

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DEL SARS-COV-2. EL PAPEL DEL LABORATORIO CLÍNICO DE MICROBIOLOGÍA DURANTE LA PANDEMIA COVID-19

LUIS MIGUEL SORIA-BLANCO¹

CARLA ANDREA ALONSO¹

JOSÉ MANUEL AZCONA-GUTIÉRREZ^{1*}

RESUMEN

En diciembre de 2019 se declararon en Wuhan los primeros casos de una neumonía grave que acabó por convertirse en la mayor crisis de salud pública de los últimos tiempos. La publicación de la secuencia completa del SARS-CoV-2, el beta-coronavirus causante de la COVID-19, fue esencial para el desarrollo de los actuales métodos diagnósticos. La detección del genoma (técnicas de amplificación de ácidos nucleicos) y proteínas virales (test de antígenos) son la base de los métodos de diagnóstico directo, siendo el *gold standard* la RT-PCR a tiempo real (*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*), por su elevada sensibilidad y especificidad. El diagnóstico serológico indirecto pone de manifiesto la presencia de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 y su evolución en el tiempo. Conocer los fundamentos, los distintos formatos comerciales y las limitaciones de todo este arsenal diagnóstico, así como establecer circuitos de trabajo eficientes y una adecuada gestión de suministros, ha sido esencial para ofrecer un diagnóstico precoz durante la pandemia, permitiendo tanto el manejo y monitorización del paciente como la aplicación de medidas preventivas para frenar la expansión del virus.

Palabras clave: SARS-CoV-2, RT-PCR, antígeno, anticuerpos.

In December 2019, the first cases of a severe pneumonia were declared in Wuban, which ended at becoming the major public health crisis within the last decades. The publication of the complete sequence of SARS-CoV-2, the beta-coronavirus that causes COVID-19, was essential for the rapid development of current diagnostic methods. The detection of the genome (nucleic acid amplification techniques) and viral proteins (antigen tests) are the basis of the direct diagnostic methods, with RT-PCR (Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction) as the gold standard due to its high sensitivity and specificity. The serological indirect diagnosis is based on the detection of specific antibodies against SARS-CoV-2 and its evolution over time. Knowing the fundamentals, the different available commercial formats and the limitations

1. Laboratorio de Microbiología. Hospital Universitario San Pedro (Logroño).

* Autor de correspondencia: jmazcona@riojasalud.es

of this entire diagnostic arsenal, as well as establishing efficient workflows and an adequate supply management, has been essential to offer an early diagnosis during the pandemic, allowing both the management and monitoring of the patient as well as the implementation of preventive measures to slow the spread of the virus.

Keywords: SARS-CoV-2, RT-PCR, antigen, antibodies.

1. INTRODUCCIÓN

A principios del presente siglo se identificó un brote de origen vírico en el sudeste asiático. El cuadro clínico consistía en una neumonía grave de rápida evolución y con una mortalidad de alrededor del 10%. El virus fue caracterizado como un coronavirus del género beta, denominado SARS-CoV. El brote, con potencial pandémico, fue contenido en pocas semanas dejando algo más de 8.000 casos en más de dos docenas de países (Kirtipal *et al.*, 2020).

Unos años más tarde, en 2012, se describió un nuevo beta-coronavirus también de origen zoonótico, el MERS-CoV, causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio y con una mortalidad de alrededor del 35%. Desde entonces se han descrito casos en 27 países, aunque la mayoría se han notificado en Arabia Saudita (Kirtipal *et al.*, 2020).

En diciembre de 2019 se declararon en la ciudad china de Wuhan los primeros casos de una neumonía grave de etiología desconocida hasta que en enero del 2020 se identificó el agente causal, el SARS-CoV-2, de nuevo un beta-coronavirus, aunque en esta ocasión el brote se convertiría en una pandemia en cuestión de semanas, detectándose el primer caso en nuestro país el 27 de febrero del 2020.

Detrás de cada una de estas epidemias han estado involucrados los murciélagos como reservorio primario. Estos mamíferos representan una de cada cinco especies descritas de mamíferos en el planeta. Son vitales para el equilibrio de los ecosistemas donde habitan, pero también son reservorios de al menos 30 familias de virus, siendo la familia *Coronaviridae*, con cerca de cuatro mil secuencias caracterizadas, la más importante. La deforestación, la intrusión en ecosistemas santuario sin presencia humana previa y el mercado de especies exóticas han aumentado los riesgos de contacto y por tanto las probabilidades de saltos y adaptación de patógenos virales entre especies (Calistri *et al.*, 2021).

Los coronavirus representan una vasta familia de virus que producen infecciones con un amplio espectro clínico que va desde casos asintomáticos o con síntomas leves de resfriado común hasta neumonía grave. Actualmente se reconocen 7 especies de coronavirus que producen infecciones en seres humanos, las tres de origen zoonótico antes mencionadas y las 4 especies de coronavirus humanos HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 y HCoV-HKU1. Presentan 4 proteínas estructurales principales que conforman su morfología característica. La glicoproteína S (espícula) transmembrana,

tiene un papel primordial en la fisiopatología y respuesta inmune ante el virus. La proteína M es la más abundante y da forma a la envoltura, siendo importante en el ensamblaje del virión. La proteína E es la más pequeña y tiene un papel en el ensamblaje y fisiopatogénesis de virus, actuando como un canal de iones. La proteína N tiene varias funciones relacionadas con el ensamblaje y la transcripción del virus (Wang *et al.*, 2020).

Los métodos diagnósticos moleculares y serológicos están basados en su mayoría en la detección directa o indirecta de algunas de estas proteínas y los genes que las codifican.

2. DIAGNÓSTICO DIRECTO: PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS Y PRUEBAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO

La publicación de la secuencia completa del SARS-CoV-2 en enero de 2020, además de permitir la caracterización del virus, sirvió como herramienta fundamental para el desarrollo de los métodos diagnósticos. Actualmente, las técnicas moleculares basadas en la RT-PCR a tiempo real (*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*) se consideran las pruebas de referencia para el diagnóstico de COVID-19 debido a su elevada sensibilidad (85-90%) y especificidad (>95%). Si bien existen diversos formatos comerciales, la mayoría de ellos emplea como genes diana uno o varios de los siguientes: el gen E de la envoltura (propio de diferentes beta-coronavirus del subgénero *Sarbecovirus*), el gen N de la nucleocápside, el gen RdRP de la ARN-polimerasa dependiente de ARN, el gen S de la espícula y las regiones ORF1 y ORF1ab. En el contexto epidemiológico de pandemia, las primeras directrices de la OMS recomendaron el gen E para el cribado de primera línea, seguido del gen RdRP para su confirmación. Los Centros para el control de Enfermedades Infecciosas (CDC) de Estados Unidos empleaban cebadores dirigidos frente a distintas regiones del gen N y los protocolos del CDC chino usaban como dianas los genes ORF1a, ORF1b y N (<https://www.chinacdc.cn/en/>, <https://www.cdc.gov/>).

Actualmente existen diversos ensayos comerciales con aprobación CE e IVD europeos o la FDA norteamericana que se emplean en el diagnóstico de pacientes con sospecha de COVID-19. Estos ensayos comerciales incluyen controles internos que aseguran la extracción eficiente del ARN y la ausencia de inhibidores de amplificación en la muestra así como controles externos positivo y negativo. Algunos de estos sistemas de amplificación de ácidos nucleicos realizan el proceso de forma totalmente automatizada, integrando en un solo paso las fases de extracción, amplificación del ARN, lectura e interpretación de los resultados, presentando además la ventaja del formato POC (*Point of Care*) con resultados en menos de una hora. Sin embargo, presentan la desventaja de un mayor coste por prueba y una menor capacidad de procesamiento simultáneo. Por otro lado, existen plataformas robotizadas de PCR disponibles que permiten multiplicar la capacidad diagnóstica facilitando el procesamiento simultáneo de un elevado número de muestras y asegurando al mismo tiempo la trazabilidad, pero con mayor tiempo de

respuesta. Aunque tales niveles de automatización ya estaban disponibles para distintas plataformas, la gestión de suministros ha representado un reto ante la elevada demanda mundial de reactivos y material fungible, incluyendo reactivos de extracción de ácidos nucleicos, de PCR, de hisopos, puntas y placas de procesamiento. Por tanto, la diversificación de proveedores ha resultado esencial para poder asumir la elevada carga asistencial experimentada por los laboratorios de microbiología. También ha sido necesario establecer, o rediseñar, flujos y circuitos de trabajo en el laboratorio microbiológico para responder de forma eficiente y adaptarse rápidamente a cada momento evolutivo de la pandemia, priorizando el uso de distintas estrategias diagnósticas en función del contexto clínico y epidemiológico.

Otra estrategia para afrontar la fuerte demanda de diagnóstico microbiológico de COVID-19 durante la pandemia ha sido el procesamiento de muestras mediante “*pooling*”. Esta metodología implica el agrupamiento de muestras para su análisis conjunto y, en caso de obtener un resultado positivo, el procesamiento unitario de las mismas. Tal y como recomienda la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (García *et al.*, 2020), el *pooling* estaría indicado exclusivamente en situaciones o entornos de baja prevalencia de casos (nunca >15%), y generalmente no se aplica a todas las muestras sino a estudios de contacto o cribados en población asintomática.

Con respecto a los resultados analíticos, la RT-PCR proporciona una estimación semicuantitativa de la carga viral por medio del valor del ciclo umbral de amplificación o Ct (*cycle threshold*). El valor del Ct expresa el número de ciclos de RT-PCR necesarios para amplificar el ARN viral hasta niveles detectables. Así, el Ct se correlaciona inversamente con la carga viral presente en la muestra. Sin embargo, al no estar normalizado, no es un valor absoluto y depende de diversas variables, como el gen objeto de amplificación, la plataforma de extracción o PCR empleada o la calidad de la muestra. A pesar de estas limitaciones, diversos estudios han establecido relaciones entre los valores de Ct y la capacidad replicativa del virus en cultivos celulares (Bullard *et al.*, 2020, La Scola *et al.*, 2020). En este sentido, y atendiendo a la evidencia científica disponible, se ha consensuado que valores de Ct >30 equivaldrían a una carga viral con escasa capacidad infectiva (García *et al.*, 2020). Sin embargo, debido a las limitaciones antes mencionadas, se aconseja interpretar los resultados del Ct dentro de un contexto general en el que se consideren también la historia epidemiológica, determinaciones serológicas y clínica del paciente.

La muestra de elección para el diagnóstico de COVID-19 es el exudado nasofaríngeo. El hisopado orofaríngeo, aunque presenta un rendimiento algo inferior, es considerado una buena alternativa. Asimismo, en pacientes con menos de 10 días de evolución, la saliva ha mostrado contener altos niveles del virus. Probablemente este hecho se relacione con la expresión de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2), que actúa como receptor viral, por parte de las glándulas salivales (Shamsoddin, 2020). Además, la saliva puede ser recogida por el propio paciente, lo que reduciría el riesgo de

infección de los trabajadores sanitarios y simplificaría el proceso, liberando recursos humanos para otras tareas.

En pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2 y resultados de ARN viral indetectable en muestras del tracto respiratorio superior, es recomendable la toma de muestras del tracto respiratorio inferior, como esputo, lavado broncoalveolar y/o aspirado endotraqueal. A partir de la segunda semana, la probabilidad de detectar ARN viral en muestras del tracto respiratorio superior decrece, aumentando en vías inferiores y heces. En personas con formas leves de COVID-19, el pico de carga viral en muestras nasofaríngeas y orofaríngeas se alcanza durante los primeros 5-6 días tras iniciarse la sintomatología, reduciéndose drásticamente a partir del día 10, lo que se relaciona con una baja capacidad de transmisión (Pan *et al.*, 2020). En pacientes con formas graves de la infección, la carga viral es hasta 60 veces superior y la excreción viral más duradera (Liu *et al.*, 2020). Es importante destacar que, en un número considerable de pacientes clínicamente recuperados, puede detectarse el ARN viral incluso 90 días después del inicio de la infección, tras un resultado de RT-PCR negativo. Estos casos se deben generalmente a la eliminación prolongada e intermitente del ARN de virus no viables más que a una reinfección. Por otra parte, en algunos pacientes se ha detectado ARN viral en diferentes compartimentos corporales, como líquido ocular, semen o líquido cefalorraquídeo (Colavita *et al.*, 2020, Li *et al.*, 2020, Moriguchi *et al.*, 2020). Además, hay estudios que sugieren que la detección del virus en plasma se asocia a mayor gravedad de COVID-19 (Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, la monitorización de la carga viral tanto en sangre como en muestras respiratorias no está recomendada ya que no ha demostrado tener impacto en el manejo del enfermo (García *et al.*, 2020).

Cabe destacar que la obtención de un resultado negativo en una prueba de RT-PCR no excluye necesariamente la infección por SARS-CoV-2. Ante una clínica compatible, grave o progresiva es recomendable repetir la prueba. Son diversos los factores que se asocian a resultados falsos negativos en pacientes infectados, entre los que destacan: a) la mala calidad de la muestra; b) la toma de muestra en fases muy precoces o tardías de la infección; c) la presencia de inhibidores de amplificación en la muestra recolectada. Aunque la aparición de mutaciones podría vincularse a la aparición de falsos negativos, las técnicas moleculares implementadas actualmente en los laboratorios clínicos reducen significativamente esta posibilidad debido al uso de múltiples dianas virales (Ramírez *et al.*, 2021). La aparición de la variante B.1.1.7 (comúnmente conocida como variante británica) que presenta, entre otras, 7 mutaciones y 2 deleciones en el gen de la proteína S, puso inicialmente en duda la sensibilidad de los métodos diagnósticos. Un proveedor anunció que una de esas deleciones (69/70del) producía ausencia de amplificación del gen S en su técnica comercializada que paradójicamente permitió implementar esta RT-PCR como método de cribado para la detección de dicha variante. Así, aunque el método de referencia para la vigilancia epidemiológica de las variantes virales es la secuenciación genómica, diversas casas comerciales han lanzado al mercado kits de RT-PCR

multiplex capaces de detectar SARS-CoV-2 e identificar múltiples variantes de interés epidemiológico del virus.

De la misma forma, para abordar el diagnóstico integral de los virus respiratorios, fundamentalmente en la temporada de infecciones por virus respiratorios estacionales, se han diseñado sistemas de PCR multiplex. Los ensayos más sencillos detectan simultáneamente SARS-CoV-2, Influenza A y B y virus respiratorio sincitial (VRS), aunque se comercializan también paneles sindrómicos respiratorios más completos que incluyen una amplia batería de virus y algunas bacterias. La SEIMC ha propuesto algoritmos diagnósticos en los que se indica el cribado de SARS-CoV-2 en población general asintomática, SARS-CoV-2 y gripe en pacientes con factores de riesgo que puedan beneficiarse del tratamiento con oseltamivir, y adicionalmente, VRS en pacientes pediátricos y geriátricos. En inmunodeprimidos y pacientes con sobreinfección bacteriana hospitalizados en UCI serán útiles paneles sindrómicos y cultivo bacteriano (García *et al.*, 2020).

Otra de las herramientas recientemente desarrolladas y validadas para el diagnóstico de SARS-CoV-2 es la basada en tecnología CRISPR. El primer kit comercializado y autorizado para su uso de emergencia por la FDA es el Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2 kit (<https://www.360dx.com/coronavirus-test-tracker-launched-covid-19-tests>), que proporciona resultados en aproximadamente una hora. Basado en el método SHERLOCK (*Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing*) está diseñado para la detección de fragmentos del ORF1ab y N. En un primer paso se produce la amplificación del ARN viral mediante la técnica RT-LAMP (*Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*). Posteriormente, se transcribe el ADN amplificado, lo que permite activar la actividad de escisión de un complejo CRISPR programado para la detección de la presencia de secuencias específicas del genoma del SARS-CoV-2.

Ante la necesidad de incorporar diagnóstico rápido en escenarios estratégicos, como aeropuertos o en regiones con escasa estructura sanitaria y de diagnóstico, se han desarrollado técnicas alternativas a la RT-PCR para el diagnóstico de COVID-19, como el empleo de la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa o RT-LAMP. El fundamento de la técnica es similar al de la PCR, pero la RT-LAMP no requiere ciclos térmicos, sino que la amplificación se lleva a cabo por una ADN polimerasa a una temperatura constante que oscila entre 60-65°C. Las principales ventajas de esta metodología son su rapidez (unos 30 minutos), que no requiere de la extracción previa del ARN viral y que el equipamiento necesario es más sencillo.

Otras técnicas rápidas orientadas al diagnóstico del SAR-CoV-2 se basan en la detección de antígenos de la nucleocápside (N), de la espícula (S) o el dominio de unión al receptor (RDB-S). Las primeras en salir al mercado estaban basadas en inmunocromatografía de flujo lateral (ICT) y permitieron la descentralización de las pruebas de los Laboratorios de Microbiología al no requerir personal especializado para su realización y el resultado se obtiene en 15-20 minutos. Su principal limitación es la baja sensibilidad (30-40%) (Schohy *et al.*, 2020), y dependiendo de los factores clínicos y epi-

demológicos del paciente puede ser necesario la utilización de pruebas moleculares de detección de ARN en un segundo paso. Posteriormente, la detección de antígenos virales se centró en quimioluminiscencia (CLIA), permitiendo la automatización del proceso y aumentando notablemente la sensibilidad media de hasta el 95% y superando el 99% cuando el Ct <30 (La Marca *et al.*, 2020). Son las técnicas utilizadas actualmente debido a su coste moderado y a su gran capacidad de procesamiento.

3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Como en la mayoría de las enfermedades infecciosas, la serología tiene un papel complementario en el diagnóstico. Se centra en la detección de anticuerpos específicos frente a los microorganismos implicados en las infecciones. Al ser un método diagnóstico indirecto no se detecta al microorganismo, sino la respuesta del sistema inmunitario a la presencia del patógeno.

Al producirse una infección, el sistema inmunitario reconoce epítomos del microorganismo y tras la colaboración de diferentes tipos celulares, los linfocitos B comienzan la producción de inmunoglobulinas específicas que ayudarán a la neutralización del patógeno.

Las inmunoglobulinas se pueden diferenciar en dos tipos principales. Los anticuerpos tipo IgM que comienzan a ser detectables a los 5-7 días del comienzo de la infección y su vida media está en torno a los 7-10 días, y los anticuerpos tipo IgG, que alcanzan el límite de detección por las técnicas habituales a los 14-21 días del comienzo de la infección. Son altamente específicos en la unión a su diana y actualmente se desconoce cuánto tiempo pueden ser detectables (Wu *et al.*, 2020).

El diagnóstico serológico se basa en la detección de los diferentes tipos de anticuerpos, su evolución en el tiempo y su correlación con los datos clínicos y epidemiológicos del paciente. La seroconversión ocurre a partir de la segunda semana del inicio de la infección y puede ser útil para el diagnóstico de casos con una clínica leve, aunque en un porcentaje importante se ha visto que puede no haber una seroconversión detectable. Las pruebas de diagnóstico serológico tienen más importancia para la realización de estudios de seroprevalencia (Sethuraman *et al.*, 2020).

Los ensayos comercializados para la detección de anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 se diferencian en dos dianas diferentes:

- Anticuerpos contra la nucleocápside (N): es un componente estructural del virus. Su uso es el más extendido para la realización de pruebas serológicas.
- Anticuerpos contra la espícula (S): forman las estructuras virales encargadas de su unión a las células y de su entrada en las mismas. Son anticuerpos neutralizantes, es decir, previenen la entrada del virus y por lo tanto la progresión de la infección. Las vacunas se basan en la generación de estos anticuerpos.

La metodología diagnóstica ha evolucionado en el tiempo de la pandemia. Las primeras pruebas disponibles se basaban en inmunocromatografía, por lo que sus valores de sensibilidad y especificidad eran bajos. El desarrollo de pruebas basadas en CLIA y ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) han permitido alcanzar unos niveles de sensibilidad del 90-94% y una especificidad >99% (Kontou *et al.*, 2020).

4. UN TOQUE DE ATENCIÓN: LECCIONES APRENDIDAS

La pandemia ha supuesto un reto global, provocando cientos de miles de muertes y millones de personas sufren las secuelas de la enfermedad. Ha llevado más allá del límite a los sistemas sanitarios de todos los países del mundo y ha puesto en la cuerda floja la economía mundial.

En definitiva, ha señalado claramente cuáles son nuestros puntos débiles y las acciones que deberíamos emprender para afrontar mejor los retos estén por venir. La estrategia *Una Sola Salud* de la Organización Mundial de la Salud tiene más sentido que nunca y el tiempo disponible para alcanzar los objetivos propuestos podría ser más corto de lo deseable.

Desde el punto de vista sanitario, es necesario mejorar los sistemas de alerta y declaración de enfermedades infecto-contagiosas, así como la coordinación entre instituciones y organismos nacionales e internacionales. Los sistemas de Salud Pública deben contar con tecnologías de información capaces de proporcionar información prácticamente en tiempo real, con el fin de poder tomar decisiones correctas que permitan controlar y/o paliar situaciones como las sufridas. Los sistemas asistenciales deben dotarse de más medios y recursos tanto humanos como materiales, haciendo especial énfasis en la primera línea de cualquier sistema sanitario, la Atención Primaria. Los hospitales deben contar con espacios, circuitos y la flexibilidad necesarios para adaptarse, escalar y desescalar su capacidad según las circunstancias. Deben dejar de ser un espacio físico y rígido, hecho de hormigón y acero para convertirse en una entidad dinámica. El trabajo en equipo e interdisciplinar ha resultado ser fundamental para poder asumir el inmenso trabajo y poder salvar vidas. La investigación biomédica ha demostrado nuevamente, ser parte imprescindible de los cimientos de cualquier sistema sanitario que aspire a la excelencia y paralelamente debe diluirse la barrera de la colaboración público-privada, excesivamente gruesa en nuestro país.

Para los laboratorios de Microbiología, la crisis ha supuesto un esfuerzo de reacción y adaptación para el que muy pocos estaban preparados. Han tenido que multiplicar sus capacidades diagnósticas por 10, 20 ó 50 veces en un período de tiempo muy corto. Aquellos laboratorios que contaban con una buena diversificación de proveedores y un adecuado nivel de automatización han salido mejor parados. El brutal aumento de la demanda debido a las pruebas de diagnóstico COVID-19, inusual para los laboratorios de Microbiología, ha obligado a automatizar y rediseñar procesos de preanalítica para mejorar la trazabilidad y eficiencia, sin descuidar el diagnóstico urgente y de rutina del resto de procesos infecciosos.

Pero la crisis también ha abierto ventanas de oportunidad: se han reforzado aquellos laboratorios que ya contaban con robotización y el resto se han actualizado en mayor o menor grado. Se han reforzado plantillas y se ha mejorado o implementado en distintos grados la atención 24/7, rompiendo al fin el estigma histórico que el diagnóstico microbiológico ha tenido en nuestro entorno, donde el laboratorio de Microbiología estaba solo disponible para aquellos pacientes que acudiesen de lunes a viernes en horario de mañana, algo antagónico en el contexto sanitario y social actual. Finalmente, se han implementado estrategias diagnósticas que han demostrado ser sensibles y coste-efectivas y que seguramente se implementarán en otras áreas del diagnóstico microbiológico.

La solución de las carencias y necesidades detectadas y la consolidación de las estrategias que han funcionado y demostrado su valor, resultarán de vital importancia ante los retos actuales y los que están por venir.

BIBLIOGRAFÍA

- Bullard, J., Dust, K., Funk, D., Strong, J.E., Alexander, D., Garnett, L., Boodman, C., Bello, A., Hedley, A., Schiffman, Z., Doan, K., Bastien, N., Li, Y., Van Caesele, P.G., Poliquin, G. (2020). Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clinical Infectious Diseases*, 71, 2663-2666.
- Calistri, P., Decaro, N., Lorusso, A. (2021). SARS-CoV-2 Pandemic: Not the first, not the Last. *Microorganisms*, 9, 433.
- Chen, W., Lan, Y., Yuan, X., Deng, X., Li, Y., Cai, X., Li, L., He, R., Tan, Y., Deng, X., Gao, M., Tang, G., Zhao, L., Wang, J., Fan, Q., Wen, C., Tong, Y., Tang, Y., Hu, F., Li, F., Tang, X. (2020). Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. *Emerging Microbes and Infections*, 9, 469-473.
- Colavita, F., Lapa, D., Carletti, F., Lalle, E., Bordi, L., Marsella, P., Nicastrì, E., Bevilacqua, N., Giancola, M.L., Corpolongo, A., Ippolito, G., Capobianchi, M.R., Castilletti, C. (2020). SARS-CoV-2 Isolation from ocular secretions of a patient with COVID-19 in Italy with prolonged viral RNA detection. *Annals of Internal Medicine*, 173, 242-243.
- García, F., Melón, S., Navarro, D., Paño, J.R., Galán, J.C. (2020). Documento SEIMC COVID-19. Organización del diagnóstico de SARS-CoV-2 y estrategias de optimización. V 1.0. 2020. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/recomendaciones/seimc-rc-2020-COVID19-OrganizacionDiagnostico.pdf>.
- Kontou, P.I., Braliou, G.G., Dimou, N.L., Nikolopoulos, G., Bagos, P.G. (2020). Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: a meta-analysis. *Diagnostics*, 10, 319.
- Kirpital, N., Bharadwaj, S., Kang, S.G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, genetics and evolution*, 85: 104502.
- La Marca, A., Capuzzo, M., Paglia, T., Roli, L., Trenti, T., Nelson, S.M. (2020). Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical

- guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive Biomedicine Online*, 41, 483–499.
- La Scola, B., Le Bideau, M., Andreani, J., Hoang, V.T., Grimaldier, C., Colson, P., Gautret, P., Raoult, D. (2020). Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39, 1059–1061.
- Li, D., Jin, M., Bao, P., Zhao, W., Zhang, S. (2020). Clinical characteristics and results of semen tests among men with coronavirus disease 2019. *JAMA Network Open*, 3:e208292.
- Liu, Y., Yan, L.M., Wan, L., Xiang, T.X., Le, A., Liu, J.M., Peiris, M., Poon, L.L.M., Zhang, W. (2020). Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet. Infectious Diseases*, 20, 656–657.
- Moriguchi, T., Harii, N., Goto, J., Harada, D., Sugawara, H., Takamino, J., Ueno, M., Sakata, H., Kondo, K., Myose, N., Nakao, A., Takeda, M., Haro, H., Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Kubokawa, K., Ogihara, S., Sasaki, T., Kinouchi, H., Kojin, H., Ito, M., Onishi, H., Shimizu, T., Sasaki, Y., Enomoto, N., Ishihara, H., Furuya, S., Yamamoto, T., Shimada, S. (2020). A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *International Journal of Infectious Diseases*, 94, 55–58.
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L.L.M., Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet. Infectious Diseases*, 20, 411–412.
- Ramírez, J.D., Muñoz, M., Patiño, L.H., Ballesteros, N., Paniz-Mondolfi, A. (2021). Will the emergent SARS-CoV2 B.1.1.7 lineage affect molecular diagnosis of COVID-19?. *Journal of Medical Virology*, 93, 2566–2568.
- Scohy, A., Anantharajah, A., Bodéus, M., Kabamba-Mukadi, B., Verroken, A., Rodriguez-Villalobos, H. (2020). Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *Journal of Clinical Virology*, 129, 104455.
- Sethuraman, N., Jeremiah, S.S., Ryo, A. (2020). Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*, 323, 2249–2251.
- Shamsoddin, E. (2020). Saliva: a diagnostic option and a transmission route for 2019-nCoV. *Evidence based-Dentistry*, 21, 68–70.
- Wang, Y., Grunewald, M., Perlman, S. (2020). Coronaviruses: An updated overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 2203, 1–29.
- Wu, F., Wang, A., Liu, M., Wang, Q., Chen, J., Xia, S., Ling, Y., Zhang, Y., Xun, J., Lu, L., Jiang, S., Lu, H., Wen, Y., Huang, J. (2020). Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. medRxiv 2020.03.30.20047365; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
- <https://www.chinacdc.cn/en/>
- <https://www.cdc.gov/>