

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



73.

Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Tomàs Pumarola Suñé

Autores

Gustavo Cilla Eguiluz
José María Navarro Mari
Juan Carlos Galán Montemayor
M^a Dolores Folgueira López
Tomàs Pumarola Suñé



ISBN: 978-84-09-33847-4

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Cilla Eguiluz G, Navarro Mari JM, Galán Montemayor JC, Folgueira López MD, Pumarola Suñé T. Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. 2021. 73. Tomás Pumarola (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2021.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

73. Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. 2021

Coordinador:

Tomàs Pumarola Suñé¹

Autores:

Gustavo Cilla Eguiluz²

José María Navarro Mari³

Juan Carlos Galán Montemayor⁴

M^a Dolores Folgueira López⁵

Tomàs Pumarola Suñé¹



¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario, San Sebastián; ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid; ⁵Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

1.	Introducción.....	5
2.	Principales muestras recomendadas para las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) y de detección de antígeno (TDAg) del SARS-COV-2.....	6
	2.1. Tipos de muestra y método de recogida.....	6
	2.2. Transporte y conservación de las muestras.....	8
	2.3. Procesamiento de las muestras en el laboratorio / Bioseguridad.....	9
3.	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN).....	10
	3.1. Técnicas disponibles.....	10
	3.2. Indicaciones de las TAAN.....	11
	3.3. Aplicaciones y limitaciones de las TAAN en el diagnóstico de infección aguda por SARS-CoV-2.....	12
	3.4. Indicaciones de las TAAN en contactos estrechos asintomáticos de casos confirmados.....	13
	3.5. Aplicaciones y limitaciones del cribado poblacional y utilización de agrupamientos de muestras.....	13
	3.6. Emisión de resultados positivos de las pruebas TAAN y el valor Ct.....	14
4.	Técnicas de detección de antígeno (TDAg).....	15
	4.1. Técnicas disponibles.....	15
	4.2. Sensibilidad y especificidad analíticas.....	16
	4.3. Sensibilidad y especificidad clínicas.....	17
	4.4. Indicaciones de las TDAg.....	17
	4.5. Empleo como auto-test.....	18
	4.6. Interpretación de los resultados. Valor del resultado negativo.....	19
	4.7. Descentralización de las técnicas de diagnóstico rápido (puntos de atención al paciente).....	19
5.	Técnicas de detección de anticuerpos específicos.....	20
	5.1. Cinética de anticuerpos.....	20
	5.2. Muestras para el diagnóstico serológico.....	21
	5.3. Técnicas disponibles.....	21
	5.4. Indicaciones e interpretación de las pruebas serológicas.....	24
6.	Cultivo celular.....	24
	6.1. Requerimientos de bioseguridad.....	25
	6.2. Tipos de muestra, conservación y preparación.....	25
	6.3. Líneas celulares permisivas a la infección por SARS-CoV-2 y material necesario para la realización de cultivo celular.....	26
	6.4. Aislamiento viral a partir de muestra clínica.....	28
	6.5. Ensayos de cuantificación viral.....	29
	6.6. Indicaciones.....	30
	6.7. Correlación de los resultados del cultivo celular con otras técnicas diagnósticas.....	31
7.	Estrategias para la detección de variantes del SARS-CoV-2.....	31
	7.1. Aproximación genética basada en cribado de variantes.....	32
	7.2. Caracterización de variantes de SARS-CoV-2 basada en secuenciación genómica parcial o completa.....	33
	7.3. Diagnóstico de la reinfección.....	36
8.	Bibliografía.....	37

1. INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019, desde Wuhan, China, se informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) de una serie de casos de enfermedad respiratoria grave atribuibles a la infección por un nuevo coronavirus. Rápidamente se obtuvo y se puso a disposición de las autoridades sanitarias y la comunidad científica internacional la secuencia de este nuevo coronavirus que pasaría a denominarse SARS-CoV-2 (1,2).

El SARS-CoV-2 es un coronavirus estrechamente relacionado con coronavirus endógenos de diferentes especies de murciélagos, que podría haber atravesado la barrera de especie e infectado a las personas a través de un huésped intermedio, como por ejemplo el pangolín. El SARS-CoV-2 se ha clasificado en el género *Betacoronavirus* (subgénero *Sarbecovirus*) de la familia *Coronaviridae* (3). Es un virus envuelto con un ARN monocatenario de polaridad positiva de 30kb de longitud (1). El virus posee una polimerasa con actividad 3'-5' exoribonucleasa, es decir posee un mecanismo de corrección de los errores de copia de su propio genoma, lo que en principio le confiere una cierta estabilidad genética. Sin embargo, hemos podido comprobar su nada despreciable variabilidad genética cuando es sometido a presiones ambientales adversas como la respuesta inmune de la población, consecuencia de la infección o de la vacunación.

El genoma codifica, además de proteínas no estructurales necesarias para su ciclo biológico, cuatro proteínas estructurales principales: la espícula (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N). De éstas, las proteínas S y N son las que presentan un mayor interés desde el punto de vista del diagnóstico microbiológico.

La espícula es la proteína más externa y responsable de la unión al receptor celular ACE-2 (receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2) (4). Se halla compuesta por dos subunidades S1 y S2. La primera es la responsable de la unión al receptor celular a través de su dominio de unión (RBD), principal diana de los anticuerpos neutralizantes inducidos por las actuales vacunas aprobadas para su utilización (5,6). La subunidad S2 es la responsable del proceso de fusión entre la envoltura viral y la membrana citoplasmática celular.

La nucleoproteína es una proteína asociada al genoma viral que se expresa abundantemente durante la infección y juega un papel importante en la transcripción del ARN y su replicación (7).

En la actualidad existen siete coronavirus con capacidad de infectar a las personas. Cuatro de ellos, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 y HCoV-OC43, son virus estacionales de distribución mundial y causa frecuente de enfermedad respiratoria leve. Los otros tres virus son responsables de enfermedad respiratoria grave, el MERS-CoV, endémico en oriente medio, el SARS-CoV-1, que ha dejado de circular entre la población, y el SARS-CoV-2, genéticamente más similar al SARS-CoV-1.

La emergencia de este nuevo virus ha tenido lugar en ausencia, en la población mundial, de inmunidad preexistente, lo que ha permitido su rápida propagación y el desarrollo de la actual pandemia.

La COVID-19, enfermedad producida por el SARS-CoV-2, puede variar desde una infección asintomática hasta una enfermedad grave (8) y la Microbiología ha representado un pilar fundamental en el diagnóstico, la comprensión y el control de la propagación del virus en la población.

En la historia natural de la infección por SARS-CoV-2, el período de incubación del virus, definido como el tiempo desde la exposición al virus hasta la aparición de los síntomas, es de 5-8 días (9). En el momento del inicio de síntomas el virus es detectable en las muestras del tracto respiratorio superior (TRS). En el paciente hospitalizado, la carga viral (CV) en el TRS es superior en la primera semana de enfermedad, para posteriormente disminuir a lo largo de las siguientes semanas (10). Sin embargo, es importante destacar que, en una gran proporción de casos, el pico de la CV en el TRS se produce justo antes del inicio de los síntomas, disminuyendo a partir de entonces con gran variabilidad entre pacientes en la pendiente de disminución de la CV (11). El ARN puede mantenerse positivo en el TRS durante un período medio de 17 a 38 días, según la gravedad de la infección, el tipo de población y el grupo de edad (12).

La respuesta de anticuerpos suele aparecer alrededor de los 7-10 días y difiere del patrón convencional, de la mayoría de infecciones de etiología viral, ya que las IgM e IgG suelen aparecer simultáneamente en el tiempo, incluso en ocasiones esta última precede a la primera (10,13). La mayoría de pacientes presentan anticuerpos detectables a lo largo del primer mes del inicio de síntomas (13-16). La IgM puede perdurar durante 7-8 semanas y la IgG más allá de los 6 meses, existiendo de nuevo, importantes diferencias en relación a la gravedad de la infección, el tipo de población y el grupo de edad. Así, por ejemplo, en los casos leves o asintomáticos los anticuerpos pueden no positivizarse o incluso serorevertir con el tiempo (17).

El diagnóstico microbiológico se basa en la detección del virus en las muestras biológicas (ARN y/o antígeno) o la detección de anticuerpos específicos. El aislamiento vírico en cultivo celular no ha sido una técnica utilizada de forma habitual en el diagnóstico, debido a la necesidad de un nivel 3 de bioseguridad, pero ha sido fundamental en la comprensión de la historia natural de la infección. Más recientemente, la variabilidad genética del SARS-CoV-2 ha obligado a la realización de una vigilancia virológica muy estrecha en base a la secuenciación parcial o completa de su genoma. Quedan todavía por definir los marcadores de protección y como cambiará el diagnóstico microbiológico en el futuro, dos aspectos de gran relevancia en el contexto de la actual vacunación masiva de la población.

A lo largo de la pandemia, y hasta no haberse resuelto gran parte del conocimiento de la historia natural de la infección por SARS-CoV-2, han existido importantes incertidumbres y controversias en la aplicación e interpretación de las técnicas microbiológicas. El presente documento intenta aportar una guía, que obligatoriamente será provisional dado el actual escenario todavía cambiante, de los conocimientos actuales relacionados con el diagnóstico y la vigilancia microbiológica del SARS-CoV-2. La discusión sobre marcadores de protección, como la detección de anticuerpos neutralizantes o la caracterización de la respuesta celular, quedará aplazada, a las futuras actualizaciones de este documento, hasta la existencia de una evidencia científica y tecnológica superior a la actual.

2. PRINCIPALES MUESTRAS RECOMENDADAS PARA LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (TAAN) Y DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO (TDAg) DEL SARS-COV-2

El procedimiento de recogida de las muestras y el mantenimiento de su integridad hasta que se realizan las pruebas microbiológicas, son esenciales para que el rendimiento de éstas sea adecuado y no difieren de los ya publicados en los protocolos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (18).

2.1. TIPOS DE MUESTRA Y MÉTODO DE RECOGIDA

Para la realización de las TAAN, las muestras más adecuadas son las de tracto respiratorio (TR). La situación clínica y/o el ámbito de asistencia sanitaria aconsejarán la obtención de las muestras más apropiadas de vías altas (TRS) y/o de vías bajas (TRI). Las muestras de TRS más usadas en nuestro medio son el exudado-frotis nasofaríngeo (FNF) y el orofaríngeo (FOF). Otras opciones incluyen frotis nasal + FOF combinados, aspirado o lavado nasal, saliva, y exudado/frotis nasal bilateral (cornete medio). Los aspirados y/o lavados nasales y los esputos inducidos, plantean la dificultad de su obtención en condiciones de bioseguridad adecuadas, debido a los aerosoles que se pueden generar, por lo que no son opciones de primera línea. Por otra parte, las muestras más utilizadas de TRI son esputo, aspirado traqueal y BAL. El rendimiento es variable según el tipo de muestra y las fuentes consultadas; en general, en TRS, los mejores rendimientos diagnósticos se obtienen con FNF y/o frotis nasal + FOF combinados, y los peores con FOF (19).

Ocasionalmente, se han explorado otros tipos de muestras, tales como heces, orina, sangre completa, con resultados muy diversos, pero con informaciones relevantes. La presencia de SARS-CoV-2 en orina o sangre se ha relacionado con mayores tasas de mortalidad (20,21) o fracaso renal agudo, mientras que los estudios en heces se han relacionado con una menor velocidad de aclaramiento viral e incluso con la existencia de un posible reservorio, con impacto en la transmisibilidad, especialmente en población pediátrica (22).

Si se analizan heces, hay que tener constancia de que el método de extracción y la TAAN que se vayan a utilizar hayan sido validadas para este tipo de muestra. Un tipo especial de muestra han sido las muestras post-mortem (frotis, biopsia con aguja o muestras de tejido), que han ayudado a comprender mejor la diseminación del virus a otros órganos además de los pulmones. Si bien en estos casos las evidencias basadas en técnicas moleculares no han dado buenos resultados en comparación con otras técnicas como la inmunohistoquímica.

La mayor parte de las TDAg comerciales están aprobadas para FNF y/o nasal bilateral (cornete medio). Como en el caso de las TAAN, el rendimiento de la toma nasal es algo menor que el del FNF, por lo que en el entorno hospitalario es conveniente emplear esta última. La toma nasal anterior bilateral (23), es otra opción para algunos kits. Se dispone de poca información sobre la utilidad de otro tipo de muestras, como la orofaríngea o la saliva, para la detección de SARS-CoV-2 utilizando inmunoensayos de flujo lateral (inmunocromatografía) (IEFL), pero de momento no se consideran adecuadas (24).

En el contexto de intervenciones de Salud Pública se ha promovido el empleo de auto-tomas, efectuadas bajo la supervisión de un profesional o tras una mínima formación, personalizada o mediante infografía, y que aportan una buena aceptabilidad. Las muestras son habitualmente nasales, bien nasal anterior o a cornete medio, a las que se añade la saliva, en este caso solo para TAAN. Las muestras de NF y OF no se consideran apropiadas para auto-toma (23), aunque la última combinada con toma nasal se está usando en algunos países como el Reino Unido (UK) (25). La información existente, aún escasa y heterogénea, y la menor sensibilidad de una auto-toma, en comparación a la efectuada por un profesional (por ejemplo, FNF), no avalan su uso en el contexto diagnóstico. Sin embargo, pueden ser útiles en programas preventivos (26), como en el caso de cribados masivos, descentralizados y repetidos en la comunidad (26,27).

En este procedimiento, describiremos el método para tomar el FNF, actualmente la muestra más utilizada y de referencia para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2, así como algunas nociones para la obtención de saliva, alternativa utilizada con cierta frecuencia, especialmente en el área pediátrica.

Toma de frotis nasofaríngeo:

El profesional que realice la toma usará equipo de protección individual (EPI) adecuado para evitar el contagio por exposición aérea (mascarilla FFP2 o superior, pantalla facial o gafas de protección ocular, guantes desechables y bata impermeable con cierre trasero).

Se utilizarán hisopos finos y flexibles (no usar hisopos con mango de madera) con extremos flocados de dacrón o poliéster (se evitarán de algodón o alginato cálcico, que pueden presentar inhibidores para TAAN y cultivos celulares). El escobillón se introducirá a través del orificio nasal hasta alcanzar la nasofaringe, tras lo cual se rotará enérgicamente durante, al menos, cinco segundos. En caso de no obtener suficiente espécimen, la operación podrá repetirse en la otra fosa nasal utilizando la misma torunda.

A continuación, se introducirá el hisopo en un tubo conteniendo 2-3 ml de medio de transporte de virus (MTV). Hemos de tener en cuenta que existen dos tipos principales de MTVs, los que preservan la viabilidad del virus y los que presentan sustancias inactivantes. Si en el uso posterior que vamos a dar a la muestra, se incluyen técnicas de aislamiento del virus en cultivo, hemos de utilizar MTV sin inactivantes. Para las técnicas TAAN, salvo algunas excepciones particulares, pueden utilizarse muestras en ambos tipos de MTV.

Saliva

La saliva se considera una alternativa diagnóstica para las TAAN en situaciones en las que no sea posible obtener FNF o frotis nasal + FOF, debido a su buen rendimiento, especialmente en los primeros días de la enfermedad (24) y en pacientes pediátricos. La saliva añade la ventaja de ser una muestra no invasiva, de fácil obtención, que se puede recoger como autotoma, por lo que se considera una alternativa en el

contexto de Salud Pública, por ejemplo, para población asintomática que requiera controles con cierta asiduidad (docentes, estudiantes, internos...).

Sin embargo, el término saliva agrupa muestras como la saliva oral o los fluidos de la orofaringe posterior, que pueden estar más o menos mezclados con secreciones respiratorias, habiéndose referido diferentes modos de recogida (24). En general, se considera que es importante que el paciente no coma, mastique chicle o fume en los 30 minutos previos a la obtención de la muestra. Se emplean diferentes tipos de contenedores con cierre hermético en los que depositar de 1 a 5 mL de saliva, con o sin aditivos para preservar o inactivar la muestra.

Como limitación importante al uso de saliva, falta un protocolo validado y consensuado del tipo de muestra y modo de recogida más apropiados.

2.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

En aquellas muestras que requieran para su envío al laboratorio donde se van a procesar circuitos de transporte externos, se utilizarán embalajes y etiquetados correspondientes, según la normativa de transporte de sustancias infecciosas categoría B (triple embalaje, norma UN3373). Las muestras tomadas en el mismo Centro del laboratorio de procesamiento, se enviarán siguiendo los procedimientos habituales de transporte de muestras al Laboratorio de Microbiología existentes en cada centro u hospital. Se evitará la utilización de sistemas de tubos neumáticos, para prevenir posibles roturas del contenedor y/o derrames.

Hasta su envío al laboratorio o su procesamiento, las muestras para TAAN se pueden mantener refrigeradas (2-8°C), entre 48 h y 5 días, según el origen. En caso de demora superior se mantendrán congeladas a -70° o menos (Tabla 1).

Tabla 1.- Principales muestras clínicas para diagnóstico de SARS-CoV-2 y condiciones de conservación

Muestra	Dispositivo/Contenedor	Temperatura de conservación hasta procesamiento
Exudado nasofaríngeo u orofaríngeo	Escobillón flocado (No algodón o alginato cálcico) en MTV*	2-8°C si ≤ 5 días -70°C si > 5 días
Saliva	Contenedor estéril tapón a rosca	2-8°C si ≤ 2 días -70°C si > 2 días
Aspirado nasofaríngeo, endotraqueal o aspirado/lavado nasal	Contenedor estéril tapón a rosca	2-8°C si ≤ 2 días -70°C si > 2 días
Espujo	Contenedor estéril tapón a rosca	2-8°C si ≤ 2 días -70°C si > 2 días
Lavado broncoalveolar	Contenedor estéril tapón a rosca	2-8°C si ≤ 2 días -70°C si > 2 días
Biopsias	Contenedor estéril tapón a rosca con suero salino o MTV	2-8°C si ≤ 1 día -70°C si > 1 día
Sangre completa	Tubo con anticoagulante	2-8°C si ≤ 5 días -70°C si > 5 días
Heces y orina	Contenedor estéril tapón a rosca	2-8°C si ≤ 5 días -70°C si > 5 días

*MTV: Medio de transporte de virus. Modificado de (28,29)

Las TDAG mediante IEFL se efectúan habitualmente en el punto de obtención de la muestra, mientras que las TDAG automatizadas, debido a su dependencia de un analizador, se efectúan en el laboratorio.

Las TDAg efectuadas mediante IEFL, incluyen las torundas estériles necesarias para efectuar las tomas. Las muestras obtenidas se deben colocar en el buffer de extracción y procesarse inmediatamente. La mayor parte de los fabricantes refieren que el procesamiento de las muestras colocadas en el buffer de extracción se puede retrasar hasta 1 h a temperatura ambiente o hasta 8 h a 2-8°C, según marca. Algunas marcas comerciales indican que su producto es compatible con el uso de MTV o universal. Sin embargo, esta práctica podría llevar a una dilución de la muestra y pérdida de sensibilidad de los IEFL (30).

Por el contrario, las TDAg automatizadas se recogen en MTV o universal, en los mismos dispositivos que se emplean para las TAAN, lo que permite compartir la muestra para ambos tipos de técnicas, siendo posible también con algunas marcas usar medio líquido de Amies, así como solución salina estéril o hisopo seco. Debido al uso de este tipo de medio de transporte, el procesamiento de las muestras puede dilatarse más que en el caso de las IEFL, 12-48 h a temperatura ambiente, y una vez en el buffer de extracción 4-48 h a temperatura ambiente, según marca, y hasta varios días a 2-8°C. En todos los casos es necesario actuar según las recomendaciones de la ficha técnica del reactivo.

En general, y tanto para IEFL como para las TDAg automatizadas, los medios comerciales con solución de preservación de ácidos nucleicos (medios inactivantes) son inapropiados ya que pueden desnaturalizar las proteínas. Se aconseja que las muestras viscosas, con precipitados o impurezas, sean centrifugadas antes de iniciar el procesamiento de las pruebas automatizadas. En principio no es conveniente tratar las muestras con enzimas líticas o agentes reductores, ya que estas sustancias pueden interferir en los resultados de algunas marcas comerciales.

2.3.PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO/BIOSEGURIDAD

El SARS-CoV-2 es un agente clasificado como de grupo de riesgo 3 (31). En este contexto, las muestras para TAAN o TDAg, se pueden procesar utilizando, al menos, normas de nivel 2 de bioseguridad (32). Las muestras deben llegar al área de recepción del laboratorio en embalajes que respeten las medidas de bioseguridad descritas anteriormente (ver apartado anterior de transporte y conservación de muestras). No deben procesarse las que vengan en contenedores inadecuados, mal identificadas y/o derramadas.

En general, para realizar las TAAN, las muestras que no vengan en medios de transporte con sustancias inactivantes deben someterse a un proceso de lisis externa, con buffer adecuado durante aproximadamente 15 minutos (31). Toda manipulación de las muestras, antes de la inactivación, se realizará en cabina de seguridad biológica tipo IIA utilizando EPI adecuados (ver apartado de toma de frotis nasofaríngeo), para evitar el contagio por salpicaduras y/o aerosoles. Posteriormente, las muestras se trabajarán en cada caso siguiendo las instrucciones de los fabricantes de los equipos que se vayan a utilizar.

Las TDAg se pueden realizar de manera segura sin cabina de seguridad biológica, dado que la manipulación y generación de aerosoles es mínima, bajo precauciones estándar, con protector facial, mascarilla quirúrgica o superior, ropa de laboratorio y guantes desechables (31). La realización de las pruebas debe ser cuidadosa evitando la generación de salpicaduras y aerosoles. Las pruebas incluyen una fase previa de tratamiento con una solución de extracción para facilitar la liberación del antígeno N, lo que reduce la carga del virus, pero no se debe asumir su inactivación en el breve tiempo que dura este proceso (33). Los residuos (torundas, tubos de extracción, cassette) se deben introducir en contenedores de pared rígida para residuos biopeligrosos (los definidos para objetos punzantes), que serán eliminados siguiendo los cauces habituales (31).

Las superficies de trabajo en las que se manipulen muestras biológicas para TAAN o TDAg deben limpiarse con desinfectantes o antisépticos activos frente a virus envueltos (por ejemplo, lejía, alcohol, povidona yodada, clorhexidina...), antes y tras su uso, en caso de derrame accidental, y varias veces al día. Se debe contemplar que ciertos desinfectantes, como la lejía, pueden producir reacciones tóxicas al ser mezclados con algunas sustancias, como el isotiocianato de guanidina, muy usado como inactivante en los MTV y en los reactivos de extracción. Asimismo, algunos reactivos incluyen en su composición azida sódica, por lo que no deben ser autoclavados o eliminados por tuberías (31). Finalmente, existen plataformas moleculares o inmunoensayos

automatizados que utilizan reactivos con procedimientos específicos para su desecho, por lo que se deben consultar, en cada caso, las guías para su eliminación recomendadas por los fabricantes.

3. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (TAAN)

La rápida disponibilidad de secuencias genómicas del SARS-CoV-2 permitió, en un corto espacio de tiempo, el desarrollo de TAAN para su detección. En un principio con protocolos caseros y posteriormente con la incorporación de reactivos comerciales, se ha conseguido dar respuesta diagnóstica a la infección por este virus.

Aunque en los primeros meses de pandemia, retrasos iniciales en el diseño de ensayos y cuellos de botella en la cadena de suministro dificultaron el despliegue e implementación de pruebas de diagnóstico precisas a escala mundial, actualmente existe gran disponibilidad y variedad de técnicas de diferentes formatos para ser utilizadas en los laboratorios de Microbiología, en respuesta a las exigencias que se planteen, tanto desde el ámbito sanitario, como desde Salud Pública.

Las TAAN, son altamente sensibles y específicas y se han convertido en los métodos de referencia en el diagnóstico de las infecciones por SARS-CoV-2.

En este procedimiento nos centraremos en desarrollar los aspectos de interés respecto a las técnicas disponibles en la actualidad y sus indicaciones de uso. Así mismo, incidiremos en aquellos aspectos más controvertidos respecto a su uso, así como en la interpretación e información de los resultados.

3.1. TÉCNICAS DISPONIBLES

Inicialmente y en los primeros meses de la pandemia, se realizó la detección de SARS-CoV-2 en muestras clínicas mediante TAAN, con protocolos caseros, siguiendo los validados por diferentes instituciones acreditadas y refrendados por la OMS, como los CDC de Estados Unidos que utiliza dos dianas genéticas de la nucleocápside (N1 y N2) o el *German Consiliary Laboratory for Coronaviruses* del Hospital de la Charité de Berlín, que recomendó una primera línea de cribado con el gen de la envoltura (E) seguido de un ensayo de confirmación utilizando el gen de la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp). Otros Organismos e Instituciones que aportaron sus protocolos fueron: China CDC, *Institut Pasteur* (Francia), *National Institute of Infectious Diseases* (Japon), HKU (Hong Kong) y el *National Institute of Health* (Tailandia). Los mismos, pueden consultarse en las webs de cada uno de estos organismos y han servido de base sobre la que posteriormente, a nivel comercial, se han ido sumando múltiples plataformas de diagnóstico molecular, con diferentes diseños, tras cumplir con los requisitos de las agencias reguladoras. En la fecha de la redacción de este documento suman en torno a 250 las TAAN registradas y validadas para su uso (34).

En general, las TAAN detectan dianas específicas de SARS-CoV-2 incluidas en regiones codificantes de tres de las cuatro proteínas estructurales del virus: espícula (S), envuelta (E) y nucleocápside (N); así como en regiones que codifican proteínas no estructurales como el *gen RdRP (RNAdependent RNA polymerase)*, y/o las regiones *ORF1ab (Open Reading Frame 1ab)* y *ORF8*. Las distintas plataformas aprobadas están diseñadas para detectar 2 o más de estas dianas, en diferentes combinaciones según los fabricantes.

La gran variabilidad de diseños técnicos se traduce en un abanico de opciones muy amplio, que va desde sistemas que permiten realizar ensayos en muestras individualizadas en un único dispositivo, lo que facilita que puedan utilizarse como técnicas de diagnóstico rápido (TDR), hasta aquellos en los que se pueden trabajar hasta 96 o más muestras a la vez, unificando todo el proceso en el mismo equipo o separando las distintas fases en diferentes equipos. A todo ello hay que sumar, en la actualidad, técnicas “multiplex”, de distintos formatos, que junto a SARS-CoV-2, detectan otros virus respiratorios, la mayoría virus de la gripe, y finalmente las diseñadas para detectar delecciones, fundamentalmente en el gen S, así como mutaciones puntuales de interés para la detección de variantes preocupantes del virus.

El tiempo necesario para la realización de las técnicas, puede ir desde varias horas (3-4 h) en las plataformas de alto rendimiento para grandes volúmenes de muestras, a 30-45 minutos, si se utilizan sistemas diseñados para muestras individuales y que pueden utilizarse como TDR.

Cada laboratorio deberá organizar su flujo de trabajo y equipamiento técnico atendiendo a la demanda de pruebas que deba procesar, al ámbito asistencial de procedencia de las muestras y al tiempo de respuesta del que disponga. Es recomendable tener implementados equipos tanto para el procesamiento adecuado de un volumen alto de muestras, como para dar respuesta a situaciones puntuales y de urgencia que no admitan demora. Así mismo y en hospitales de tercer nivel se debe contar con procedimientos “multiplex” para descartar otros virus respiratorios, como gripe y VRS, que puedan circular simultáneamente y que interese investigar en pacientes atendidos en urgencias o ingresos hospitalarios.

Las técnicas más usadas, y de las que existe mayor disponibilidad comercial, son de tipo RT-PCR convencional. Algunas TAAN isotérmicas tipo TMA (*Transcription Mediated Amplification*) que detectan directamente ARN, utilizando una transcriptasa inversa retroviral y T7 ARN polimerasa, también, han sido muy utilizadas; no obstante, su uso está paulatinamente siendo más restringido.

Otras técnicas que se están introduciendo progresivamente para el diagnóstico de COVID-19 son:

- Las basadas en el método RT-LAMP (*Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (35,36), que para mejorar la sensibilidad utilizan de cuatro a seis secuencias diana diferentes, identificadas simultáneamente por distintos cebadores en la misma reacción y que combinan LAMP con un paso de retro-transcripción para la detección de ARN. Dada su sencillez, al requerir sólo calentamiento e inspección visual, tienen un futuro prometedor para la detección de virus en muestras clínicas.
- Técnicas CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), (37), basadas en la existencia de una familia de secuencias de ácido nucleico que se encuentran en organismos procariotas, que pueden ser reconocidas y cortadas por un conjunto de enzimas, denominadas “Cas”. En origen sería una herramienta que utilizan las bacterias y arqueas, para eliminar virus que las infectan. Algunas de estas enzimas como la Cas12 o 13 pueden detectar y cortar secuencias de ARN viral que nos interesen. Según la “Cas” utilizada y el procedimiento para revelar la reacción, tendremos las diferentes técnicas con este fundamento (38-44). Dentro de ellas las SHERLOCK (*Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*) son las más evolucionadas (45).
- Finalmente, aunque todavía en fases muy preliminares, otras técnicas cuya utilidad está siendo valorada para detectar SARS-CoV-2 son los microarrays moleculares, la utilización de biosensores (46) y algunas derivaciones de LAMP como *Nicking enzyme-assisted amplification* (NEAA) (47), *Helicase-dependent amplification* (HDA) (48) y *Strand displacement amplification* (SDA).

3.2. INDICACIONES DE LAS TAAN

Las TAAN son las técnicas actualmente disponibles más sensibles para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2. Esta sensibilidad es variable, entre un 85-90%, según el momento en el curso evolutivo de la infección en que se utilicen (49), la plataforma diagnóstica que se use y el tipo de muestra empleada; en cualquier caso, su especificidad es muy alta y está en torno al 99,5%. Los valores predictivos negativos y positivos van a depender de la prevalencia de la infección y de la probabilidad pretest en la población estudiada. En general se admite que las TAAN realizadas son técnicas rápidas, que pueden utilizarse como técnicas de point of care (TPOC), y que tienen menos sensibilidad que las que se realizan en plataformas más complejas.

El SARS-CoV-2 puede detectarse en muestras adecuadas, a partir de 3-5 días tras el contagio hasta pasadas 3-4 semanas del mismo (media 17-38 días tras inicio de los síntomas) (50-52). Ocasionalmente, puede detectarse el genoma del virus durante un periodo de tiempo más prolongado, incluso meses, en pacientes

con mala evolución y en inmunodeprimidos (especialmente en pacientes con inmunodeficiencias hematológicas) (53). El aclaramiento viral se produce antes en TRS que en TRI.

Todo lo expuesto debe tenerse en cuenta a la hora de establecer las indicaciones de uso e interpretación de las TAAN, además de la existencia de otros procedimientos microbiológicos como las técnicas de detección de antígeno (TDAg), que pueden utilizarse de forma complementaria o en sustitución de las TAAN, en determinadas situaciones.

En la tabla 2, se expone una propuesta de uso de las TAAN existentes, según el ámbito de actuación y tiempo de respuesta exigido y que se desarrollará en los siguientes apartados.

Tabla 2.- Indicaciones de uso de las diferentes TAAN para SARS-CoV-2, atendiendo al ámbito de actuación y tiempo de respuesta esperado

Tipo de TAAN	Tiempo de realización de técnica	Tiempo de respuesta óptimo	Indicaciones de uso fundamentales*
Kits individualizados (uso como TPOC) o plataformas para número de muestras inferior a 50	30-60 min	<6 h	Pacientes sintomáticos que requieren hospitalización
		<24 h	-Paciente sintomático vulnerable -Estudio de brotes activos
Plataformas de alto rendimiento (más de 94 muestras)	3-6 h	24-48 h	-Cribados poblacionales aleatorios -Cribado preingreso hospitalario o en residencias de ancianos -Cribado a profesionales sanitarios, de residencias y de centros socio-sanitarios -Prevención de brotes en ámbitos estratégicos -Persona sintomática no grave/no vulnerable -Contactos estrechos de pacientes SARS-CoV-2 en comunidad
TAAN Multiplex	30 min a 3 h	Entre 6 y 24 h	Pacientes ingresados para descartar otros virus respiratorios

* Estas indicaciones son compatibles con el uso de otras pruebas de diagnóstico microbiológico en algunas de las situaciones que se contemplan (54,55)

3.3. APLICACIONES Y LIMITACIONES DE LAS TAAN EN EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN AGUDA POR SARS-CoV-2

Para el diagnóstico de la infección aguda, se utilizarán las TAAN en pacientes que puedan estar infectados por presentar síntomas compatibles y, en situaciones clínicas concretas como inmnodeprimidos o pacientes graves, para ayudar a determinar la posible resolución de la infección (53).

En general en la fase aguda de la infección la CV es alta y tras los primeros 5-7 días tiende a disminuir hasta desaparecer, por lo que si bien en los primeros 5 días desde el contagio, las TDAg pueden ser equiparables a las TAAN, a partir del quinto día el rendimiento diagnóstico de las TAAN es mucho mayor. Aunque inicialmente, la CV no tiene valor pronóstico, existe constancia de que en pacientes con mala evolución suele permanecer alta durante más tiempo (56-58). A pesar de no existir una correlación absoluta entre CV,

viabilidad y contagiosidad, a efectos prácticos se puede aceptar que muestras con alta CV, tienen más virus viables y por ende mayor contagiosidad (59).

La cinética viral es variable entre pacientes, especialmente al comienzo y en las fases de resolución de la infección, en las que en ocasiones aparecen resultados de TAAN difíciles de interpretar. La emisión de resultados por las distintas plataformas comerciales se realiza de forma cualitativa, no existiendo plataformas autorizadas por los organismos reguladores, que permitan la emisión de resultados cuantitativos de CV de SARS-CoV-2.

Los resultados positivos débiles o dudosos, deben interpretarse con precaución. Ocasionalmente pueden detectarse señales falsas con valores de Ct altos y producirse resultados no válidos o cuestionables. Estos resultados pueden darse en 2 contextos clínicos muy diferentes, bien en fases muy iniciales de la infección (con alta replicación viral pero con poca carga) y por tanto en un individuo que puede ser muy contagioso en horas, o bien en fases de resolución de la enfermedad, donde el impacto para el paciente y para el entorno es mínimo (60). Ante este escenario tan contrario, debemos conocer el contexto clínico del paciente y si es factible, repetir la prueba con una nueva muestra. Si no es posible, deberíamos volver a realizar una nueva extracción de ácidos nucleicos de la muestra original y repetir la prueba en el mismo equipo o, si se dispone, con otra técnica alternativa.

Por otro lado, los resultados negativos pueden no descartar totalmente una infección por SARS-CoV-2 (falsos negativos) (FN) y, por tanto, no deben usarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo clínico del paciente, sobre todo en los casos en los que la sospecha de infección por SARS-CoV-2 es alta. Han de combinarse, en la fase aguda, con observaciones clínicas, diagnóstico de imagen, antecedentes del paciente, información epidemiológica, etc. Entre otros factores, pueden conducir a un resultado FN en una persona infectada: mala calidad de la muestra; muestra tomada al final de la evolución de la enfermedad o de una región corporal que no contenga virus en ese momento; envío de muestra en condiciones de temperatura inadecuadas, razones inherentes a la técnica (59,61-63) o incluso la posible presencia de mutaciones presentes en nuevas variantes en las regiones diana de la PCR.

En caso necesario, ante la sospecha de un resultado FN, es aconsejable repetir las determinaciones al mismo paciente, pasadas 24 o 48 h, bien en otra muestra similar o bien en muestras de otro origen.

3.4. INDICACIONES DE LAS TAAN EN CONTACTOS ESTRECHOS ASINTOMÁTICOS DE CASOS CONFIRMADOS

El diagnóstico virológico debe realizarse ante la sospecha de exposición reciente a personas ya diagnosticadas de infección por SARS-CoV-2, para despistaje de contactos estrechos o en el contexto de estudio de brotes en la comunidad o intrahospitalarios. El periodo que se debe considerar para seleccionar a los contactos expuestos, cuando se utilicen TAAN, será desde 2 días antes del inicio de síntomas del caso índice, hasta el momento en que éste es aislado. En los casos asintomáticos confirmados, los contactos se buscarán desde 2 días antes de la fecha de toma de muestra en la que se hizo el diagnóstico. En cualquier caso, deben tenerse en cuenta las actualizaciones periódicas en las recomendaciones que, sobre este aspecto epidemiológico concreto, se vayan produciendo (55).

3.5. APLICACIONES Y LIMITACIONES DEL CRIBADO POBLACIONAL Y UTILIZACIÓN DE AGRUPAMIENTOS DE MUESTRAS

La utilización de las TAAN como técnicas de cribado poblacional, incluye a personas asintomáticas o en estados preclínicos, sin que haya exposición conocida, para así poder tomar medidas encaminadas a prevenir una mayor transmisión.

Los cribados pueden ser puntuales, dirigidos a determinados grupos o poblaciones; periódicos, como los realizados en diferentes fases de la pandemia en personas trabajadoras y residentes de centros sanitarios o sociosanitarios y sistemáticos, ante nuevos ingresos en centros sanitarios o sociosanitarios o de forma

previa a algunas actuaciones asistenciales. Siempre siguiendo las guías o protocolos actualizados del Ministerio de Sanidad (55).

Si el número de muestras a procesar es tan alto como para comprometer la capacidad de respuesta del laboratorio con sus medios habituales y con el fin de no demorar el diagnóstico, puede ser útil la metodología por “*pooles*” o lotes, utilizando FNF o saliva. Esta metodología consiste en combinar muestras de varias personas y realizar una prueba de laboratorio en el conjunto y en caso de positividad, ensayar cada una de las muestras por separado, para detectar el positivo de forma individual. Como alternativa puede utilizarse la combinación en matrices, en las que las agrupaciones se hacen por fila y por columna, y tras el análisis por RT-PCR, la posición en la matriz identifica la muestra positiva sin pruebas adicionales, si la prevalencia es suficientemente baja. Dependiendo de lo robusto que sea el método de prueba en matriz en un contexto específico, aún podría ser aconsejable volver a analizar las muestras positivas identificadas para su confirmación.

Según el número de muestras que se combinen en un mismo lote se obtendrá mayor o menor ahorro en reactivos y tiempo de respuesta. El *pool* de muestras se procesará en conjunto, como si se tratara de una muestra individual, es decir, la mezcla se hará a partir de las muestras originales y no de los eluidos de cada una de ellas.

Este procedimiento debe usarse sólo en áreas o situaciones donde se espera que el número de resultados positivos de la prueba sea bajo. El número de muestras que contenga cada pool puede variar entre 5 y 20 o más, y estará en razón inversa a la prevalencia de la infección en la población estudiada; así con una prevalencia del 5%, utilizando *pools* de 5 muestras se podría obtener una reducción del número de pruebas realizadas mayor al 50% (64). En general, la probabilidad de generar falsos negativos está en razón directa con el número de muestras por *pool* y/o su realización en muestras con Cts elevados (65).

Se han publicado diferentes modelos matemáticos e incluso existen aplicaciones como <https://bilder.shinyapps.io/PooledTesting/> que se pueden utilizar para obtener el número de muestras óptimas por pool, dependiendo de la prevalencia de la infección en la población estudiada y de la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizada. En este sentido como se expone en <https://covid19.seimc.org/index.php/diagnostico-sars-cov-2/>, los modelos matemáticos sugieren que, si la prevalencia esperada es 15%, 5% o 1%, el número de muestras incluidas por pool sea 3, 5 u 11, con una reducción en el número de pruebas a realizar del 28%, 57% y 80% respectivamente. El seguimiento de la prevalencia de la enfermedad y la validación adecuada del ensayo y la instrumentación utilizada son importantes para minimizar los resultados falsos negativos.

Los principales problemas para utilizar este procedimiento pueden venir determinados por la dificultad de automatización del proceso para la realización de pools y para aplicar algoritmos de identificación de las muestras positivas, así como para la exportación de los resultados de forma individual para cada muestra, a través del sistema de información del laboratorio. En la primera fase, la realización de *pools*, puede verse facilitada utilizando sistemas robóticos programables existentes en el mercado.

3.6. EMISIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS DE LAS PRUEBAS TAAN Y EL VALOR Ct

Se ha generado gran controversia en cuanto a la correlación de la CV existente en la muestra con el Ct (ciclo umbral-*Cycle threshold*: número de ciclos en un ensayo de RT-PCR necesario para amplificar el ARN viral para alcanzar un nivel detectable) obtenido en las técnicas de RT-PCR, y su posible uso como predictores de la evolución de pacientes con COVID-19, de la contagiosidad y de la viabilidad de los virus en una determinada muestra o para monitorización de pacientes graves. La utilización de los valores altos de Ct, para proceder a altas hospitalarias o para reincorporar a profesionales a su ámbito laboral, ha sido una constante a la que nos hemos enfrentado desde el inicio de la pandemia y su abordaje desde los laboratorios no está teniendo una respuesta uniforme. Así, se ha publicado que muestras con resultados de Ct >30 contendrían virus no viable, especialmente en individuos con más de 10 días de evolución. Sin

embargo, estas afirmaciones están llenas de matices y excepciones (57). En primer lugar, es cierto que el valor de los Cts es inversamente proporcional a la CV en la muestra, y esta correlación se infiere fácilmente en una muestra homogénea; sin embargo, en muestras no homogéneas como las del tracto respiratorio esta correlación es sólo aproximativa y sujeta a múltiples variables (61). Por otra parte, el valor Ct difiere según la diana y rendimiento de la PCR utilizada, pudiendo existir variaciones intra e interensayo con un mismo reactivo, que se maximizan entre ensayos con diferentes plataformas (66).

Por otro lado, para poder establecer una cuantificación real, actualmente no se dispone de material de referencia estandarizado internacionalmente, necesario para la validación de ensayos cuantitativos, y que puedan ayudar a generar resultados comparables entre los distintos fabricantes y laboratorios. Utilizar curvas estándar con diluciones de plásmidos, fabricados de forma casera, expresamente para una técnica o ámbito concreto, o el uso como control interno de un gen celular con aplicación del “delta Ct”, son soluciones parciales que no resuelven absolutamente el problema.

Además, factores relacionados con la etapa preanalítica, como el método de recogida, origen y heterogeneidad de la muestra, tipo de medio de transporte, volumen, duración desde la toma de la muestra hasta el análisis y el periodo evolutivo de la infección, afectan a la cantidad de ARN viral que podría ser detectable y reflejarse en el valor del Ct (61). Finalmente hay que tener en cuenta la existencia de TAAN comerciales que no son RT-PCR y que, por tanto, con las mismas no podría utilizarse este criterio. Todo ello, y en espera de informaciones más concluyentes, debe hacernos reflexionar sobre la utilidad real de informar este parámetro para su uso en la práctica clínica (66,67).

Uno de los grandes retos de las técnicas de amplificación molecular ha sido establecer una correlación entre detección positiva y transmisión de la enfermedad. Para precisar la capacidad de contagio, en los casos que permanecen positivos en el tiempo, la técnica de referencia es el aislamiento del virus en cultivo celular, que se describe en otro apartado de este procedimiento; no obstante y dadas las dificultades para su implementación en la mayoría de los laboratorios, la baja sensibilidad de la técnica, el retraso confirmatorio de la presencia de virus viable, hace que se haya propuesto como una alternativa útil y más asequible, la posibilidad de la detección de ARN subgenómico. Es decir, detección de fragmentos del genoma que solo se generan en virus replicativos. Esto ocurre porque la transcripción del coronavirus es discontinua (68), permitiendo que una secuencia reguladora pueda colocarse justo delante de los principales genes virales cuando la RdRp es funcional. Esto permite que se fusionen fragmentos genómicos que de otra manera estarían muy alejados entre sí, y por tanto una detección de esos subfragmentos es un indicador subrogado de la actividad viral. Esta estrategia no se usa por su complejidad de manera habitual, pero si puede ser de gran valor clínico en los pacientes “long-COVID” (69-72)

4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO (TDAg)

4.1. TÉCNICAS DISPONIBLES

En la actualidad se han desarrollado dos grandes grupos de técnicas de detección de antígeno (TDAg) de SARS-CoV-2. Las más usadas se basan en la inmunocromatografía o inmunoensayos de flujo lateral (IEFL), pero más recientemente se están comercializando inmunoensayos basados en técnicas de quimioluminiscencia (CLIA) o enzimoimmunoensayo (EIA), de uso por el momento menos extendido.

Tanto los IEFL como las TDAg automatizadas se basan en la detección de la nucleoproteína viral (proteína N). Su empleo en las pruebas de antígeno viene avalado por su abundancia en el virión (≈1000 copias que conforman la nucleocápside helicoidal), su longitud de 419 aminoácidos que sustenta varios determinantes antigénicos y por el hecho de que es una proteína interna en el virión y no unida a membrana, lo que facilita el proceso de extracción.

Las TDAg, tanto en formatos de IEFL como CLIA o EIA automatizados, utilizan principalmente inmunoensayos de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno (proteína N), emplean anticuerpos monoclonales generalmente de ratón, o policlonales de conejo, humanos o de otras especies. Algunos kits, sobre todo automatizados, usan combinaciones de varios anticuerpos frente a la proteína N, incrementando la sensibilidad y robustez de los ensayos. Como se ha dicho, todas las TDAg tienen una fase de pretratamiento utilizando un buffer de extracción, cuya finalidad es liberar la proteína N y disgregar las proteínas de la muestra, de manera que la proteína N quede expuesta y pueda reaccionar eficientemente con los anticuerpos de los inmunoensayos.

Los IEFL realizan simultáneamente una reacción de control utilizando como diana una proteína normalmente de origen animal (por ejemplo, anti IgY de pollo) que incorpora el ensayo. La lectura de las pruebas de IEFL se realiza en unos 15 minutos (10-30 min según marca) y es visual, aunque algunos *kits* disponen de un pequeño lector, imprescindible si la detección usa fluorescencia. El resultado es cualitativo (positivo/negativo), siempre tras comprobar la adecuada reactividad de la reacción de control.

En las TDAg automatizadas la señal lumínica producida aumenta en relación a la cantidad de proteína N presente en la muestra. Estos ensayos incluyen calibradores además de controles, dado que se trata de pruebas cuantitativas, si bien el informe es cuantitativo (pg/mL o TCID₅₀/mL) en algunas marcas y cualitativo (S/CO) en otras. No obstante, se desconoce aún el valor práctico de esta cuantificación, que es esperable como en el caso de las TAAN, presente importantes limitaciones como la variabilidad en la calidad de las muestras obtenidas, falta de estandarización entre pruebas, etc. El tiempo hasta la obtención de resultados es más prolongado que en el caso de los IEFL, entre 35 y 160 minutos, según método, incluyendo la fase de pretratamiento. Estos métodos utilizan analizadores por lo que normalmente se instalan en laboratorios, aunque también en otras localizaciones (aeropuertos) o incluso en forma de laboratorios móviles (eventos...), y su rendimiento es medio-elevado, entre 100 y 400 muestras/hora/analizador.

4.2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICAS

La OMS ha señalado que las TDAg deben detectar consistentemente los pacientes más infecciosos, que expresan $\geq 10^6$ copias de genoma/mL (Ct $\approx 25-30$), con el fin de interrumpir la transmisión viral, y aspirar a detectar 10^4 copias de genoma/mL (73). La mayor parte de los fabricantes valoran el límite de detección (LD o sensibilidad analítica) en TCID₅₀/mL de un cultivo viral, pero esta unidad no es traducible directamente a unidades estandarizadas como ng/mL de proteína N que permitan establecer comparaciones robustas. Utilizando IEFL, el LD de algunos de los *kits* más usados en el mercado se ha situado en 100-400 TCID₅₀/mL, $10^6-5,5 \times 10^7$ copias/mL de SARS-CoV-2 o 5-25 ng/mL de proteína N (74-75). En el caso de las TDAg automatizadas, los LD comunicados por los fabricantes son menores, tanto en TCID₅₀/mL ($\approx 3-40$) como ng/mL ($\approx 0,001-0,01$) o en copias/mL ($\approx 10^4$ genomas/mL) (76,77), indicando una sensibilidad analítica mayor, atribuible a la tecnología de CLIA o EIA. A modo de comparación, la FDA americana ha estimado el LD de algunas de las RT-PCR comerciales más usadas en 600-6000 NAAT *detectable units/mL* (78). No parece que la sensibilidad de las TDAg se haya visto de momento comprometida por la emergencia de variantes del SARS-CoV-2. Sin embargo, este es un aspecto a vigilar, aunque se espere poco impacto debido a que se acumulan menos mutaciones en la región N que en la región S viral. La mayor parte de los fabricantes comunican ausencia de efecto prozona cuando las TDAg se efectúan con concentraciones altas de SARS-CoV-2 obtenido en cultivo celular.

Con pocas excepciones (74), la especificidad analítica de las pruebas de IEFL y CLIA/EIA es excelente, debido a que no han mostrado reactividad cruzada con muestras conteniendo otros coronavirus (salvo el SARS-CoV-1) así como otros virus respiratorios, y también a las pocas interferencias analíticas con sustancias (por ejemplo, fármacos) usadas en infecciones respiratorias. No obstante, algunas marcas, especialmente de TDAg automatizadas comunican posibles interferencias con concentraciones elevadas de sangre, hemoglobina, así como enzimas y agentes reductores usados en el laboratorio para la lisis de esputo.

4.3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICAS

La tercera revisión Cochrane (79) y amplios estudios posteriores (80-82) han señalado que la sensibilidad de los IEFL frente a la RT-PCR es mayor en pacientes sintomáticos en la primera semana de enfermedad ($\approx 70-90\%$), que disminuye rápidamente en los días siguientes, y que es menor en asintomáticos ($\approx 30-70\%$). Estas diferencias son consecuencia de que los IEFL tienden a identificar aquellos sujetos con cargas virales de SARS-CoV-2 más elevadas, habiéndose referido sensibilidad elevada para muestras con $Ct \leq 25$ ($>87\%$) y ≤ 30 ($>80\%$) (79-82), rango (Ct 25-30) relacionado con la cifra de 10^6 copias/mL de ARN viral, considerada marcador indirecto de infecciosidad (73). De hecho, debido a la detección prolongada de ARN viral mediante RT-PCR en sujetos infectados, las TDAG ofrecen un valor predictivo positivo (VPP) más alto que la RT-PCR cuando se comparan con el cultivo viral, marcador de referencia de infectividad (83). Por otra parte, los aún escasos estudios existentes sobre el rendimiento de los métodos automatizados sugieren una sensibilidad clínica entre la que ofrecen los mejores IEFL y la RT-PCR, de 90-100% para $Ct < 33-35$ (77,84). En resumen, se considera que las TDAG detectan la mayor parte de los individuos infecciosos y que los sujetos antígeno-positivo son probablemente casos activos de COVID-19. Sin embargo, el resultado negativo no permite calificar a las personas como no infecciosas, ya que se han documentado sujetos potencialmente infecciosos con TDAG negativa (81,82).

La especificidad clínica de las IEFL es en general excelente, $>99\%$ (79-82), habiendo oscilado en el caso de las TDAG automatizadas entre 90% y 100%, en función de los puntos de corte escogidos en los estudios (77-84). No obstante, son necesarios más estudios para valorar las características clínicas de las pruebas automatizadas y su aplicabilidad en diferentes escenarios, así como para ajustar puntos de corte (84).

El número de TDAG comercializadas con marcado CE-IVD está en crecimiento continuo, más de 150 a 7 de junio de 2021 (85). Estudios de validación independiente que han comparado frente a frente diferentes TDAG, han constatado diferencias significativas en los valores de sensibilidad y en menor medida, especificidad, entre marcas comerciales (79), que en ocasiones quedan lejos de los manifestados por los fabricantes, y que no alcanzan los valores de sensibilidad $\geq 80\%$ y de especificidad $\geq 97\%$ considerados como aceptables por la OMS y el ECDC (33,73). A la vista de esta heterogeneidad y de que muchos reactivos autorizados no han sido objeto aún de validaciones independientes (33) resulta imprescindible una revisión de la literatura científica o una validación local antes de elegir una marca concreta.

4.4. INDICACIONES DE LAS TDAG

Diagnóstico de infección aguda

Las TDAG se pueden emplear en pacientes con sospecha clínica de infección en los primeros cinco días desde el inicio de síntomas (33,55). Una TDAG-positiva aporta la consideración de caso confirmado a pacientes con sospecha clínica de COVID-19 (86). El entorno habitual de aplicación son las Consultas de Atención Primaria, atención continuada de los Servicios de Microbiología y en algunos casos en Servicios de Urgencia de Hospitales (triaje). En estos entornos el factor tiempo es esencial, para facilitar la gestión rápida y adecuada de los pacientes, y adelantar el rastreo de contactos.

En el caso de pacientes con sintomatología sospechosa de COVID-19 que precisen ser hospitalizados, así como trabajadores sanitarios y pacientes ingresados por otros motivos que inicien síntomas, y presenten TDAG-negativo, se les debe efectuar lo antes posible una RT-PCR (55). A pesar de su consideración de caso confirmado, es conveniente realizar una RT-PCR a aquellos pacientes que sean hospitalizados, lo que facilitará disponer de un valor basal de Ct y de un estudio de variantes. En el ámbito comunitario, si a pesar de un resultado negativo en la TDAG persiste sospecha clínico-epidemiológica de infección, está indicado mantener al paciente en aislamiento y repetir la prueba (preferiblemente RT-PCR) en menos de 48 h.

Las TDAg pueden facilitar el manejo de brotes de COVID-19 en instituciones, preferiblemente tras la confirmación de los casos iniciales mediante RT-PCR, permitiendo la rápida detección y aislamiento de nuevos casos (87). En centros sociosanitarios, así como penitenciarios y otras instituciones cerradas, las TDAg son una opción para el diagnóstico de casos sospechosos, si los resultados de la RT-PCR no están disponibles en menos de 24 h (55).

Contactos estrechos asintomáticos de casos confirmados

Diversas instituciones consideran en estos casos a las TDAg como una alternativa válida (30,33,55,87). Sin embargo, en esta situación algunos estudios han mostrado una sensibilidad menor a la ofrecida por TAAN (88). La RT-PCR es de elección, siempre que se pueda disponer de resultado en un plazo razonable (55), y especialmente si han transcurrido más de 7 días tras el contacto (33). No obstante, una TDAg-positiva proporciona la consideración de caso confirmado a los contactos estrechos. En las últimas recomendaciones del Ministerio de Sanidad, y al igual que en el caso de la RT-PCR, si la TDAg es negativa y se realiza antes de los 10 días tras el último contacto, se debe cumplir la cuarentena hasta el día 10 (55).

Cribados poblacionales/Detección de infectados asintomáticos

Las TDAg constituyen buenas herramientas desde la perspectiva de la Salud Pública, dando pie a una estrategia de uso complementaria a la diagnóstica, cuyo objetivo no es el diagnóstico preciso de cada caso, sino detectar los sujetos infecciosos para entretener la transmisión viral y evitar la aparición de brotes. Así, se han usado con buenos resultados en cribados poblacionales en contexto de transmisión comunitaria y ámbitos geográficos extensos (localidades, regiones, país) (89). El empleo de las TDAg en estos cribados ha sido controvertido a causa de su sensibilidad limitada, pero al ser efectivas para detectar sujetos infecciosos (79,82) facilitan la interrupción de muchas cadenas de transmisión (60,90). En el contexto de la Salud Pública, la menor sensibilidad de las TDAg puede ser compensada por su corto tiempo de respuesta (especialmente en el caso de los IEFL), un uso repetido y extenso de la prueba y la rapidez con la que se pueden implementar las intervenciones (30,91). Por otra parte, las TDAg aportan una especificidad elevada, característica esencial para los cribados.

Las TDAg pueden ser usadas en el contexto de la vigilancia en instituciones cerradas y semi-cerradas, en momentos de alta transmisión comunitaria o cuando se ha confirmado un caso interno (87). En estas situaciones se puede efectuar la prueba a todas las personas del centro (residentes y profesionales) de manera seriada (por ejemplo, 1-2 veces/semana) (30,33). Asimismo, una TDAg-negativa se ha usado como requisito para facilitar el acceso a actividades e instalaciones de diversa índole, incluyendo eventos socio-culturales y deportivos (92).

4.5. EMPLEO COMO AUTO-TEST

Recientemente, en algunos países como el Reino Unido, Alemania u Holanda y también en España, se ha facilitado el acceso de IEFL al público en general, en formato auto-toma y auto-test, mediante entrega directa o a través de agentes interpuestos (por ejemplo, las farmacias), desde el Sistema Público de Salud, o autorizando la compra en establecimientos (93). Esta estrategia busca incrementar la realización de pruebas, uno de los principales pilares en la respuesta a la pandemia, y con ello la detección y aislamiento de más personas infecciosas (60). Los auto-tests son menos precisos que los realizados por un profesional y no están indicados para personas sintomáticas o contactos de casos confirmados, ni se admiten para pre-admisión a un evento, o tras volver de un área de riesgo, pero sí en el caso de asintomáticos que buscan una mayor seguridad antes de ir al trabajo, centro educativo, a una reunión o celebración, etc. Es importante que las autoridades sanitarias establezcan, en los países en los que están autorizados, unos requerimientos mínimos de calidad para estas pruebas, ya que la situación es la de un mercado abierto con muchos (decenas) reactivos comercializados, y con frecuencia sin estudios de validación independiente. Asimismo, se deben establecer mecanismos informáticos o telefónicos para que los resultados de estas pruebas o al menos los positivos sean comunicados al Sistema Sanitario.

4.6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS. VALOR DEL RESULTADO NEGATIVO

La interpretación de los resultados de las TDAg es estrechamente dependiente de las características de las diferentes pruebas (sensibilidad, especificidad analítica,...) y de la probabilidad pretest, relacionada con la prevalencia de la infección en la población diana y el contexto clínico del paciente (30,33).

En situaciones en que la prevalencia de la infección es elevada y/o el paciente, clínica y/o epidemiológicamente sospechoso (contacto estrecho de caso confirmado), el valor pretest es alto, y por tanto también el valor predictivo positivo (VPP) de la TDAg. En este contexto, se considera que el resultado positivo tiene valor diagnóstico y avala la consideración de caso de COVID-19 confirmado. Sin embargo, debido a la sensibilidad limitada de las TDAg, el valor predictivo negativo (VPN) es bajo y, por tanto, un resultado negativo requiere una prueba adicional, preferiblemente mediante TAAN (30,33,55). Se debe tener en cuenta que hay situaciones de indefinición (ejemplo: sospecha clínica o epidemiológica baja), en las que el juicio clínico valore que un resultado positivo requiera confirmación y no la requiera un resultado negativo (30).

Por el contrario, en situaciones en las que el valor pretest es bajo, el sujeto asintomático y sin sospecha epidemiológica, el VPP será bajo (94), por lo que los resultados positivos requieren confirmación mediante TAAN, para evitar el informe de resultados falsamente positivos (30,33). En este contexto, el VPN se considera elevado y se acepta el resultado negativo de la prueba. En el contexto de la Salud Pública y cuando se están realizando TDAg repetidas de vigilancia en un colectivo, un resultado positivo no necesita confirmación si no es el primero del colectivo y está precedido de resultados negativos del propio paciente.

4.7. DESCENTRALIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (PUNTOS DE ATENCIÓN AL PACIENTE)

Las IEFL para la detección de antígeno del SARS-CoV-2 ofrecen ventajas prácticas sobre las TAAN como sencillez de uso, rapidez en la obtención de resultados, y no necesitar aparatos para su realización. Estas pruebas son más baratas que las TAAN y se comercializan en forma de kits completos que incluyen los reactivos y el utillaje necesario. Los IEFL son menos sensibles que las TAAN, pero detectan los sujetos con cargas virales más elevadas, probablemente infecciosos, y son altamente específicos. Todo ello ha facilitado que los IEFL hayan sido descentralizados e implementados a gran escala en puntos de atención al paciente (por ejemplo, en Atención Primaria), lejos de los Laboratorios de Microbiología de Referencia. Sin embargo, el papel de éstos es esencial para que las TDAg se implanten en el momento y entorno apropiado y se efectúen eficientemente (95).

Los microbiólogos deben formar parte de los grupos que toman decisiones acerca de la introducción de estos inmunoensayos en los diferentes entornos sanitarios. Esta decisión requiere, además de conocer la estructura y situación de la organización sanitaria local o regional, un conocimiento profundo de las características intrínsecas y en diferentes escenarios de las TDAg y TAAN. Desde el primer momento, es necesario incorporar en el Sistema Informático de Laboratorio y en tiempo real, las peticiones de IEFL que se efectúan de manera descentralizada y sus resultados, y con ello en la historia clínica del paciente, lo que facilitará su supervisión por parte de Microbiología y su integración en algoritmos diagnósticos.

Aunque se efectúen fuera del laboratorio, la elección de los IEFL a implantar en distintos escenarios es responsabilidad del Servicio/Unidad de Microbiología, igual que la capacitación del personal que llevará a cabo las pruebas y del control de calidad, para lo que deberá elaborar procedimientos operativos de trabajo, vídeos tutoriales y/o sesiones formativas, no sólo en la fase de implantación, debido al frecuente recambio de personal.

Son muchos los factores a controlar y los errores que pueden tener lugar durante la realización de IEFL a pesar de su sencillez. Lejos del laboratorio, estos errores pueden convertirse fácilmente en sistemáticos, por lo que es esencial un papel vigilante por parte de Microbiología que garantice la calidad del proceso diagnóstico. Entre otros, se deben controlar aspectos como el almacenamiento adecuado de los reactivos,

ya que el almacenamiento a temperaturas superiores al margen de tolerancia disminuye la sensibilidad mientras que a temperaturas bajas empeora la especificidad de los reactivos (75); asegurar el cumplimiento de los protocolos de limpieza y desinfección; garantizar la adecuada realización de las pruebas (muestras a emplear, proceso de trabajo, tiempos de lectura e interpretación de resultados,...); el uso de controles de calidad, etc. Los laboratorios de Microbiología deben monitorizar los resultados de los diferentes puntos descentralizados a su cargo para detectar posibles inconsistencias (por ejemplo: número inusual de resultados positivos sin correlación clínico-epidemiológica) (30) y supervisar la cumplimentación de los registros de calidad (lotes de reactivos, temperatura de almacenamiento, resultados de los controles...). Por tanto, es responsabilidad de los Laboratorios de Microbiología la adecuada implementación y ejecución de las TDAg realizadas en puntos de atención al paciente, lo que requiere una supervisión directa y constante.

5. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

5.1. CINÉTICA DE ANTICUERPOS

La mayoría de las personas inmunocompetentes desarrollan una respuesta inmune adaptativa después de la infección por SARS-CoV-2 (96), en su doble faceta humoral y celular, dirigida a la neutralización de la infección vírica. Como se ha indicado previamente, el genoma del SARS-CoV-2 codifica 4 proteínas estructurales principales: la espícula (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N). De éstas, las proteínas S y N han demostrado ser inmunógenas y los anticuerpos dirigidos contra estos antígenos son la diana de las pruebas serológicas de la infección por SARS-CoV-2 actualmente disponibles (96,97).

La respuesta inmune humoral frente al SARS-CoV-2 se basa principalmente en la inducción de anticuerpos contra la proteína N y contra la proteína S, incluyendo estos últimos, anticuerpos específicos frente a la subunidad S1 y el RBD. En la mayoría de los pacientes, la seroconversión ocurre en las 2 primeras semanas después del inicio de los síntomas y en su práctica totalidad desarrollan niveles detectables de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 de las clases IgM, IgA e IgG antes del día 28 del inicio de síntomas (13-16).

Las IgM son las primeras inmunoglobulinas en aparecer, entre 7 y 14 días después del inicio de los síntomas, y se utilizan como marcador de infección reciente. Las IgG se pueden detectar simultáneamente a las IgM, incluso en ocasiones antes (13), pero en la mayoría de los pacientes son de aparición posterior y alcanzan una meseta entre los días 15 y 21 (13,98). Sin embargo, en una evaluación de diferentes estudios realizada por la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) (99), no parece haber diferencia significativa en las semanas siguientes a la infección, en la sensibilidad de las pruebas que detectan IgM en comparación con las que detectan IgG: durante la primera semana, la sensibilidad para la detección de IgM fue de alrededor del 33% en comparación con el 23% para la detección de IgG, y a partir de la segunda semana, del 73% para las IgM y del 68% para las IgG. La especificidad para la detección de IgM fue ligeramente menor (98%) en comparación con la de IgG (99%). Por lo tanto, según la evidencia disponible, no parece haber una mayor precisión de diagnóstico cuando se utilizan pruebas de IgM en comparación a las de IgG al inicio del curso clínico de la enfermedad. Sin embargo, la detección de anticuerpos totales en las dos primeras semanas sí parece aportar un incremento de sensibilidad manteniendo niveles elevados de especificidad. La sensibilidad global durante la primera semana tras el inicio de síntomas fue con este marcador del 23%-63% y en la segunda semana del 68%-96% (99).

La IgA secretora es importante para la inmunidad de las mucosas. Las IgA también se pueden detectar a nivel sistémico, pero en la COVID-19 se sabe poco sobre su cinética en sangre, por lo que actualmente no es una prueba utilizada habitualmente en la serología de la infección por SARS-CoV-2.

La persistencia de los anticuerpos a lo largo del tiempo y su relación con la capacidad de protección continúan siendo motivo de estudio, aunque en la mayoría de las personas los anticuerpos IgG persisten durante al menos varios meses (100) y estarían asociados a un cierto nivel de protección frente a la reinfección. En los casos leves, el título de anticuerpos suele ser menor, pueden no ser detectables o incluso serorevertir a las pocas semanas (16,101-105). En este sentido, algunos estudios han observado que

aproximadamente el 5-10% de los pacientes no desarrollan anticuerpos IgG detectables después de la infección (106,107). Existe evidencia suficiente para pensar que tanto las IgG como los anticuerpos con capacidad neutralizante empiezan a disminuir a partir del tercer mes de infección, especialmente en las formas leves de COVID-19, de forma similar a lo que tiene lugar con los coronavirus estacionales (17,101). Sin embargo, aunque es posible que no se detecten anticuerpos neutralizantes en pacientes con enfermedad leve o asintomática (108), la respuesta inmune humoral puede mantenerse incluso con la falta de detección de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo (109). Son necesarios estudios futuros para acabar de dilucidar todos estos aspectos.

De manera similar, se desconoce la respuesta de anticuerpos en poblaciones especiales como niños y personas de edad avanzada, pacientes inmunodeprimidos, y pacientes con enfermedades autoinmunes o reumatológicas.

5.2. MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las muestras, y los protocolos para su obtención, transporte, manipulación y conservación no difieren de los ya publicados en los diferentes procedimientos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (18,32) para el diagnóstico serológico de otras infecciones. El tipo de muestra utilizada para cada prueba (suero, plasma o sangre total, incluida la sangre de punción en el dedo) podría afectar a los resultados de la prueba y su comparabilidad entre sí (110-112), pero actualmente, no existe suficiente evidencia científica para obtener conclusiones al respecto (99).

5.3. TÉCNICAS DISPONIBLES

Los inmunoensayos actualmente comercializados son capaces de detectar aisladamente las inmunoglobulinas de las clases IgA, IgM e IgG. Los ensayos de detección de anticuerpos totales están diseñados para determinar los niveles de todas ellas en combinación.

Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos S y N son la diana de las actuales pruebas serológicas de detección de la infección por SARS-CoV-2 (96,97). La sensibilidad y la especificidad de los ensayos serológicos también pueden verse afectadas por el antígeno diana elegido. Así, se ha descrito que la proteína N, al estar relativamente bien conservada en los coronavirus, podría ser causa de reacciones serológicas cruzadas. Por otra parte, se ha referido que aparecen antes anticuerpos frente a la proteína N que frente a la proteína S (113) y los primeros tienen tendencia a disminuir e incluso negativizarse antes que los anticuerpos frente a la proteína S (114). Así, la sensibilidad de los ensayos que se dirigen frente a una única proteína puede verse afectada según el momento de la infección. Sin embargo, los datos no son concluyentes y presentan una amplia variabilidad entre los diferentes trabajos publicados (99,103).

Dado que la mayoría de la población ha estado expuesta a coronavirus humanos estacionales (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 o HCoV-HKU1) que presentan similitudes en su estructura antigénica con el SARS-CoV-2 (115), es importante asegurar que los ensayos serológicos no presentan reacciones cruzadas entre los diferentes coronavirus (116). Las pruebas serológicas actualmente comercializadas han demostrado poseer una especificidad superior al 98% (117). En el contexto de condiciones como la gestación o enfermedades autoinmunes, y como es conocido en las pruebas serológicas en general, puede aumentar la frecuencia de resultados inespecíficos (falsos positivos).

Los anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 que inhiben la replicación viral *in vitro* se dirigen principalmente a la región RBD (96) de la subunidad S1, que a su vez es la principal diana de los anticuerpos inducidos por las actuales vacunas aprobadas para la prevención de la infección por este virus (5,6). Existe la necesidad de desarrollar ensayos estandarizados que puedan correlacionar los títulos de anticuerpos con

el nivel de neutralización vírica (118). Incluso si existiera algún grado de correlación, se desconoce el título y la duración del nivel de protección y su validez frente a las futuras variantes víricas.

Actualmente hay varios centenares de pruebas disponibles en el mercado (85,119,120), pero, para la gran mayoría se dispone de datos limitados de validación clínica. Tan sólo deben utilizarse ensayos con una sensibilidad y especificidad superiores al 95% y 98% respectivamente (28).

Existen diferentes plataformas para la realización de las pruebas serológicas. Las más comúnmente utilizadas son las técnicas de diagnóstico rápido basadas en inmunoensayos de flujo lateral (IEFL) y las plataformas automatizadas de gran capacidad basadas en enzimoimmunoensayo (EIA) o en inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA) (103,121-123). Adicionalmente, pueden utilizarse técnicas con cultivos celulares de detección de anticuerpos neutralizantes. Por último, el estudio de la respuesta celular como marcador de protección, puede llegar a tener relevancia en el futuro, pero en la actualidad todavía no existe el conocimiento científico suficiente para su utilización en clínica.

Inmunoensayos de flujo lateral (IEFL)

Los IEFL generalmente requieren una gota de sangre por punción en el dedo (o suero o plasma) aplicada a una tira reactiva, con lectura de resultados en aproximadamente 15-30 minutos (124). Estas técnicas son fáciles de realizar y no requieren instrumental adicional, por lo que son adecuadas para su realización en el lugar de atención al paciente o en la implementación de encuestas serológicas sobre el terreno. Sin embargo, actualmente no se recomienda su uso (29,125,126) debido a la gran heterogeneidad en la calidad de los reactivos comercializados (103), la falta de cuantificación y la subjetividad de su lectura.

Plataformas automatizadas de gran capacidad basadas en enzimoimmunoensayo (EIA) o en inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA)

La recomendación actual (29,125,126) es la de realizar las técnicas serológicas en plataformas automatizadas de alto rendimiento (ELISA, CLIA) en muestras de suero o plasma, tan sólo realizables en el contexto de un laboratorio con experiencia en este tipo de técnicas. La mayoría de las pruebas de alto rendimiento proporcionan resultados cualitativos o semicuantitativos, sin que exista una indicación clara del valor clínico de la cuantificación, con excepción de la evaluación de la seroconversión. Las principales desventajas continúan siendo la falta de estandarización internacional, la existencia de límites de detección variables y el uso de diferentes dianas antigénicas, factores todos ellos que dificultan la comparación de resultados. Adicionalmente, la sensibilidad y la especificidad varían ampliamente entre ensayos e incluso dentro de un mismo ensayo validado por diferentes usuarios (127), lo que hace necesaria, en muchas ocasiones, la validación local de los reactivos a utilizar (128).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (129) ha desarrollado un estándar internacional (NIBSC code: 20/136) para armonizar y estandarizar los ensayos serológicos que detectan anticuerpos neutralizantes y que además puede utilizarse para comparar los que detectan anticuerpos específicos de unión a SARS-CoV-2. Cuando se utiliza para estandarizar ensayos de neutralización se le asignan unidades internacionales por mililitro (UI/mL), pero cuando se utiliza para ensayos serológicos que detectan anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 se le asignan unidades de unión a anticuerpo por mililitro (BAU/mL, del inglés *binding antibody units*). En este último caso, debemos tener presente que la comparación de ensayos serológicos con BAU/mL sólo será posible si determinan el mismo isotipo de anticuerpo (IgG, IgM, anticuerpos totales, etc) y tienen la misma especificidad antigénica (anti-N, anti-RBD, anti-S1, etc). La mayoría de fabricantes de ensayos serológicos ya se han comparado con este estándar internacional y han publicado un factor de correlación con el que modifican su punto de corte para poderlo expresar en BAU/ mL.

Ya son varios los artículos científicos que expresan los resultados cuantitativos de respuesta serológica vacunal con BAU/mL, pero sus resultados ponen en evidencia lo comentado anteriormente, aún utilizando las mismas unidades, no son comparables entre sí puesto que utilizan ensayos distintos (130). Además, este estándar internacional no define un punto de corte de protección, por el que su utilidad clínica aún suscita algunas dudas.

Esto lleva a la discusión de como informar de los resultados en un informe clínico. Es evidente que, con la diversidad de ensayos serológicos que determinan diferentes anticuerpos, es importante informar frente a qué subunidad antigénica se unen y que isotipo estamos detectando (IgG anti-S, anticuerpos totales anti-N, IgG anti-S1/S2, etc). Esta información además podría ir acompañada de una breve explicación para facilitar la interpretación clínica de los resultados (por ejemplo, si estos anticuerpos se producen ante una infección natural, anti-N, o también después de la vacunación, anti-S). En cuanto a la información del resultado propiamente dicho, a día de hoy, con la variedad de ensayos serológicos utilizados, sin un punto de corte de inmunización ni unas UI/mL establecidas post-vacunales, no se aconseja informar del valor cuantitativo sino solo del cualitativo según la interpretación establecida por cada fabricante. De hecho, no olvidemos que, como en muchas enfermedades infecciosas, la mejor forma de confirmar serológicamente una infección reciente es demostrando una seroconversión de IgG entre dos muestras de suero, en fase aguda y convaleciente, analizadas mediante un ensayo cuantitativo o semicuantitativo y demostrando un incremento de cuatro veces del título de anticuerpos. Sin embargo, esta aproximación es tardía y exige la recogida de los sueros en fase aguda y convaleciente.

Pruebas de detección de anticuerpos neutralizantes en cultivo celular

Las pruebas de detección de anticuerpos neutralizantes determinan la capacidad funcional de los anticuerpos para prevenir la infección por virus *in vitro*. Estas pruebas controlan la inhibición del crecimiento viral en cultivos celulares cuando se incuban con suero o plasma. Las pruebas más utilizadas son la neutralización por reducción de placa y la microneutralización, mediante la utilización de un aislado clínico de SARS-CoV-2 o bien de pseudovirus recombinantes (como el virus de la estomatitis vesicular) que incorporan la proteína S del SARS-CoV-2. Sin embargo, estas técnicas requieren conocimientos altamente especializados e instalaciones de cultivo con nivel de bioseguridad 3, por lo que se realizan en un número limitado de laboratorios. Recientemente, se han desarrollado pruebas competitivas de neutralización y una de ellas ha sido autorizada por la FDA (cPass) y se halla comercializada. La prueba imita la interacción de la región RBD con el receptor celular ACE-2 (sin la utilización de virus vivos) en un formato de ELISA y evalúa la capacidad de los anticuerpos presentes en el suero del paciente de interferir en dicha unión.

Sin embargo, incluso una prueba de anticuerpos neutralizantes positiva, con los datos actuales, no garantiza la protección contra la reinfección o la durabilidad de los niveles de anticuerpos neutralizantes, especialmente en un escenario de gran dinamismo en la selección de nuevas variantes de SARS-CoV-2 en circulación.

Estudio de la respuesta celular

El estudio de la respuesta celular específica frente a SARS-CoV-2 desarrollada después de la infección natural o de la vacunación, aún está restringida a estudios de investigación. La bibliografía científica aún es escasa, y se basa en la estimulación celular por pool de antígenos específicos mediante ensayos no comerciales o ensayos comerciales del tipo del quantiferon que tan sólo están disponibles en versión RUO (*research use only*) (131). Estos estudios podrían ser de utilidad en el estudio de la respuesta vacunal de determinados pacientes que tienen su inmunidad humoral comprometida.

5.4. INDICACIONES E INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS

Debido a la baja sensibilidad de la detección de anticuerpos en las primeras semanas de infección, las pruebas serológicas tienen utilidad limitada en el diagnóstico de la infección aguda, que se basa actualmente en las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) y/o de detección de antígeno (29,125,126). Podrían ser de ayuda en aquellos casos con clínica e imagen compatible y TAAN y/o antígeno negativos (104,126). Sin embargo, un paciente con síntomas respiratorios y una prueba de anticuerpos positiva, no necesariamente tiene una infección por SARS-CoV-2 reciente. En estos casos, la detección de una seroconversión confirmaría el diagnóstico y la de IgM sería muy sugestiva. Adicionalmente, a pesar de la elevada especificidad de las técnicas, en casos con baja probabilidad pretest de infección, la proporción de falsos positivos puede llegar a ser elevada.

Por tanto, actualmente, las técnicas serológicas no se recomiendan en el diagnóstico de la infección aguda y su uso se halla prácticamente restringido a los estudios de seroprevalencia (29,125,126). Tan sólo se recomienda la serología como prueba de primera línea en el caso del síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico, trastorno que se ha relacionado con la infección por SARS-CoV-2 y que puede ocurrir semanas después de la infección aguda (132).

La síntesis de anticuerpos inducida por la vacuna tiene implicaciones en la realización e interpretación de las pruebas serológicas. Antes de la introducción de la vacuna, se consideraba que una prueba serológica del SARS-CoV-2 que detectara cualquiera de los anticuerpos frente a las proteínas N, S o la región RBD de S1, era indicativa de exposición previa. Con la introducción de la vacuna, las personas vacunadas pueden ser positivas en las pruebas serológicas para las dianas antigénicas S y RBD de la vacuna, pero no frente a la proteína N. Por tanto, la presencia de IgG frente a la proteína N indica antecedente de infección por SARS-CoV-2. Si bien, de su no detección, como antes se ha indicado, no se puede inferir lo contrario. Tan sólo los anticuerpos IgG frente a la proteína S o la región RBD se pueden llegar a correlacionar con los anticuerpos neutralizantes. En definitiva, es importante considerar los antecedentes de vacunación y/o infección previa SARS-CoV-2 al interpretar los resultados de las pruebas serológicas. En este sentido, la posibilidad de poder diferenciar entre infección natural y vacunación, podría ser una herramienta de salud pública útil a medida que se implementan los programas de vacunación, siempre y cuando las pruebas serológicas estén adecuadamente validadas para detectar con gran especificidad anticuerpos frente a antígenos únicos.

Por tanto, en la interpretación de los resultados de la serología deben tenerse en cuenta aspectos como el tipo de paciente, la gravedad, el momento en el que se realiza la prueba, la diana antigénica o el estado de vacunación, entre otros.

Por último, y como ya se ha comentado previamente, los resultados serológicos no se pueden utilizar, actualmente, para establecer el nivel de protección a la infección o enfermedad. Así, no se recomienda la detección de anticuerpos para evaluar el nivel de protección después de la vacunación o para evaluar la necesidad de vacunación en una persona no vacunada.

6. CULTIVO CELULAR

La técnica diagnóstica que mejor nos indica la viabilidad viral, y por tanto cuanto tiempo un paciente infectado por SARS-CoV-2 puede transmitir el virus, es el cultivo celular. Desgraciadamente la mayoría de los Laboratorios de Virología han ido abandonando progresivamente esta técnica, siendo difícil actualmente contar con personal técnico cualificado para su realización. En el caso de SARS-CoV-2 se necesitan instalaciones que cumplan con los requerimientos de bioseguridad de nivel 3, lo que dificulta aún más la

realización del cultivo celular.

A continuación, hablaremos de los requerimientos de bioseguridad, los tipos de muestra idóneos para la realización de cultivo celular y su preparación, las diferentes modalidades de cultivo celular que pueden realizarse para la detección de SARS-CoV-2 y su aplicabilidad.

6.1. REQUERIMIENTOS DE BIOSEGURIDAD

Además de la utilización de equipos de protección individuales, previamente descritos en este procedimiento, el aislamiento del virus en muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2 debe realizarse sólo en laboratorios capaces de cumplir con los criterios de contención siguientes:

1. Sistema de ventilación controlada con presión negativa. El aire debe filtrarse con filtros HEPA (filtros de alta eficiencia de partículas suspendidas) en caso de que se reacondicione y recircule dentro del laboratorio. Cuando el aire evacuado del laboratorio se descarga al exterior, debe dispersarse lejos de edificios ocupados y entradas de aire y debe desecharse a través de filtros HEPA
2. El laboratorio debe contar con un lavabo para el lavado de las manos
3. Todas las manipulaciones de las muestras clínicas deben realizarse en cabinas de seguridad biológica (CSB) debidamente mantenidas y validadas
4. El personal del laboratorio debe usar un equipo de protección que incluya dos pares de guantes desechables, batas impermeables sin abertura delantera y que cubran por completo los antebrazos, gorros, cubrecalzado o calzado especial y protección ocular (gafas de protección o pantalla facial). Asimismo, debe utilizar protección respiratoria (mascarillas respiratorias de ajuste individual comprobado, FFP2 o N95).
5. La centrifugación de las muestras debe realizarse con rotores o cubetas selladas o cubetas selladas para las muestras. Los rotores o las cubetas deben cargarse y descargarse dentro de una CSB.
6. Se debe disponer de un autoclave de doble apertura dentro de la instalación de cultivo; todo el material empleado en la realización del cultivo celular debe salir autoclavado de la sala de cultivos.

Además, ciertos procedimientos experimentales pueden conllevar riesgos adicionales de mutaciones víricas con posible aumento de la patogenia o la transmisibilidad o producir virus con una alteración de la capacidad antigénica o la sensibilidad a fármacos. Se deben realizar valoraciones específicas del riesgo y adoptar las medidas oportunas de control del riesgo antes de realizar cualquiera de los procedimientos siguientes:

1. Coinfección de cultivos celulares con coronavirus diferentes o cualquier procedimiento que pueda resultar en una coinfección y, a su vez, en una recombinación.
2. Cultivo del virus en presencia de fármacos antivirales.
3. Modificación genética deliberada del virus.

6.2. TIPOS DE MUESTRA, CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN

Tipos de muestra y métodos de recogida

Para el aislamiento de SARS-CoV-2, como para otros virus respiratorios, son adecuadas tanto muestras del tracto respiratorio superior (TRS) como inferior (TRI). Las muestras del TRS más adecuadas son el exudado nasofaríngeo y el aspirado nasofaríngeo, y en el caso del TRI el lavado broncoalveolar (LBA). La utilización de secreciones bronquiales o esputo presentan una menor rentabilidad en cultivo celular, debido a la dificultad para su homogeneización y a la carga bacteriana que contienen.

Se ha investigado la presencia de virus viable en otros tipos de muestras como suero, heces, orina y lágrimas. El número de muestras extra-respiratorias examinado es limitado, reportándose el aislamiento ocasional del virus en heces (133). Dada la poca rentabilidad encontrada en este tipo de muestras no se recomienda su utilización para el aislamiento de SARS-CoV-2.

La obtención de muestras ha sido comentada en detalle previamente en otros apartados de este procedimiento. Recordar la importancia para la realización de cultivo celular de la utilización de torunda flocada y de viales con 2-3 ml de VTM (medio de transporte viral) o UTM (medio de transporte universal) que contengan perlas de vidrio.

El transporte y conservación de las muestras es similar al mencionado previamente para otras técnicas, pero teniendo en cuenta que en el caso del cultivo celular las muestras se deben conservar siempre a -80°C y deben evitarse los ciclos de congelación-descongelación repetidos.

Preparación de las muestras

Hay que asegurarse de que el vial con medio de transporte esta perfectamente cerrado antes de proceder a su agitación con un vórtex durante 20-30 segundos para desprender las partículas virales. La torunda se debe retirar rotándola contra la pared interna del envase para eliminar el medio de transporte viral que retenga.

Tanto los aspirados nasales como los LBA deben diluirse en una proporción 1:1 con medio de transporte viral, perlas de vidrio, y mezclarse agitando con un vórtex tal y como se ha descrito anteriormente.

Las muestras deben centrifugarse a $600\times g$ durante 15 min y utilizar el sobrenadante para el cultivo celular. Previamente hay que adicionar antibiótico y anfotericina B para eliminar las bacterias y hongos presentes en la muestra. La gentamicina es el antibiótico más ampliamente utilizado a una concentración final 5-10 $\mu\text{g/ml}$, utilizándose la anfotericina B a una concentración final de 1-4 $\mu\text{g/ml}$. Antes de proceder a la inoculación de la muestra en el cultivo celular hay que esperar 30 min tras haber añadido los antimicrobianos.

6.3. LÍNEAS CELULARES PERMISIVAS A LA INFECCIÓN POR SARS-CoV-2 Y MATERIAL NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DE CULTIVO CELULAR

La infección celular por Coronavirus depende de la unión de la proteína S a receptores celulares específicos; en el caso de SARS-CoV-2 este receptor es ACE-2 que se expresa en diferentes tejidos humanos como pulmón, corazón, riñón y testículos. También se ha descrito la infección de líneas celulares procedentes de riñón de gato (CRFK), conejo (RK-13) y cerdo (PK-15). Se ha demostrado que todas las líneas celulares de riñón de dos especies de mono (cercopiteco verde y macaco rhesus) son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, presentando efecto citopático temprano (48 h) excepto la línea LLC-MK2 (134,135). Las líneas celulares en las que se ha comunicado replicación de SARS-CoV-2, su origen y si se desarrolla un efecto citopático (ECP) claramente identificable se muestran en la Tabla 3. A excepción de la línea celular Calu-3 todas las líneas celulares son de estirpe epitelial.

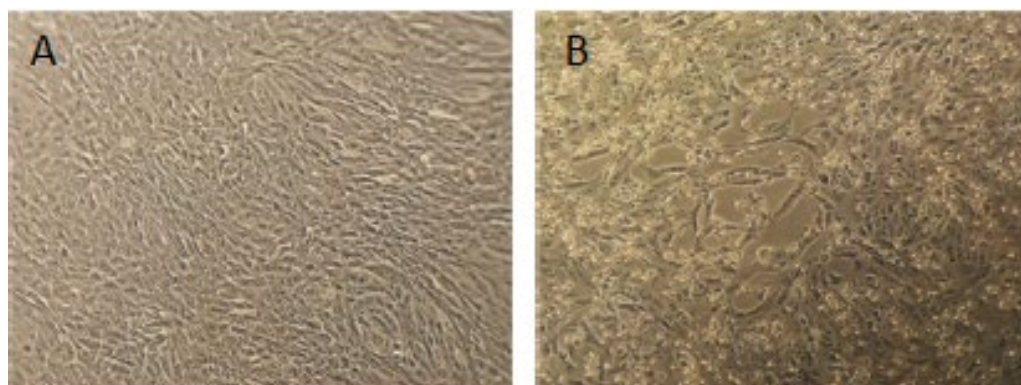
El ECP típico de SARS-CoV-2 que se desarrolla en la línea celular Vero E6, la más utilizada hasta el momento, es la aparición de células redondeadas, desprendimiento y degeneración de las mismas y formación de sincitios. En la Figura 1 se muestra el aspecto normal de la línea celular Vero E6 y el ECP producido tras la infección por SARS-CoV-2.

Se ha reportado variabilidad entre los virus aislados y propagados en cultivo celular respecto al nivel máximo de replicación alcanzada, encontrándose hasta 3 logaritmos de diferencia en la $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ alcanzada (134).

Tabla 3. Líneas celulares susceptibles a la infección por SARS-CoV-2

LÍNEA CELULAR	ORIGEN DE LA LÍNEA CELULAR	DESARROLLO DE ECP
BGM	Riñón cercopiteco verde	48 h
MA 104	Riñón cercopiteco verde	48 h
VERO E6	Riñón cercopiteco verde	48 h
VERO E6 TMPRSS2	La línea celular VERO E6 ha sido modificada para expresar la proteasa TMPRSS2. (136)	48 h
VERO 81	Riñón cercopiteco verde (no expresa la proteína STAT-1)	48 h
VERO/hSLAM	Riñón cercopiteco verde (expresa CDw150, receptor para el virus del sarampión)	48 h
LLC-MK2	Riñón de macaco Rhesus	NO
Caco-2	Adenocarcinoma colo-rectal	NO
Calu-3	Adenocarcinoma pulmonar	NO
Huh7	Carcinoma hepatocelular	NO
U251	Glioblastoma	NO
293T	Células renales embrionarias	NO

Figura 1. Aspecto de la línea celular Vero E6 (A) y ECP producido por SARS-CoV-2 (B) tras 72 h de incubación



Material necesario para la realización de cultivo celular

Una vez decidida la línea celular a utilizar deben seguirse las recomendaciones establecidas para la utilización del medio de cultivo más idóneo.

En líneas generales cualquiera de las variantes de la línea celular Vero crecen con medio de cultivo MEM (medio esencial mínimo de Eagle) o D-MEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) que contiene una mayor proporción de aminoácidos (x2) y vitaminas (x4) en su composición. Existen formulaciones comerciales de los medios de cultivo que incluyen la presencia de L-glutamina, que si no forma parte de la composición original, debe ser añadida en un volumen que suponga el 2% del volumen total del medio de cultivo (concentración del stock de L-glutamina 1 M). Se añade también antibiótico, la combinación clásica utilizada es penicilina+estreptomina a una concentración de 100 U/ml, y un 5-10% de suero bovino fetal previamente inactivado tras una incubación de 1 hora a 56°C. Una vez preparado el medio de cultivo se mantiene refrigerado a 4°C, debiendo atemperarse (en baño a 37°C) cada vez que vaya a ser utilizado.

Dependiendo del tipo de cultivo, aislamiento a partir de muestra clínica o propagación viral se utilizará un formato adecuado para el mismo. En el caso del aislamiento a partir de muestra clínica el formato recomendado es la placa de 24 pocillos, mientras que para la propagación del virus es más conveniente la utilización de flascos de 25 cm². Dependiendo de la atmósfera de incubación se seleccionará el tipo de tapón (gas permeable o no) de los flascos de cultivo.

Para el mantenimiento de la línea celular se realiza cultivo en flascón, y dos veces por semana se cambia el medio y se despegan las células utilizando tripsina, se lavan con PBS 1x, y se resuspenden en medio de cultivo para proceder a su conteo en cámara de Neubauer, ajustándose la concentración a 1x10⁵ células/ml. Para proceder a la infección, la monocapa celular debe estar en un estado de semiconfluencia, evitando el sobrecrecimiento.

6.4. AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE MUESTRA CLÍNICA

Como se ha mencionado anteriormente el formato de cultivo más utilizado es la placa de 24 pocillos en la que se han dispensado las células VERO a una concentración de 1x10⁵ células/ml/pocillo. A las 48 h se añade a cada pocillo el sobrenadante viral (200-500 µl) obtenido tras la preparación de la muestra, tal y como se ha indicado en un apartado anterior, incubando entre 2-12 h. Tras la incubación se retira el medio de cada pocillo y se lava con PBS 1x al menos 2 veces, teniendo siempre el máximo cuidado para que no se desprenda la monocapa y para no hacer aerosoles. Se añade 1 ml de medio de cultivo completo a cada pocillo y se deja incubar a 37°C durante 5 días, sin realizar ningún cambio de medio de cultivo. Para el cultivo en formato de placa es recomendable la utilización de un incubador con atmósfera con 5% CO₂.

El ECP se desarrolla rápidamente (Figura 1) siendo posible su visualización antes de las 48 h. Se recomienda comprobar la replicación viral recogiendo al final entre 200-700 µl, dependiendo de la plataforma molecular que vaya a utilizarse, del sobrenadante del cultivo para realizar una rRT-PCR y comparar el valor de Ct que se obtenga con el que se obtuvo al testar la muestra en el momento del diagnóstico molecular. Debe haber al menos una diferencia de 3 ciclos entre el valor de Ct obtenido en el sobrenadante del cultivo y el valor de Ct obtenido inicialmente en la muestra (*Ct sobrenadante de cultivo - Ct inicial de la muestra* >3), lo que equivale aproximadamente a 1 log de diferencia en la concentración. Habitualmente esta diferencia es de varios logaritmos.

Cultivo-detección en shell-vial

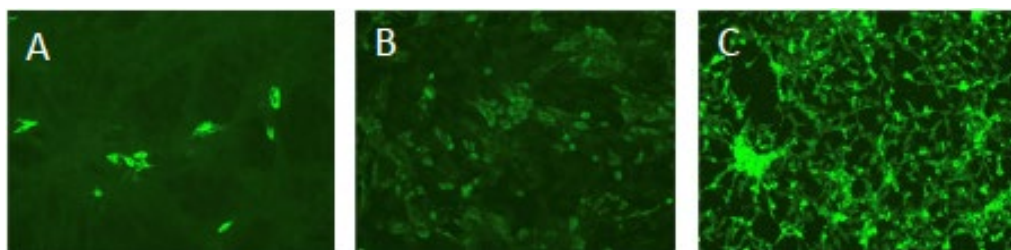
El cultivo-detección en shell-vial permite identificar la presencia del virus en la muestra clínica sin esperar al desarrollo del ECP. Para ello se necesita un anticuerpo primario que reconozca una proteína viral, que en el caso de SARS-CoV-2 es normalmente la proteína N, y un anticuerpo secundario que reconozca el origen de la inmunoglobulina que constituye el anticuerpo primario. Así, si se utiliza una IgG humana anti-N, el anticuerpo secundario puede ser una IgG originada en ratón y que se una a la IgG humana. En la primera ola pandémica y ante la falta de anticuerpos monoclonales comerciales, se utilizó el suero de sujetos convalecientes con buenos resultados. Se recomienda utilizar anticuerpos dirigidos frente a proteínas conservadas que presenten poca variabilidad.

La preparación de las muestras, de la placa de 24 pocillos y el procedimiento de inoculación de la muestra son los mismos que los descritos para el cultivo celular convencional. El periodo de incubación se limita a 48 h, y transcurrido este tiempo, se retira el sobrenadante, se lava la monocapa celular con PBS 1x una vez, y se añade a cada pocillo 1 ml de metanol que se mantiene durante 10 min. Pasado este tiempo, se aspira y se lava de nuevo con PBS 1x, añadiendo a continuación el anticuerpo primario diluido en 500 µl de PBS 1x de acuerdo a las instrucciones del proveedor (normalmente se utiliza una dilución 1:1.000). Se incuba a

37°C en atmósfera de CO₂ durante 1-2 h, y transcurrido este tiempo se lava dos veces cada pocillo con 1 ml de PBS 1x y se añade el anticuerpo secundario diluido (1: 1.000) también en tampón PBS 1x, incubando en este caso 30 min-1 hora. A continuación, se lava cada pocillo con 1 ml de PBS 1x y se examina la placa con un sistema de imagen digital que permite detectar fluorescencia de varios colores y que incorpora un microscopio invertido, enfoque automático y un *software* integrado para la adquisición de imágenes (EVOS M5000 (Thermo Fisher) o similar). Si no se dispone de este tipo de imagen debe utilizarse en vez de placa de 24 pocillos tubos de *shell-vial* individuales, extrayendo tras llegar al final del proceso el cubreobjetos al que está adherida la monocapa celular, procediendo a su montaje en un portaobjetos para su visualización en microscopio de fluorescencia. Si se realiza el procedimiento utilizando esta opción tener en cuenta que existen proveedores de *shell-vial* de diferentes líneas celulares listos para su inoculación (consultar disponibilidad para Vero E6).

En la Figura 2 puede observarse la detección SARS-CoV-2 con el cultivo mediante la técnica de *shell-vial* en muestras respiratorias que contienen diferentes concentraciones virales. Las células de color verde, predominantemente en su citoplasma, son células Vero E6 infectadas.

Figura 2. Cultivo celular en *shell-vial*. Las células con fluorescencia verde están infectadas por SARS-CoV-2 presente en la muestra clínica.



Diferentes concentraciones del virus viable presentes en la muestra clínica se ven reflejadas en los diferentes paneles: A, baja carga viral; B, carga viral intermedia; C: alta carga viral que produce a las 48 h ECP visible también en el cultivo en *shell-vial*.

Aunque la utilización de la técnica de *shell-vial* se generalizó para la detección en cultivo celular de virus respiratorios como virus influenza y virus respiratorio sincitial (VRS), debido a su rapidez comparando con el cultivo celular convencional, no existen datos sobre su aplicación para el diagnóstico de SARS-CoV-2, sin duda debido a la rapidez con la que el virus desarrolla ECP. Su utilización hasta ahora ha sido como una prueba confirmatoria de la especificidad del ECP detectado en cultivo celular convencional.

6.5. ENSAYOS DE CUANTIFICACIÓN VIRAL

Se utilizan fundamentalmente en investigación. La opción más sencilla es el cálculo de la TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose*), la cantidad de virus necesaria para producir ECP en el 50% de las células susceptibles a la infección después de su infección con diluciones seriadas de la muestra que contiene SARS-CoV-2 (137). Siempre debe testarse cada dilución en triplicado.

El ensayo de formación de focos se basa en la detección de células que han sido infectadas por una unidad infecciosa, y que expresan una gran cantidad de antígeno viral que se detectan utilizando anticuerpo virus-específico directamente conjugado a una sustancia colorimétrica o a través de un anticuerpo secundario fluorescente (138). Este tipo de ensayo permite testar un número elevado de muestras de forma simultánea utilizando placas de 96 pocillos.

El método de referencia para la cuantificación de partículas virales con capacidad infectiva es el ensayo de placas (139,140). El término placa describe la zona de muerte celular que ocurre una vez que una unidad infectiva entra en la célula y se disemina a las células adyacentes durante el periodo de incubación. Este ensayo no utiliza reactivos virus-específico, y no puede aplicarse cuando la muestra que se va a utilizar tiene efecto citotóxico por sí misma o cuando el virus desarrolla un ECP muy leve en la línea celular. Es imprescindible utilizar líneas celulares muy permisivas a la infección viral, en las que SARS-CoV-2 cause una mortalidad sustancial (138,141). Suele utilizarse un cultivo en placa de 6 pocillos y se testan las diluciones de la muestra (10^{-1} a 10^{-8}) al menos en duplicado. Debe generarse un volumen suficiente para que cada pocillo contenga 200 μ l; siempre se inocula primero la dilución mayor, tras haber retirado el medio de cultivo. Se incuba 1 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ rotando las placas cada 15 min para evitar que se sequen, preparándose mientras MEM 2x + 4% suero bovino fetal con 2% de metil-celulosa en una proporción 1:1. Se mantiene la mezcla a 37°C hasta ser utilizada. Al finalizar la incubación se añaden 2 ml de MEM, metil-celulosa a cada pocillo y se incuban las placas 3 días a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Al finalizar la incubación se retira cuidadosamente la capa de metil-celulosa y se fijan las células añadiendo a cada pocillo 3 ml de 4% de paraformaldehído en PBS 1x, incubando a temperatura ambiente durante 20 min. Tras retirar la solución de paraformaldehído se añade 1 ml de 0,05% de cristal violeta en 20% de metanol a cada pocillo y se incuba durante 20-30 min. El siguiente paso es retirar el cristal violeta lavando con agua destilada cuantas veces sea necesario, hasta que las placas sean claramente visibles. Se procede al conteo de placas en la dilución en la que encontremos entre 10-100. Para calcular el título de unidades formadoras de placa/ml se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Título (PFU/ml)} = \frac{\text{Número de placas}}{0.2 \text{ ml}} \times 10^{\text{Número de diluciones}}$$

6.6. INDICACIONES

El cultivo celular es la técnica que nos da información sobre la presencia de virus viable en la muestra clínica, proporcionándonos por tanto información sobre la infectividad del paciente con COVID-19. La utilización de las técnicas moleculares para el seguimiento de los pacientes infectados y su prolongada positividad ha inducido a la inclusión en protocolos de actuación clínica la exigencia de una detección negativa en muestra respiratoria para considerar que un sujeto infectado ha dejado de ser contagioso. Los trabajos publicados (16), en los que se ha seguido al paciente infectado con rRT-PCR y cultivo celular, han demostrado que el virus se mantiene viable un periodo de tiempo muy inferior al de la positividad de la detección molecular, un hecho común a todas las infecciones respiratorias víricas.

El cultivo celular es además imprescindible para avanzar en el conocimiento sobre el comportamiento de las diferentes variantes y medir su capacidad infectiva, la generación de sobrenadantes virales titulados que nos permitan medir la actividad neutralizante de los anticuerpos generados tras la infección natural o tras la vacunación y la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* frente a fármacos con actividad frente a SARS-CoV-2.

Viabilidad SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19

Existen diferencias en los estudios publicados en cuanto a la duración de la viabilidad viral en muestras respiratorias (142). Estas diferencias vienen dadas por cuestiones técnicas como la línea celular utilizada (143,144), si el cultivo viral se ha realizado de forma prospectiva o retrospectiva, tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas, gravedad del cuadro clínico (57) y si el paciente está inmunocomprometido (53) o no.

De forma general podemos asumir que en pacientes con COVID leve y sin inmunosupresión el virus permanece viable en muestras respiratorias menos de 1 semana, pudiendo encontrarse algunos sujetos infectados con replicación viral hasta el día 10, mientras que en pacientes con neumonía bilateral o que están recibiendo terapia inmunosupresora, y especialmente en estos últimos, el virus puede presentar replicación en tracto respiratorio durante periodos de tiempo prolongados (más de 20 días).

6.7. CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CULTIVO CELULAR CON OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

La mayoría de los datos de los que disponemos comparan el cultivo celular con la rRT-PCR. Los estudios muestran que existe una correlación entre la presencia de virus viable y un valor de Ct bajo (<25), tiempo transcurrido desde el inicio de síntomas < 1 semana, presentación de neumonía severa e inmunosupresión. Con respecto a la presencia de virus viable en presencia de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 se ha demostrado que esta situación clínica es posible (57), no debiendo asumirse que la presencia de anticuerpos equivale a falta de infectividad cuando estamos en presencia de pacientes con neumonía severa o pacientes inmunocomprometidos.

Existen menos datos sobre la correlación entre la detección antigénica y la viabilidad viral (83), y están limitados a muestras obtenidas en la primera semana de inicio de síntomas, mostrándose una mejor correlación del cultivo viral con la detección antigénica, que con la rRT-PCR. La explicación más plausible es la relación entre la observación de ECP y la cantidad de virus presente en la muestra, semi-cuantificada a través del valor del Ct. La detección antigénica es menos sensible que la rRT-PCR detectando habitualmente muestras con un valor de Ct < 30.

7. ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE VARIANTES DEL SARS-COV-2

Solo una semana después del anuncio de la OMS de unos casos de neumonía de origen desconocido, más tarde denominada COVID-19, se obtuvo la primera secuenciación de genoma completo de un nuevo agente infeccioso responsable de los mismos, el coronavirus SARS-CoV-2. Desde entonces una cantidad sin precedentes de genomas completos de este nuevo virus se han depositado en bases de datos públicas, especialmente en GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*). Por ello, podemos afirmar que la pandemia de COVID-19 ha supuesto el impulso definitivo para la implementación de la estrategia de secuenciación de genomas completos en los laboratorios de Microbiología Clínica, ofreciendo un servicio de enorme importancia a la Salud Pública, como la mejor propuesta para conocer en tiempo real la diseminación y diversificación de cualquier agente infeccioso responsable de epidemias presentes o futuras. Así a nivel nacional, desde el Ministerio de Sanidad y el Centro Nacional de Microbiología se ha gestado una red de laboratorios (145) con capacidad de realizar estas técnicas de secuenciación en aras de fortalecer la vigilancia de la pandemia de COVID-19, así como de identificar lo antes posible la aparición y dispersión de variantes virales de interés (las denominadas VOI, acrónimo de las siglas inglesas *variants of interest*) y de variantes de preocupación (las denominadas VOC, acrónimo de las siglas inglesas *variants of concern*) por su potencial amenaza para la sociedad. Esta clasificación es común para todas las agencias internacionales, pero el ECDC y los CDC han incorporado 2 nuevos tipos de variantes a vigilar. Los CDC han creado el grupo de las variantes con altas consecuencias (las denominadas VOHC, acrónimo de *variants of high consequences*), pero no han propuesto aún ninguna variante que pueda incluirse dentro de este grupo. Por su parte, el ECDC diferencia las denominadas *variants under monitoring* (VUM) para aquellas variantes con indicios de que podrían tener propiedades similares a las de una VOC, siendo las pruebas de momento débiles. Por tanto, a día de hoy, si estableciéramos un gradiente entre las variantes de SARS-CoV-2 sería, de menor a mayor relevancia: VUM, VOI, VOC y VOHC (146).

Es indiscutible que la secuenciación de genomas completos aporta la información más completa y precisa sobre las dinámicas de aparición y dispersión de variantes en una región y tiempo determinado; sin embargo, en la práctica esta estrategia no permite ni el análisis de todas las muestras positivas ni la posibilidad de obtener los resultados en un tiempo de respuesta adecuado para poder implementar medidas de Salud Pública eficientes (147). Por ello, se ha optado en muchos laboratorios de diagnóstico clínico por un cribado de todas las muestras positivas mediante RT-PCR de mutaciones concretas que permiten sospechar la presencia de estas variantes. Cada centro deberá aplicar un algoritmo diferente para la detección de la mayoría de las mutaciones relacionadas con estas variantes, una representación de las cuales, deberá ser posteriormente confirmada por secuenciación. Esta estrategia debe ser flexible y rápidamente adaptable a cambios dependiendo de la epidemiología local (147) y debe permitir sospechar, al menos, la presencia de las denominadas VOC (148). Es importante resaltar que ambas aproximaciones son complementarias y cada una de ellas responde a diferentes objetivos. Es deseable que, la mayoría, sino todos, los laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular puedan implementar su propio algoritmo basado en PCR en tiempo real y en aquellos laboratorios con capacidad de secuenciación genómica, una estrategia en dos etapas (149) que incluya el cribado de variantes y la confirmación posterior por secuenciación parcial o completa.

7.1. APROXIMACIÓN GENÉTICA BASADA EN CRIBADO DE VARIANTES

Aunque algunas empresas de diagnóstico informan que su estrategia consiste en asignar linajes en base a la detección de una única mutación, resulta una aproximación algo arriesgada y probablemente cuestionable. Es más razonable en las estrategias de cribado, asumir que ninguna mutación está asociada exclusivamente a un determinado linaje o VOC. Por ejemplo, la mutación N501Y se describe en las 3 principales VOC (B.1.1.7, B.1.351 y P1), o la delección 69-70 en la espícula, asociada fuertemente al linaje B.1.1.7 (variante británica), pero también presente en B.1.525 (variante Nigeria) clasificada como VOI. Por ello, se debe establecer el número mínimo de mutaciones o rasgos genéticos a analizar, para asignar con un grado de confianza moderado, que pudiéramos estar ante una determinada VOC. Aun así, la adscripción a un determinado linaje será siempre presuntiva y debemos aceptar que esta estrategia, muy útil por su rapidez (<24 h) y viabilidad para aplicar en todas las muestras positivas, debe estar sometida continuamente a revisión y adaptación en función de la aparición de nuevas variantes o nuevas mutaciones en variantes descritas.

Diferentes estrategias técnicas para inferir la presencia de variantes de preocupación

Existen varias aproximaciones técnicas desarrolladas por diferentes plataformas comerciales, tales como cribados basados en discriminación alélica de mutaciones puntuales por PCR alelo-específico o por Tm (*temperature of melting*), o bien por detección de deleciones específicas y análisis de fragmentos por electroforesis capilar. La estrategia más altamente implementada en los laboratorios clínicos es la discriminación alélica. Si esta es la primera opción, al ser una técnica que se basa en la alta especificidad del diseño de cebadores y sondas, es recomendable usar técnicas comerciales ampliamente ensayadas. A la hora de decidir una plataforma comercial u otra se debe analizar cuál es la oferta de SNPs (acrónimo de *single nucleotide polymorphisms*) que pueden ser analizados y cual se adapta mejor a cada escenario epidemiológico en particular. Las técnicas basadas en discriminación alélica requieren en el diseño la posibilidad de detectar en el mismo ensayo tanto la población salvaje como la población que porta la mutación objeto de estudio (población mutada), de manera que se puedan discriminar una u otra. Esta diferenciación se hace por el uso de fluoróforos diferentes para cada subpoblación en la estrategia de PCR alelo específica o por el análisis de Tm, donde cada ADN amplificado (mutado y salvaje), de cadena doble, se disociará a una temperatura diferente.

Se ha descrito otra aproximación basada en las deleciones que se identifican en SARS-CoV-2, de las que algunas son comunes a varios linajes VOC y otras específicas de ellos. Consisten en amplificar fragmentos genómicos que incluyan estas deleciones y separarlos luego por electroforesis. Por ejemplo, la delección en ORF1A (SDF3675_3677del) está presente en las 3 principales VOC que ya se han comentado previamente, mientras que la delección en la posición 69-70 de S está presente en B.1.1.7. Con esta estrategia se pueden identificar con cierta rapidez más muestras en un mismo ensayo a menor coste y analizando más diferencias por ensayo que en la estrategia de discriminación alélica (150).

Propuesta de algoritmo para la sospecha de variantes de preocupación

Atendiendo al número de VOC descritas a nivel mundial y a la presencia de éstas en nuestro entorno, nos atrevemos a proponer un algoritmo, más como ejercicio estratégico que como recomendación, pues siendo hoy una estrategia válida, podría no serlo cuando este documento sea público, especialmente en el contexto actual de gran dinamismo de las variantes de SARS-CoV-2. Las principales VOC según el ECDC son Alpha o B.1.1.7 (incluyendo la variante B.1.1.7+E484K), Gamma o B.1.1.28 (o P1), Beta o B1.351 y Delta o B.1.617.2 (146), mientras que el CDC incluye también Epsilon o B.1.427 y B.1.429 (151). En nuestro entorno, hasta finales del mes de junio de 2021, B.1.1.7 ha representado la VOC mayoritaria, alcanzando >80% de los casos diagnosticados, seguidos por B.1.1.28 y en menor medida B.1.351. Estos linajes tienen en común la presencia de la mutación N501Y, lo que sugiere que este cambio es un evento inicial clave y su aparición debe monitorearse en todo el mundo con atención. Si bien en muchos sitios, especialmente de Europa, está implementada la estrategia SGTF (del acrónimo inglés *S gene target failure*) para detectar la delección 69-70 de la proteína S para sospechar B.1.1.7, por estar asociada a una plataforma de diagnóstico ampliamente distribuida. Se conozca o no la presencia de la delección 69-70, la mutación N501Y debe estar en las primeras etapas de nuestro algoritmo. En una segunda etapa o simultáneamente según el flujo de trabajo más adecuado a cada laboratorio, las mutaciones E484K y K417T/N. Con este sencillo esquema, podremos hacer una asignación presuntiva de las principales VOC de España a fecha junio de 2021 (B.1.1.7, B.1.1.7+E484K, B.1.1.28, B1.351) basado en >2 mutaciones (148). Como ya se ha comentado, nos hallamos en un contexto absolutamente dinámico y habrá que actualizar constantemente estos algoritmos. Por ejemplo, en el momento de realizar la última corrección a este documento, la variante delta (B.1.617.2) ya está considerada como VOC y es la predominante en gran parte de España.

Si bien la mayoría de las propuestas de cribado se han basado en detectar unos determinados SNPs para asociar presuntivamente a un linaje o VOC, esta aproximación es muy dependiente de la acumulación de nuevas mutaciones en esos linajes. Otra aproximación más duradera en el tiempo puede ser realizar un seguimiento de mutaciones asociadas a mayor transmisibilidad o escape vacunal (152), en lugar de un seguimiento de variantes. El incremento poblacional de esas mutaciones bien conocidas sería un marcador de cambio epidemiológico relevante.

7.2. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 BASADA EN SECUENCIACIÓN GENÓMICA PARCIAL O COMPLETA

Los estudios genómicos nos darán una información útil de la pandemia de SARS-CoV-2, ya que permiten conocer la dinámica de introducción de nuevos virus en la región de vigilancia, identificar cadenas de transmisión en la población o inferir si existe relación entre determinadas variantes y una peor progresión de la enfermedad.

En enero de 2021, siguiendo las recomendaciones de la OMS (153) y ECDC (154), la Ponencia de Alertas y la Comisión de Salud Pública aprobaron el documento de "*Estrategia de integración de la secuenciación en la vigilancia de SARS CoV-2*", que plantea la necesidad de incluir como parte de la vigilancia de la COVID-19, los datos generados mediante secuenciación genómica de SARS-CoV-2 para la detección e identificación de variantes virales en España (145). Los objetivos, contemplados en ese primer documento se centran en la identificación de variantes que impliquen un aumento de la transmisibilidad, virulencia o sospechas de reinfecciones y fallos de la respuesta inmune. La vigilancia genómica combinada con la información epidemiológica muestra grandes beneficios para la investigación de la COVID-19 asociado a la atención médica (155) y la salud pública.

Selección de muestreo. Tipos de muestras

Como no es viable desde el punto de vista económico y temporal la secuenciación genómica de todas las muestras en las que se demuestra la presencia de SARS-CoV-2, es necesario secuenciar un número representativo que debe ser al menos el 5%, y preferiblemente el 10%, de los resultados positivos de las pruebas de COVID-19. El ECDC ha establecido los criterios precisos para definir ese número representativo

por unidad de tiempo y unidad geográfica, asumiendo un muestreo aleatorio mediante el método binomial (156). Una vez definido el tamaño muestral, se debe establecer un criterio de selección: aleatorio, dirigido o mixto. Las estrategias dirigidas deben incluir la selección de variantes de escape de la vacuna del SARS-CoV-2, virus que causan reinfecciones, variantes que surgen en poblaciones animales, variantes con transmisión aumentada (especialmente si no se explican por otros factores epidemiológicos) o aisladas de pacientes con mala evolución. La estrategia mixta sugiere incluir todos los escenarios anteriormente descritos y completar con una selección aleatoria de muestras procedentes de atención primaria y hospitalización en una proporción 4:1 (157). Esta opción se está implementando poco a poco para poder alcanzar los objetivos propuestos, a costa de perder mayor precisión en la distribución poblacional de variantes. Es conveniente recordar dos observaciones bien conocidas por los usuarios de esta técnica, tanto la necesidad de incluir un control negativo desde las primeras etapas para excluir la contaminación, como la necesidad de completar los ensayos con el máximo de muestras que permita nuestro ensayo, para optimizar costes.

Las muestras seleccionadas asumimos que serán muestras respiratorias, casi siempre los remanentes de las *muestras nasofaríngeas* usadas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. Las muestras de origen respiratorio además de ser las más abundantes, generalmente ofrecen mayores cargas virales y por tanto mayor garantía de éxito en la secuenciación, por lo que elegiremos siempre este tipo de muestra.

Sin embargo, el virus se puede detectar en otros tipos de muestras, que pueden ser ocasionalmente elegidas. Por ejemplo, muestras del tracto gastrointestinal, o muestras de autopsia ofrecen un valor clínico y epidemiológico muy valioso, especialmente cuando el resultado en las muestras respiratorias es negativo, pero tienen limitaciones. Las muestras gastrointestinales deben ser centrifugadas y filtradas para eliminar bacterias o células humanas que puedan reducir la sensibilidad de las diferentes estrategias de secuenciación, mientras que las muestras de autopsia, difíciles de obtener, generalmente estarán parafinadas y el tratamiento posterior rinde un ARN muy fragmentado, en cuyo caso nuestra estrategia de secuenciación podría variar respecto a la de la muestra respiratoria. Hay otros 2 tipos de muestra que requieren también una mención. Las muestras de saliva, que en algunas áreas o situaciones se han generalizado, tienen la limitación de una alta variabilidad en la CV dependiente del proceso de recolección, que puede ofrecer un menor número de muestras con Ct adecuados para emprender la secuenciación. Por otra parte, también pueden utilizarse los aislados procedentes de cultivos virales. Aunque no son muchos los laboratorios que, por requerimientos de bioseguridad, tienen implementada esta técnica es importante recordar que, si bien el éxito de la secuenciación está más garantizado, el resultado podría no representar la población viral real en el paciente, tanto por generación de variantes artificiales como por reducción de la diversidad viral. Por tanto, en esta fase de la vigilancia epidemiológica de SARS-CoV-2, la secuenciación del virus procedente de cultivo no es una buena alternativa.

Estrategias de secuenciación: secuenciación genómica parcial o completa

Se aceptan dos estrategias de secuenciación; por un lado, la secuenciación parcial y por otro la de genoma completo. La secuenciación parcial hace referencia a la secuenciación parcial o completa del gen S, al codificar este gen la proteína de la espícula implicada en el reconocimiento del receptor ACE2 y por tanto sometido a presión selectiva, en el que se han descrito las principales mutaciones implicadas en transmisibilidad (como D614G o N501Y), virulencia (V1176F) o resistencia a los anticuerpos (E484K); si bien otras mutaciones en otras regiones también estarían relacionadas con virulencia (L3930F en ORF1A). Aquellos laboratorios que se han decantado por esta estrategia generalmente usan la tecnología Sanger, por su facilidad de uso y ser ampliamente accesible en muchos laboratorios de Microbiología.

Por otro lado, muchos laboratorios han decidido dar un salto hacia la implementación de la secuenciación completa. Se trata de una estrategia que ofrece más información, pero que requiere personal más entrenado y espacios dedicados a esta tecnología robusta pero sensible. Si este proceso se realiza en el propio laboratorio que hace el diagnóstico, se podrá utilizar el ARN restante usado para el diagnóstico molecular (conservado entre -20°C a -80°C dependiendo del tiempo estimado entre ambas técnicas). Si por el contrario el ensayo de secuenciación está externalizado, es aconsejable enviar la muestra original inactivada y realizar

la extracción en el centro que realice la secuenciación.

Hay varios métodos disponibles para la secuenciación de genomas completos de SARS-CoV-2 a partir de muestras clínicas basados en el concepto general de NGS (acrónimo de *Next Generation Sequencing*). Para una descripción detallada de las plataformas de secuenciación completa, recomendamos la lectura del Procedimiento n° 71 de la SEIMC recientemente publicado (158). Básicamente podemos definir 2 estrategias, los protocolos metagenómicos (mNGS) y los protocolos de enriquecimiento. Los mNGS no requieren conocimiento previo del patógeno, lo que resulta muy útil en las fases iniciales de la pandemia, pero son poco utilizados en el momento actual debido a que estas estrategias, en comparación con otras, requieren más CV ($Ct < 25$) para alcanzar el éxito de secuenciación con buena cobertura. Los protocolos de enriquecimiento se pueden diferenciar en protocolos por captura de una secuencia determinada (*targeted capture-based approaches*) y protocolos por amplicones de PCR (*targeted amplicon-based approaches*). Los protocolos de enriquecimiento permiten trabajar muestras clínicas con $Ct \leq 30-35$, incrementando entre 100-10.000 veces la sensibilidad (159). Los métodos de captura toleran una diferencia de 10-20% en las sondas de captura que no se permite en la estrategia basada en amplicones por PCR. Si bien esa característica técnica ofrece una ventaja a las aproximaciones por captura, resulta una técnica más compleja y más cara (153), y teniendo en cuenta que el virus tiene actualmente poca variabilidad genética, la aproximación por amplicones es la preferida por los usuarios. Sin embargo, es un protocolo que requiere continua revisión a medida que se observen fallos de amplificación independientemente de la CV, debido a la posible emergencia de nuevas mutaciones y deleciones.

Para la mayoría de los objetivos de vigilancia genómica, es suficiente una secuencia de consenso del genoma completo o casi completo. Esto se puede lograr de manera rentable mediante múltiples amplicones, como propone el protocolo ARTIC v4 (<https://artic.network/ncov-2019>), disponibles para las plataformas Illumina y Ion Torrent con excelentes coberturas del genoma viral (>99%) usando 98 o 237 amplicones (Illumina COVIDSeq y Ion AmpliSeq panel de Ion Torrent), respectivamente.

Análisis de datos: protocolos de bioinformática

El protocolo ARTIC y los *kits* comerciales para las plataformas más comúnmente usadas incluyen *pipelines* de análisis bioinformático sencillo y casi automáticos (Dragen y Genexus, para Illumina y Ion Torrent, respectivamente) y son adecuados para la detección de las variantes mayoritarias, así como pequeñas inserciones/deleciones nucleotídicas, y para la generación de secuencias de consenso para depositar en bases públicas de datos de secuencias. Para otros tipos de análisis, como la determinación de variantes minoritarias se recomienda la competencia específica ya que estos análisis son técnicamente desafiantes y, a menudo, no pueden automatizarse por completo. En general debemos asumir que no se puede identificar una variante con precisión con menos de 20 lecturas. Las posiciones polimórficas deben denominarse bases ambiguas (X) en el genoma de consenso final. Cuando las secuencias tengan >10% de posiciones ambiguas deberían ser eliminadas, ya que son sospechosas de poblaciones virales mixtas y de contaminación cruzada, por lo que deberían ser revisadas con detalle. Por otra parte, es importante recordar que a partir de muestras con valores de Ct altos, por distribución estocástica, aumenta mucho la probabilidad de detectar tanto variantes minoritarias como variantes mayoritarias, generando errores de interpretación.

La asignación de linaje por *Pango lineage* (<https://cov-lineages.org/>) es el método preferido para la asignación de linajes y la confirmación de variantes, pero hay que recordar que Pango identifica un número mínimo de mutaciones para asignar a un linaje. Por ejemplo, de las 17 mutaciones del linaje B.1.1.7, con tan solo 5 mutaciones *Pango* asigna ese linaje (10/17 para P1 o 5/9 para B.1.351), por lo que es importante conocer en nuestro entorno qué combinaciones de mutaciones son más frecuentemente asociadas a los linajes conocidos y asegurar que cada mutación no común o nueva es identificada para vigilarla y comunicarla.

Otra consideración que debemos recordar en el proceso de asignación de linaje y representación gráfica, cuando la rama de nuestra secuencia es muy larga probablemente nos esté indicando algún error en el ensamblaje o sospecha de recombinación (aún no descrito en SARS-CoV-2 al ser un virus emergente y con

poco tiempo de evolución para que podamos detectarlo). En cualquiera de los dos escenarios, es absolutamente necesario revisar nuestra secuencia.

Compartir y reportar datos

Los resultados de las secuencias consenso del SARS-CoV-2 obtenidas en los laboratorios deben compartirse a través de plataformas de acceso público como GISAID EpiCov (www.gisaid.org), para permitir el análisis filogenético global. Para depositar las secuencias en esta base de datos debe estar registrado al menos un representante del laboratorio. Por cada secuencia depositada se exige una información mínima como edad y sexo del paciente, país de origen o fecha de la muestra. Una vez subidos los archivos, antes de asignar un número definitivo, esta información se revisa por la plataforma. Si existe algún error, los administradores se ponen en contacto con la persona registrada para que revise una determinada secuencia. Una vez subsanado el error, se adjudica un número en GISAID que corresponderá específicamente a una secuencia.

Además, deberán informarse a los departamentos de Salud Pública, así como al Centro Nacional de Micro-biología como seguimiento de un resultado positivo e identificando los motivos que llevaron a esa secuenciación (aleatorio, reinfección, mala evolución, fallo vacunal, patrón atípico de mutaciones en cribado, o simplemente vigilancia...). Cada laboratorio deberá establecer con sus representantes de Salud Pública el sistema de transmisión de la información que incluya datos demográficos del paciente, tipo de análisis, tipo y fecha de muestra, información del centro responsable de la secuenciación, así como información relevante sobre el resultado de secuenciación, linaje identificado, detección de mutaciones no esperadas y número de acceso a GISAID.

7.3. DIAGNÓSTICO DE LA REINFECCIÓN

Las reinfecciones por coronavirus estacionales eran fenómenos conocidos antes de la aparición de la CO-VID-19. Se aceptaba en esos modelos que la reinfección podía ocurrir de media después de 90 días del primer episodio. Este valor temporal se ha usado de referencia para sospechar una posible reinfección en el caso de SARS-CoV-2 en nuestro país (aunque muchos países europeos consideran solo 2 meses, siempre y cuando exista un periodo asintomático entre los 2 episodios) (160). Por otra parte, el riesgo de reinfección puede ocurrir aun con niveles de anticuerpos relativamente altos y estables, por lo que el valor de la serología puede ser muy limitado en este punto. Una cuestión importante es con qué frecuencia se detectan reinfecciones. Varias publicaciones notifican un 0,3- 0,7% (161), por lo que la probabilidad de reinfecciones por SARS-CoV-2 es *a priori* un evento raro y por tanto debemos definir bien los criterios de selección de casos.

Desde el punto de vista óptimo se considera* (162):

- a) *reinfeción confirmada*, cuando se obtiene una secuencia genética viral diferente en el primer y en el segundo episodio. También se considerará reinfección confirmada cuando habiendo detectado el mismo linaje viral, la diferencia genética entre las secuencias de un episodio y otro es >2 mutaciones/mes, entre episodios.
- b) *reinfeción probable*, se entenderá cuando se confirmen en 2 estudios moleculares diferentes correspondientes a los 2 episodios de infección, valores de Ct bajos sugerentes de infección activa y exista al menos un test negativo entre ambos episodios.
- c) *reinfeción posible*, cuando se obtengan resultados positivos (por ensayos moleculares o pruebas rápidas de antígeno) en los 2 episodios de infección, sin información de Ct o sin posibilidad de disponer de alguna de las muestras para confirmación, pero existan criterios clínicos y/o epidemiológicos que lo avalen.

* Se adapta la nomenclatura del documento del Ministerio de Sanidad (55), pero modificando los criterios de inclusión en cada apartado.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5:536-544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579:265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
3. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2020 27 July 2020]; Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/>.
4. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020; 181(2):281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
5. Poh CM, Carissimo G, Wang B, Amrun SN, Lee CY, Chee RS, et al. Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. *Nat Commun.* 2020; 11(1):2806. doi: 10.1038/s41467-020-16638-2.
6. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol.* 2020; 41:355-359. doi: 10.1016/j.it.2020.03.007.
7. Dutta NK, Mazumdar K, Gordy JT. The nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: a target for vaccine development. *J Virol.* 2020; 94(13):e00647-20. doi: 10.1128/JVI.00647-20.
8. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Información clínica COVID-19 Actualización, 25 de marzo 2021. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Documento_CLINICA.pdf
9. McAloon C, Collins Á, Hunt K, Barber A, Byrne AW, Butler F, et al. Incubation period of COVID-19: a rapid systematic review and meta-analysis of observational research. *BMJ Open.* 2020; 10(8):e039652. doi: 10.1136/bmjopen-2020-039652.
10. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20:565-574. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
11. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26:672-675. doi: 10.1038/s41591-020-0869-5.
12. Mancuso P, Venturelli F, Vicentini M, Perilli C, Larosa E, Bisaccia E, et al. Temporal profile and determinants of viral shedding and of viral clearance confirmation on nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2-positive subjects: a population-based prospective cohort study in Reggio Emilia, Italy. *BMJ Open.* 2020; 10(8):e040380. doi: 10.1136/bmjopen-2020-040380.
13. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26:845-848. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
14. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol.* 2020; 5(52):eabe0367. doi: 10.1126/sciimmunol.abe0367.
15. Qu J, Wu C, Li X, Zhang G, Jiang Z, Li X, et al. Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis.* 2020; 71:2255-2258. doi: 10.1093/cid/ciaa489.
16. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020; 581:465-469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
17. Ibarrondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARSCoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 383:1085-1087. doi: 10.1056/NEJMc2025179.
18. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. 2017. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
19. Tsang NNY, So HC, Ng KY, Cowling BJ, Leung GM, Ip DKM. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2021 Apr 12;S1473-3099(21)00146-8. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00146-8.
20. Morell-García D, Ramos-Chavarino D, Bauça JM, Argente Del Castillo P, Ballesteros-Vizoso MA, et al. Urine biomarkers for the prediction of mortality in COVID-19 hospitalized patients. *Sci Rep.* 2021; 11(1):11134. doi: 10.1038/s41598-021-90610-y.
21. Rodríguez-Serrano DA, Roy-Vallejo E, Zurita Cruz ND, Martín Ramírez A, Rodríguez-García SC, Arevalillo-Fernández N, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in serum is associated with increased mortality risk in hospitalized COVID-19 pa-

- tients. *Sci Rep.* 2021; 11(1):13134. doi: 10.1038/s41598-021-92497-1.
22. Xu CLH, Raval M, Schnall JA, Kwong JC, Holmes NE. Duration of respiratory and gastrointestinal viral shedding in children with SARS-CoV-2: a systematic review and synthesis of data. *Pediatr Infect Dis J.* 2020; 38(9):e249-e256. doi: 10.1097/INF.0000000000002814.
23. Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Interim guidelines for collecting and handling of clinical specimens for COVID-19 testing. Interim guidelines for clinical specimens for COVID-19 | CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Considerations for the use of saliva as sample material for COVID-19 testing. 3 May 2021. Stockholm: ECDC; 2021. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/considerations-use-saliva-sample-material-covid-19-testing>
25. National Health System (UK). Regular rapid lateral flow coronavirus (COVID-19) tests. Disponible en: <https://www.nhs.uk/conditions/coronavirus-covid-19/testing/regular-rapid-coronavirus-tests-if-you-do-not-have-symptoms/>
26. Stohr JJJ, Zwart VZ, Goderski G, Meijer A, Nagel-Imming CRS, Kluytmans-van den Bergh MFQ, et al. Self-testing for the detection of SARS-CoV-2 infection with rapid antigen tests. *medRxiv* 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.21.21252153>, February 23.
27. Mina MJ, Andersen KG. COVID-19 testing: one size does not fit all. *Science.* 2021; 371(6525):126-127. doi: 10.1126/science.abe9187.
28. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 19 March 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Interim Guidance 11 September 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
30. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19. Interim guidance for antigen testing for SARS-CoV-2. Updated May 13, 2021. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#>
31. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19). Interim guidance, 28 January 2021. Disponible en: <file:///D:/Users/46217053w/Downloads/WHO-WPE-GIH-2021.1-eng.pdf>
32. Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. 2014. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.
33. European Centre for Disease Prevention and Control. Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. 19 November 2020. ECDC: Stockholm; 2020. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-use-rapid-antigen-tests-covid-19-eueea-and-uk>
34. Food and Drug Administration (FDA) 2021. In vitro diagnostics EUAs - Molecular diagnostic tests for SARS-CoV-2. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-molecular-diagnostic-tests-sars-cov-2>
35. Alekseenko A, Barrett D, Pareja-Sanchez Y, Howard RJ, Strandback E, Ampah-Korsah H, et al. Direct detection of SARS-CoV-2 using non-commercial RT-LAMP reagents on heat-inactivated samples. *Sci Rep.* 2021; 11(1):1820. doi: 10.1038/s41598-020-80352-8.
36. Anastasiou OE, Holtkamp C, Schäfer M, Schön F, Eis-Hübinger AM, Krumbholz A. Fast detection of SARS-CoV-2 RNA directly from respiratory samples using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test. *Viruses.* 2021; 13(5):801. doi: 10.3390/v13050801..
37. conPrueba. La tecnología CRISPR en SARS-CoV-2. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Sanidad 2020. Disponible en: <https://www.conprueba.es/la-tecnologia-crispr-en-la-infeccion-por-sars-cov-2>
38. Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature.* 2020; 582:277-282. doi:10.1038/s41586-020-2279-8.
39. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* 2018; 360:436-439. doi: 10.1126/science.aar6245.
40. Dara M, Talebzadeh M. CRISPR/Cas as a potential diagnosis technique for COVID-19. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2020; 12:201-202. PMID: 32695284; PMCID: PMC7368118.
41. Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng.* 2020; 4:1140-1149. doi: 10.1038/s41551-020-00603-x.
42. Paul B, Montoya G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed J.* 2020;43:8-17. doi: 10.1016/j.

bj.2019.10.005.

43. Storch GA. CRISPR tool scales up to interrogate a huge line-up of viral suspects. *Nature*. 2020; 582:188-189. doi: 10.1038/d41586-020-01447-w.
44. Zhu X, Wang X, Li S, Luo W, Zhang X, Wang C, et al. Rapid, ultrasensitive, and highly specific diagnosis of COVID-19 by CRISPR-based detection. *ACS Sens*. 2021; 6:881-888. doi: 10.1021/acssensors.0c01984.
45. Joung J, Ladha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot testing. *N Engl J Med*. 2020; 383:1492-1494. doi: 10.1056/NEJMc2026172.
46. Seo G, Lee G, Kim MJ, Baek SH, Choi M, Ku KB, et al. Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*. 2020; 14:5135-5142. doi:10.1021/acsnano.0c02823. Erratum in: *ACS Nano*. 2020 Sep 22;14(9):12257-12258.
47. Qian C, Wang R, Wu H, Ji F, Wu J. Nicking enzyme-assisted amplification (NEAA) technology and its applications: A review. *Anal Chim Acta*. 2019; 1050:1-15. doi: 10.1016/j.aca.2018.10.054.
48. Singh S, Kumar V, Kapoor D, Dhanjal DS, Bhatia D, Jan S, et al. Detection and disinfection of COVID-19 virus in wastewater. *Environ Chem Lett*. 2021 Feb 22;1-17. doi: 10.1007/s10311-021-01202-1. Epub ahead of print.
49. Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, Zambrano-Achig P, Del Campo R, Ciapponi A, et al. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One*. 2020; 15(12):e0242958. doi: 10.1371/journal.pone.0242958.
50. Bohn MK, Mancini N, Loh TP, Wang CB, Grimmmer M, Gramegna M, et al. IFCC Interim guidelines on molecular testing of SARS-CoV-2 Infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58:1993-2000. doi:10.1515/cclm-2020-1412.
51. Bohn MK, Lippi G, Horvath A, Sethi S, Koch D, Ferrari M, et al. Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58:1037-1052. doi: 10.1515/cclm-2020-0722.
52. Marks M, Millat-Martinez P, Ouchi D, Roberts CH, Alemany A, Corbacho-Monné M, et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2021; 21:629-636. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30985-3.
53. Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, Pryce R, Williamson BN, Anzick SL, et al. Case Study: Prolonged infectious SARS-CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer. *Cell*. 2020; 183:1901-1912.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.049.
54. García F, Melón S, Navarro D, Paño JR, Galán JC. Editores: Galán JC y Paño JR. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2020. Organización del diagnóstico de SARS-CoV-2 y estrategias de optimización. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2020-COVID19-OrganizacionDiagnostico.pdf>
55. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19, 5 de julio de 2021. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/COVID19_Estrategia_vigilancia_y_control_e_indicadores.pdf
56. Bermejo-Martin JF, González-Rivera M, Almansa R, Micheloud D, Tedim AP, Domínguez-Gil M, et al. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit Care*. 2020; 24(1):691. doi:10.1186/s13054-020-03398-0.
57. Folgueira MD, Luczkowiak J, Lasala F, Pérez-Rivilla A, Delgado R. Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19. *Clin Microbiol Infect*. 2021; 27:886-891. doi: 10.1016/j.cmi.2021.02.014.
58. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, Richter F, Zhao S, Wajnberg A, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(9):e70. doi:10.1016/S2213-2600(20)30354-4.
59. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(32):2001483. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483
60. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking Covid-19 test sensitivity - A strategy for containment. *N Engl J Med*. 2020; 383(22):e120. doi: 10.1056/NEJMp2025631.
61. Dahdouh E, Lázaro-Perona F, Romero-Gómez MP, Mingorance J, García-Rodríguez J. Ct values from SARS-CoV-2 diagnostic PCR assays should not be used as direct estimates of viral load. *J Infect*. 2021; 82:414-451. doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.017.
62. Bellon M, Baggio S, Bausch FJ, Spechbach H, Salamun J, Genecand C, et al.. SARS-CoV-2 viral load kinetics in symptomatic children, adolescents and adults. *Clin Infect Dis*. 2021 May 5:ciab396. doi: 10.1093/cid/ciab396. Online ahead of

print.PMID: 3394965

63. Procop GW, Brock JE, Reineks EZ, Shrestha NK, Demkowicz R, Cook E, et al. A Comparison of five SARS-CoV-2 molecular assays with clinical correlations. *Am J Clin Pathol*. 2021; 155:69-78. doi: 10.1093/ajcp/aqaa181.
64. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidance for use of pooling procedures in SARS-CoV-2 diagnostic and screening testing. Updated June 30, 2021. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html>
65. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu L, Gligor-Popa S, Flonta M, Man MA, et al. Critical aspects concerning the development of a pooling approach for SARS-CoV-2 diagnosis using large-scale PCR testing. *Viruses*. 2021; 13(5):902. doi: 10.3390/v13050902.
66. Rhoads D, Peaper DR, She RC, Nolte FS, Wojewoda CM, Anderson NW, et al. College of American Pathologists (CAP) Microbiology Committee Perspective: caution must be used in interpreting the cycle threshold (Ct) value. *Clin Infect Dis*. 2021; 72(10):e685-e686. doi: 10.1093/cid/ciaa1199.
67. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19. *Infect Dis Ther*. 2020; 9:573-586. doi: 10.1007/s40121-020-00324-3. Erratum in: *Infect Dis Ther*. 2020 Aug 18.
68. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu Rev Virol*. 2015; 2:265-288. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055218
69. Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun*. 2020; 11(1):6059. doi: 10.1038/s41467-020-19883-7.
70. Dagotto G, Mercado NB, Martinez DR, Hou YJ, Nkolola JP, Carnahan RH, et al. Comparison of subgenomic and total RNA in SARS-CoV-2 challenged rhesus macaques. *J Virol*. 2021; 95(8):e02370-20. doi:10.1128/JVI.02370-20.
71. Nomburg J, Meyerson M, DeCaprio JA. Pervasive generation of non-canonical subgenomic RNAs by SARS-CoV-2. *Genome Med*. 2020; 12(1):108. doi:10.1186/s13073-020-00802-w.
72. Perera RAPM, Tso E, Tsang OTY, Tsang DNC, Fung K, Leung YWY, et al. SARS-CoV-2 virus culture and subgenomic RNA for respiratory specimens from patients with mild coronavirus disease. *Emerg Infect Dis*. 2020; 26:2701-2704. doi:10.3201/eid2611.203219.
73. World Health Organization. COVID-19 target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0. 28 September 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1>
74. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlemann B, Zuchowski M, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe*. 2021; 2(7):e311-e319. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00056-2.
75. Haage V, Ferreira de Oliveira-Filho E, Moreira-Soto A, Kühne A, Fischer C, Sacks JA, et al. Impaired performance of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests at elevated and low temperatures. *J Clin Virol*. 2021; 138:104796. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104796.
76. Menchinelli G, Bordi L, Liotti FM, Palucci I, Capobianchi MR, Sberna G, et al. SARS-CoV-2 Ag assay evaluation using clinical samples from different testing groups. *Clin Chem Lab Med*. 2021 Apr 7. doi: 10.1515/ccim-2021-0182
77. Favresse J, Gillot C, Oliveira M, Cadrobbi J, Elsen M, Eucher C, et al. Head-to-head comparison of rapid and automated antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *J Clin Med*. 2021; 10(2):265. doi: 10.3390/jcm10020265.
78. Food and Drug Administration. SARS-CoV-2 Reference Panel Comparative Data. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-reference-panel-comparative-data>
79. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database of Syst Rev*. 2021; 3(3):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.pub2.
80. Bulilete O, Lorente P, Leiva A, Carandell E, Oliver A, Rojo E, et al. Panbio™ rapid antigen test for SARS-CoV-2 has acceptable accuracy in symptomatic patients in primary health care. *J Infect*. 2021; 82:391-398. doi: 10.1016/j.jinf.2021.02.014.
81. Landaas ET, Storm ML, Tollånes MC, Barlinn R, Kran AB, Bragstad K, et al. Diagnostic performance of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in a large, Norwegian cohort. *J Clin Virol*. 2021; 137:104789. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104789
82. Berger A, Nsoga MTN, Perez-Rodriguez FJ, Aad YA, Sattonnet-Roche P, Gayet-Ageron A, et al. Diagnostic accuracy of two commercial SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid tests at the point of care in community-based testing centers. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248921. doi: 10.1371/journal.pone.0248921.
83. Pekosz A, Parvu V, Li M, Andrews JC, Manabe YC, Kodsí S, et al. Antigen-based testing but not real-time polymerase chain reaction correlates with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral culture. *Clin Infect Dis*. 2021 Jan

20:ciaa1706. doi: 10.1093/cid/ciaa1706.

84. Gili A, Paggi R, Russo C, Cenci E, Pietrella D, Graziani A, et al. Evaluation of Lumipulse® G SARS-CoV-2 antigen assay automated test for detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) in nasopharyngeal swabs for community and population screening. *Int J Infect Dis.* 2021; 105:391-396. doi: 10.1016/j.ijid.2021.02.098.
85. Find. SARS-COV-2 diagnostic pipeline. 2020. Disponible en: <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline>
86. European Centre for Disease Prevention and Control. Case definition for coronavirus disease 2019 (COVID-19), as of 3 December 2020. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/case-definition>
87. World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Interim guidance. 11 September 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>
88. Torres I, Poujois S, Albert E, Colomina J, Navarro D. Evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic close contacts of COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect.* 2021; 27(4):636.e1-636.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2020.12.022.
89. Pavelka M, Van-Zandvoort K, Abbott S, Sherratt K, Majdan M; CMMID COVID-19 working group; Inštitút Zdravotných Analýz, Jarčuška P, et al. The impact of population-wide rapid antigen testing on SARS-CoV-2 prevalence in Slovakia. *Science.* 2021; 372:635-641. doi: 10.1126/science.abf9648
90. Mina MJ, Peto TE, García-Fiñana M, Semple MG, Buchan IE. Clarifying the evidence on SARS-CoV-2 antigen rapid tests in public health responses to COVID-19. *Lancet.* 2021; 397:1425-1427. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00425-6.
91. Larremore DB, Wilder B, Lester E, Shehata S, Burke JM, Hay JA, et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. *Sci Adv.* 2021; 7(1):eabd5393. doi: 10.1126/sciadv.abd5393.
92. Revollo B, Blanco I, Soler P, Toro J, Izquierdo-Useros N, Puig J, et al. Same-day SARS-CoV-2 antigen test screening in an indoor mass-gathering live music event: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2021; S1473-3099(21)00268-1. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00268-1.
93. Government of the Netherlands. Coronavirus self-test. Coronavirus self-tests | Coronavirus COVID-19 | Government.nl
94. Pray IW, Ford L, Cole D, Lee C, Bigouette JP, Abedi GR, et al. Performance of an antigen-based test for asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 testing at two university campuses - Wisconsin, September-October 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021; 69:1642-1647. doi: 10.15585/mmwr.mm695152a3
95. SEIMC. Consideraciones SEIMC sobre la detección de antígenos frente a SARS-CoV-2: ¿Cuáles? ¿Cómo? ¿A quién? ¿Dónde? ¿Quién? ¿Cuándo? 27 de septiembre 2020. Disponible en: https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2020-SARS-CoV-2_deteccion_antigenos.pdf
96. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, Lorenzi JCC, Wang Z, Cho A, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature.* 2020; 584:437-442. doi: 10.1038/s41586-020-2456-9.
97. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann A, et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol.* 2020; 5(48):eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
98. Lee CY, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological approaches for COVID-19: epidemiological perspective on surveillance and control. *Front Immunol.* 2020;11:879. doi: 10.3389/fimmu.2020.00879. eCollection 2020.
99. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, Englund JA, Hayden MK, Lee MJ, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the diagnosis of COVID-19: serologic testing. *Clin Infect Dis.* 2020 Sep 12:ciaa1343. doi: 10.1093/cid/ciaa1343
100. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to eight months after infection. *Science.* 2021; 371(6529):eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063.
101. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020; 26:1200-1204. doi: 10.1038/s41591-020-0965-6.
102. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun.* 2020; 11(1):4704. doi: 10.1038/s41467-020-18450-4.
103. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020; 6(6):CD013652. doi: 10.1002/14651858.CD013652.
104. Cheng MP, Yansouni CP, Basta NE, Desjardins M, Kanjilal S, Paquette K, et al. Serodiagnostics for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 : a narrative review. *Ann Intern Med.* 2020; 173:450-460. doi: 10.7326/M20-2854.
105. Milani GP, Dioni L, Favero C, Cantone L, Macchi C, Delbue S, et al. Serological follow-up of SARS-CoV-2 asymptomatic

matic subjects. *Sci Rep.* 2020; 10(1):20048. doi: 10.1038/s41598-020-77125-8.

106. Kaufman HW, Chen Z, Meyer WA 3rd, Wohlgemuth JG. Insights from patterns of SARS-CoV-2 immunoglobulin G serology test results from a national clinical laboratory, United States, March-July 2020. *Popul Health Manag.* 2021; 24(S1):S35-S42. doi: 10.1089/pop.2020.0256.

107. Petersen LR, Sami S, Vuong N, Pathela P, Weiss D, Morgenthau BM, et al. Lack of antibodies to SARS-CoV-2 in a large cohort of previously infected persons. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 4:ciaa1685. doi: 10.1093/cid/ciaa1685. Online ahead of print.

108. Payne DC, Smith-Jeffcoat SE, Nowak G, Chukwuma U, Geibe JR, Hawkins RJ, et al. Infections and serologic responses from a sample of U.S. Navy service members – USS Theodore Roosevelt, April 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020; 69:714-721. doi: 10.15585/mwr.mm6923e4.

109. Ogega CO, Skinner NE, Blair PW, Park HS, Littlefield K, Ganesan A, et al. Durable SARS-CoV-2 B cell immunity after mild or severe disease medRxiv. 2020 Oct 30:2020.10.28.20220996. doi: 10.1101/2020.10.28.20220996. Preprint.

110. Black MA, Shen G, Feng X, Garcia Beltran WF, Feng Y, Vasudevaraja V, et al. Analytical performance of lateral flow immunoassay for SARS-CoV-2 exposure screening on venous and capillary blood samples. *J Immunol Methods.* 2021; 489:112909. doi: 10.1016/j.jim.2020.112909.

111. Pellanda LC, da Ros Wendland EM, McBride AJA, Tovo-Rodrigues L, Alves Ferreira MR, Dellagostin OA, et al. Sensitivity and specificity of a rapid test for assessment of exposure to SARS-CoV-2 in a community-based setting in Brazil. medRxiv [Preprint] May 10, 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.20093476>.

112. Prazuck T, Colin M, Giachè S, Gubavu C, Seve A, Rzepecki V, et al. Evaluation of performance of two SARSCoV-2 rapid whole-blood finger-stick IgM-IgG combined antibody tests. *PLoS One.* 2020; 15(9):e0237694. doi: 10.1371/journal.pone.0237694. eCollection 2020.

113. Borremans B, Gamble A, Prager KC, Helman SK, McClain AM, Cox C, et al. Quantifying antibody kinetics and RNA detection during early-phase SARS-CoV-2 infection by time since symptom onset. *Elife.* 2020; 9:e60122. doi: 10.7554/eLife.60122.

114. Muecksch F, Wise H, Batchelor B, Squires M, Semple E, Richardson C, et al. Longitudinal serological analysis and neutralizing antibody levels in coronavirus disease 2019 convalescent patients. *J Infect Dis.* 2021; 223:389-398. doi: 10.1093/infdis/jiaa659.

115. Bradburne AF. Antigenic relationships amongst coronaviruses. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1970; 31:352-364. doi: 10.1007/BF01253769.

116. Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res.* 2014; 194:175-183. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.018.

117. Zheng M, Song L. Novel antibody epitopes dominate the antigenicity of spike glycoprotein in SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV. *Cell Mol Immunol.* 2020; 17:536-538. doi: 10.1038/s41423-020-0385-z.

118. Gundlapalli AV, Salerno RM, Brooks JT, Averhoff F, Petersen LR, McDonald LC, et al. SARS-CoV-2 serologic assay needs for the next phase of U.S. COVID-19 pandemic response. *Open Forum Infect Dis.* 2020; 8(1):ofaa555. doi: 10.1093/ofid/ofaa555. eCollection 2021 Jan.

119. EC. European Commission. COVID-19 In Vitro Diagnostic Devices and Test Methods Database. Disponible en: https://covid-19-diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices?manufacturer&text_name&marking=Yes&rapid_diag&format&target_type&search_method=AND#form_content

120. Food and Drug Administration. Independent evaluations of COVID-19 serological tests. Disponible en: <https://open.fda.gov/apis/device/covid19serology/>

121. Estrela P, Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016; 60:111-120. doi: 10.1042/EBC20150012.

122. Caini S, Bellerba F, Corso F, Díaz-Basabe A, Natoli G, Paget J, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. *Euro Surveill.* 2020; 25(23):2000980. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2000980.

123. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for COVID-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2020; 370:m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516.

124. Sheridan C. Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:515-518. doi: 10.1038/d41587-020-00010-2.

125. European Centre for Disease Prevention and Control. The use of antibody tests for SARS-COV-2 in the context of Digital Green Certificates. 20 May 2021. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/use-antibody-tests-sars-cov-2-context-digital-green-certificates>

126. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for COVID-19 antibody testing. Updated March 2021.

Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>

127. Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, Cray C. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol.* 2020; 154:293-304. doi: 10.1093/ajcp/aqaa112.

128. Theel E, Filkins L, Palavecino E, Mitchell S, Campbell S, Pentella M, et al. , Verification procedure for commercial serologic tests with emergency use authorization for detection of antibodies to SARS-CoV-2. American Society for Microbiology, 2020. Disponible en: <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/ASM-Web-protocol-serology-062220-FINAL.pdf?ext=.pdf>

129. World Health Organization. WHO/BS.2020.2403 Establishment of the WHO international standard and reference panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. November 2020. March 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>

130. Borobia AM, Carcas AJ, Pérez-Olmeda M, Castaño L, Bertran MJ, García-Pérez J, et al. Immunogenicity and reactivity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2021; 398(10295):121-130. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01420-3.

131. Martínez-Gallo M, Esperalba-Esquerria J, Pujol-Borrell R, Sandá V, Arrese-Muñoz I, Fernández C Naval, et al. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in health care workers. *MedRxiv* April 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254472>

132. Centers for Disease Control and Prevention. Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) associated with coronavirus disease 2019 (COVID-19) 2020. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6932e2.htm>

133. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020; 323:1843-1844. doi: 10.1001/jama.2020.3786.

134. Wurtz N, Penant G, Jardot P, Duclos N, La Scola B. Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021; 40:477-484. doi: 10.1007/s10096-020-04106-0.

135. Chu H, Chan JF, Yuen TT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe.* 2020; 1(1):e14-e23. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30004-5.

136. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117:7001-7003. doi: 10.1073/pnas.2002589117.

137. vanDoremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020; 382:1564-1567. doi: 10.1056/NEJMc2004973.

138. Case JB, Bailey AL, Kim AS, Chen RE, Diamond MS. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology.* 2020; 548:39-48. doi: 10.1016/j.virol.2020.05.015.

139. Cooper PD. The plaque assay of animal viruses. *Adv Virus Res.* 1961; 8:319-378. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60689-2.PMID: 13881155

140. Juarez D, Long KC, Aguilar P, Kochel TJ, Halsey ES. Assessment of plaque assay methods for alphaviruses. *J Virol Methods.* 2013; 187:185-189. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.09.026.

141. Mendoza EJ, Manguiat K, Wood H, Drebot M. Two Detailed plaque assay protocols for the quantification of infectious SARS-CoV-2. *Curr Protoc Microbiol.* 2020; 57(1):ecpmc105. doi: 10.1002/cpmc.105.

142. Walsh KA, Spillane S, Comber L, Cardwell K, Harrington P, Connell J, et al. The duration of infectiousness of individuals infected with SARS-CoV-2. *J Infect.* 2020; 81:847-856. doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.009.

143. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis.* 2020; 71:2663-2666. doi: 10.1093/cid/ciaa638.

144. vanKampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun.* 2021; 12(1):267. doi: 10.1038/s41467-020-20568-4.

145. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Integración de la secuenciación genómica en la vigilancia del SARS-CoV-2. 22 de enero de 2021. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Integracion_de_la_secuenciacion_genomica_en_la_vigilancia_del_SARS-CoV-2.pdf

146. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 1 July 2021. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>

147. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. 3 March 2021. ECDC and WHO Regional Office for Europe: Stockholm and Copenhagen; 2021. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/methods-detection-and-identifica>

tion-sars-cov-2-variants

148. Matic N, Lowe CF, Ritchie G, Stefanovic A, Lawson T, Jang W, et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 variants of concern, including B.1.1.28/P.1, in British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27:1673-1676. doi: 10.3201/eid2706.210532.27(6).
149. Bal A, Destras G, Gaymard A, Stefic K, Marlet J, Eymieux S, et al. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69-V70, France, August to December 2020. *Euro Surveill.* 2021; 26(3):2100008. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2100008
150. Clark AE, Wang Z, Cantarel B, Kanchwala M, Xing C, Chen L, et al. Multiplex fragment analysis identifies SARS-CoV-2 Variants. *medRxiv* 2021.04.15.21253747; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.15.21253747>
151. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 variant classifications and definitions. Disponible en: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fcases-updates%2Fvariant-surveillance%2Fvariant-info.html
152. Rees-Spear C, Muir L, Griffith SA, Heaney J, Aldon Y, Snitselaar JL, et al. The effect of spike mutations on SARS-CoV-2 neutralization. *Cell Rep.* 2021; 34(12):108890. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108890.
153. World Health Organization. SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals: Interim guidance, 8 January 2021. Geneva: WHO; 2021. Disponible en: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-genomic_sequencing-2021.1
154. European Centre for Disease Prevention and Control. Risk related to spread of new SARS-CoV-2 variants of concern in the EU/EEA [Internet]. 2020 dic. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-risk-related-to-spread-of-new-SARS-CoV-2-variants-EU-EEA.pdf>
155. Meredith LW, Hamilton WL, Warne B, Houldcroft CJ, Hosmillo M, Jahun AS, et al. Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20:1263-1271. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30562-4.
156. European Centre for Disease Prevention and Control. Sequencing of SARS-CoV-2: first update. 18 January 2021. ECDC: Stockholm; 2021.
157. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid. Procedimiento integración de la secuenciación genómica del SARS-CoV-2 en la Comunidad de Madrid. Febrero 2021. Disponible en: https://www.comunidad.madrid/sites/default/files/doc/sanidad/epid/procedimiento_secuenciacion_laboratorios_cm.pdf
158. López Causape C, González Candelas F, Tomás Carmona M, Oliver Palomo A. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. 2021. 71. Antonio Oliver Palomo (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2021.
159. Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evol.* 2020; 6(2):veaa075. doi: 10.1093/ve/veaa075.
160. European Centre for Disease Prevention and Control. Reinfection with SARS-CoV-2: implementation of a surveillance case definition within the EU/EEA. 8 April 2021. ECDC: Stockholm, 2021. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/reinfection-sars-cov-2-implementation-surveillance-case-definition-within-eueea>
161. Leidi A, Koegler F, Dumont R, Dubos R, Zaballa ME, Piumatti G, et al. Risk of reinfection after seroconversion to SARS-CoV-2: A population-based propensity-score matched cohort study. *Clin Infect Dis.* 2021 May 27;ciab495. doi: 10.1093/cid/ciab495.
162. Yahav D, Yelin D, Eckerle I, Eberhardt CS, Wang J, Cao B, Kaiser L. Definitions for coronavirus disease 2019 reinfection, relapse and PCR re-positivity. *Clin Microbiol Infect.* 2021; 27:315-318. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.028.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-DCOV-1

Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

La descripción de las técnicas de aislamiento de SARS-CoV-2 en cultivo celular a partir de muestra respiratoria y la cuantificación de partículas virales infectivas presentes en las mismas. .

2. FUNDAMENTO

El cultivo celular es la técnica de referencia para determinar la viabilidad viral. Teniendo en cuenta que el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 está basado en las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), que pueden ser positivas durante periodos prolongados de tiempo, sólo el aislamiento del virus en cultivo celular nos permite determinar el periodo de infectivo de los pacientes con COVID-19.

3. REQUERIMIENTOS DE BIOSEGURIDAD

El nivel de bioseguridad requerido para la realización de cultivo celular de SARS-CoV-2 es el nivel 3 (BSL3). El personal debe utilizar en todo momento equipos de protección individual (EPI) adecuados y el área de cultivos debe cumplir con todos los requerimientos de contención necesarios (ver Procedimiento en Microbiología Clínica 10a, mencionado en el apartado siguiente)

4. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Documento científico de este Procedimiento SEIMC. Pumarola T (Coordinador), Cilla CG, Navarro JM, Galán JC, Folgueira MD. Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. Procedimientos en Microbiología Clínica 73. SEIMC 2021. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

5. MATERIAL Y EQUIPAMIENTO NECESARIO

5.1. MATERIAL

- Línea celular Vero E6 (ATCC CRL1586)
- Anticuerpo monoclonal anti-N SARS-CoV-2
- Anticuerpo secundario marcado con fluoresceína que reconozca al anticuerpo primario
- Placas de 96 pocillos con fondo en U
- Placas de 24 pocillos para cultivo celular
- Placas de 6 pocillos para cultivo celular
- Flask de 25 y 75 cm² con tapón gas-permeable
- Pipetas graduadas estériles de 5, 10 y 25 ml
- Puntas con filtro 20, 200 y 1000 µl
- Tubos de 2 ml con tapón de rosca
- Medio de cultivo D-MEM con L-glutamina

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

- Medio de cultivo MEM 10x
- Suero fetal bovino inactivado
- Penicilina + Estreptomicina
- Tripsina-EDTA
- L-glutamina 1 M
- HEPES 10 mM
- Metil-celulosa 2%
- Cristal violeta 1%
- Paraformaldehido 4%
- PBS 1x

5.2. EQUIPAMIENTO

- Cuarto de cultivos que cumpla requisitos de bioseguridad de nivel 3
- Cabina de seguridad biológica IIA con sistema de vacío
- Centrífuga con tapas de seguridad en los contenedores
- Incubador 37°C CO₂
- Microscopio invertido
- Equipo de imagen tipo EVOS M5000 o superior
- Nevera
- Congelador -20°C
- Baño térmico
- Microondas
- Cámara de Neubauer o contador automático de células
- Pipeteador automático para pipetas serológicas
- Pipetas de precisión para volúmenes de 2-10, 20-200, 200-1000 µl

6. MUESTRAS

6.1. MUESTRAS RESPIRATORIAS ADECUADAS PARA LA REALIZACIÓN DE CULTIVO CELULAR

- Muestras del tracto respiratorio superior: exudado nasofaríngeo y aspirado nasofaríngeo en pacientes pediátricos
- Muestras del tracto respiratorio inferior: lavado broncoalveolar (LBA)

6.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El profesional que realice la toma usará equipo de protección individual (EPI) adecuado.

Para la obtención de exudados nasofaríngeos se utilizará un hisopo fino y flexible con extremo flocado de dacrón o poliéster, introduciendo el escobillón a través del orificio nasal hasta alcanzar la nasofaringe, tras lo cual se rotará enérgicamente durante, al menos, cinco segundos. La operación se repite en la otra fosa nasal utilizando la misma torunda.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

A continuación, se introducirá el hisopo en un tubo conteniendo 3 ml de medio de transporte de virus (MTV) o medio de transporte universal (UTM) que NO contenga sustancias inactivantes y garantice el mantenimiento de la viabilidad viral. Comprobar que el tubo contiene perlas de vidrio.

Los aspirados nasofaríngeos se obtienen utilizando un sistema de aspiración conectado a una toma de vacío tipo De Lee.

6.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El rendimiento de la técnica de cultivo celular depende de la correcta manipulación y conservación de las muestras antes de su análisis.

Las muestras se procesarán, si es posible, a su llegada al laboratorio. En caso de no procesarse de forma inmediata, las muestras se mantendrán congeladas a -80°C . Todos los recipientes utilizados en la extracción deben contar con cierre hermético y permitir la congelación a -80°C sin que se produzcan fisuras que puedan originar fugas de la muestra obtenida.

Las muestras se deben transportar en contenedores de bioseguridad que cumplan los requerimientos para el transporte de agentes biológicos UN3373, Sustancia Biológica, Categoría B, evitando el envío a través de tubo neumático.

La apertura de los contenedores de transporte debe realizarse en una cabina de seguridad biológica (CSB).

6.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se rechazarán las muestras mal identificadas, derramadas o en medio de transporte inadecuado

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Ver referencia bibliográfica nº 1.

Homogeneizar las muestras agitando los contenedores de transporte perfectamente cerrados con un vórtex durante 20-30 segundos para desprender las partículas virales. En el caso de los exudados nasofaríngeos se retira la torunda rotándola contra la pared interna del envase para eliminar el medio de transporte viral que retenga.

Los aspirados nasales y los LBA deben diluirse en una proporción 1:1 con medio de transporte viral/universal para después mezclar agitando con un vórtex tal y como se ha descrito anteriormente.

Trasvasar las muestras diluidas a un tubo tipo Falcon de 12-15 ml que se adapte a la centrifuga de la que disponga el laboratorio. Esta centrifuga debe cumplir con requerimiento BSL3 (tapas de seguridad), procediéndose a la carga/descarga de las muestras en los contenedores de centrifugación dentro de una CBS.

Todas las muestras deben centrifugarse a 600xg durante 15 min y utilizar el sobrenadante para el cultivo celular.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

Descontaminación de las muestras:

Las muestras que van a ser procesadas para cultivo celular deben ser previamente descontaminadas, añadiendo para ello

- 100 µl de gentamicina (vial de 2 ml proporcionado por el Servicio de Farmacia a una concentración de 40 mg/ml)
- 25 µl de anfotericina B a una concentración de 250 µg/ml

7.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Medio de cultivo: D-MEM con L-glutamina y HEPES 10 mM al que se ha añadido 100 U/ml de penicilina + 100 U/ml de estreptomycin y 10% de suero bovino fetal inactivado. Conservar a 4°C
- Medio de infección: se diferencia del anterior en la concentración de suero bovino fetal, que en este caso debe ser del 2%. Conservar a 4°C.
- MEM 2x (para 1 L): 200 ml 10x MEM, 20 ml de L-glutamina 1 M, 20 ml HEPES 1 M, 40 ml de suero bovino fetal inactivado, 4,2 g de bicarbonato sódico, 20 ml de penicilina 10.000 U/ml + 10.000 µg/ml de estreptomycin. Completar volumen con agua destilada desionizada (Milli-Q), filtrar y conservar a 4°C.

7.3. CULTIVO CELULAR CONVENCIONAL

- Dispensar en una placa de 24 pocillos las células VERO E6 a una concentración de 1×10^5 células/ml/pocillo.
- A las 24-48 h se añade a cada pocillo el sobrenadante viral (200-500 µl) obtenido tras la preparación de la muestra incubando hasta el día siguiente.
- Retirar el medio de cada pocillo y lavar con PBS 1x 2 veces, teniendo siempre el máximo cuidado para que no se desprenda la monocapa y para no hacer aerosoles.
- Añadir 1 ml de medio de cultivo completo a cada pocillo y dejar incubar a 37°C durante 5 días.
- Comprobar el desarrollo de efecto citopático (ECP): aparición de células redondeadas, desprendimiento y degeneración de las mismas y formación de sincitios.

7.4. CULTIVO-DETECCION EN SHELL-VIAL

- Dispensar en una placa de 24 pocillos las células VERO E6 a una concentración de 1×10^5 células/ml/pocillo
- A las 24-48 h se añade a cada pocillo el sobrenadante viral (200-500 µl) obtenido tras la preparación de la muestra, incubando hasta el día siguiente.
- Retirar el medio de cada pocillo lavar con PBS 1x 2 veces, teniendo siempre el máximo cuidado para que no se desprenda la monocapa y para no hacer aerosoles.
- Añadir 1 ml de medio de cultivo completo a cada pocillo y dejar incubar a 37°C durante 2 días.
- Transcurrido este tiempo retirar el medio de cada pocillo y lavar con PBS 1x 2 veces, teniendo siempre el máximo cuidado para que no se desprenda la monocapa y para no hacer aerosoles.
- Añadir 1 ml/pocillo de metanol y dejar incubar a temperatura ambiente dentro de la CSB 10-15 min.
- Retirar el metanol y lavar con PBS 1x una vez.
- Añadir una dilución 1:1000 (ver instrucciones del proveedor) del anticuerpo primario en PBS 1x, asegurándose de añadir un volumen suficiente para cubrir el pocillo. Incubar 1-2 h a 37°C en incubador con CO₂.
- Retirar el anticuerpo primario y lavar con PBS 1x dos veces.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

- Añadir el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína diluido 1:1.000 (ver instrucciones del proveedor) en PBS 1x e incubar 30 min-1 h a 37°C en incubador con CO₂.
- Retirar el anticuerpo primario y lavar con PBS 1x dos veces.
- Examinar la placa en un equipo de imagen digital EVOS M5000 o similar; las células infectadas se ven de color verde (mayor tinción en el citoplasma).

7.5. ENSAYO DE PLACAS

Ver referencia bibliográfica n° 2.

- Dispensar en una placa de 6 pocillos las células VERO E6 a una concentración de 6x10⁵ células/ml/pocillo.
- Preparar diluciones seriadas 10⁻¹ a 10⁻⁶ de las muestras a titular en tubos de 2 ml utilizando para la dilución medio de infección.
- Retirar el medio de cultivo de cada pocillo y lavar con PBS 1x una vez.
- Añadir 200 µl de cada una de las diluciones en los pocillos debidamente marcados. Empezar dispensando la dilución de menor concentración. Incubar 1 h a 37°C en incubador con CO₂, agitando las placas suavemente cada 15 min.
- Durante este intervalo preparar la mezcla en proporción 1:1 de MEM 2x con el preparado de metil-celulosa al 2%. Incubar a 37°C hasta su utilización para disminuir la viscosidad de la solución.
- Tras la hora de incubación añadir 2 ml de la mezcla anterior a cada uno de los pocillos. Incubar a 37°C en incubador con CO₂ durante 3 días. Transcurrido este tiempo las placas pueden detectarse a simple vista.
- Retirar con cuidado la capa de metil-celulosa con una pipeta y añadir 3 ml/pocillo de paraformaldehído al 4%. Incubar a temperatura ambiente 20 min.
- Retirar el paraformaldehído y añadir 1 ml de cristal violeta al 0,05% diluido en metanol al 20%. Incubar 20-30 min.
- Retirar la solución de cristal violeta y lavar con agua destilada hasta que las placas se visualicen fácilmente
- Para calcular el título de unidades formadoras de placa/ml se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Título (PFU/ml)} = \frac{\text{Número de placas}}{0,2 \text{ ml}} \times 10^{\text{Número de diluciones}}$$

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en el programa informático y serán validados por el facultativo responsable.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Aislamiento y cuantificación de SARS-CoV-2 en cultivo celular	PNT-DCOV-1	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

1. Las muestras en las que se ha realizado cultivo celular convencional se informarán como: Se cultiva SARS-CoV-2 o No se cultiva SARS-CoV-2.
2. Las muestras en las que se ha realizado cultivo en *shell-vial* se informarán como: Se detecta SARS-CoV-2 o No se detecta SARS-CoV-2
3. En las muestras en las que se ha realizado ensayo de placas se informa el título (PFU/ml)

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación, por parte de los servicios médico/quirúrgicos, debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de Cultivo Celular.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ocasionalmente, el proceso de descontaminación de las muestras puede no haber sido suficiente e impedir el cultivo celular por contaminación bacteriana o fúngica, debiendo informarse este resultado como cultivo celular contaminado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Case JB, Bailey AL, Kim AS, Chen RE, Diamond MS. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology*. 2020; 548:39-48. doi: 10.1016/j.virol.2020.05.015.
2. Mendoza EJ, Manguiat K, Wood H, Drebot M. Two detailed plaque assay protocols for the quantification of infectious SARS-CoV-2. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 57(1):ecpmc105. doi: 10.1002/cpmc.105.