Centro de Análisis Sanitarios (CAS). Santiago siempre tuvo una especial sensibilidad por los temas relacionados con la profesión, tanto la farmacia como el laboratorio, por lo que entró en el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y más tarde se incorporó a la Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA). Fue partícipe de su nacimiento y en ella desempeñó distintos cargos hasta ejercer de presidente entre los años 2004 y 2011.

Desde sus inicios, Santiago vio claro el futuro de la asociación, que tenía como objetivos prioritarios el reconocimiento de la especialidad, la calidad de los laboratorios y la formación continuada de sus asociados. Junto a un equipo único e irrepetible de amigos y de compañeros, entre ellos Jaime Cobreros, Camilo Fernández Espina y Juan Domingo Saigí, crearon los cimientos de AEFA. Más tarde, Santiago, junto con Ramón Goya, lograron consolidar la asociación con su sede en Madrid, en una decisión personal arriesgada pero vital para su futuro.

Como presidente vivió una de las etapas decisivas para los análisis clínicos en España: la creación, junto con la Sociedad Española de Química Clínica (SEQC) y la Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM), de la revista única *Laboratorio Clínico* y del congreso único, así como la consolidación de las relaciones internacionales con la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI) y con la Ordem dos Farmacêuticos de Portugal.

En 2014 fue nombrado presidente de la Asociación Empresarial del Laboratorio de Análisis Clínicos (AN-LAC), creada para la defensa de los intereses de los laboratorios clínicos privados de España. Fue nombrado socio de honor de AEFA en 2019 y ese mismo año recibió la medalla al mérito profesional del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

Cuando hablabas con Santiago Martínez del Olmo de cualquier tema, su conversación reflejaba la viva imagen de la sabiduría, alimentada por alguien que supo desde muy niño, en su pequeño pueblo de Cuenca, que la vida no se lo iba a poner fácil. Se trataba de trabajar duro y tenazmente para salir adelante, con la fuerza que dan los campos castellanos, y así lo hizo Santiago, quien además muy pronto comprendió que el estudio y la formación serían su principal baza.

Sus pacientes le adoraban y hasta sus últimos años acudía fielmente a realizar tomas a domicilios (avisos) sin importarles nada más que el bienestar de las personas que acudían a su laboratorio para ser atendidas y la mejora continua en la calidad de sus prestaciones.

Santiago siempre dejaba hablar, nunca interrumpía a un interlocutor, aunque este solo hablara sin decir nada, y en ocasiones puntualizaba con su peculiar ironía la conversación. Era un hombre de una gran cultura y una enorme curiosidad, tanto en el ámbito profesional como en el personal, amante de la lectura, de la gastronomía (un excepcional catador de aceites y de vinos) y, sobre todo, de la conversación, de conocer la opinión de la gente e intentar comprender el porqué de las situaciones, dialogar, dejar hablar y escuchar, en una palabra, aprender.

Entendía que la palabra era uno de nuestros legados más decisivos. Sin el rigor y la belleza de la palabra

los hombres son unos ignorantes. Tal era el valor que le daba a la palabra que era habitual en su época de presidente el uso de un diccionario de la lengua española para puntualizar el sentido exacto de un término en algún documento o acta. En las reuniones de AEFA, escucharle cómo planteaba las soluciones a problemas complejos, por ejemplo, dejaba una huella indeleble en sus compañeros.

En los últimos tiempos paseaba algún desencanto cuando percibía una cierta mediocridad social, incapaces hoy en día los hombres y las mujeres de usar su imaginación para concebir ideales que le propongan un futuro por el que luchar, justo la antítesis por la que Santiago había elaborado su ideal de vida.

Llevaba en la sangre la sencilla filosofía del hombre de campo y cada experiencia, positiva o no, le servía para tejer una compleja ética de comportamiento personal que aplicó toda su vida a los avatares con los que se enfrentó. Una ética basada en la moral, la justicia y la lealtad en su relación con la sociedad de la cual formaba parte.

Respetaba enormemente a las personas con principios y que vivían en concordancia con ellos, fueran o no próximos a los suyos, y tenía un sentido de la amis-

tad profundo, fraterno y desinteresado, sentimientos que trasladó a AEFA, en la que todos siempre nos hemos sentido como en una gran familia.

Como dicen que dejó escrito en su tumba Mario Moreno, Cantinflas: "Parece que se ha ido, pero no es cierto". Santiago no se ha ido, permanecerá con todos nosotros, con los que trabajaron, soñaron y vivieron con él. Lo veremos repantingado en la silla con su sonrisa franca, dispuesto a ayudarnos, a encontrar la solución fácil, a consolarnos, siempre desinteresadamente.

En el recuerdo vivo quedará la imagen de Santiago como la de un hombre bueno, educado y culto. Trabajador incansable, tenaz y brillante. Luchador por su profesión y por sus compañeros del que nos gustaría poder guardar su espíritu.

En alguna parte, ahora mismo seguro que estará en una animada tertulia con sus amigos Jaime, Camilo y Juan y seguro que es feliz. Nosotros también los somos por la inmensa suerte de haberle conocido.

Rafael Calafell
Expresidente de AEFA

