


ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Genética i de Microbiología

Programa de Doctorado en Microbiología

Universidad Autónoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

Aportación del cultivo virológico en la interpretación de las pruebas moleculares en dos modelos de infección respiratoria: Citomegalovirus y SARS-CoV-2

Presentada por: Carla Berengua Pereira

Para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona

Dirigida por la Dra. M^a Ángeles Marcos Maeso y el Dr. Rodrigo Martino Bufarull

Tutorizada por el Dr. Ferran Navarro Risueño

Barcelona 2023

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Genética i de Microbiología

Programa de Doctorado en Microbiología

Universidad Autónoma de Barcelona

La Dra. M^a Ángeles Marcos Maeso y el Dr. Rodrigo Martino Bufarull

CERTIFICAN que,

El presente trabajo **“Aportación del cultivo virológico en la interpretación de las pruebas moleculares en dos modelos de infección respiratoria: Citomegalovirus y SARS-CoV-2”**, presentado por Carla Berengua Pereira para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha sido desarrollado bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su lectura y defensa delante del tribunal correspondiente.

Y para que así conste,

Firmamos este certificado en Barcelona, 19 de diciembre del 2023.

M^a Angeles
Marcos
Maeso
09269583P

Firmado digitalmente por
M^a Angeles Marcos
Maeso 09269583P
Fecha: 2023.12.19
12:01:46 +01'00'

RODRIGO
MARTINO
BOFARULL /
num:08272203

Signat digitalment
per RODRIGO
MARTINO
BOFARULL /
num:08272203
Data: 2023.12.19
10:12:45 +01'00'

Dra. M^a Ángeles Marcos Maeso

Dr. Rodrigo Martino Bufarull

A mi abuela. Ya te echo de menos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi gratitud infinita a Núria Rabella, la persona que marcó el inicio de este apasionante viaje. Gracias por ofrecerme la posibilidad de realizar la tesis doctoral sobre el maravilloso mundo del citomegalovirus y del cultivo celular, que fue interrumpida por el SARS-CoV-2 y una dura pandemia. A pesar de los desafíos y dificultades que enfrentamos durante este período, estoy convencida de que esta experiencia me ha permitido aprender mucho más. Quiero expresar mi reconocimiento por tu capacidad de transmitirme tu pasión por la virología clínica, así como por los años de dedicación a mi formación y los conocimientos compartidos. Estoy segura que no podría haber tenido una mejor maestra y tus enseñanzas han dejado una huella imborrable en mi vida profesional y personal. Gracias por confiar en mí.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis actuales directores, M^a Ángeles Marcos y Rodrigo Martino, por acogerme en mitad del camino. Ha sido un verdadero placer compartir este trabajo también con vosotros y disfrutar de vuestras valiosas aportaciones como expertos destacados en el tema. Cada uno ha aportado una perspectiva diferente pero altamente enriquecedora para mí. También quiero agradecer a mi tutor, Ferran Navarro, por su continuo respaldo y motivación. Su apoyo no solo se ha limitado a la presente tesis, sino que ha sido fundamental a lo largo de mis años en el laboratorio.

Gracias a mis compañeros y compañeras del laboratorio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Desde el primer día que llegué, me he sentido como en casa. A lo largo de estos años, he tenido el privilegio de aprender enormemente de cada uno de vosotros y vosotras. Quisiera destacar especialmente la importante contribución de mis compañeras del área de virología y de PCR: Marga, Pilar, Montse, Paula, Marina, Cristina y Marta. Parte de los logros de este trabajo también se deben a su dedicación y colaboración.

En el apartado de agradecimientos, no podría faltar mi familia, lo más importante de mi vida. Sinceramente, creo que formamos una familia numerosa preciosa, que llena mi corazón de inmensa felicidad. Teneros lejos duele cada día más, pero mis escapadas mensuales a casa, alivian en parte el sufrimiento. Por su apoyo constante, quiero hacer un reconocimiento especial a mi madre y mi abuela, las mujeres de mi vida y mis ejemplos a seguir. De ellas he

aprendido que, con esfuerzo y amor, todo se puede conseguir. Gracias a ellas he llegado hasta aquí. A mi querida hermana, gracias por estar siempre presente y por regalarme a las personitas más bonitas del mundo, Darío y Hugo. Su amor y presencia han enriquecido mi vida.

Gracias a mis amigos y amigas, tanto a aquellas que han estado a mi lado desde siempre como a las que se han sumado a lo largo de los años. Gracias a mi pequeña familia gallega en Barcelona, por acompañarme en los momentos de morriña y soledad. Quiero hacer una mención especial para a mi amiga Cris, mi constante apoyo y compañera de batallas, que siempre lo solucionamos con buena comida. Nos espera un año apasionante.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero expresar mi agradecimiento y amor a Juan, mi reciente marido (me sigue sonando raro). Son tantas cosas las que te tengo que agradecer... Gracias por haberlo dejado todo por mí y por acompañarme tan lejos en la búsqueda de mis sueños. Gracias por entender esta loca pasión por mi trabajo y comprender que mi hora de salida del hospital rara vez coincide con la que debería. Lamento las horas que esta tesis y mi trabajo nos han “robado”, pero prometo devolverlas. Gracias por ser mi apoyo incondicional, mi compañero de vida y mi mejor amigo. Lo mejor para nosotros está por llegar.

ÍNDICE

Agradecimientos	1
Índice	5
Abreviaturas	11
Resumen	17
Introducción	19
1. EL CULTIVO CELULAR	
1.1. Definición e historia	19
1.2. Tipos de cultivos celulares	20
1.3. Tipos de crecimiento celular	21
1.4. Ventajas del cultivo celular	21
1.5. Desventajas del cultivo celular	22
1.6. Aplicaciones del cultivo celular	23
1.7. El cultivo celular en virología	24
1.8. Líneas celulares utilizadas en virología	24
1.9. Otros componentes necesarios en el cultivo viral	26
1.10. Factores clave en el cultivo viral	27
1.11. Inoculación de las muestras en el cultivo	28
1.12. Identificación vírica en los cultivo celulares	29
1.13. Ventajas del cultivo celular en virología	29
1.14. Desventajas del cultivo celular en virología	30
1.15. Situación actual del cultivo viral tradicional	30
1.16. Cultivo centrifugación (shell-vial)	31
2. CITOMEGALOVIRUS HUMANO	
2.1. Introducción	33
2.2. Estructura y genoma del HCMV	33
2.3. Tropismo celular del HCMV	35

2.4.	Ciclo replicativo del HCMV -----	36
2.5.	Epidemiología y prevalencia de la infección por HCMV-----	39
2.6.	Definiciones de la infección por HCMV -----	40
2.7.	Infección por HCMV y transmisión -----	40
2.8.	Latencia y reactivación del HCMV -----	42
2.9.	Patogénesis del HCMV, manifestaciones clínicas y respuesta inmune-----	43
2.10.	Diagnóstico de la infección por HCMV-----	46
2.11.	Definiciones para la detección de HCMV en sangre y enfermedad por HCMV	
2.12.	Neumonía por HCMV -----	54
2.13.	Prevención y tratamiento de la infección por HCMV-----	58

3. SARS-CoV-2

3.1.	Introducción -----	63
3.2.	Estructura y genoma del SARS-CoV-2-----	66
3.3.	Tropismo celular del SARS-CoV-2 -----	68
3.4.	Ciclo replicativo del SARS-CoV-2 -----	69
3.5.	RNA subgenómico del SARS-CoV-2 -----	71
3.6.	Epidemiología y prevalencia de la infección por SARS-CoV-2 -----	71
3.7.	Infección por SARS-CoV-2 y transmisión-----	74
3.8.	Patogénesis del SARS-CoV-2, manifestaciones clínicas y respuesta inmune-----	76
3.9.	Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2-----	79
3.10.	Variantes del SARS-CoV-2 -----	87
3.11.	Prevención y tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 -----	90

4. TABLAS, FOTOS Y FIGURAS

4.1. Tablas

Tabla 1. Líneas celulares más utilizadas tradicionalmente para el aislamiento de virus -----	25
---	----

Tabla 2. Factores que influyen en los valores del Ct de las RT-PCR -----	82
---	----

4.2. Fotos

Foto 1. Shell-vial de células MRC-5 -----	32
--	----

Foto 2. Partícula de SARS-CoV-2 al microscopio electrónico	63
---	----

4.3. Figuras

Figura 1. Estructura del HCMV	34
Figura 2. Organización del genoma del HCMV	35
Figura 3. Ciclo replicativo del HCMV	36
Figura 4. Mecanismo de entrada de HCMV en la célula	37
Figura 5. Expresión génica de HCMV	37
Figura 6. Seroprevalencia mundial de HCMV en adultos durante el año 2005 y 2015	39
Figura 7. Efectos directos e indirectos de la infección activa por HCMV ---	43
Figura 8. Técnicas de laboratorio utilizadas para la detección del HCMV ---	47
Figura 9. Mecanismo de acción de los antivirales disponibles para la infección por HCMV	62
Figura 10. Clasificación de los coronavirus	64
Figura 11. Cronología de los HCoV	64
Figura 12. Hospedadores de HCoV y consecuencias de su infección	65
Figura 13. Organización genómica del SARS-CoV-2	67
Figura 14. Estructura del SARS-CoV-2	68
Figura 15. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2	69
Figura 16. Casos confirmados de SARS-CoV-2 por región	72
Figura 17. Fallecidos confirmados por SARS-CoV-2 por región	73
Figura 18. Incidencia acumulada (IA) de la infección por SARS-CoV-2 en España por 100.000 habitantes, y edad	73
Figura 19. Tasa mortalidad (TM) de la infección por SARS-CoV-2 en España por millón habitantes, y edad	74
Figura 20. Vías de transmisión persona-persona de SARS-CoV-2	75
Figura 21. Manifestaciones extrarrespiratorias más comunes de la infección por SARS-CoV-2	77
Figura 22. Técnicas de laboratorio utilizadas para la detección del SARS-CoV-2	
Figura 23. Evolución temporal de la viremia, antigenemia y respuesta inmunológica durante la infección aguda por SARS-CoV-2	80
Figura 24. Relación filogenética de los linajes de SARS-CoV-2, definidos por Nexstrain	88

Figura 25. Evolución de las variantes de SARS-CoV-2 en España entre las semanas 1 de 2021 a 22 de 2023 -----	89
Figura 26. Evolución de los linajes de Ómicron en España entre las semanas 48 de 2021 y 22 de 2023 -----	89
Figura 27. Tratamientos de la COVID-19: agentes antivirales y terapias dirigidas al huésped -----	91
Justificación -----	95
Hipótesis -----	99
Objetivos -----	101
Material, métodos y resultados -----	103
<ul style="list-style-type: none"> • Primer Trabajo: <i>Quantitative PCR for the Diagnosis of HCMV Pneumonia in HSCT Recipients and Other Immunocompromised Hosts.</i> • Segundo Trabajo: <i>Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients with pneumonitis by viral culture and DNA quantification.</i> • Tercer Trabajo: <i>Viral culture and immunofluorescence for the detection of SARS-CoV-2 infectivity in RT-PCR positive respiratory samples.</i> 	
Discusión -----	141
Conclusiones -----	169
Referencias -----	173
Anexos -----	205
<ul style="list-style-type: none"> • Anexo 1: otros trabajos relacionados con la tesis ya publicados en revistas. • Anexo 2: otros trabajos relacionados con la tesis pendientes de publicación (enviados). • Anexo 3: otros trabajos relacionados con la tesis presentados en Congresos Nacionales e Internacionales. 	

ABREVIATURAS

- A549:** línea continua de carcinoma pulmonar humano
- ACE2:** enzima convertidora de angiotensina-2
- AdV:** adenovirus
- AG:** aparato de Golgi
- Ag:** antígeno
- Alo-TPH:** trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
- ALT:** alanina aminotransferasa
- AST:** aspartato aminotransferasa
- BAL:** lavado broncoalveolar
- BSL-2:** nivel 2 de bioseguridad
- BSL-3:** nivel 3 de bioseguridad
- CAP:** Colegio Americano de Patólogos
- CDC:** Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
- CDV:** Cidofovir
- CLIA:** inmunoensayo quimioluminiscente
- CMV:** citomegalovirus
- CoV:** coronavirus
- COVID-19:** enfermedad por coronavirus 2019
- Ct:** *cycle threshold*
- CV:** carga viral
- D:** donante
- DMEM:** medio de Eagle modificado de Dulbecco
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- dsDNA:** ácido desoxirribonucleico de doble cadena
- E:** *early* o temprano
- ECP:** efecto citopático
- EICH:** enfermedad injerto contra huésped
- ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- Env:** envuelta
- EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ER: retículo endoplásmico

ExoN: exorribonucleasa

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos o *Food and Drug Administration*

FOS: Foscarnet

GC: guanina citosina

GCV: Ganciclovir

GI: gastrointestinal

gp: glucoproteína

HCMV: citomegalovirus humano

HCoV: coronavirus humano

HeLa: línea continua de carcinoma de cérvix humano

HEp-2: línea celular continua de carcinoma de laringe humano

HHV-5: herpesvirus humano tipo 5

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

HSV: virus herpes simplex

IA: incidencia acumulada

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

IE: *immediate early* o temprano inmediato

IF: inmunofluorescencia

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN: interferón

IgG: inmunoglobulinas G

IgM: inmunoglobulinas M

IHQ: inmunohistoquímica

IL-6: interleucina-6

L: *late* o tardío

LAMP: Amplificación Isotérmica Mediante Bucle

LCR: líquido cefalorraquídeo

LLC-MK2: línea celular de riñón de mono Rhesus

LMV: Letermovir

M: membrana

mAb: anticuerpos monoclonales

MBV: Maribavir

MCP: proteína mayor de la cápside

MDCK: línea celular continua de riñón de perro

MERS-CoV: Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

MIEP: promotor inmediato-temprano mayor

MEM: medio mínimo esencial modificado de Eagle

mL: mililitro

MRC-5: línea celular semicontinua diploide de pulmón embrionario humano

mRNA: RNA mensajero

N: nucleocápside

NGS: secuenciación de nueva generación

NK: células *natural killer* o naturales asesinas

nm: nanómetros

Nps: proteínas no estructurales

NTD: dominio N-terminal

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGHS: proteoglicanos de heparán sulfato

PMN: neutrófilos polimorfonucleares

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: marco de lectura abierto

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa

R: receptor

R₀: número reproductivo básico

RBD: dominio de unión al receptor

RB3: riesgo biológico 3

RD: línea continua de rabdomiosarcoma embrionario humano

RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA

RNA: ácido ribonucleico

RSV: virus respiratorio sincitial

RTC: complejo replicasa-transcriptasa

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

S: superficie o *spike*

SARS-CoV: Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus-2 o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*

SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedad Infecciosas y Microbiología Clínica

SFB: suero bovino fetal

sgRNA: RNA subgenómico

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC: sistema nervioso central

ssRNA: ácido ribonucleico de cadena sencilla

TM: tasa de mortalidad

TMA: Amplificación Mediada por Transcripción

TMPRESS2: serina proteasa transmembrana de tipo II

TOS: trasplante de órgano sólido

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

UCI: unidad de cuidados intensivos

UI: Unidades Internacionales

UL: único largo

US: único corto

VBM: variantes bajo monitorización

VGCV: Valganciclovir

VERO: línea celular continua de riñón de mono

VERO E6: línea celular continua de riñón de mono modificada

VOC: variantes de preocupación

VOHC: variantes con consecuencias elevadas

VOI: variantes de interés

VZV: virus varicela zóster

μL: microlitros

RESUMEN

El cultivo viral es la técnica microbiológica de referencia para la detección de virus con capacidad infectiva, a diferencia de las técnicas moleculares, como las PCR a tiempo real, que detectan fragmentos específicos de material genético del virus, sin proporcionar una distinción clara de si el virus se está replicando y es infectivo o no. Diversas limitaciones inherentes al cultivo viral, tales como el prolongado tiempo que necesitan algunos virus para multiplicarse en cultivo, o la necesidad de contar con instalaciones especiales, han conducido a que en la actualidad sólo un número muy limitado de laboratorios de diagnóstico dispongan de esta técnica. No obstante, hoy en día las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas en todos los laboratorios, y su aplicabilidad se ha incrementado de manera constante gracias a la automatización y la simplificación técnica. El uso generalizado de las técnicas de PCR a tiempo real para en el diagnóstico de la mayoría de las infecciones virales, puede conllevar a la detección, en algunas ocasiones, de material genético viral que no necesariamente refleja una infección activa. En consecuencia, una interpretación errónea de los resultados obtenidos puede derivar en situaciones de sobrediagnóstico, aislamientos prolongados o en la administración excesiva de tratamientos para determinadas infecciones virales.

En esta Tesis Doctoral, se lleva a cabo un estudio comparativo entre los resultados obtenidos mediante dos técnicas diferentes en muestras respiratorias: el cultivo viral y la PCR a tiempo real. Este estudio se centra particularmente en dos virus con características virológicas y patogenia muy diferentes, pero ambos con relevancia clínica significativa, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, como son el citomegalovirus humano (HCMV) y el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio severo (SARS-CoV-2). En el caso del HCMV se evalúa además la carga viral en lavado broncoalveolar y su correlación con la infección activa del virus en el pulmón, así como su relación con la carga viral en plasma. Por otro lado, en el caso del SARS-CoV-2, se investiga la correlación entre la capacidad infectiva del virus, el valor del Ct de la PCR y los días transcurridos desde el inicio de los síntomas.

INTRODUCCIÓN

1. EL CULTIVO CELULAR

1.1. Definición e historia:

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento o multiplicación *in vitro* de células. Estas células se pueden obtener a partir de tejidos humanos, animales o vegetales¹.

El procedimiento de obtención de las células consiste en liberarlas del tejido original mediante disgregación enzimática o mecánica, y llevarlas a un ambiente artificial que permita su multiplicación. Las células del cultivo deben mantener su metabolismo, propiedades fisiológicas y bioquímicas de una manera similar a las que tenían *in vivo*. Para ello se utilizan medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, humedad y aireación controladas¹.

El cultivo celular empezó a desarrollarse en los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. En 1885, Wilhem Roux fue capaz de mantener células embrionarias de pollo en solución salina caliente durante varios días y estableció los principios del cultivo de tejidos. R.G Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, ya que fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*. Desde ese momento (1907) el cultivo celular se estableció como técnica para estudiar el comportamiento de las células animales *in vitro*².

A lo largo del siglo XX se produjeron importantes avances en la evolución del cultivo celular y en la aplicación de su tecnología en diferentes áreas de conocimiento, que han permitido grandes avances científicos. Algunos trabajos basados en el cultivo celular les valieron a sus autores el Premio Nobel, como fue la demostración por parte de John F. Enders, Thomas H. Weller y Frederick C. Robbins en 1954 de que el virus de la poliomielitis podía multiplicarse en cultivos de células no nerviosas, el establecimiento de la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales por Georges Köhler y César Milstein en 1975, o el descubrimiento de Rita Levi-Montalcini en 1986 de que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones de tejidos en cultivo².

1.2. Tipos de cultivos celulares:

Existen varios tipos de cultivos celulares, cada uno con su propia aplicación y utilidad en la investigación y la biotecnología². Cada uno tiene sus propias ventajas y aplicaciones específicas, y la elección del tipo de cultivo dependerá de los objetivos de investigación y las preguntas científicas que se estén abordando. A continuación, se explicarán algunos de los cultivos celulares más comunes^{2,3}.

1.2.1. Cultivo de órganos:

Se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo representa una buena réplica del tejido de origen porque mantiene la arquitectura característica del tejido *in vivo* y conserva las interacciones histológicas, por lo que se mantienen los tipos celulares diferenciados. Sin embargo, su mantenimiento es limitado y no se pueden propagar. Se necesita un nuevo explante para cada experimento.

1.2.2. Explantes primarios:

Se coloca un fragmento de tejido u órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie del material y las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie del soporte.

1.2.3. Cultivo celular primario:

Son células provenientes del tejido original y recién trasplantadas a condiciones artificiales. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. Las células del cultivo conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, su propagación *in vitro* es limitada y hay inhibición por contacto. Pueden ser retiradas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios (líneas celulares) mediante subcultivos o "pases".

1.2.4. Línea celular:

Son células derivadas de un cultivo primario, las cuales pueden subcultivarse *in vitro* repetidamente. Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que se puede prolongar entre 20 y 80 pases, según el tipo de célula. Superados estos pases, las células entran en una etapa de senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar y mueren. Sin embargo, algunas células se transforman, de forma natural o inducida, y

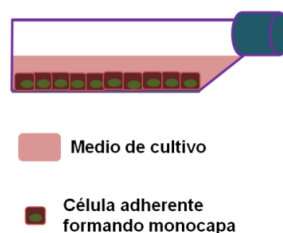
evitan la senescencia, dando lugar a líneas celulares continuas que crecen indefinidamente.

1.3. Tipos de crecimiento celular:

Los cultivos celulares pueden exhibir diferentes patrones de crecimiento dependiendo de factores como el tipo de células, las condiciones de cultivo y los objetivos de investigación. Los dos tipos de crecimiento más habituales son^{2,3}:

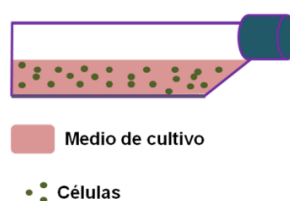
1.3.1. Cultivos en monocapa:

Son los más utilizados. Está formado por células adherentes que establecen contacto entre sí y necesitan unirse a una superficie para multiplicarse. Éstas se multiplican adheridas sobre un soporte (vidrio o plástico) formando una monocapa celular. Para hacer subcultivos de estas células se deben desprender de la superficie, y esto se puede hacer de manera enzimática, química o mecánica.



1.3.2. Cultivos en suspensión:

Las células se multiplican suspendidas en el medio líquido, sin adherirse a la superficie. El subcultivo se realiza mediante diluciones.



1.4. Ventajas del cultivo celular:

El cultivo celular brinda una serie de ventajas destacadas en la investigación biomédica, la biotecnología y otros campos científicos. Algunas de estas ventajas más notables incluyen⁴:

- Control preciso del ambiente: el cultivo celular permite un control preciso de las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del entorno gracias a los medios de cultivo diseñados. Esto proporciona un nivel de control que no siempre es posible en sistemas *in vivo*.
- Homogeneidad de las muestras: los cultivos celulares ofrecen una homogeneidad excepcional en las muestras, lo que reduce las variabilidades inherentes a los sistemas biológicos más complejos. Esto facilita la obtención de datos más coherentes.
- Reducción de costos: en comparación con los estudios *in vivo*, el cultivo celular suele ser una alternativa más económica, lo que puede aumentar la eficiencia y el rendimiento de los experimentos.
- Reducción del uso de animales: el cultivo celular permite reducir considerablemente la necesidad de utilizar animales para experimentación.

1.5. Desventajas del cultivo celular:

A pesar de sus múltiples ventajas, el cultivo celular también presenta algunas desventajas y limitaciones. Entre estas se destacan⁴:

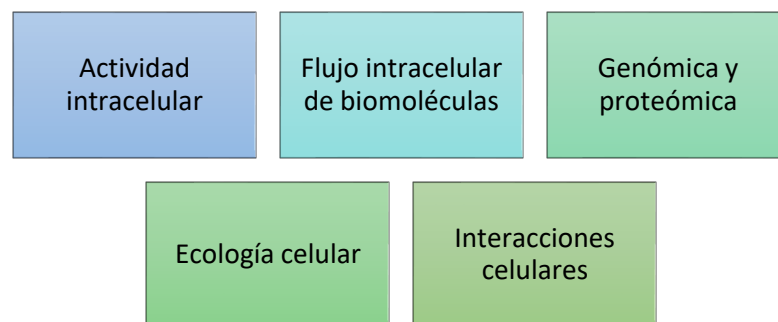
- Sensibilidad a contaminaciones y variaciones ambientales: el cultivo celular es susceptible a contaminaciones microbianas y a las fluctuaciones de las condiciones ambientales, lo que puede afectar los resultados experimentales y requerir medidas rigurosas de control.
- Requiere personal especializado y dedicación: el cultivo celular demanda una inversión significativa en términos de tiempo y recursos humanos. Se necesita personal capacitado para realizar y mantener adecuadamente los cultivos celulares.
- Desdiferenciación e inestabilidad celular: las células cultivadas pueden experimentar desdiferenciación y cambios en su fenotipo a medida que se someten a múltiples pasas, lo que puede influir en la representatividad de los resultados.
- Correlación *in vitro* e *in vivo*: en algunos casos, los resultados obtenidos en cultivos celulares pueden no reflejar fielmente lo que ocurre en organismos vivos lo que limita la extrapolación de hallazgos.
- Necesidad de instalaciones especiales: el establecimiento de un cultivo celular exitoso requiere instalaciones adecuadas, como salas limpias cerradas y sin corrientes de aire, para minimizar el riesgo de contaminación.

- Equipamiento específico requerido: se necesitan equipos especializados como cabinas de flujo laminar, microscopios ópticos invertidos, contadores de células, autoclaves e incubadoras.
- Reactivos y componentes especiales: el cultivo celular requiere el uso de diversos reactivos y componentes como medios de cultivo (como MEM), soluciones de lavado (PBS), enzimas (tripsina), aminoácidos, antibióticos, antifúngicos y suero bovino fetal (SFB), lo que agrega costos y complejidad.

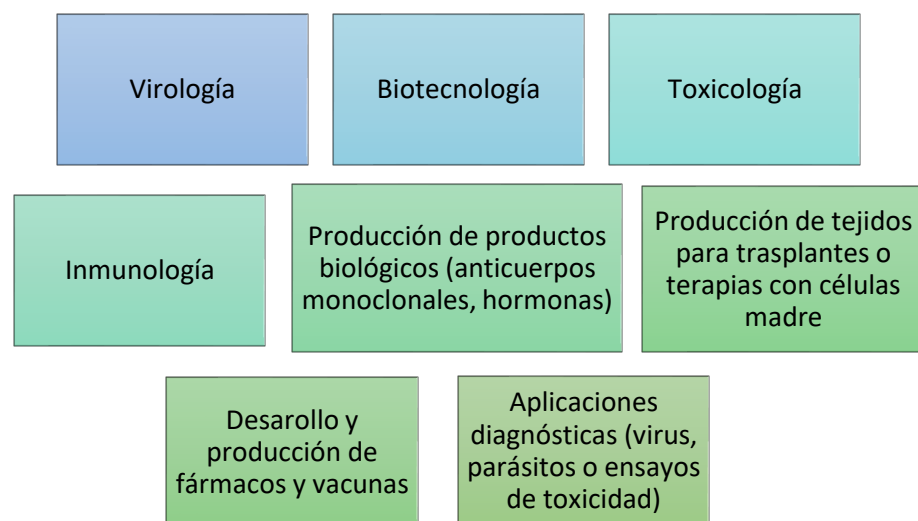
1.6. Aplicaciones del cultivo celular:

El cultivo celular tiene una amplia variedad de aplicaciones en la investigación científica, la biotecnología y la medicina. Es una de las principales herramientas utilizadas en biología celular y molecular, que se utiliza tanto en la investigación básica como en la aplicada^{3,4}.

1.6.1. Investigación básica:



1.6.2. Investigación aplicada:



1.7. El cultivo celular en virología:

Los cultivos celulares han desempeñado un papel fundamental en la investigación de los virus, permitiendo el aislamiento, la amplificación y el descubrimiento de nuevos virus⁵.

Los virus, al ser parásitos intracelulares obligados, requieren penetrar y replicarse dentro de las células para sobrevivir tanto *in vitro* como *in vivo*. Como resultado, las células infectadas experimentan cambios morfológicos y metabólicos, que son característicos de cada virus, lo que conduce a alteraciones visibles en el cultivo celular conocidas como "efecto citopático" (ECP)⁵.

La capacidad de las células de cultivo de permitir la multiplicación de los virus y experimentar alteraciones depende tanto del tipo de tejido y especie de la que proceden las células como de las condiciones de cultivo, además de las características intrínsecas de cada virus.

En los primeros años de la historia del cultivo celular, su aplicación en virología se limitaba casi exclusivamente a la investigación. Algunos ejemplos de los primeros usos del cultivo en virología incluyen la propagación del virus vaccinia en 1913, seguido unos años más tarde por la propagación del virus de la viruela y el de la fiebre amarilla, con el propósito de producir vacunas. Estos hitos marcaron el inicio de la aplicación práctica del cultivo celular en la producción de agentes de inmunización².

No obstante, a partir de la década de los 70, el uso del cultivo viral experimentó una expansión en los laboratorios con fines diagnósticos. Este avance fue posible en gran parte a la disponibilidad y comercialización de líneas celulares previamente preparadas, así como al desarrollo de los medios de cultivo químicamente definidos. Esto hizo que esta técnica se volviera más accesible, práctica y barata².

Desde entonces y a lo largo de los años, el cultivo viral se estableció como una herramienta indispensable para la detección e identificación de virus. De hecho, el aislamiento viral se considera todavía la técnica *gold standard* para el diagnóstico de infecciones virales.

1.8. Líneas celulares utilizadas en virología:

El éxito en la multiplicación de ciertos virus en un cultivo celular depende en gran medida del tipo de células que lo componen. Sin embargo, esta capacidad no es universal para todos los virus, ya que está condicionada por la existencia de un receptor específico en las células del

cultivo, necesario para que el virus pueda llevar a cabo la infección. Por este motivo, con el propósito de asegurar la presencia de un huésped adecuado para cualquier posible virus que pueda estar presente en la muestra, se procede a la inoculación de varias líneas celulares diferentes, seleccionadas según los virus que se presentan aislar².

A continuación, se destacan las líneas celulares más ampliamente utilizadas en el ámbito de la virología para llevar a cabo el aislamiento e identificación de los virus presentes en las muestras clínicas².

Tabla 1. Líneas celulares más utilizadas tradicionalmente para el aislamiento de virus.

LÍNEA CELULAR	TEJIDO DE ORIGEN	VIRUS con capacidad de infectar estas células
HEp-2	Carcinoma epidermoide de laringe humano	Herpes simplex, enterovirus, poliovirus, adenovirus, virus respiratorio sincitial
MDCK	Riñón canino	Virus gripales, adenovirus
MRC-5	Pulmón embrionario humano	Citomegalovirus, virus varicela-zóster, herpes simplex
VERO	Riñón de mono verde africano	Herpes simplex, poliovirus
VERO E6	Riñón de mono verde africano (modificadas)	SARS-CoV, SARS-CoV-2, Herpes simplex
HeLa	Carcinoma de cérvix humano	Poliovirus, adenovirus
RD	Rabdomiosarcoma humano	Herpes simplex, poliovirus
A549	Adenocarcinoma epidermoide de alveolo humano	Adenovirus, enterovirus, poliovirus
LLC-MK2	Riñón de mono Rhesus	Enterovirus, virus gripales, virus parainfluenza, metapneumovirus

Estas líneas celulares permiten la replicación de un amplio espectro de virus, aunque en la Tabla 1 se destacan aquellos para los que estas células proporcionan condiciones óptimas para su propagación.

Tal y como se observa la Tabla 1, algunos virus que frecuentemente se asocian con infecciones en humanos, pueden multiplicarse en diferentes líneas celulares. Sin embargo, otros virus que también tienen un papel importante en medicina humana, no se multiplican en cultivos celulares estándar, lo que imposibilita su diagnóstico mediante esta técnica. Algunos ejemplos

notables incluyen algunos virus de la familia *Herpesviridae* (virus Epstein-Barr, herpes virus tipos 6, 7, 8), de la familia *Polyomaviridae* (poliomavirus BK o JC) o de la familia *Parvoviridae* (parvovirus B19). Esta restricción en la aplicabilidad generalizada del cultivo celular como método diagnóstico para ciertas enfermedades víricas ha impulsado el desarrollo de otras técnicas diagnósticas que serán abordadas más adelante⁵.

1.9. Otros componentes necesarios en el cultivo viral:

Las células que conforman el cultivo deben conservar su metabolismo, propiedades fisiológicas y características bioquímicas de una manera similar a las que tenían *in vivo*. Este aspecto es esencial para que las células puedan ser susceptibles a la infección. Para lograrlo, se utilizan medios de cultivo de composición química específica y se mantienen en condiciones controladas de temperatura, pH, humedad y aireación. La elección de la composición de cada medio de cultivo dependerá en gran medida de la línea celular que estemos utilizando y de la finalidad del cultivo^{2,5}.

Se emplean dos tipos de medios de cultivo para recrear las condiciones naturales de las células: medios naturales y medios artificiales^{2,5}.

- Los medios naturales se basan en fluidos biológicos preexistentes, como plasma, suero, linfa o extractos de tejidos. Sin embargo, su aplicación está restringida debido a su baja capacidad de reproducibilidad.
- Los medios artificiales se preparan agregando nutrientes orgánicos e inorgánicos. Estos medios son más utilizados actualmente por su mayor reproducibilidad.

Los componentes de los medios de cultivo celular pueden variar según el tipo de célula que se está cultivando y el propósito del cultivo, pero en general, incluyen^{2,3}:

- Soluciones salinas tamponadas: mezcla de sales inorgánicas, incluyendo bicarbonato y muchas veces complementadas con glucosa (PBS, sales de Earle o de Hank).
- Medios completos: mezcla de medios basales (MEM, DMEM) a los que se les añaden las sales inorgánicas. Contienen:
 - Aminoácidos: esenciales y no esenciales. La glutamina es la más importante (fuente de nitrógeno).
 - Glucosa: fuente de energía
 - Vitaminas: generalmente hidrosolubles

- Antibióticos y antifúngicos: se suelen utilizar mezclas, para evitar la multiplicación de los contaminantes. Deben añadirse de forma controlada, ya que pueden ser nocivos para el cultivo.
- Factores de crecimiento u hormonas
- Suero: aporta factores de crecimiento, factores de adhesión, nutrientes, hormonas, tampón y viscosidad. El más utilizado es el SFB.

1.10. Factores clave en el cultivo viral:

El éxito del cultivo viral depende de una serie de factores clave que deben ser considerados y optimizados para lograr la replicación eficiente del virus en las células huésped. Aquí hay algunos factores esenciales^{5,6}:

- Elección de la línea celular adecuada: seleccionar la línea celular correcta que sea susceptible al virus y permita su replicación es fundamental. Algunos virus tienen preferencias específicas por ciertos tipos celulares, por lo que es importante investigar y seleccionar una línea celular compatible con el virus que se presenten aislar.
- Condiciones del cultivo celular: las células del cultivo tienen que estar en condiciones óptimas para ser infectadas. Para ello la monocapa celular debe estar repartida de forma uniforme por la superficie del tubo o frasco en el que se va a inocular la muestra, evitando el exceso de células, y éstas deben mantener su morfología. Para ello es fundamental que el medio de cultivo mantenga las condiciones fisicoquímicas adecuadas, evitando así la toxicidad de las células.
- La recogida, el transporte y el procesamiento adecuados de las muestras clínicas también son importantes para el éxito del aislamiento del virus. Es esencial preservar las muestras para que mantengan el título viral y la infectividad hasta que se puedan inocular en cultivo. Mantener las muestras frías (de 2 a 8°C) hasta la inoculación ayuda a preservar la infectividad viral y aumenta la tasa de recuperación de virus, sobre todo en el caso de virus lábiles como el virus respiratorio sincitial (RSV). En algunas muestras también es importante utilizar medios de transporte adecuados que favorezcan la conservación de los virus hasta su inoculación.

1.11. Inoculación de las muestras en cultivo:

Los protocolos de inoculación de las muestras en cultivo pueden variar entre los diferentes laboratorios. La elección de las líneas celulares para la inoculación dependerá del tipo de muestra, de los virus que se pretendan aislar, así como de las características clínicas del paciente⁶.

Las líneas celulares destinadas a la inoculación se habrán preparado previamente y dispondrán de todos los componentes necesarios para el cultivo. Estas líneas se conservarán a 35-37°C hasta la formación de la monocapa de células (2-3 días). Una vez transcurrido este período, se debe verificar que cada monocapa celular esté en condiciones óptimas para la inoculación antes de su utilización^{6,7}.

En el proceso de inoculación, lo más habitual es primero centrifugar las muestras para que los elementos de mayor peso (células, moco, bacterias y hongos) se sedimenten en el fondo del tubo, mientras que los virus quedan en el sobrenadante. A continuación, se debe tratar el sobrenadante obtenido con una combinación de antibióticos y antifúngicos para evitar la contaminación del cultivo, especialmente si se trata de muestras procedentes de un territorio no estéril, como las muestras respiratorias, las heces o las muestras cutáneas^{6,7}.

Primero se debe decantar el medio de cultivo de los tubos y añadir en cada uno 0,2-0,3 mL de la muestra pretratada. Para favorecer el contacto entre los virus de la muestra con la monocapa, se deben incubar los tubos entre 35-37°C en posición horizontal durante al menos 30 minutos. Pasado este tiempo se debe añadir medio de cultivo nuevo para aportar a las células los nutrientes y propiedades necesarias para su mantenimiento. Los cultivos deberán incubarse nuevamente a 35-37°C, en estático o en rotación (*rolling racks*). La segunda opción mejora la velocidad y sensibilidad de la recuperación de los virus^{6,7}.

Los días de incubación de los cultivos también dependerá del tipo de muestra y los virus de los que se sospecha. La monocapa celular se debe examinar diariamente durante la primera semana desde la inoculación, ya que es cuando se detectan la mayoría de los virus, y a días alternos durante el resto de la incubación. La visualización de la monocapa debe realizarse mediante un microscopio óptico invertido a pocos aumentos (x40)^{6,7}.

1.12. Identificación vírica en los cultivos

Si el virus posee la capacidad de multiplicarse e infectar las células del cultivo, producirá cambios degenerativos visibles en la monocapa, los cuales se conocen como ECP. La apariencia de estos ECP puede ser diversa en función del virus causante, incluyendo manifestaciones como la hinchazón o redondeo celular, la formación de sincitios, y en algunos casos la degradación total de la monocapa. El tiempo de incubación hasta la aparición del ECP también varía entre los diferentes virus en cuestión. Por ejemplo, mientras que los herpes simples pueden inducir ECP en un período de 24-48 horas, los citomegalovirus pueden requerir 2-3 semanas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los ECP se manifiestan en un plazo de 5-7 días desde la inoculación^{6,7}.

Es posible realizar una identificación presuntiva del virus implicado en función de las características del ECP observado, la línea celular implicada, el tiempo de incubación y la muestra clínica. Sin embargo, es necesario realizar la identificación definitiva mediante otras pruebas, siendo la más habitual la inmunofluorescencia (IF)^{6,7}.

La técnica de IF se basa en la reacción de anticuerpos monoclonales de especificidad conocida y marcados con fluoresceína, con los antígenos virales expresados en las células infectadas. Las células de la monocapa del tubo se rascan y se colocan en un portaobjetos, se fija la preparación con acetona y se recubre con los anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína contra el virus que queremos confirmar. Por último, debe verse la preparación en un microscopio de fluorescencia (x400). En el caso de que la IF sea positiva (reacción entre el antígeno del virus y el monoclonal específico frente a ese virus) las células se observarán fluorescentes al microscopio, identificando así el virus que infectó las células del cultivo. Además, el tipo de fluorescencia y la localización de ésta en la célula (nuclear o citoplasmática) también ayudan a la identificación del virus, ya que suele ser característica de cada virus^{6,7}.

1.13. Ventajas del cultivo celular en virología:

El cultivo celular desempeña un papel fundamental en la virología debido a sus numerosas ventajas que permiten investigar y comprender la biología de los virus de manera más detallada. Algunas de las principales ventajas incluyen⁷:

- Verificar la capacidad infectiva del virus: a diferencia de las técnicas moleculares o de detección de antígenos, el cultivo celular proporciona información directa sobre si el virus es capaz de replicarse y causar infección activa en las células huésped.
- Detección de múltiples virus: permite detectar más de un virus en la misma muestra clínica.
- Aislamiento y estudios posteriores: posibilita el aislamiento del virus y la ampliación a otros estudios como la susceptibilidad fenotípica a los antivirales y la determinación de serotipos.
- Mayor sensibilidad en comparación con muchas técnicas de detección de antígenos.

1.14. Desventajas del cultivo celular en virología:

Aunque es una herramienta valiosa, también presenta algunas desventajas y limitaciones importantes. Algunas de las principales desventajas incluyen⁷:

- Necesidad de instalaciones y equipos especiales para la preparación de los cultivos celulares.
- Necesidad de instalaciones especiales para poder manipular los cultivos inoculados (BSL-2 o BSL-3 dependiendo del tipo de virus).
- Necesidad de personal con experiencia tanto en la manipulaciones de los cultivos como en la lectura e interpretación de los ECP que se desarrollan.
- Necesidad de disponer de un microscopio de fluorescencia y monoclonales específicos para cada virus, para la confirmación e identificación de los ECP de los cultivos.
- Necesidad de periodos de incubación largos para la formación de ECP de algunos virus, lo que retrasa los resultados.
- Algunos virus pueden no proliferar eficientemente en cultivos celulares.
- Para una única muestra o síndrome, a menudo es necesario inocular varias líneas celulares diferentes.

1.15. Situación actual del cultivo viral tradicional:

El cultivo celular aplicado a la virología sigue siendo una herramienta fundamental en los laboratorios de investigación, así como en el desarrollo de vacunas o fármacos. Además, desempeña un papel crucial en el estudio fenotípico de susceptibilidad a los antivirales.

También, en el ámbito del diagnóstico, el cultivo celular sigue siendo insustituible en ciertos casos, ya que algunos centros de referencia necesitan disponer de esta técnica como *gold standard* para el diagnóstico y vigilancia de algunas enfermedades infecciosas, como es el caso de la polio, donde la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda mantener el cultivo para su detección⁸.

En contraste, en la actualidad, para el diagnóstico rutinario de las infecciones virales, el cultivo viral ha sido desplazado casi por completo en la mayoría de los laboratorios. La laboriosidad y complejidad del cultivo, y la necesidad de disponer de personal altamente capacitado, han favorecido su sustitución gradual por técnicas más sencillas. Este cambio también se ha visto impulsado por la necesidad e importancia de obtener resultados de forma rápida, para que éstos tengan impacto en las decisiones clínicas y en el manejo de las infecciones. Esta necesidad es más notable en la detección de aquellos virus que necesitan periodos más largos para poder detectarse en el cultivo tradicional, como es el caso del citomegalovirus (CMV) que necesita al menos dos semanas.

1.16. Cultivo centrifugación (shell-vial)

Esta técnica, desarrollada en la década de los 80, es una variación del cultivo celular tradicional para acelerar y mejorar la detección de algunos virus *in vitro*⁹.

La técnica consiste en la inoculación de la muestra clínica en un monocapa de células de cultivo dispuesta sobre un cubreobjetos o “lentilla” contenida en un tubo (Foto 1). Tras esta inoculación, se procede a la centrifugación a baja velocidad seguida de un periodo de incubación. Posteriormente, se tiñe la monocapa celular infectada con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, para detectar la presencia de los antígenos virales mediante observación en un microscopio de fluorescencia⁹.

La centrifugación del cultivo ejerce un efecto positivo sobre la infectividad viral al potenciar la penetración del virus en las células del cultivo, sin comprometer la sensibilidad. De este modo, el shell-vial posibilita la detección de virus en 1 o 2 días, a diferencia del cultivo tradicional que puede requerir días o semanas para poder observar e ECP^{9,10}.

Es relevante mencionar que, a pesar de sus beneficios, el shell-vial presenta una limitación significativa: no permite el aislamiento del virus. Por lo tanto, procedimientos posteriores

como análisis fenotípicos de resistencia o el serotipado no pueden llevarse a cabo mediante esta técnica⁹.

En la actualidad, es posible adquirir los shell-vial con la monocapa celular ya formada sobre la “lentilla” y preparados para su utilización. Las células más comúnmente utilizadas son las MRC-5, que son células de fibroblastos humanos⁹.

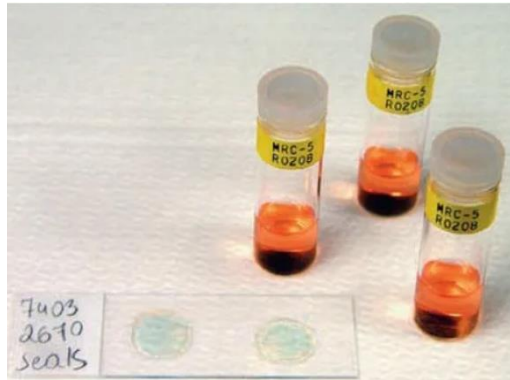


Foto 1. Shell-vial de células MRC-5

La técnica de shell-vial se ha empleado para la detección de diversos virus, entre los que se incluyen^{9,10}:

Citomegalovirus (CMV)	Virus varicela zóster (VZV)	Virus herpes simplex (HSV)
Adenovirus (AdV)	Influenza y parainfluenza	Virus respiratorio sincitial (RSV)

2. CITOMEGALOVIRUS HUMANO

2.1. Introducción

El Citomegalovirus humano (HCMV) o herpesvirus humano tipo 5 (HHV-5) es un virus con un genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) perteneciente a la familia *Herpesviridae* y subfamilia *Betaherpesvirinae*. Su nombre está formado por dos raíces griegas *kytos* que significa célula y *megalo* que significa grande, haciendo referencia al aumento de tamaño de las células por alteración de su citoesqueleto cuando son infectadas por este virus.

La primera evidencia que hay del HCMV fue la observación de unas inclusiones corporales en células de riñón y glándula paratiroides de un paciente, por Hugo Ribbert en 1881¹¹, pero no se describieron adecuadamente hasta los estudios de Jesionek y Kiolemenoglu en 1904^{11,12}. Sin embargo, no se consiguió aislar el virus hasta 1956, a partir de glándulas salivares humanas, por Smith, Rowe y Weller¹³. Finalmente, en 1984 se secuenció por primera vez el genoma del HCMV (cepa AD169), convirtiéndose en el mayor genoma contiguo secuenciado hasta ese momento^{14,15}.

2.2. Estructura y genoma del HCMV

El genoma del HCMV codifica numerosas proteínas con diferentes funciones, como las proteínas reguladoras, proteínas estructurales del virión, proteínas que facilitan la evasión de la inmunidad innata y adaptativa del huésped o proteínas que modulan la transcripción y traducción de la célula huésped. Las proteínas estructurales del virión están divididas en tres regiones: la cápside, el tegumento y la envuelta lipídica, que le confieren un tamaño a partícula del virión maduro de 150-200 nanómetros (nm) de diámetro^{16,17} (Figura 1).

La estructura más interna del virión es la cápside, que junto con el material genético (DNA lineal bicatenario) forman la nucleocápside. El HCMV tiene una nucleocápside icosaédrica de aproximadamente 110 nm de diámetro, formada por 162 capsómeros (150 capsómeros hexaméricos y 12 pentaméricos). Existen 5 proteínas importantes en la cápside, siendo la mayoritaria la Proteína Mayor de la Cápside (MCP) codificada por el gen UL86, y es la que forma los hexones y pentones^{17,18}.

La nucleocápside está incrustada en un recubrimiento amorfo llamado tegumento o matriz, que mantiene la asociación entre la cápside y la envuelta¹⁷. El tegumento es la estructura más

heterogénea de este virus y está formado por al menos 27 proteínas estructurales. La mayoría de las proteínas del tegumento están fosforiladas y son altamente inmunogénicas^{16,17}. Además están involucradas en procesos como la maduración del virión, el bloqueo de la respuesta celular mediante la degradación de DNA entrante, participan en las primeras etapas de la infección potenciando la transcripción del gen *immediate early* (IE) y en la regulación de promotores virales y celulares. Las proteínas del tegumento más abundantes son ppUL32 (pp150) y ppUL83 (pp65)¹⁹⁻²¹.

La envuelta del virión está formada por una bicapa fosfolipídica, que contiene glicoproteínas (gp) codificadas por el virus, como la gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gpUL74 (gO), gpUL75 (gH), UL100 (gM), y gpUL115 (gL)¹⁷. Estas glicoproteínas juegan un papel esencial en la entrada del virus en las células huésped, la propagación de célula a célula y la maduración del virión, así como propiedades antigénicas^{22,23}.

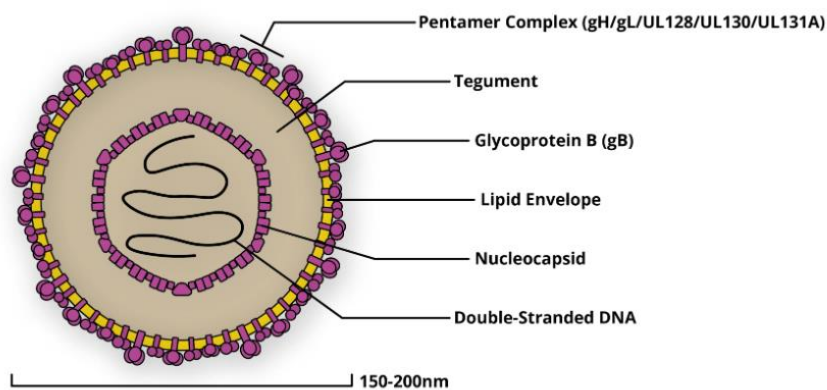


Figura 1. Estructura del HCMV (“*The Bumpy Road to a Cytomegalovirus Vaccine*”, 2020)²⁴

El genoma de HCMV consiste en un DNA lineal de doble cadena (dsDNA) empaquetado en una cápside icosaédrica. Su longitud es de aproximadamente 230.000 pares de bases (pb), convirtiéndolo en el virus con el genoma más largo que puede infectar a los humanos. Su genoma contiene un alto porcentaje (57%) de guanina+citosina (GC) y tiene más de 220 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican más de 165 genes, 4 ácidos ribonucleicos (RNA) no codificantes y 14 microRNA. Entre los que codifican proteínas, 43 son genes de replicación comunes a todos los virus de la familia *Herpesviridae*, mientras que aproximadamente 30 son exclusivos de los Betaherpesvirus^{16,25,26}.

La organización del genoma de HCMV consiste en dos dominios centrales que pueden invertirse entre sí²⁷. Los dos dominios se conocen como segmentos genómicos largos y cortos

(L y S), y cada dominio está compuesto por una región central única (UL y US) flanqueada por segmentos repetidos que residen en los extremos del genoma completo (TRL y TRS) o internamente en la intersección de segmentos largos y cortos (IRL e IRS). Por lo tanto, el genoma del HCMV presenta la siguiente organización general: TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS (Figura 2)²⁵.



Figura 2. Organización del genoma del HCMV. De Murphy E. et al.²⁵

2.3. Tropismo celular del HCMV

El tropismo celular hace referencia a las células diana en las que el virus puede penetrar y reproducirse con éxito²⁸.

A nivel del huésped, el HCMV está estrictamente restringido a los humanos, pero dentro del huésped humano se puede propagar a prácticamente cualquier tejido debido a la amplia gama de células diana que pueden ser infectadas por el virus. Esto justifica la diversidad de patologías que puede causar el HCMV^{29,30}.

Entre las células diana se incluyen las células parenquimatosas y del tejido conjuntivo de prácticamente cualquier órgano y varios tipos de células hematopoyéticas. Las células epiteliales, las células endoteliales, los fibroblastos y las células del músculo liso son los objetivos predominantes para la replicación del virus. La infección de las células epiteliales contribuye a la transmisión entre huéspedes, la infección de células endoteliales y hematopoyéticas facilita la diseminación sistémica dentro del huésped, mientras que la infección de fibroblastos y células de músculo liso proporciona el escenario para la proliferación eficaz del virus^{28,30}.

El tropismo por las células endoteliales, los macrófagos y las células dendríticas varía mucho entre las diferentes cepas de HCMV, dependiendo principalmente de alteraciones dentro del locus del gen UL128-131, que van a regular la penetración viral²⁸.

2.4. Ciclo replicativo del HCMV

En el ciclo replicativo del HCMV se pueden diferenciar diferentes fases, empezando por la entrada del virión en la célula huésped y terminando con la liberación de nuevas partículas víricas infectivas (Figura 3)³¹.

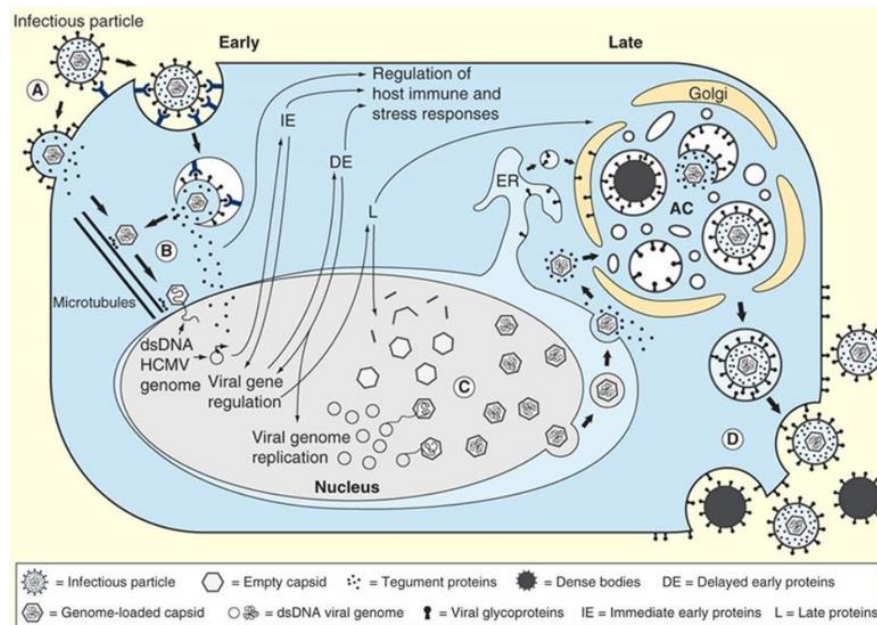


Figura 3. Ciclo replicativo del HCMV. De Jean Beltran PM, Cristea IM.³¹

2.4.1. Unión y penetración del virus.

La entrada del virus en la célula diana es consecuencia de una cascada de interacciones entre las diferentes glicoproteínas de la superficie del virus y receptores celulares de la membrana plasmática de la célula huésped³².

Durante las interacciones iniciales entre el virus y la célula, el HCMV se adhiere a la superficie celular por una unión de baja afinidad de la glicoproteína gB a los proteoglicanos de heparán sulfato (PGHS). Después se produce una interacción de gB con su receptor no heparínico, y convierte la débil adhesión en una unión más estable. Finalmente se produce la unión del complejo heteroligomérico gH-gL-gO. Esta interacción de las glicoproteínas del HCMV con sus receptores es suficiente para generar la transducción de señales intracelulares, que conducen a la alteración de la expresión génica celular y la activación de la respuesta inmune (Figura 4)³³.

Como consecuencia de esta serie de uniones, se produce la entrada del virus mediante la fusión directa de la envuelta del virus con la membrana de la célula huésped, a pH neutro³⁴. Sin embargo, en algunas células como las células epiteliales pigmentarias de

la retina y células endoteliales, el HCMV entra por endocitosis mediada por receptor, lo que requiere un pH bajo³⁵.

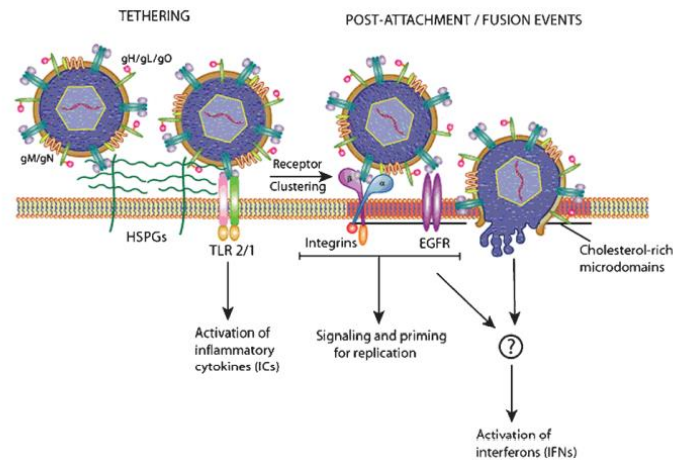


Figura 4. Mecanismo de entrada de HCMV en la célula. De Isaacson MK. et al.³³

Una vez que el HCMV consiguió penetrar en la célula huésped, se produce la liberación de la nucleocápside y las proteínas del tegumento en el citoplasma celular. Rápidamente, se produce la liberación del DNA viral (decapsidación), y la traslocación del DNA y las proteínas al núcleo de la célula²⁶.

2.4.2. Regulación de la expresión génica.

El genoma del HCMV se expresa en una cascada temporalmente coordinada y regulada de eventos transcripcionales. En el ciclo de replicación del virus se diferencian tres fases: temprana-inmediata (IE), temprana (E) y tardía (L). Esto conduce a la síntesis de tres familias de genes virales, descritos como genes IE, genes E y genes L. Las familias de genes IE y E regulan la activación de los genes expresados posteriormente (Figura 5)^{16,37}.

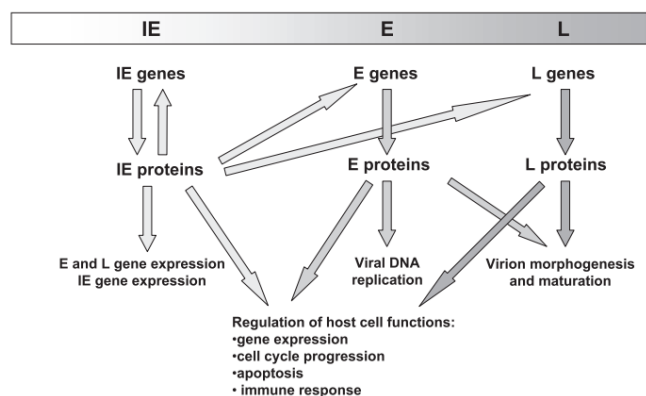


Figura 5. Expresión génica de HCMV. De Landolfo S. et al.¹⁶

- **Fase IE (α):** tan pronto el genoma viral llega al núcleo de la célula, se produce la expresión de genes IE. Los genes IE incluyen los genes principales UL122 y UL123 (IE1 y IE2) que se expresan bajo el control del promotor inmediato-temprano mayor (MIEP), y genes auxiliares como UL36-UL38 o TRS1 y IRS1³⁸. Las proteínas IE1 e IE2 tienen una función reguladora sobre la expresión de genes E y L del HCMV actuando como transactivadoras, y también como autoestimuladoras de los genes IE. Además, estas proteínas tienen un papel importante en la fisiología de la célula huésped, ya que regulan la expresión de un gran número de sus genes que actúan en la progresión del ciclo celular, la apoptosis o la respuesta inmune. Esta fase depende únicamente de factores celulares y no requiere la síntesis de proteínas virales *de novo*^{16,38}.
- **Fase E (β):** La expresión de los genes E depende de la presencia de proteínas IE funcionales y no se ve afectada por inhibidores de la replicación del DNA. Los genes E codifican principalmente proteínas no estructurales, incluyendo factores de replicación del DNA viral (como la DNA polimerasa), enzimas reparadoras y proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune³⁸.
- **Replicación del DNA:** La replicación del DNA viral y empaquetamiento ocurre en el núcleo de la célula huésped. Empieza a las 14-16 horas desde la entrada del virus en la célula³⁹. Ello requiere la contribución de proteínas de la célula y proteínas virales producidas en las fases IE y E, así como la estimulación de expresión de enzimas celulares para la síntesis de precursores de DNA. Durante las últimas etapas de la replicación del DNA viral, los genomas recién sintetizados maduran mediante su escisión y empaquetamiento (capsidación)³⁸.
- **Fase L (γ):** Las proteínas L son los últimos productos génicos expresados durante la replicación del HCMV. Su transcripción comienza pasadas 24 horas desde la entrada del virus en la célula y requiere la replicación previa del DNA viral. Las proteínas L desempeñan principalmente funciones estructurales y contribuyen principalmente al ensamblaje, morfogénesis y maduración del virión³⁶. La mayoría de los genes del HCMV pertenecen a la clase L⁴⁰.
- **Ensamblaje, maduración y liberación del virus:** la formación de la cápside y el empaquetamiento tiene lugar en el núcleo de la célula huésped⁴¹. Posteriormente, las nucleocápsides formadas adquieren una envoltura primaria perteneciente a la membrana nuclear y son eliminadas al espacio perinuclear por exocitosis. Ya en el

citoplasma pierden la envoltura primaria, adquieren las proteínas del tegumento y la envoltura definitiva procedente del aparato de Golgi. Finalmente, los viriones y cuerpos densos (partículas no infectivas) son eliminados por exocitosis al exterior de la célula, aproximadamente 72h después de su infección^{42,43}.

2.5. Epidemiología y prevalencia de infección por HCMV

Los citomegalovirus pueden infectar a varias especies de mamíferos, mientras que la infección por HCMV está restringida a los humanos.

El HCMV es un virus muy ubicuo que está ampliamente distribuido por todo el mundo. La infección por HCMV se considera endémica, con una seroprevalencia global entre 45-100%⁴⁴.

A pesar de tener una distribución universal, ésta no es igual en los diferentes países del territorio. Esta importante variabilidad geográfica está condicionada por múltiples factores, entre los que destacan las condiciones socioeconómicas de cada país. En países del hemisferio norte como EE. UU., Australia y Europa, la seroprevalencia del HCMV en adultos está entre el 36-77%; por el contrario, el HCMV es altamente endémico en los países en vías de desarrollo y, en particular en el África subsahariana, con una tasa de seropositividad cercana al 100% en adultos (Figura 6)⁴⁵. También se ha observado que la seroprevalencia en las personas de raza no-blanca es un 20-30% superior que la de las personas de raza blanca, y en todos los países estudiados se observa que la seroprevalencia también aumenta con la edad⁴⁴.

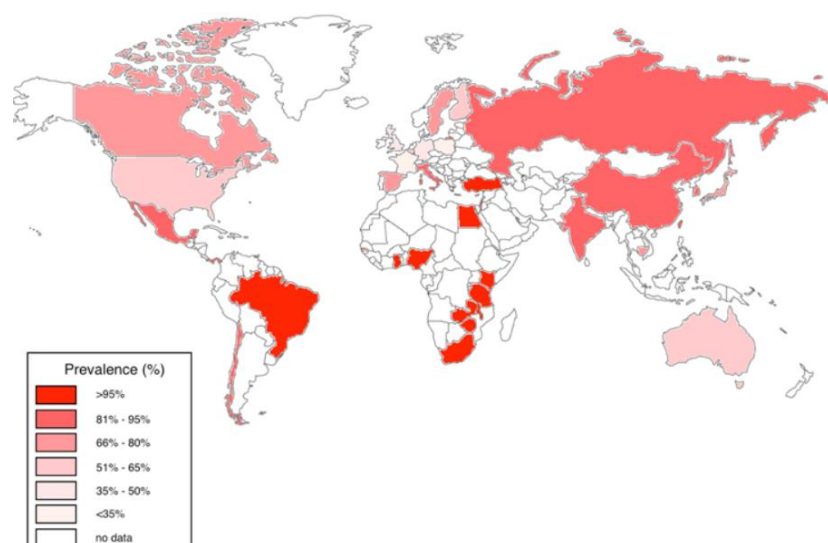


Figura 6. Seroprevalencia mundial de HCMV en adultos durante el año 2005 y 2015. De Adland E. et al.⁴⁵

2.6. Definiciones de la infección por HCMV

Como parte de la “Cuarta Conferencia Internacional sobre el HCMV” celebrada en París en 1993, se desarrollaron y publicaron una serie de definiciones relacionadas con la infección por HCMV, con el fin de unificar los resultados de los ensayos clínicos publicados sobre este tema. Estas definiciones se han ido actualizando (en 1995, en 2002 y recientemente en 2017) a medida que han ido apareciendo nuevas técnicas de diagnóstico y de tratamiento⁴⁶.

- Infección por HCMV: se define como el aislamiento del virus o la detección de proteínas virales (antígenos) o ácido nucleico en cualquier fluido corporal o tejido.
- Replicación del HCMV: se utiliza para indicar la evidencia de multiplicación viral.
- Infección primaria por HCMV (primoinfección): se define como la primera detección de infección por HCMV en un individuo sin evidencia de exposición previa al virus.
- Infección recurrente por HCMV: se define como una nueva infección por HCMV en un paciente con evidencia previa de infección por HCMV, en el que no se había detectado el virus durante un intervalo de al menos 4 semanas de vigilancia activa. La infección recurrente puede deberse a la reactivación del virus latente (endógena) o reinfección (exógena).
- La reactivación del HCMV: se define como la detección de una cepa de HCMV igual a la anterior.
- La reinfección por HCMV: se define como la detección de una cepa de HCMV distinta de la cepa que causó la infección inicial.
- Enfermedad por HCMV: requiere la presencia de signos y/o síntomas clínicos compatibles junto con la detección del HCMV en un órgano determinado.

2.7. Infección por HCMV y transmisión

Las personas pueden adquirir el virus de forma horizontal o vertical, mediante infección primaria (primoinfección) o por reinfección⁴⁷.

- **Transmisión horizontal**: el virus se adquiere por contacto directo con secreciones contaminadas de personas ya infectadas, en las que el virus se excreta durante meses o años, como la orina, saliva, lágrimas, leche materna, semen o secreciones vaginales. La transmisión es mayor entre personas que tienen contacto estrecho, como entre parejas sexuales, personas al cuidado de niños pequeños o entre niños pequeños con

estrecha relación⁴⁸. También se ha descrito la transmisión de HCMV por transfusiones de sangre o trasplante de órganos de donantes seropositivos⁴⁹.

- **Transmisión vertical:** la transmisión puede ocurrir a través de la placenta (transplacentaria), durante el parto (intraparto) o por lactancia materna. Consecuencia de ello, alrededor del 10% de los lactantes ya están infectados a los 6 meses de edad, siendo la leche materna la vía de infección vertical más frecuente⁴⁸.

La infección durante el parto es el resultado de la excreción del virus en las secreciones de la vagina o el cuello uterino, seguida de la ingestión de secreciones infectadas. La excreción cerca del momento del parto se ha observado entre el 2% y el 28% de las madres^{48,50}.

La replicación del virus tiene lugar en las células epiteliales de la zona en la que se produjo el contacto directo con el virus (mucosas y glándulas), en el caso de que éste haya entrado vía oral, respiratoria o genital. En el caso de la vía transplacentaria, por transfusión o por donación de órganos, la entrada se produce vía hematológica³⁰. Posteriormente, los leucocitos y las células endoteliales contribuyen a la propagación del HCMV. En la fase aguda, los antígenos virales se encuentran en neutrófilos y monocitos principalmente, ya que las quimiocinas codificadas por el virus pueden facilitar la diseminación del HCMV atrayendo neutrófilos y monocitos desde la replicación inicial. Además, las células endoteliales desprendidas de la membrana basal como consecuencia de la infección por HCMV también participan en la propagación hematológica del virus⁵¹.

El gran número de células diana susceptibles a ser infectadas por HCMV permite que el virus se disemine por células de las glándulas salivares, conducto biliar, epitelio bronquial y renal, los hepatocitos, células epiteliales del oído interno, el endotelio capilar, los astrocitos y las neuronas. En casos de enfermedad diseminada grave, el HCMV puede acabar afectando a todos los órganos⁵².

El sistema inmunitario controla las infecciones por HCMV mediante la actuación coordinada de la respuesta innata y la respuesta adaptativa (humoral y celular)^{53,54}.

- **Respuesta innata:** La activación del sistema inmunitario innato es clave para controlar la infección y para desarrollar una respuesta inmunitaria adaptativa de calidad. Esto incluye la activación de interferones primarios (IFN), de células presentadoras de antígenos y el reclutamiento y activación de células *natural killer* (NK). Como consecuencia, se promueve una activación más eficaz de las células presentadoras de

antígenos, células T y citoquinas inflamatorias. Los macrófagos no tienen un papel importante en el control de la infección por HCMV^{35,53}.

- Respuesta adaptativa humoral: La infección primaria por HCMV produce anticuerpos específicos para numerosas proteínas del virus, incluidas las proteínas estructurales del tegumento (p. ej. pp65 y pp150), glicoproteínas de la envoltura (principalmente gB y gH) y así como proteínas no estructurales como la proteína IE1^{53,55}.
- Respuesta adaptativa celular: La acción de los linfocitos T (CD8⁺ y CD4⁺) es crucial para el control de la infección por HCMV. Por ello, los pacientes con una respuesta celular deficiente, como los pacientes con SIDA o receptores de un trasplante alogénico de células hematopoyéticas, son los que presentan infecciones más graves por HCMV⁵⁶.

2.8. Latencia y reactivación del HCMV

Como ocurre con los otros virus de la familia herpes, después de la primoinfección por HCMV, incluso cuando el sistema inmune actúa correctamente, no se consigue la eliminación total del virus y la infección dura toda la vida. El genoma viral permanece en el interior de diferentes células en estado latente, es decir, sin replicación viral y, por tanto, sin producir partículas virales infecciosas⁴⁷. Para ello, se produce la circularización del genoma viral en el núcleo celular de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ y monocitos que pueden diseminar el virus a diversos órganos. La latencia se establece mediante mecanismos de silenciamiento transcripcional específicos de cada tipo celular. Las células de la médula ósea y la sangre periférica son los principales reservorios de la infección latente por HCMV^{57,58}.

Cuando aparecen ciertas condiciones que provocan estrés celular (lesión, inflamación o infección) se desencadenan la estimulación transcripcional del genoma, la expresión de genes líticos y la reactivación del virus latente. Como consecuencia, el HCMV empieza a producir nuevos viriones infecciosos, que se liberan en diferentes fluidos corporales, lo que favorece la propagación del virus. Frecuentemente, se establece un equilibrio entre la respuesta inmunitaria y la reactivación vírica, pero la pérdida de este equilibrio en el huésped inmunodeprimido puede conducir a una replicación viral incontrolada tras la reactivación del virus latente, con la consiguiente enfermedad y mortalidad^{53,59}.

El HCMV modula la respuesta inmunitaria innata y adaptativa en cada etapa de su ciclo vital⁵³. Amortigua la activación de genes antivirales inducidos por los interferones mediante varios mecanismos⁶⁰, y posee multitud de genes dedicados a modular y escapar de la respuesta inmunitaria celular. Varios genes son capaces de inhibir de forma independiente la

presentación de antígenos a las células T citolíticas y posee variedad de métodos para desencadenar la activación o inhibición de los receptores activadores e inhibidores de las células NK y T, así como en células auxiliares del sistema inmunitario^{61,62}.

2.9. Patogénesis del HCMV, manifestaciones clínicas y respuesta inmune

En la mayoría de los casos, tanto la primoinfección, la reinfección y la reactivación de HCMV en personas inmunocompetentes, cursa de forma asintomática o con un cuadro febril inespecífico, autolimitado y que raramente desencadena enfermedad grave⁶³. La infección por HCMV en pacientes inmunodeprimidos o la infección congénita sí que puede provocar enfermedad grave^{64,65}.

La infección activa por HCMV en pacientes con inmunosupresión puede provocar daños directos como consecuencia de la replicación del virus, y efectos indirectos que son consecuencia de la modulación del sistema inmune y la expresión de citoquinas⁶⁶. Algunos de estos efectos indirectos son, el rechazo del injerto y la inmunodepresión en pacientes trasplantados, favoreciendo la aparición de otros patógenos oportunistas. Además, esta infección actúa como cofactor en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y vasculares, como es el caso de la arteriopatía coronaria aterosclerótica (Figura 7)⁶⁷.

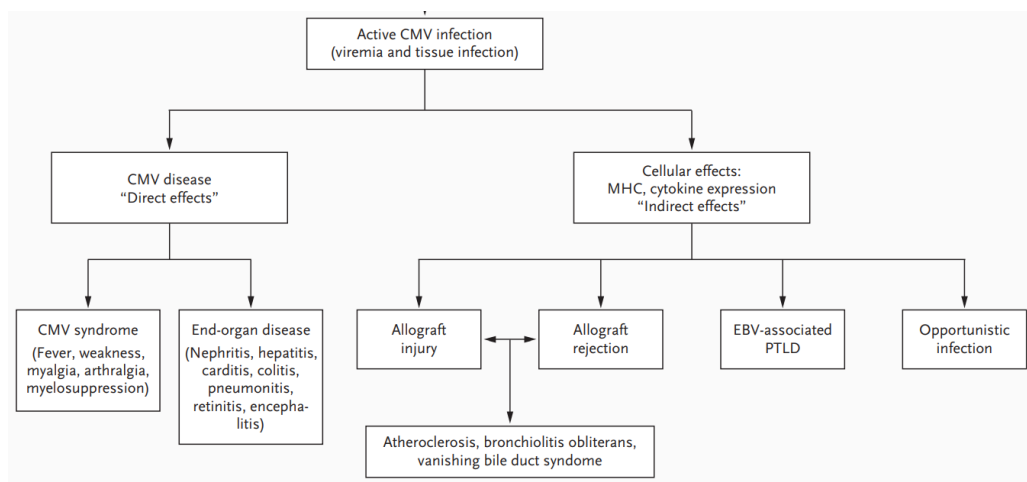


Figura 7. Efectos directos e indirectos de la infección activa por HCMV. De Fishman et al⁶⁷.

2.9.1. Infección en el huésped inmunocompetente:

Generalmente es subclínica, pero en el 8% de los casos causa un síndrome mononucleósico. Este consiste en fiebre persistente, mialgia, cefalea, linfadenopatía

cervical, hepatomegalia, esplenomegalia, *rash* cutáneo y síntomas constitucionales inespecíficos, que pueden persistir durante semanas. A nivel analítico se observa una elevación de enzimas hepáticas (ALT y AST) y linfocitos^{68,69}.

Raramente la infección por HCMV en personas previamente sanas se asocia con complicaciones graves, pero si se han descrito casos con afectación sistémica o de órganos. Las complicaciones infrecuentes descritas incluyen neumonía, miocarditis, anemia hemolítica, retinitis, colitis, hepatitis, afectación del SNC (síndrome de Guillain-Barré) y neuropatía periférica^{70,71}.

2.9.2. Infección congénita:

La infección congénita por HCMV es la causa infecciosa más frecuente de malformaciones neonatales en países desarrollados⁷². La mayoría de los niños con infección congénita por HCMV (entre el 85%-90%) no presentan hallazgos clínicos al nacer (infección asintomática), mientras que el 10%-15% restante sí que nacen con anomalías clínicas (infección sintomática). La mitad de los neonatos sintomáticos son pequeños para la edad gestacional y un 5% mueren durante el período neonatal⁷³.

La aparición de síntomas y la gravedad de la enfermedad neonatal se relaciona con la edad gestacional en el momento de la infección (más grave si se produce en el primer trimestre)⁷⁴ y con el tipo de infección de la madre (infección primaria más grave que la reinfección)⁷⁵.

En los neonatos con infección congénita sintomática por HCMV, las manifestaciones clínicas pueden variar desde hallazgos leves inespecíficos hasta afectación de múltiples órganos, con especial predilección por el sistema reticuloendotelial y el sistema nervioso central. Los hallazgos físicos más comúnmente observados son erupción petequial, ictericia, hepatoesplenomegalia, anomalías neurológicas como microcefalia y calcificaciones intracraneales. A nivel oftalmológico alrededor del 10% de los neonatos presentan afectaciones oftalmológicas como coriorretinitis o atrofia óptica⁷⁶.

Entre los neonatos con infección congénita por HCMV que son asintomáticos al nacimiento, aproximadamente un 10% acabarán desarrollando complicaciones neurológicas durante los siguientes años. La afectación más frecuente es la pérdida auditiva, seguida de defectos motores y coriorretinitis^{73,76}.

2.9.3. Infección en el huésped inmunodeprimido:

Los pacientes inmunocomprometidos son aquellos que tienen un sistema inmunitario deficiente, lo que implica reducción de capacidad de respuesta frente a agentes patógenos. Se pueden diferenciar dos tipos de inmunodepresión, la primaria o congénita y la secundaria o adquirida.

Las inmunodeficiencias primarias están causadas por trastornos genéticos heredados de forma congénita que afectan a diferentes componentes de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, y que provocan un aumento de la incidencia, frecuencia o gravedad de las infecciones y/o una desregulación inmunitaria⁷⁷.

Las inmunodeficiencias secundarias o adquiridas aparecen después del nacimiento y no están ligadas a una deficiencia genética; pueden estar causadas por múltiples factores:

- Fármacos inmunodepresores (iatrogenia) utilizados en el cáncer o afectaciones hematológicas, en enfermedades autoinmunes o inflamatorias, en pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS) o de progenitores hematopoyéticos (TPH).
- Algunos virus como el de la inmunodeficiencia humana (HIV), que infecta a los linfocitos CD4⁺ y provoca el SIDA.
- Neoplasias hematológicas o linfoides, en las que se reducen el número de células del sistema inmune y la síntesis de anticuerpos.
- Las edades extremas de la vida o enfermedades como la diabetes.

EL HCMV es uno de los patógenos oportunistas más importantes en el paciente inmunodeprimido, pudiendo causar afectaciones graves tanto en la primoinfección, en la reactivación y en la reinfección. Además, la infección por HCMV favorece la infección por otros patógenos oportunistas⁶⁷.

Algunos pacientes acaban desarrollando enfermedad de órgano o *end-organ disease*. Aunque es frecuente que HCMV infecte las glándulas salivares y el riñón, raramente causa enfermedad en ellos. Sin embargo, si puede causar patología grave más frecuentemente en otros órganos como en el hígado (hepatitis), en la retina (retinitis), en el intestino (enterocolitis), en el esófago (esofagitis) en el cerebro (encefalitis) o en el pulmón (neumonía)⁶⁷.

La gravedad de la infección suele estar directamente relacionada con el nivel de inmunosupresión del huésped, y afecta sobre todo a las personas con la inmunidad celular

dañada. En función de la causa de la inmunodepresión, las manifestaciones clínicas observadas varían tanto en localización, en frecuencia y en gravedad⁷⁸.

- Pacientes trasplantados de órganos sólido (TOS): el HCMV se localiza frecuentemente en el órgano trasplantado, y posteriormente se extiende a otros órganos. La enfermedad invasiva se produce generalmente durante el primer año tras la finalización de la profilaxis y se manifiesta con mayor frecuencia como fiebre y neutropenia; algunos pacientes presentan linfadenopatía, hepatitis, trombocitopenia, neumonía, invasión gastrointestinal (con colitis difusa, gastritis, úlceras y hemorragias), pancreatitis, coriorretinitis (que suele ser tardía) o meningoencefalitis (poco frecuente). Además, los efectos indirectos de la infección por HCMV pueden conllevar la pérdida o rechazo del órgano trasplantado⁶⁷.
Si el receptor era seronegativo antes del trasplante y el donante del órgano era seropositivo (R-/D+) hay más riesgo de infección por HCMV⁷⁹.
- Pacientes trasplantados de progenitores hematopoyéticos (TPH): la infección por HCMV después de un TPH es una de las complicaciones infecciosas con mayor morbilidad y mortalidad. La tasa de reactivación del virus latente está entre 30-70% en pacientes que no reciben profilaxis antiviral. La mortalidad por esta infección está entre el 45-60%, siendo la neumonía y la encefalitis las enfermedades más mortales. También puede favorecer el rechazo del trasplante⁸⁰.
Si el receptor era seropositivo antes del trasplante hay más riesgo de infección por HCMV⁸¹.
- Pacientes infectados por el HIV: la infección por HCMV es la infección sistémica oportunista más frecuente en el paciente infectado por el HIV y con SIDA, ya que ocurre en cerca del 40% de los pacientes con inmunodepresión profunda (recuento de CD4 inferior a 50/ μ L). Las afectaciones más frecuentes en estos pacientes son la retinitis, la colitis y diferentes formas de afectación del SNC como la encefalitis o la mielitis. En pacientes con recuentos normales de CD4, el riesgo de infección por HCMV disminuye considerablemente^{82,83}.

2.10. Diagnóstico de la infección por HCMV

Se pueden emplear diferentes técnicas de laboratorio, tanto directas como indirectas, para realizar el diagnóstico de la infección por HCMV (Figura 8). La selección de la técnica empleada en cada caso se determina en función de las manifestaciones clínicas y el tipo de

paciente, la respuesta clínica deseada, la muestra clínica disponible o las capacidades técnicas de los distintos laboratorios.

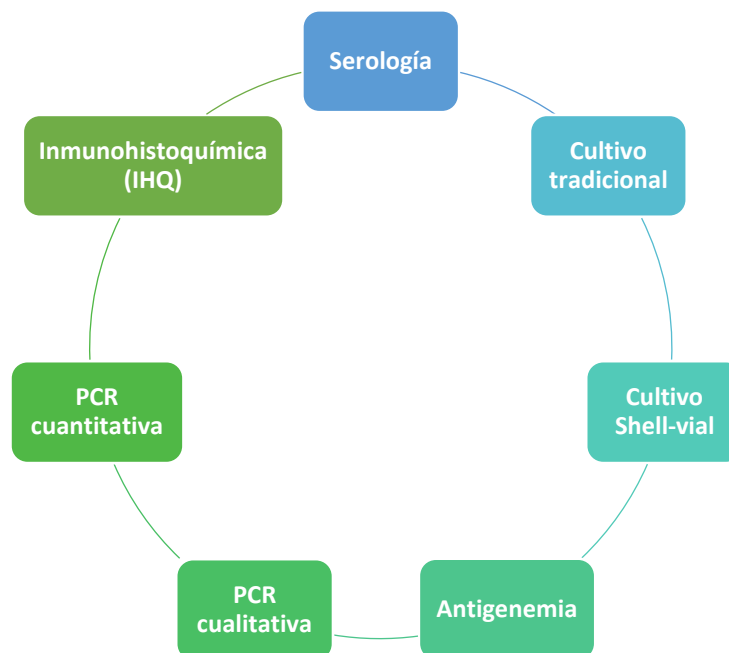


Figura 8. Técnicas de laboratorio utilizadas para la detección del HCMV.

2.10.1. Detección de anticuerpos mediante serología:

La respuesta humoral a la infección por HCMV se manifiesta con la producción de anticuerpos HCMV-específicos. Los anticuerpos IgM se producen entre 2 y 4 semanas después de la infección primaria, y la producción de anticuerpos IgG se produce poco después. Esta técnica es útil para el diagnóstico de la primoinfección (seroconversión de IgG negativa a IgG positiva en el intervalo entre dos pruebas serológicas) y para conocer si un paciente ya ha estado en contacto con el virus (estado inmunitario). Esto último es importante para determinar el riesgo de infección por HCMV en los pacientes trasplantados, teniendo en cuenta el estado inmunitario del donante y del receptor antes del trasplante, así como en la mujeres gestantes, para conocer el riesgo de HCMV congénito⁸⁴.

2.10.2. Cultivo viral:

La recuperación del virus en cultivo celular continúa siendo la técnica *gold standard* para el diagnóstico de la infección por HCMV. Sus principales ventajas son su elevada especificidad

y la alta correlación con la enfermedad por HCMV. Permite detectar replicación viral, es decir, la detección del virus en cultivo indica que el virus se está multiplicando y tiene capacidad de infectar las células^{84,85}.

La forma tradicional se basa en el cultivo celular en tubo. Éste es un ensayo laborioso, que además necesita personal con experiencia en cultivo celular e instalaciones adecuadas. Sus principales limitaciones son que requiere prolongados tiempos de incubación y respuesta (al menos dos semanas) y que tiene una sensibilidad menor que técnicas más recientes^{84,85}. Adicionalmente, durante el periodo de incubación del cultivo es necesario cambiar semanalmente el medio de cultivo del tubo. Este procedimiento es esencial para prevenir la toxicidad de las células y garantizar un entorno propicio para su multiplicación. Es de suma importancia llevar a cabo este proceso con precaución para evitar cualquier posibilidad de contaminación del cultivo.

A finales de la década de los 80, se implementó el cultivo-centrifugación o shell-vial, que posibilita la detección del antígeno precoz del HCMV en el cultivo. Mediante la centrifugación del cultivo se incrementa la infectividad viral al facilitar la penetración del virus en las células del cultivo, lo que aumenta la sensibilidad respecto al cultivo tradicional en tubo. Además, esta técnica presenta la ventaja principal de reducir significativamente el tiempo de respuesta, que pasa a ser de sólo 1 o 2 días⁸⁶.

Ambas técnicas basadas en el cultivo han sido desplazadas por técnicas moleculares en la mayoría de los laboratorios para el diagnóstico rutinario de la infección por HCMV. Sin embargo, el cultivo sigue siendo fundamental para estudiar la susceptibilidad fenotípica a los antivirales, para evaluar la importancia clínica de mutaciones genotípicas, para el desarrollo de vacunas y terapias, así como para la evaluación de nuevas técnicas y reactivos de diagnóstico⁸⁷⁻⁸⁹.

2.10.3. Antigenemia:

El ensayo de antigenemia constituye un método cuantitativo rápido para la detección de antígenos de HCMV. Este procedimiento implica la inmunotinción directa de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) de muestras de sangre. Para ello se utilizan anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la proteína pp65 de la matriz inferior del HCMV (UL83). Los resultados se expresan en términos cuantitativos, como el número de PMN infectados por HCMV en relación con la cantidad total de evaluadas^{84,90}.

Esta técnica exhibe una sensibilidad superior en comparación con las técnicas de cultivo tradicional y posee una alta especificidad para el HCMV. No discrimina si el virus se está replicando o no, aunque niveles elevados de antigenemia tienden a presentar una correlación más sólida con la presencia de enfermedad actual. Es importante resaltar que el umbral clínicamente significativo varía según el riesgo de los diferentes grupos de pacientes⁹¹.

Debido a sus numerosas limitaciones, en la actualidad la técnica de antigenemia también ha sido desplazada por las técnicas moleculares en la mayoría de los laboratorios. Presenta una sensibilidad menor que las técnicas moleculares y requiere el procesamiento inmediato de las muestras después de su recogida. Así mismo, el procesamiento es laborioso y carece de una estandarización, lo que resulta en una variabilidad significativa en los resultados obtenidos. Además, sólo es aplicable a muestras de sangre que contengan un número suficiente de PMN, lo cual no siempre es posible, especialmente en pacientes neutropénicos sometidos TPH^{84,92}.

2.10.4. Detección de ácidos nucleicos mediante PCR:

La incorporación y empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de ácidos nucleicos de HCMV ha supuesto un avance significativo en el diagnóstico y el manejo de la infección por este virus, especialmente en los pacientes sometidos a trasplante. Esta técnica proporciona un método de diagnóstico rápido y altamente sensible⁹².

Inicialmente, esta técnica se basaba en PCR manuales o caseras con detección a punto final, en las que primero se extraía el material genético de la muestra, luego se procedía a la amplificación en termocicladores, seguida de separación de los productos amplificados mediante electroforesis, y finalmente técnicas de hibridación en sonda para la identificación. Sin embargo, estas PCR a punto final resultan laboriosas y no ofrecen una reducción significativa del tiempo de respuesta en comparación con el shell-vial o la antigenemia. Una desventaja adicional de estas PCR manuales es la posible variabilidad metodológica entre los distintos laboratorios. Esto abarca diferencias en aspectos como en la elección de los cebadores, las concentraciones de los reactivos o los parámetros de ciclado en el proceso de PCR. Debido a esta falta de estandarización, los resultados obtenidos no son ampliamente reproducibles entre los distintos laboratorios^{84,93}.

En los últimos años, ha tenido lugar una notable transición en los laboratorios clínicos, donde las técnicas de PCR de punto final han sido reemplazadas por las PCR a tiempo real. Esta transformación se sustenta en un conjunto de ventajas sustanciales. Entre ellas, se destaca su capacidad para brindar una sensibilidad y especificidad significativamente superiores, así como una menor probabilidad de contaminación. Además, permiten la obtención de resultados más rápidamente y la posibilidad de cuantificar el material genético presente en las muestras mediante la modalidad de PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR). En sus primeros años, las PCR a tiempo real requerían un grado considerable de intervención manual, con procesos como la extracción previa del material genético seguida de la amplificación, pero cada vez son más habituales las plataformas totalmente automatizadas. Estas últimas permiten obtener directamente a partir de la muestra la interpretación del resultado final, eliminando la necesidad de procesamientos manuales intermedios. Esta automatización no solo acelera el tiempo de respuesta, sino que también facilita un control más riguroso sobre las variables del proceso, contribuyendo así a incrementar la reproducibilidad y trazabilidad de los resultados. Esto se traduce en una mayor consistencia y en la facilidad de comparar los resultados entre diferentes laboratorios que empleen la misma metodología⁹⁴.

Las técnicas de PCR se basan en la detección del material genético del microorganismo diana, pero no tiene la capacidad de distinguir si éste se está replicando o no, siendo esta su principal limitación. El caso del HCMV, las PCR no pueden diferenciar si el DNA detectado pertenece a una fase de replicación activa, si es residual o si proviene de una fase de latencia viral. No obstante, hay que tener en cuenta también el tipo de muestra clínica en la que se detecta el HCMV mediante PCR, ya que la detección en plasma suele ser indicativa de replicación activa del virus⁹⁵. A pesar de esta limitación, el uso de las qPCR para medir la cantidad de DNA presente en la muestra puede ser muy valioso desde el punto de vista clínico. Esto se debe a que mayores cargas de DNA del HCMV se correlacionan con una mayor actividad replicativa del virus y con una mayor riesgo de enfermedad grave por HCMV^{96,97}.

Los ensayos de qPCR se utilizan cada vez más en el entorno clínico, consolidándose como la opción preferente para identificar a las personas con riesgo de desarrollar enfermedad por HCMV, proporcionar un diagnóstico rápido y certero de la enfermedad por HCMV establecida, monitorizar la respuesta viral al tratamiento antiviral, predecir el riesgo de los pacientes de recaída viral y clínica, y como indicador precoz de la resistencia antiviral.

Estos ensayos se aplican predominantemente para cuantificar la carga de HCMV en muestras de plasma o sangre total. No obstante, su alcance se extiende a otras muestras, como el líquido cefalorraquídeo (LCR) y los lavados broncoalveolares (BAL)⁹⁸. Los resultados obtenidos se expresan en copias/mL.

La cuantificación de la carga viral (CV) aporta múltiples beneficios en el manejo de la infección por HCMV. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la qPCR presenta también una serie de limitaciones que deben ser consideradas. Entre estas limitaciones destaca la ausencia de valores de CV establecidos de manera definitiva para guiar las distintas aplicaciones clínicas de esta técnica, por ejemplo, la ausencia de un valor universal de CV de HCMV a partir del cual empezar el tratamiento preventivo⁹⁸. Esta situación se origina principalmente debido a la influencia de múltiples factores que contribuyen a la variabilidad en los resultados obtenidos, además de la falta de uniformidad entre las distintas plataformas comerciales disponibles en los diversos laboratorios⁹⁹. En un estudio que involucró a 33 laboratorios que utilizaban diferentes plataformas de qPCR para la detección de HCMV reveló una notable discrepancia en la CV obtenida en los distintos ensayos¹⁰⁰. Esta variabilidad se atribuyó principalmente a la falta de un calibrador estándar universal. Como respuesta a esta problemática, en 2015 la OMS introdujo un estándar internacional para la cuantificación del HCMV¹⁰¹. La implementación de este estándar permite que los resultados de las qPCR de HCMV se pueden expresar en Unidades Internacionales por mililitro (UI/mL), lo cual facilita la comparación de resultados entre diferentes estudios y laboratorios.

A pesar de las mejoras introducidas por la implementación del estándar internacional de calibración propuesto por la OMS, persisten las diferencias de relevancia clínica en los valores de carga de HCMV obtenidos por qPCR¹⁰². Estas discrepancias se originan debido a la variabilidad presente en diversos aspectos de los protocolos de las pruebas de qPCR. Factores como el rendimiento del ensayo (incluyendo los límites de detección y cuantificación), el tipo de muestra utilizada, el método de extracción de DNA, el gen diana seleccionado o el tamaño del amplicón, todos contribuyen a estas diferencias observadas. Además, es esencial tener en cuenta que los valores de carga de HCMV clínicamente significativos estarán influenciados y variarán en función del perfil de riesgo específico de cada tipo de paciente^{103,104}.

2.11. Definiciones para la detección de HCMV en sangre y enfermedad por HCVM

La incorporación de las técnicas moleculares de qPCR para el diagnóstico rutinario y seguimiento de la infección por HCMV, ha requerido la revisión y actualización de las definiciones para la detección del virus en sangre, así como para la definición de enfermedad por HCMV⁴⁶.

- Viremia: se define como el aislamiento del virus en sangre, mediante técnicas de cultivo tradicional o cultivo rápido (shell-vial).
- Antigenemia: se define como la detección del antígeno pp65 en PMN.
- DNAemia: se define como la detección de DNA del HCMV en muestras de sangre, plasma, suero, sangre total o PMN aislados. Existen diferentes técnicas de detección y cuantificación del DNA y se recomienda utilizar aquellas que han sido calibradas con el calibrador estándar internacional de la OMS¹⁰¹.
- Neumonía por HCMV:
 - La neumonía probada por HCMV requiere de síntomas y/o signos clínicos de neumonía como nuevos infiltrados en las imágenes de pulmón, hipoxia, taquipnea y/o disnea, combinados con la detección de HCMV en tejido pulmonar mediante aislamiento del virus en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial), histopatología, IHQ o técnicas de hibridación del DNA.
 - La neumonía probable por HCMV requiere síntomas y/o signos clínicos de neumonía, combinados con la detección de HCMV mediante aislamiento del virus en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial) o la cuantificación del DNA del HCMV (qPCR) en muestra de BAL.
- Enfermedad gastrointestinal (GI) por HCMV:
 - La enfermedad GI probada por HCMV requiere síntomas gastrointestinales superiores y/o inferiores junto con lesiones macroscópicas en la mucosa GI, más la detección de HCMV en el tejido GI mediante histopatología, aislamiento del virus mediante cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial), IHQ o técnicas de hibridación del DNA.
 - La enfermedad GI probable por HCMV requiere síntomas gastrointestinales superiores y/o inferiores, junto con la detección del HCMV en tejido mediante histopatología, aislamiento del virus mediante cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial), IHQ o técnicas de hibridación del DNA, pero sin ser necesario la existencia de lesiones macroscópicas en

la mucosa GI. La detección de DNA de HCMV en sangre, la antigenemia o la detección de HCMV por PCR en biopsias de tejido GI no son suficientes para el diagnóstico de enfermedad GI por HCMV, aunque se observó una buena correlación entre la detección del HCMV mediante PCR y la detección por IHQ¹⁰⁵.

➤ Hepatitis por HCMV:

- La hepatitis probada por HCMV requiere pruebas de función hepática anormales más la detección de HCMV en tejido hepático mediante histopatología, IHQ, aislamiento en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial) o técnicas de hibridación de DNA, más la ausencia de otra causa documentada de hepatitis.
- La hepatitis probable por HCMV no es una categoría aceptada, debido a la existencia de factores de confusión como el rechazo agudo y crónico del aloinjerto en receptores de trasplante hepático o la enfermedad injerto contra huésped (EICH) en los TPH, así como la frecuente disfunción hepática asociada a fármacos.

➤ Retinitis por HCMV:

- La retinitis probada por HCMV requiere la presencia de signos oftalmológicos típicos de retinitis. Si la presentación es atípica, se recomienda el diagnóstico mediante detección de DNA de HCMV en líquido de humor vítreo.
- La retinitis probable por HCMV no es una categoría aceptada.

➤ Encefalitis por HCMV:

- La encefalitis probada por HCMV requiere síntomas de afectación del SNC y la detección del virus en tejido del SNC mediante aislamiento en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial), IHQ, técnicas de hibridación de DNA o cuantificación del DNA (qPCR).
- La encefalitis probable requiere síntomas de afectación del SNC más la detección del HCMV en LCR sin contaminación visible con sangre (LCR hemático) y resultados anormales de las pruebas de imagen o evidencia de encefalitis en el electroencefalograma.

➤ Otras categorías de órgano terminal o *end-organ disease*:

El HCMV también puede provocar enfermedad en otros órganos, como el miocardio o el páncreas. Para la enfermedad probada en otros órganos también se requieren la presencia de signos y/o síntomas compatibles con esa enfermedad,

junto con la detección de HCMV mediante histopatología, IHQ, asilamiento en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial) o técnicas de hibridación de DNA en el tejido de biopsia del órgano aceptado. La categoría de enfermedad probable no está aceptada para otras enfermedades por HCMV.

- Síndrome por HCMV: es una definición que solo debe utilizarse en pacientes trasplantados y no existe la categoría probada. El síndrome por HCMV probable requiere la detección de HCMV en sangre mediante aislamiento viral en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial), antigenemia o detección de DNA, junto con al menos dos de las siguientes condiciones:
 - Fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ durante al menos 2 días.
 - Malestar general nuevo o en aumento (grado de toxicidad 2) o fatiga nueva o en aumento (grado de toxicidad 3)¹⁰⁶.
 - Leucopenia o neutropenia en dos mediciones separadas con al menos 24 horas de diferencia.
 - Un recuento de 5% o más de linfocitos atípicos.
 - Trombocitopenia.
 - Elevación de las aminotransferasas hepáticas (ALT y AST) hasta dos veces superior a la normalidad (no aplicable a receptores de trasplante hepático).

2.12. Neumonía por HCMV

2.12.1. Epidemiología y factores de riesgo:

En los últimos años se ha observado una reducción de los casos de enfermedad por HCMV, en gran parte gracias a la implementación de mejores herramientas de diagnóstico, prevención y tratamiento antiviral. No obstante, a pesar de estos avances, el HCMV continúa siendo uno de los patógenos oportunistas de mayor preocupación en los pacientes inmunodeprimidos¹⁰⁷.

La neumonía por HCMV se considera una de las manifestaciones más graves de la infección por este virus, y se calcula que representa aproximadamente un tercio de los casos de enfermedad por HCMV. A pesar de los avances, ésta continúa teniendo altos índices de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeprimidos, particularmente en aquellos que tienen comprometida la inmunidad mediada por células T^{108,109}.

En los primeros años del TPH, antes de la implementación de estrategias preventivas contra el HCMV, la tasa de incidencia de neumonía causada por el HCMV solía oscilar entre un 10% y un 35% en pacientes sometidos a trasplante alogénico (alo-TPH), mientras que en receptores de trasplantes autólogos se situaba entre el 1% y el 6%. En la actualidad, los pacientes receptores de alo-TPH continúan presentando un riesgo especialmente elevado de desarrollar neumonía por HCMV, con una incidencia extremadamente variable (entre el 1% y el 30%) y una tasa de mortalidad que puede alcanzar el 70%. La mayoría de los episodios de neumonía por HCMV siguen produciéndose durante el periodo postrasplante temprano (\leq día +100). Sin embargo, se ha registrado un aumento de la cantidad de casos que se producen en el periodo tardío (después del día +100)^{109,110}.

En los pacientes sometidos a TPH, la neumonía por HCMV se produce con mayor frecuencia en los siguientes casos^{111,112}:

- El factor de riesgo más importante de neumonía por HCMV es el estado serológico tanto del paciente como del donante. Los receptores seropositivos que reciben un injerto de un donante seronegativo al HCMV son los que presentan un mayor riesgo. Por otro lado, si ambos son seronegativos, la incidencia de enfermedad por HCMV se reduce significativamente, registrándose en menos del 1% de los casos^{113,114}. Es importante tener en cuenta que, en pacientes sometidos a tratamientos altamente inmunosupresores, como las terapias con células CAR-T, se debe considerar el estado serológico frente al HCMV al momento del diagnóstico de la enfermedad, en lugar de basarse únicamente en los resultados previos al trasplante. Esto se debe a que la alteración del sistema inmunológico de estos pacientes puede llevar a resultados serológicos falsamente negativos, lo que podría llevar a subestimar el riesgo real de infección por HCMV.
- Las complicaciones post-trasplante también afectan al riesgo de neumonía por HCMV. El desarrollo de EICH aguda y crónica se asocia con el desarrollo de enfermedad por HCMV. Esta relación también se extiende a los pacientes que experimentan una reactivación del HCMV durante los primeros tres meses tras el TPH, así como aquellos que presentan linfopenia persistente en el día +100 o un recuento bajo de CD4^{113,115}.
- La estrategia inmunosupresora utilizada en la profilaxis de EICH también es importante. Se ha observado que las terapias con células T y el micofenolato de mofetilo retrasan la respuesta de las células T específicas del HCMV, lo que a su vez aumenta la probabilidad de complicaciones relacionadas con el HCMV. En

contraste, el sirolimus puede tener un papel protector en la infección por HCMV^{113,116}.

En los pacientes receptores de órgano sólido, el HCMV también destaca como el patógeno vírico más frecuente en todos los tipos de trasplante. La transmisión del virus puede tener lugar a través de la transferencia en el órgano trasplantado o mediante la reactivación del virus latente en el receptor. Los receptores seronegativos que reciben un órgano de donantes seropositivos son los que tienen más riesgo tanto de desarrollar enfermedad por HCMV como de que ésta sea más grave. En la mayoría de casos, la infección ocurre en los primeros tres meses del trasplante, aunque puede retrasarse en los pacientes que reciben profilaxis^{110,117}.

En este grupo de pacientes, la incidencia de neumonía por HCMV varía en función de varios factores, incluido el tipo de órgano trasplantado. Entre estos factores, la incidencia más alta se produce en los pacientes trasplantados de pulmón (15-55%), mientras que en otros tipos de trasplante la incidencia es más baja (0-9,2% entre los receptores de trasplantes hepáticos, del 0,8-6,6% entre los receptores de trasplantes cardíacos y de menos del 1% entre los receptores de trasplantes renales)^{110,118-121}.

2.12.2. Diagnóstico de la neumonía por HCMV:

Los hallazgos radiológicos y los síntomas clínicos de la neumonía por HCMV tienden a ser inespecíficos, lo que con frecuencia dificulta y retrasa su diagnóstico. En las radiologías de tórax, la neumonía por HCMV se manifiesta típicamente como infiltrados intersticiales difusos u opacificación en vidrio deslustrado, aunque en ocasiones se puede observar un patrón nodular o infiltrados pulmonares totalmente inespecíficos^{122,123}.

Como se ha mencionado previamente, con el propósito de establecer definiciones precisas y unificadas sobre la infección y enfermedad por HCMV, se elaboró un informe de consenso en la Cuarta Conferencia Internacional sobre HCMV, celebrada en París en 1993. Desde entonces, se han logrado avances significativos en el diagnóstico y el tratamiento de la infección por HCMV, lo que ha dado lugar a varias actualizaciones de estas definiciones, siendo la más reciente en 2017. En este documento, se establece la definición para el diagnóstico de la neumonía probada por HCMV, para el cual es necesario la presencia de síntomas y/o signos clínicos de neumonía (nuevos infiltrados en las imágenes pulmonares, hipoxia, taquipnea y/o disnea), combinados con la detección de HCMV en el tejido

pulmonar mediante diferentes métodos como el aislamiento del virus en cultivo tradicional, cultivo rápido (shell-vial), histopatología, IHQ o técnicas de hibridación del DNA. Adicionalmente, el documento también aborda la definición de neumonía probable por HCMV. Para este diagnóstico, se requieren síntomas y/o signos clínicos de neumonía, conjuntamente con la detección de HCMV a través del aislamiento del virus en cultivo, cultivo rápido o mediante la cuantificación del DNA del HCMV (qPCR) en muestra de BAL⁶³.

El diagnóstico de neumonía probada implica la necesidad de obtener tejido pulmonar a través de una biopsia. Sin embargo, esta es una técnica invasiva que a menudo está contraindicada, especialmente en los pacientes receptores de TPH. En vista de esta limitación, en los últimos años, ha ganado terreno el empleo de muestras de BAL como una alternativa para el diagnóstico de neumonía, lo cual está ampliamente aceptado en la actualidad¹²⁴.

Las técnicas consideradas *gold standard* en los laboratorios para la detección del HCMV, como el cultivo tradicional o el shell-vial, han sido reemplazadas en la mayoría de los laboratorios por las técnicas de PCR, ya que son más sencillas y permiten una respuesta más rápida. Además, las técnicas de PCR han demostrado tener una sensibilidad y un valor predictivo negativo superior que las técnicas basadas en el cultivo para el diagnóstico de neumonía por HCMV, aunque son menos específicas de enfermedad¹²⁵. No obstante, es importante resaltar que la detección de HCMV mediante PCR en BAL no siempre se asocia con la presencia de infección activa en pulmón. En pacientes seropositivos, esto también puede ser resultado de la detección de DNA sin replicación activa, HCMV latente o infección asintomática. De hecho, se ha visto que la detección de HCMV en BAL mediante PCR es bastante común en personas sin enfermedad por HCMV, especialmente en los pacientes post-TPH¹²⁶.

El uso generalizado de las técnicas de PCR y la posible interpretación errónea de sus resultados pueden llevar a un sobrediagnóstico de la enfermedad por HCMV y, en consecuencia, al sobretratamiento¹²⁶. Con el propósito de facilitar la interpretación de los resultados positivos para HCMV en las PCR cualitativas en muestras de BAL y distinguir entre pacientes con neumonía por HCMV y aquellos que no la tienen, se introdujo el uso de las qPCR en muestras de BAL para el diagnóstico de la neumonía (probable)¹²⁷. Sin embargo, las qPCR de HCMV en BAL, al igual que pasa en las muestras de sangre, presentan la limitación principal de que todavía no se ha conseguido establecer un valor

de CV universal que permita discernir a los pacientes con enfermedad por HCMV o que permita guiar diversas aplicaciones clínicas⁹⁹.

Durante los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios con el objetivo principal de establecer un valor óptimo de carga de HCMV en BAL que permita diferenciar a los pacientes con neumonía de aquellos que no la padecen¹²⁵⁻¹³⁸. Una conclusión que prevalece en estos estudios es que la carga promedio de HCMV en BAL fue significativamente superior en los pacientes con neumonía en comparación con aquellos sin neumonía. Sin embargo, los valores de CV obtenidos en estos estudios presentan una notable variabilidad. Todos ellos también coincidieron en señalar la dificultad que representa establecer este valor de CV universal indicativa de replicación activa de HCMV en pulmón. La discrepancia en resultados y conclusiones entre los estudios publicados puede atribuirse a múltiples factores, como la diversidad en los métodos empleados, la falta de empleo de técnicas de referencia para contrastar los resultados obtenidos o la baja incidencia global de esta enfermedad. Adicionalmente, existen diversos factores inherentes al HCMV, a la muestra recolectada, a la técnica de qPCR utilizada y a las características del paciente que pueden influir en los resultados de la CV obtenidos mediante qPCR en las muestras de BAL.

Además de la cuantificación de DNA de HCMV en BAL, algunos investigadores también han explorado las implicaciones de cuantificar el DNA de HCMV en sangre (DNAemia) como método para el diagnóstico de la neumonía por HCMV^{127,128,130-132,134,137,138}. De igual forma que ocurre con las muestras de BAL, no se han alcanzado conclusiones definitivas y existen discrepancias en los resultados publicados. No obstante, la mayoría de los estudios concuerdan en que las muestras de BAL son más efectivas que las de plasma para el diagnóstico de esta enfermedad.

2.13. Prevención y tratamiento de la infección por HCMV

2.13.1. Prevención:

Existen dos estrategias principales para prevenir la infección por HCMV en individuos que presentan alto riesgo, como los pacientes receptores de TOS o TPH. La elección entre estas estrategias depende en gran medida del nivel de riesgo específico que tiene cada individuo de sufrir una infección por HCMV. Este riesgo viene dado fundamentalmente por el estado serológico frente a HCMV tanto del donante como del receptor antes del trasplante, así como

por el tipo de trasplante^{139,140}. En pacientes sometidos a tratamientos altamente inmunosupresores, se debe considerar el estado serológico frente al HCMV al momento del diagnóstico de la enfermedad, en lugar de basarse únicamente en los resultados previos al trasplante. Las dos posibles estrategias son:

- **Profilaxis universal:** implica la administración de antivirales eficaces durante los primeros meses después del trasplante, normalmente entre 3 a 6 meses. Se aplica incluso en ausencia de sospecha clínica y sin datos microbiológicos que indiquen una infección. Esta estrategia se prefiere en pacientes con un mayor riesgo. El antiviral más utilizado en profilaxis después del TOS es el Valganciclovir (VGCV), ya que puede administrarse vía oral, y en ocasiones el Ganciclovir (GCV) que requiere administración intravenosa. En los receptores de alo-TPH seropositivos se emplea Letemovir (LMV) como profilaxis¹³⁹.
- **Terapia anticipada:** involucra la monitorización semanal de la CV de HCMV en plasma o en sangre durante las primeras semanas o meses tras el trasplante, incluso en ausencia de sospecha clínica de infección. Se iniciará el tratamiento antiviral si se detecta una CV del virus por encima de cierto umbral, el cual deberá individualizarse en cada caso, ya que no hay establecido un valor de CV universal que determine cuando deberá iniciarse el tratamiento. Un punto crítico tanto en la terapia anticipada como en el seguimiento de la CV una vez que se inicia el tratamiento es asegurarse de que la monitorización de la viremia de HCMV en una persona se realice siempre utilizando el mismo tipo de muestra (plasma o sangre total), así como la misma metodología de qPCR en el laboratorio. Esto es esencial para minimizar la variabilidad en las mediciones de la CV entre distintas determinaciones¹⁴¹.

2.13.2. Tratamiento

Existen varios antivirales disponibles para el tratamiento de la infección o enfermedad por HCMV. Estos medicamentos actúan en diferentes fases del ciclo de replicación del virus (Figura 9)¹⁴². En aquellos casos en los que sea posible, además de la administración de antivirales, es importante considerar la opción de reducir la inmunosupresión como medida para que el sistema inmune frene la replicación del virus.

- **Ganciclovir (GCV) y Valganciclovir (VGCV):** se consideran fármacos de primera línea para el tratamiento de la infección por HCMV, y también están aprobados para la profilaxis. El VGCV es el profármaco del GCV y se administra vía oral. El GCV se

administra principalmente vía intravenosa, ya que la biodisponibilidad de la vía oral es muy baja. Ambos son análogos de la guanosina, y para adquirir su forma activa requieren de una primera fosforilación intracelular por una proteína vírica codificada por UL97 y dos fosforilaciones celulares posteriores. Estos fármacos actúan bloqueando la síntesis de DNA viral al inhibir la DNA polimerasa del virus, codificada por UL54. El principal efecto adverso de ambos es la mielosupresión y la leucopenia, lo cual es especialmente preocupante en pacientes sometidos a un TPH^{143,144}. Ambos han demostrado tasas de éxito similares en la erradicación de la viremia y no presentan diferencias significativas en los efectos secundarios. Por lo tanto, se recomienda utilizar el VGCV vía oral tanto en la profilaxis como en el tratamiento, y reservar la terapia intravenosa con GCV para los casos de enfermedad grave¹⁴⁵.

- **Foscarnet (FOS):** es un fármaco considerado de segunda línea en el tratamiento de la infección por HCMV, utilizado principalmente en la enfermedad por HCMV resistente o refractaria, o cuando VGCV o GCV no solo tolerados. Es un análogo del pirofosfato que no requiere activación intracelular. Actúa inhibiendo la síntesis del DNA viral al funcionar como terminador de la cadena, bloqueando el sitio de unión del pirofosfato en la DNA polimerasa del HCMV. Se administra vía intravenosa y los efectos secundarios más importantes son la nefrotoxicidad y alteraciones bioquímicas¹⁴³.
- **Cidofovir (CDV):** es un fármaco considerado de segunda línea en el tratamiento de la infección por HCMV, utilizado especialmente en la enfermedad por HCMV resistente o refractaria, o cuando VGCV o GCV no solo tolerados. El CDV es un análogo no cíclico del monofosfato de citidina, que no requiere fosforilación inicial por una cinasa vírica, sino que depende de la fosforilación por cinasas celulares para su activación. El CDV difosfato actúa como inhibidor de la DNA polimerasa actuando como terminador de cadena. Se administra vía intravenosa, y la nefrotoxicidad es el principal efecto secundario, que requiere la administración de probenecid y fluidos para prevenir la insuficiencia renal¹⁴³. El Brincidofovir, profármaco oral del CDV, inicialmente se presentó como una alternativa más segura debido a su capacidad para evitar la toxicidad renal. Sin embargo, en la práctica, se ha observado que este medicamento con frecuencia provoca enterocolitis farmacológica, lo que ha limitado su desarrollo clínico y su uso generalizado.
- **Letemovir (LMV):** aprobado por la FDA en 2018 para la profilaxis del HCMV en adultos seropositivos receptores de TPH¹⁴⁶. No está indicado para el tratamiento de la enfermedad por HCMV, ya que ha mostrado una baja barrera de resistencia *in vitro* e *in vivo*. Actualmente, se está estudiando su uso como profilaxis en los receptores de

TOS¹⁴⁷. LMV actúa inhibiendo la escisión de los concatémeros de DNA viral y la formación de viriones de HCMV maduros, dirigiéndose a la subunidad UL56 del complejo terminasa. El LMV presenta alta selectividad y efectividad a bajas concentraciones, mostrando una potencia 100 veces mayor que GCV contra HCMV, mostrando efectividad incluso contra aislados virales resistentes a los inhibidores de la DNA polimerasa. Además, las combinaciones de LMV con GCV y CDV presentan efectos aditivos, lo que sugiere que las combinaciones con otros agentes antivirales podrían ser una estrategia valiosa en el tratamiento de infecciones por HCMV. Se puede administrar vía oral o intravenosa y generalmente es bien tolerado. Los efectos secundarios más frecuentes incluyen náuseas, diarrea, vómitos, tos, dolor de cabeza, fatiga y dolor abdominal^{142,146}.

- Maribavir (MBV): aprobado por la FDA en 2021 para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos con infección o enfermedad por HCMV postrasplante que han experimentado efectos adversos a tratamientos con GCV o FOS, en los cuales su uso está desaconsejado, o en aquellos casos de infección refractaria al tratamiento (con o sin resistencia genotípica) con GCV/VGCV, CDV o FOS. MBV es un L-ribósido de benzimidazol, y actúa como un inhibidor competitivo de la unión ATP a la quinasa UL97 del virus, y no requiere fosforilación intracelular para ser activo. Actúa bloqueando la actividad quinasa de UL97, lo que provoca defectos en el ciclo de replicación viral. El MBV no debe ser administrado simultáneamente con GCV/VGCV, ya que ambos antivirales requieren de la activación por UL97 para ser efectivos. Por otro lado, las terapias combinadas de MBV con CDV, FOS y LMV presentaron efectos sinérgicos contra cepas de HCMV. Se administra vía oral y el efecto secundario más frecuente de la MBV es la disgeusia^{142,148}.

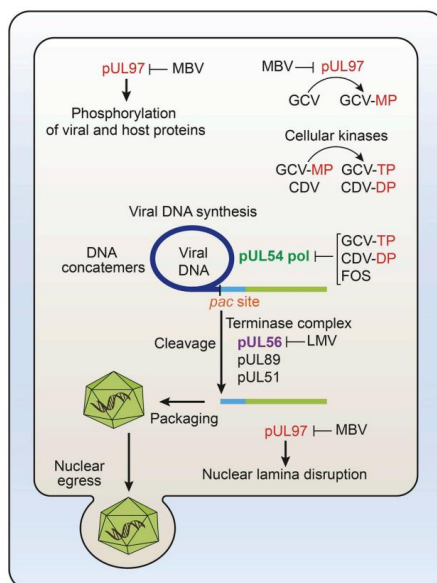


Figura 9. Mecanismo de acción de los antivirales disponibles para la infección por HCMV. De Piret et al¹⁴².

Durante el tratamiento de la infección o la enfermedad por HCMV, es esencial monitorizar la DNAemia una o dos veces por semana, preferiblemente mediante técnicas de qPCR a tiempo real, hasta que la CV sea negativa o muy baja en una o dos determinaciones. Es importante que, para un paciente en particular, la monitorización de la CV se realice sistemáticamente utilizando el mismo método de extracción de DNA, el mismo ensayo de qPCR y el mismo tipo de muestra. Tras la negativización de la DNAemia, la profilaxis secundaria no ha demostrado ser efectiva y sólo se recomienda en situaciones de alto riesgo. Sí se recomienda continuar la monitorización de la carga de HCMV semanalmente con el objetivo de reiniciar la terapia antiviral si la CV alcanza niveles significativos nuevamente. No existe consenso sobre la CV a partir de la cual debe iniciarse el tratamiento antiviral, ya que el punto de corte puede adaptarse en función de los factores de riesgo específicos de cada paciente^{108,139}.

3. SARS-CoV-2

3.1. Introducción

El Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2* es el virus causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Fue identificado y aislado por primera vez a finales del año 2019 en Wuhan, China¹⁴⁹. En las semanas posteriores, la propagación del virus se aceleró rápidamente por todo el mundo, por lo que el 11 de marzo del 2020, con 114 países afectados y más de 100.000 casos confirmados, la OMS declaró la COVID-19 como una pandemia, situación que continúa presente más de tres años después, si bien en mayo del 2023 la OMS anunció el cese de la emergencia internacional asociada a esta enfermedad¹⁵⁰.

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*. Esta subfamilia se divide en cuatro géneros (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*), y se conocen comúnmente como coronavirus o CoV, debido a su apariencia de corona cuando se observa al microscopio electrónico (Foto 2)¹⁵¹. Son virus esféricos de 125nm de diámetro, envueltos y tienen un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva de gran tamaño, que va desde 26.000 a 32.000 pb.

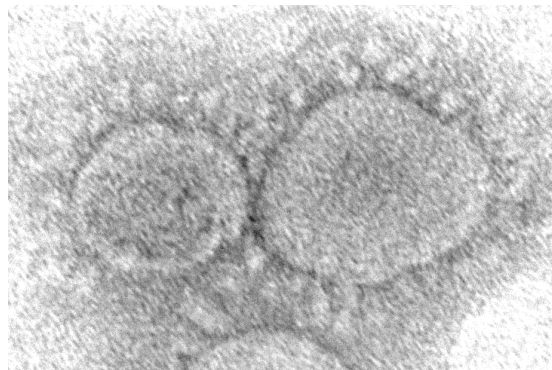


Foto 2. Partícula de SARS-CoV-2 al microscopio electrónico. De CDC/ Hannah A. Bullock and A.Tamin¹⁵¹.

Todos los CoV son virus zoonóticos, y hasta este momento se han identificado siete coronavirus con capacidad de infectar a los seres humanos (HCoV). De estos, dos pertenecen al género *Alphacoronavirus* (HCoV 229E y HCoV NL63), y los otros cinco al género *Betacoronavirus* (HCoV OC43, HCoV HKU1, SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV) (Figura 10)¹⁵².

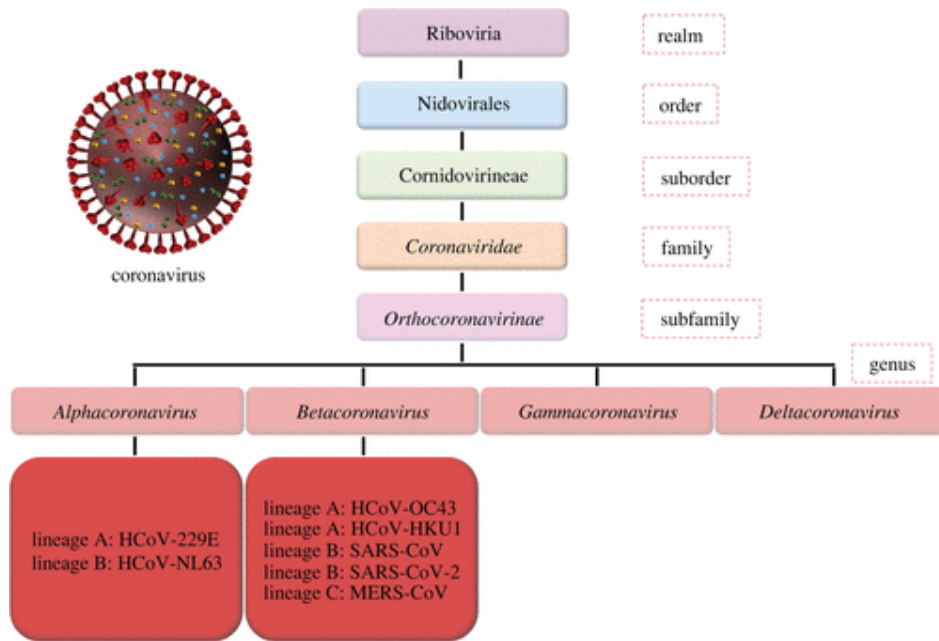


Figura 10. Clasificación de los coronavirus. De Aydogdu MO. et al.¹⁵²

Los primeros HCoV fueron descubiertos en 1965 (HCoV 229E y HCoV OC43) en el tracto respiratorio de pacientes con resfriado común. Posteriormente, en la década de los 2000, se identificaron los otros HCoV restantes (Figura 11)^{153,154}.

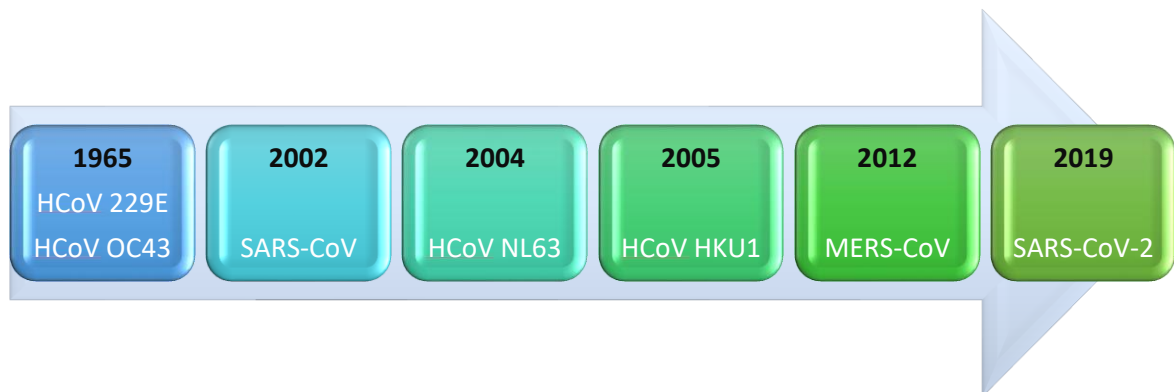


Figura 11. Cronología de los HCoV.

El hospedador natural de la mayoría de los coronavirus es el murciélago, por lo que existe elevada similitud genética entre los coronavirus de estos mamíferos y los HCoV¹⁵⁵. Como ejemplo, mediante secuenciación se ha demostrado una homología genética del 88% entre el SARS-CoV-2 y dos coronavirus del murciélago (bat-SL-CoVZC45 y bat-SL-CoVZXC21)¹⁵⁶. Diferentes animales salvajes actúan como hospedadores intermediarios, facilitando la aparición de estos virus en los humanos (Figura 12)¹⁵⁷. Para algunos HCoV se ha definido cuál

es el hospedador intermediario, como la civeta en el SARS-CoV o el camello en el MERS-CoV, mientras que en otros no ha sido posible identificarlo^{154,158}. El hospedador intermediario del SARS-CoV-2 sigue sin estar del todo claro, ya que se ha visto que puede infectar a diversos animales, pero gracias a los estudios de secuenciación, la teoría más aceptada considera al pangolín como el hospedador intermediario del SARS-CoV-2 responsable de la COVID-19¹⁵⁹.

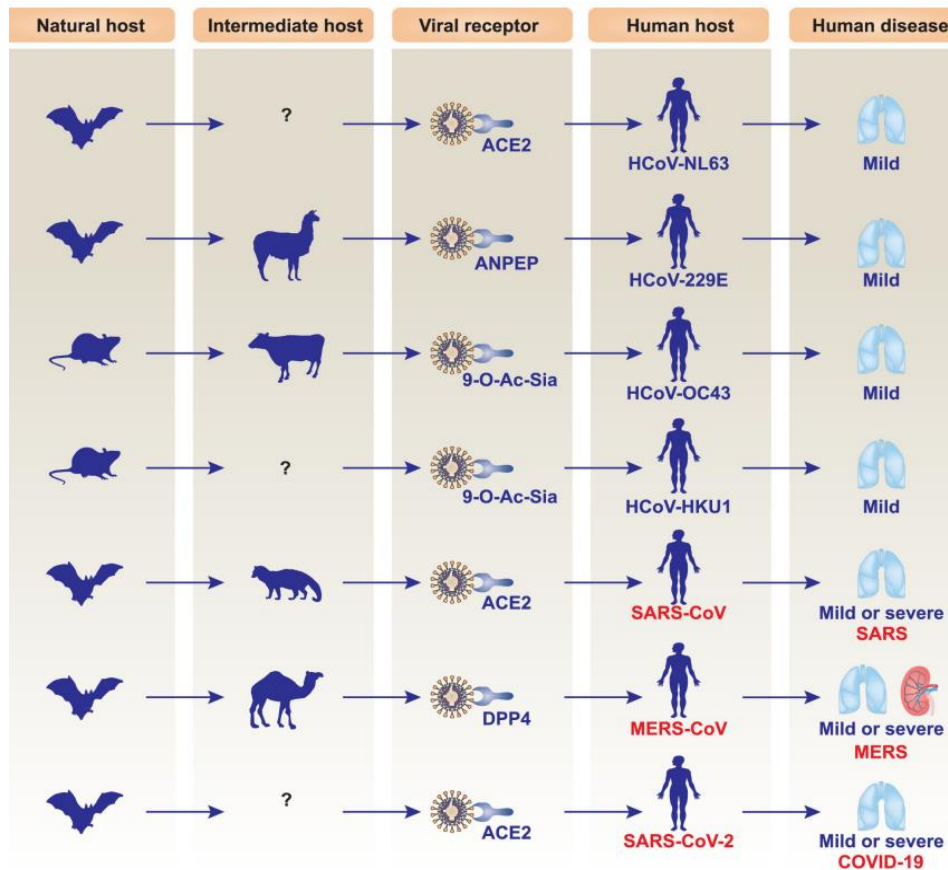


Figura 12. Hospedadores de HCoV y consecuencias de su infección. De D. Tang et al.¹⁵⁷

Cuatro HCoV (HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NL63 y HCoV HKU1) causan infecciones respiratorias leves en pacientes inmunocompetentes (Figura 12). Tienen una distribución mundial y tienden a transmitirse predominantemente durante los meses más fríos del año. Se consideran los agentes causantes de aproximadamente el 30% de los resfriados comunes^{160,161}. Sin embargo, los otros 3 HCoV, SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, se asocian con cuadros respiratorios epidémicos que pueden llegar a ser más graves (Figura 12). El SARS-CoV (coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave) se descubrió en China en 2002, afectó a 8000 personas en 29 países y tuvo una mortalidad de aproximadamente el 10%. El último caso detectado fue en 2003. El MERS-CoV se descubrió en Arabia Saudí en 2012 y todavía sigue

habiendo algunos casos en esa región. Desde ese momento se han reportado unos 2600 casos en 27 países, con una mortalidad cercana al 40%¹⁶¹⁻¹⁶³. El SARS-CoV-2, desde finales de 2019 ha infectado a más de 600 millones de personas en todo el mundo y ha matado a casi 7 millones. La incidencia, la gravedad de las infecciones y la mortalidad han ido variando a lo largo de los 3 años de pandemia, principalmente como consecuencia de la inmunización y de la aparición de nuevas variantes^{164,165}.

3.2. Estructura y genoma del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto que contiene un genoma no segmentado de RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA). El tamaño del genoma es de aproximadamente 30.000 pb, lo que lo convierte en el más largo de los virus RNA. Mediante secuenciación se observó que el genoma del SARS-Co-2 tiene una homología del 79% con el SARS-CoV y un 50% con el MERS-CoV¹⁶⁶. La microscopía electrónica mostró que los viriones tienen forma esférica con cierto pleomorfismo y glicoproteínas que salen de la superficie dándole el aspecto característico de corona, y tienen un tamaño que varía entre 60-140 nm de diámetro^{167,168}.

El genoma del SARS-CoV-2 (Figura 13) posee dieciséis ORF. Dos ORF superpuestos (ORF1a y ORF1b) que siguen al extremo 5' y ocupan los primeros dos tercios del genoma, codifican dieciséis proteínas no estructurales (nsp1-16). El otro tercio del genoma, que precede al extremo 3' (ORF10 y 11), codifica cuatro proteínas estructurales que incluyen la proteína de superficie o *spike* (S), de envoltura (Env), de membrana (M) y de nucleocápside (N). Además, los genes estructurales codifican nueve proteínas accesorias (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 10), codificadas por los genes ORF3a, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF14 y ORF10^{169,170}.

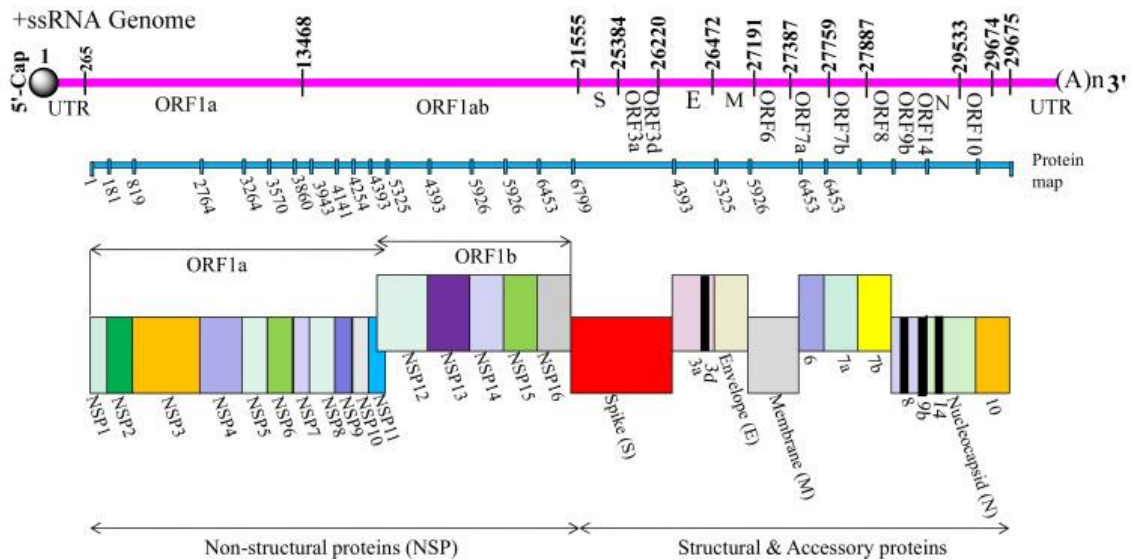


Figura 13. Organización genómica del SARS-CoV-2. De Yadav R.¹⁷⁰

Las proteínas no estructurales (nps) tienen un papel importante en múltiples funciones importantes de ciclo vital del SARS-CoV-2. Participan en la replicación, ya que incluyen varias proteínas de replicación como la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), la RNA helicasa y exorribonucleasa (ExoN), así como en la transcripción y en la traducción. Además, algunas nps modulan también la inmunidad del huésped^{171,172}.

Las proteínas estructurales (S, Env, M y N) forman el virión de SARS-CoV-2 (Figura 14)¹⁷³. Múltiples copias de la glicoproteína S están insertadas en la membrana de virión, dándole el aspecto de corona y mediando la entrada de las partículas víricas en las células. Es el componente más inmunogénico del SARS-CoV-2. Se compone de dos unidades funcionales (S1 y S2). La subunidad S1, expuesta a la superficie, está formada por el dominio N-terminal (NTD) y el dominio de unión al receptor (RBD) y es la que se une al receptor de la célula huésped. La subunidad S2 actúa como proteína de fusión, facilitando la fusión del virión en la membrana de la célula¹⁷⁴. La proteína Env es un pequeño polipéptido que está implicada en muchos aspectos del ciclo de replicación viral a través de la formación de oligómeros y viroporinas que permeabilizan la membrana celular¹⁷⁵. Las viroporinas son capaces de transportar selectivamente iones como el Ca^{2+} y participar en el ensamblaje y liberación de partículas víricas de las células huésped¹⁷⁶. La glicoproteína M es el componente más abundante en los CoV. Desempeña un papel importante en el ensamblaje viral, la morfogénesis, la homeostasis interna y el metabolismo energético del virus¹⁷⁷. Por último, la glicoproteína N, que está unida al RNA formando la nucleocápside, participa en la organización del genoma viral y

empaquetamiento del RNA viral en la ribonucleocápside, facilita el ensamblaje del virión y mejora la eficiencia de la transcripción y replicación del virus¹⁷⁸.

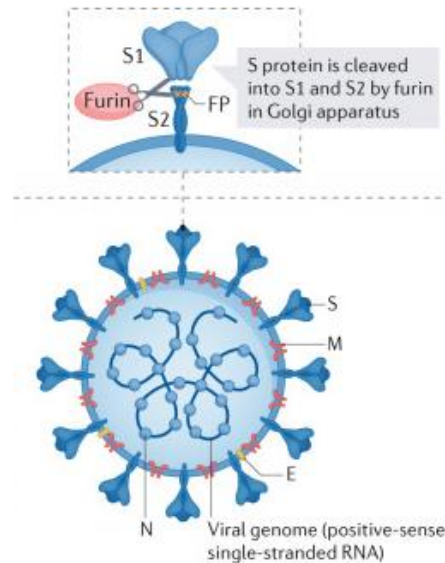


Figura 14. Estructura del SARS-CoV-2. De Cody B. Jackson¹⁷³

3.3. Tropismo celular del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 infecta las células mediante la unión de la proteína S de su superficie con el enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2) presente en la membrana de la célula huésped. Esta interacción exhibe una afinidad 10-20 veces mayor que la del SARS-CoV, lo que provoca que el SARS-CoV-2 tenga una capacidad de transmisión más eficiente¹⁷⁹. Además, para que el virus penetre en la célula y dé inicio la patogénesis, es esencial la coexpresión tanto del enzima ACE2 como de la serina proteasa transmembrana de tipo II (TMPRESS2)¹⁸⁰.

El SARS-CoV-2 presenta un tropismo preferente hacia las células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior, que incluyen las células en la nariz, la garganta y los pulmones. Sin embargo, se ha observado que el virus puede afectar una variedad de tejidos y órganos en el cuerpo, lo que contribuye a la amplia diversidad de síntomas y complicaciones en pacientes con COVID-19. Esto es resultado de la presencia del receptor ACE2 en las membranas celulares de múltiples órganos, como los pulmones, las arterias, los riñones, el corazón, el cerebro y el intestino, lo que los hace susceptibles a la infección por el SARS-CoV-2¹⁸¹.

3.4. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2

En el ciclo replicativo del SARS-CoV-2 se pueden diferenciar diferentes fases, empezando por la entrada del virión en la célula huésped y terminando con la liberación y maduración de nuevas partículas víricas infectivas (Figura 15)¹⁸².

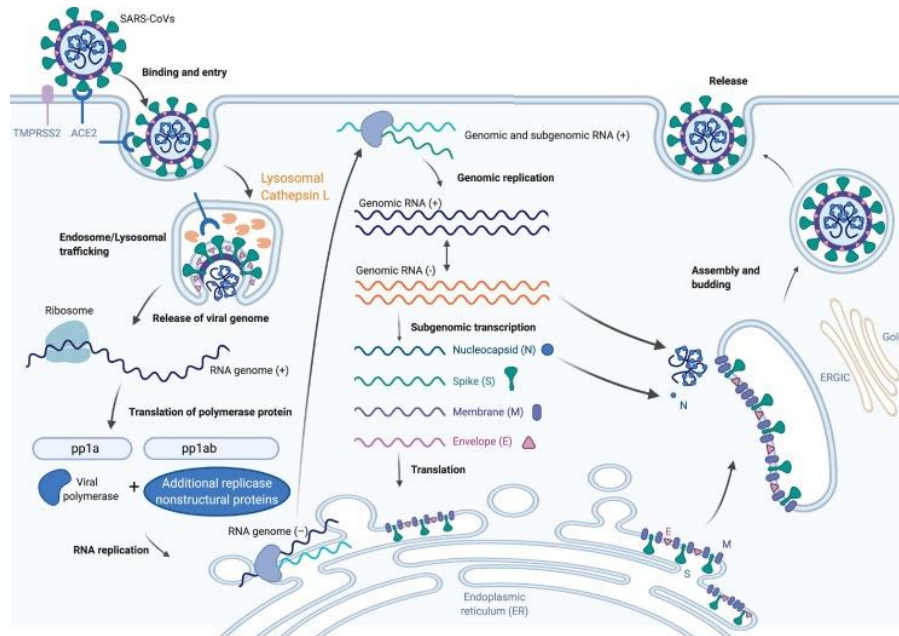


Figura 15. Ciclo replicativo del SARS-CoV-2. De Harrison AG¹⁸².

3.4.1. Penetración del virus:

La entrada del virus en la célula huésped, que incluye la adhesión y fusión, está mediada por la proteína S. La diana de la superficie celular a la que se une el virus es el receptor ACE2, que está presente en las células de múltiples órganos como pulmones o corazón. Es el RBD de la subunidad S1 la parte de la proteína S del virus que se une específicamente al receptor ACE2, mientras que la subunidad S2 ancla la proteína a la membrana^{182,183}. Además, para que se produzca la fusión entre las membranas de la célula y del virus y la entrada, se requiere la activación y escisión de la proteína S por dos sitios. La escisión está mediada por furina, abundante en el tracto respiratorio, y por la TMPRSS2 del huésped, una quimotripsina que se expresa en próstata, glándula salival, colon y estómago. Todo esto provoca cambios conformacionales sutiles, la entrada del virus mediante endocitosis y liberación del genoma en el citoplasma celular^{173,184}.

3.4.2. Expresión de genes virales y síntesis de ARN:

La liberación del genoma del SARS-CoV-2 en el citoplasma de la célula huésped marca el inicio de un complejo programa de expresión génica viral altamente regulado. La traducción de ORF1a y ORF1b a partir del RNA genómico produce dos poliproteínas, pp1a y pp1ab, respectivamente. Dieciséis proteínas no estructurales (nsp1-16) se liberan tras la escisión proteolítica por dos proteasas que se encuentran dentro de nsp3 y nsp5. La liberación proteolítica de nsp1 se produce rápidamente y se dirige a la maquinaria de traducción de la célula huésped. El resto (nps2-16) componen el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) viral, que contiene las funciones enzimáticas principales de la replicación del RNA, la transcripción de los RNA subgenómicos (sgRNA) y la corrección del RNA. La síntesis de RNA se lleva a cabo por la RdRp que reside en nsp12, y sus dos cofactores nsp7 y nsp8¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

La replicación genómica viral se inicia mediante la síntesis de copias de RNA de sentido negativo que funcionan como moldes para la generación de nuevo RNA genómico de sentido positivo. La traducción de estos genomas recién sintetizados se utiliza para generar más nsp y RTC o se empaquetan en nuevos viriones. Una característica de los CoV es la transcripción viral discontinua durante la síntesis de RNA de cadena negativa, que produce un conjunto de sgRNA coterminales anidados en 3' y 5', que finalmente se traducen en proteínas estructurales y accesorias¹⁸⁸.

3.4.3. Expresión de proteínas estructurales y accesorias:

Los ORF que codifican las proteínas estructurales (S, Env, M, y N) se encuentran en el tercio 3' del genomas del SARS-CoV-2. Intercalados entre estos ORF están los ORF que codifican las proteínas accesorias. La proteína N que se sintetiza por ribosomas libres del citoplasma, y el resto de las proteínas estructurales y accesorias son sintetizadas por los ribosomas ligados al retículo endoplásmico (ER) desde donde son secretadas al aparato de Golgi (AG)^{182,183}.

3.4.4. Ensamblaje y liberación del virión:

En el AG se produce el ensamblaje entre RNA genómico viral recién sintetizado y las proteínas para dar lugar a virus maduros, que se desplazan a la superficie de la célula en vesículas y son liberados por exocitosis^{182,183}.

3.5. RNA subgenómico del SARS-CoV-2

Durante la transcripción del SARS-CoV-2 en el citoplasma de la célula huésped, tiene lugar la generación de sgRNA a partir de intermediarios de RNA genómico de sentido negativo¹⁸⁹. Estos sgRNAs son intermediarios transcripcionales, susceptibles a la degradación enzimática, y se cree que no se empaquetan en el virión final, por lo que sólo se producen durante la replicación viral. Los sgRNAs del SARS-CoV-2 codifican las 4 proteínas estructurales principales (S, Env, M, N), así como varias proteínas accesorias (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 10)¹⁹⁰ (Figura 15)¹⁸².

Estudios realizados en cultivos con células VERO E6 y posteriormente confirmados mediante secuenciación en muestras clínicas, han mostrado que no todos los tipos de sgRNA generados están en la misma proporción. Los sgRNA S, Env, M, N, ORF6, ORF7a están presentes en niveles más altos y los ORF7b y ORF10 en niveles bajos¹⁹¹. Así mismo, también se demostró que el N sgRNA es más abundante que el Env sgRNA y persiste durante periodos más largos¹⁹².

3.6. Epidemiología y prevalencia de la infección por SARS-CoV-2

El 31 de diciembre de 2019 las autoridades sanitarias de la ciudad de Wuhan, China, notificaron la existencia de 27 casos similares de neumonía de origen desconocido. La mayoría de estos pacientes tenían un vínculo epidemiológico reciente con un mercado mayorista de mariscos de esa ciudad¹⁹³. El 7 de enero se consiguió aislar el virus causante de estas neumonías, y el 12 de enero se consiguió secuenciar su genoma, lo que permitió conocer que se trataba de un nuevo coronavirus, nombrado temporalmente como "2019-nCoV". Unas semanas más tarde, el "Comité Internacional de Taxonomía de Virus" (ICTV) le asignó el nombre definitivo tanto al virus como a la enfermedad causada por el mismo, SARS-CoV-2 y COVID-19 respectivamente¹⁹⁴.

El 13 de enero del 2020 se notificó en Tailandia el primer caso de COVID-19 fuera de China, y el 15 de enero en Japón. Los primeros casos fuera de China fueron en personas que habían viajado recientemente a este país, pero posteriormente se empezaron a notificar casos en personas sin relación epidemiológica con China¹⁵⁷.

El 30 de enero de 2020 la OMS declaró la situación del SARS-CoV-2 como emergencia de Salud Pública Internacional, con más de 7000 casos y 170 muertos en China. En ese momento, en el resto del mundo ya se habían confirmado casos en 18 países, y el número de infecciones y su distribución en diferentes regiones siguió aumentando rápidamente. En marzo de 2020 el virus había infectado a más de 100.000 personas en 114 países, lo que llevó a la OMS a declarar el

estado de pandemia el 11 de marzo¹⁴¹. En España, el 14 de marzo de 2020, se declaró el estado de alarma en todo el territorio, cuando había confirmados 6.000 casos y 200 fallecidos.

A nivel mundial, se establecieron diversas estrategias para intentar frenar los contagios, como el uso de mascarillas, distanciamiento social, restricciones de movilidad o confinamientos, pero no fueron suficientes para frenar la expansión del virus. A finales del 2020 se autorizaron diferentes vacunas contra el SARS-CoV-2, mostrando un gran impacto sobre todo en la reducción de casos graves y en la mortalidad por COVID-19. La tasa de vacunación fue desigual en los diferentes regiones del mundo, ya que el suministro de vacunas fue menor en países de baja renta^{195,196}.

Más de tres años después, en octubre de 2023 se han confirmado más de 771 millones de infecciones en el mundo y 6,9 millones de muertos. Es muy probable que los datos reales sean considerablemente superiores a los informados oficialmente, como consecuencia del infradiagnóstico e infranotificación de casos, especialmente en los últimos meses de pandemia. La evolución de la incidencia y la tasa de mortalidad han ido variando durante los estos 3 años, y también ha sido variable entre diferentes regiones geográficas. Globalmente, el continente más afectado en cuanto a número de casos ha sido Europa (Figura 16)¹⁹⁷, y en número de fallecidos América (Figura 17)¹⁹⁷.

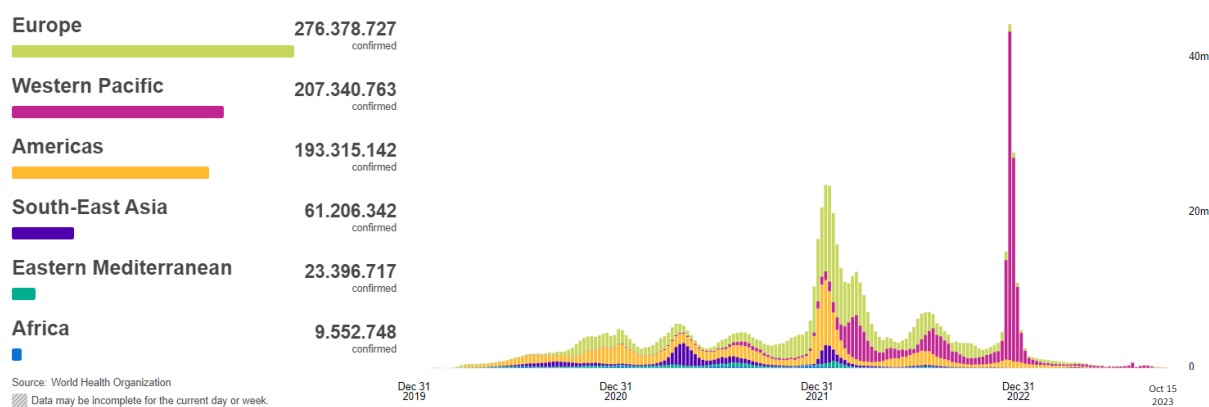


Figura 16. Casos confirmados de SARS-CoV-2 por región, según datos de la OMS (octubre 2023)¹⁹⁷

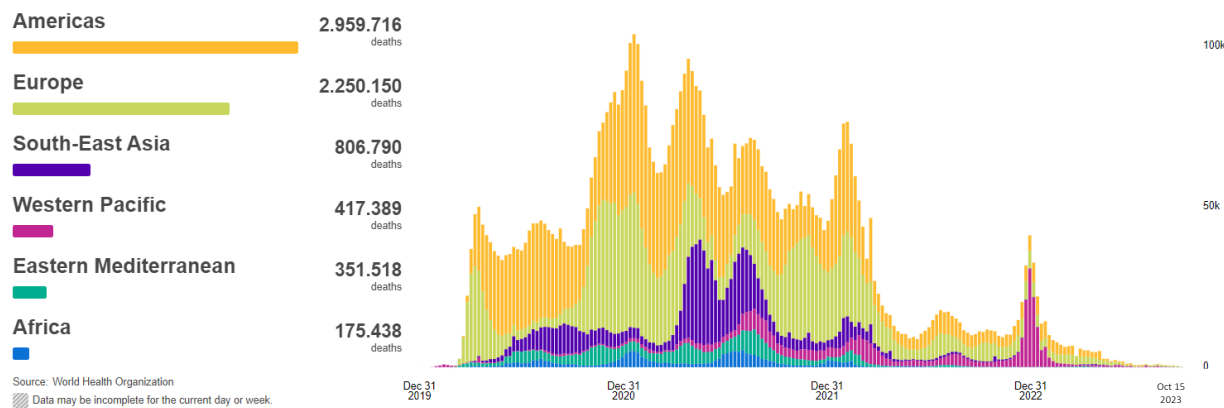


Figura 17. Fallecidos confirmados por SARS-CoV-2 por región, según datos de la OMS (octubre 2023)¹⁹⁷

En España, hasta julio del 2023, se han notificado más de 13 millones de infecciones y más de 121.000 fallecidos¹⁹⁸. Analizando la evolución de la incidencia en la población se han identificado siete periodos epidémicos de COVID-19, siendo el sexto periodo (14 de octubre de 2021-27 de marzo de 2022) el que tuvo la incidencia acumulada (IA) más alta (Figura 18)¹⁹⁹. La tasa de mortalidad (TM) más alta se observó en el primer periodo epidémico (desde el inicio hasta el 21 de junio de 2020) y se ha ido reduciendo paulatinamente en los siguientes periodos (Figura 19)¹⁹⁹, principalmente como consecuencia de la adquisición de la población de inmunidad natural por la infección y la proporcionada por las vacunas, que se introdujeron en España en diciembre de 2020. Así mismo, tanto la IA como la TM observadas siempre fue superior en los grupos de mayor edad.

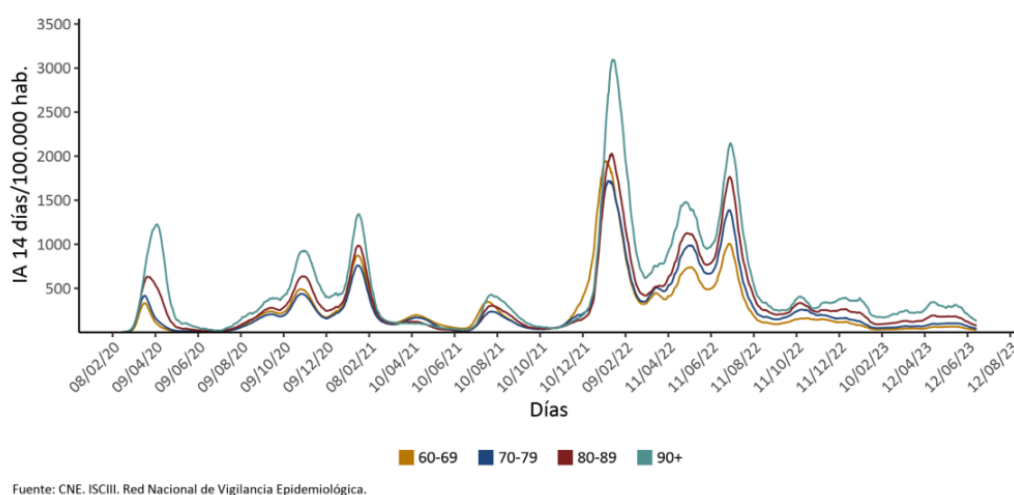


Figura 18. Incidencia acumulada (IA) de la infección por SARS-CoV-2 en España por 100.000 habitantes, y edad. De RENAVE¹⁹⁹

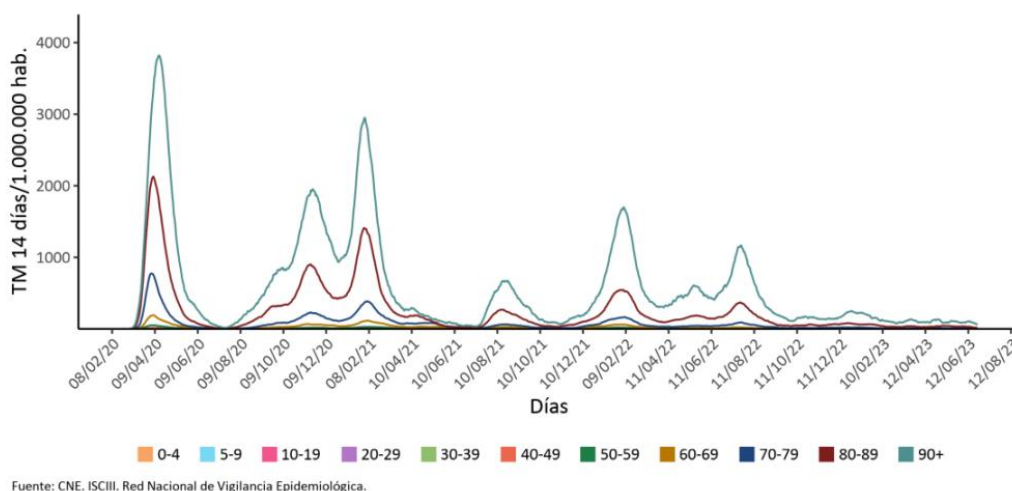


Figura 19. Tasa mortalidad (TM) de la infección por SARS-CoV-2 en España por millón habitantes, y edad. De RENAVE¹⁹⁹

3.7. Infección por SARS-CoV-2 y transmisión

La transmisión respiratoria es la principal vía a través de la cual el SARS-CoV-2 se propaga entre personas. Esto ocurre cuando una persona infectada elimina el virus a través de secreciones respiratorias (en forma de gotas o aerosoles) y alcanzan a otra persona que, mediante inhalación directa o contacto con mucosas respiratorias, se infectan (Figura 20)¹⁹². La posibilidad de infección es mayor si la distancia entre personas es <1 metro y en espacios mal ventilados²⁰⁰. Por este motivo se ha recurrido a la distancia social y a las mascarillas para evitar contagios y frenar la transmisión de SARS-CoV-2.

Cuando se descubrió el virus, hubo una preocupación inicial por la posible transmisión indirecta a través del contacto con superficies o fómites infectados, o incluso por vía fecal-oral. Aunque estas formas de contagio sí que están descritas, actualmente este mecanismo de transmisión no se considera importante por el bajo riesgo de generar nuevas infecciones, ya que se ha demostrado que el virus permanece viable poco tiempo en superficies²⁰⁰. También se ha visto que la transmisión vertical del SARS-CoV-2 es muy rara²⁰¹.

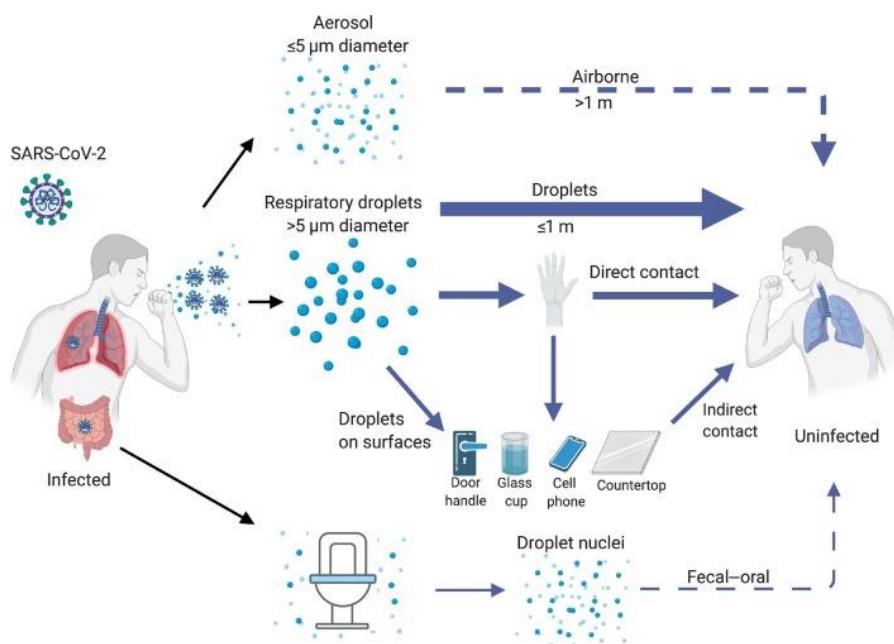


Figura 20. Vías de transmisión persona-persona de SARS-CoV-2. De Harrison AG¹⁹²

La transmisibilidad o infecciosidad del SARS-CoV-2 depende principalmente de factores del huésped, pero también factores ambientales y del virus. Se puede estimar a través del número reproductivo básico (R_0), que es el número promedio de infecciones nuevas que genera un caso durante la infección. Este valor ha ido variando a lo largo de la pandemia. Actualmente, se estima que el R_0 del SARS-CoV-2 está entre 2 y 3, aunque en algunos períodos fue superior a 14^{202,203}.

Conocer la duración de la infectividad de personas con COVID-19 es fundamental para desarrollar políticas de salud pública y evitar casos secundarios. Permite conocer cuánto debe durar el aislamiento de los casos positivos o las bajas laborales, así como poder realizar rastreo de los contactos²⁰⁴.

Se ha demostrado que los portadores asintomáticos pueden transmitir el virus, pero menos que los pacientes que desarrollan síntomas. Así mismo, la probabilidad de que los pacientes sintomáticos infecten a sus contactos es superior en aquellos con enfermedad clínicamente más grave, comparado con los que presentan síntomas leves^{205,206}.

El potencial de transmisión de SARS-CoV-2 empieza antes de la aparición de los síntomas, es máximo durante los primeros 3-6 días desde la infección y después va disminuyendo²⁰⁷. La duración de la transmisibilidad después de la infección es variable entre individuos, y depende de varios factores como el estado inmunológico o edad del paciente, la gravedad de la

infección o la variante del SARS-CoV-2 que cause la infección²⁰⁶. Pasados 10 días desde la infección es poco probable la eliminación de virus infectivo en personas inmunocompetentes que han pasado una infección leve o asintomática, aunque algunas personas pueden infectar durante más tiempo. Esta excreción prolongada de virus infectivo se ha observado sobre todo en pacientes con inmunodepresión o aquellos con infección grave, que puede ser superior a 30 días²⁰⁸⁻²¹⁰.

3.8. Patogénesis del SARS-CoV-2, manifestaciones clínicas y respuesta inmune

El receptor ACE2 está presente en las membranas celulares de múltiples órganos, como pulmones, arterias, riñón, corazón, cerebro o intestino, lo que los hace susceptibles a ser infectados por el SARS-CoV-2, explicando así la multitud de cuadros clínicos que provoca la infección por este virus¹⁷¹. El enzima ACE2 tiene funciones importantes en el organismo, como la regulación de la presión arterial y el equilibrio de electrolitos, vasodilatación y protección cardiovascular, o regulación de la función pulmonar y del sistema inmune. La unión del SARS-CoV-2 al receptor ACE2 provoca la alteración en su expresión y en consecuencia de sus funciones²¹¹.

Entre el 30-60% de las infecciones por SARS-CoV-2 son asintomáticas o dan síntomas muy leves²¹². La duración promedio del periodo de incubación es de 5 días (intervalo de confianza del 95% de 4-6 días)²¹³. La COVID-19 es principalmente una enfermedad respiratoria que puede manifestarse como un síndrome agudo de las vías respiratorias superiores y/o inferiores de gravedad variable. La principal vía de entrada del SARS-CoV-2 en el organismo es vía respiratoria, donde ya empieza a infectar las células de la nasofaringe, pudiendo dar síntomas leves como congestión nasal, estornudos, tos o dolor de garganta. También puede ocasionar daños temporales en el epitelio olfativo y pérdida de las sensaciones gustativas (disgeusia) y olfativas (anosmia). En algunos pacientes, el virus puede infectar también células del tracto respiratorio inferior y provocar daño pulmonar grave que se puede manifestar con dolor torácico, insuficiencia respiratoria, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) o neumonía^{214,215}. Frecuentemente, los síntomas respiratorios suelen ir acompañados de fiebre, fatiga o mialgia²¹⁶. Aparte de síntomas respiratorios, el SARS-CoV-2 puede unirse a receptores ACE2 del epitelio y endotelio de otros tejidos y provocar síntomas extrarrespiratorios (Figura 21) más o menos graves, como diarrea, erupciones cutáneas, linfopenia, trombocitopenia, complicaciones cardiovasculares, isquémicas, renales o hepáticas²¹⁷⁻²¹⁹.

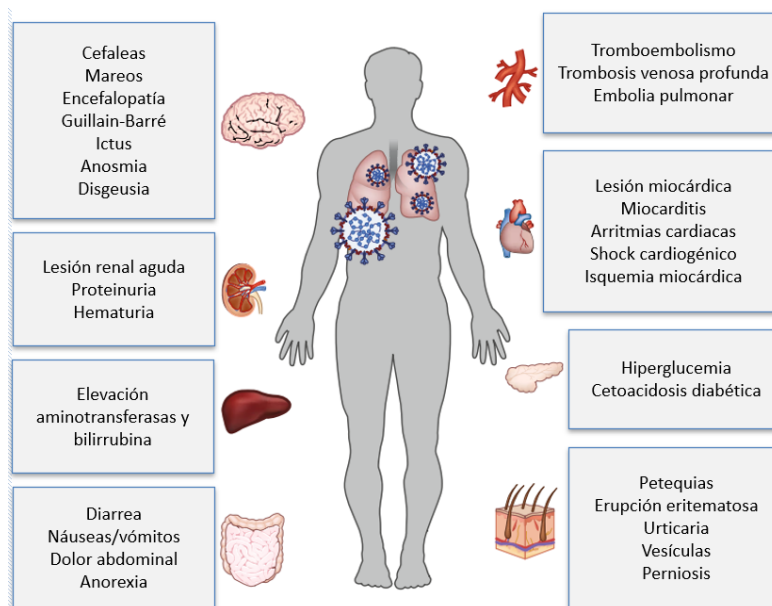


Figura 21. Manifestaciones extrarrespiratorias más comunes de la infección por SARS-CoV-2. Adaptado de Aakriti Gupta et al.²¹⁹

La mayoría de los síntomas anteriores son consecuencia del daño directo causado por el virus, y en la mayoría de las personas con COVID-19 la actuación precoz y eficaz del sistema inmune innato y adaptativo es suficiente para controlar la infección. Sin embargo, en un número reducido de pacientes el sistema inmune no puede controlar de forma precoz la infección por SARS-CoV-2 y se desencadena adicionalmente una respuesta tormentosa del sistema inmunitario. Se produce una liberación exacerbada de citocinas, interleucina-6 (IL-6), marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, aumento de la producción de fibrinógeno y un estado de hipercoagulación. Las citoquinas regulan la inmunidad, la inflamación y la hematopoyesis, pero una sobreproducción y acumulación de citoquinas proinflamatorias acaban causando daños indirectos como daño tisular intenso en todo el organismo, formación de trombos y disfunción de los órganos^{220,221}.

En cuanto a las complicaciones desarrolladas durante la infección por COVID-19, se observó que la presencia de insuficiencia orgánica, el SDRA, la neumonía grave, la respuesta inflamatoria incontrolada y el estado hipercoagulable tenían un impacto significativo en la gravedad y mortalidad de la enfermedad²²².

Se ha identificado que hay varios factores del huésped previos a la infección por SARS-CoV-2, que predisponen más a los pacientes de desarrollar enfermedad grave y mayor mortalidad por COVID-19^{213,223}:

- **Edad avanzada:** las personas con 70 años o más, tienen mayor riesgo de infección por SARS-CoV-2, mayor riesgo de progresión y enfermedad grave por COVID-19 así como mayor necesidad de ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y muerte. Esto es consecuencia principalmente de que la edad avanzada se asocia con mayor número de comorbilidades y con la debilitación del sistema inmune²²⁴.
- **Sexo masculino:** se ha visto que los hombres tienen más riesgo de presentar infecciones graves que las mujeres y mayor tasa de ingreso UCI y muerte por COVID-19. Se asocia con que los hombres tienden a tener estilos de vida menos saludables, como más tabaquismo, y más comorbilidades²²⁴.
- **Comorbilidades:** la presencia de comorbilidades es más frecuente en pacientes con COVID-19 grave, como son las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, la obesidad, la diabetes, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), neoplasias, enfermedades cerebrovasculares y enfermedad renal crónica. Todas ellas también se asocian con mayor tasa de mortalidad, respecto a la población previamente sana^{225,226}.
- **Inmunosupresión:** las personas con disfunciones inmunitarias, especialmente aquellas con neoplasias hematológicas, tienen mayor morbilidad y mortalidad asociadas a la infección por SARS-CoV-2. Este se debe principalmente a la incapacidad de su sistema inmune de controlar la infección y eliminar el virus de forma temprana y eficaz. En consecuencia, estos pacientes presentan CV superiores y el virus puede estar replicándose durante mucho más tiempo. Además, en estas personas se ha visto que la eficacia de la vacunación contra el SARS-CoV-2 es menor que en la población inmunocompetente²²⁷.

Por otra parte, existen varios factores que pueden actuar como protectores contra la enfermedad grave y muerte por COVID-19²²².

- **Vacunación:** la vacunación contra la COVID-19 ha demostrado ser altamente eficaz para prevenir la hospitalización, las complicaciones graves y reducir el riesgo de muerte^{228,229}.
- **Inmunidad natural previa:** haber pasado una infección previa por SARS-CoV-2 ofrece protección y reduce el riesgo de futuras infecciones graves, incluso por infecciones producidas por variantes diferentes a la de la primera infección²³⁰.
- **Buen estado de salud:** tener una buena salud general en el momento de la infección, puede proteger frente la enfermedad grave. Esto incluye tener una alimentación saludable, hacer ejercicio regularmente, mantener un peso adecuado y controlar las enfermedades crónicas existentes²²².

3.9. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2

La detección rápida de las personas infectadas por SARS-CoV-2 es una estrategia clave para el control de nuevos casos de COVID-19, ya que permite el aislamiento temprano de los casos positivos, así como el cribado de sus contactos. El diagnóstico preciso de la infección por SARS-CoV-2, como ocurre en todas las enfermedades infecciosas, se basa en la recogida correcta de la muestra biológica más representativa de la infección, en el momento en el que el virus esté presente. Se recomienda recoger las muestras para el diagnóstico microbiológico pasados 2 días desde el inicio de los síntomas o 5 días desde la exposición. Posteriormente, las muestras deben conservarse de forma adecuada hasta su procesamiento. Si estas recomendaciones no se cumplen se pueden obtener resultados falsamente negativos^{231,232}.

Es posible detectar virus en diferentes fluidos de sujetos infectados, como en muestras respiratorias, heces, lágrimas o suero. Teniendo en cuenta que el virus entra y se multiplica en nasofaringe, la CV en muestras respiratorias es superior y el porcentaje de positividad de las pruebas diagnósticas en estas muestras también es más alto que en el resto²³³. La muestra óptima del tracto respiratorio superior es la muestra de nasofaringe, aunque también se pueden utilizar otras muestras como la de orofaringe o la saliva. En pacientes graves se utiliza también el BAL para poder estudiar la presencia del virus en el tracto respiratorio inferior, que en estos casos de enfermedad grave ha demostrado ser una muestra con mayores tasas de positividad que las muestras del tracto respiratorio superior^{234,235}. Además, en pacientes con COVID-19 grave, se ha utilizado la viremia del SARS-CoV-2 como marcador de gravedad y como predictor de mortalidad²³⁶.

Las técnicas microbiológicas utilizadas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 se basan principalmente en la detección directa del material genético del virus o en la detección de antígenos (Figura 22). Además, también se han utilizado técnicas serológicas de detección de anticuerpos, sobre todo para estudios de seroprevalencia o para conocer la respuesta vacunal.

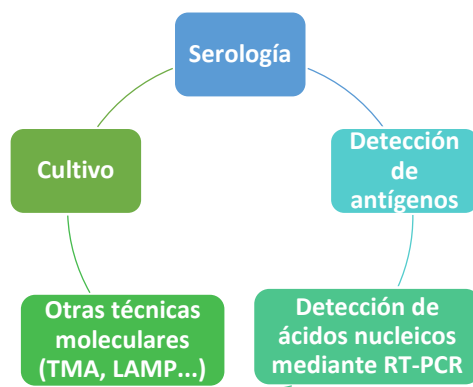


Figura 22. Técnicas de laboratorio utilizadas para la detección del SARS-CoV-2.

La fisiopatología del SARS-CoV-2 influye en la progresión temporal del virus en el organismo y en el tiempo que éste puede ser detectado en determinada muestra clínica. En consecuencia, la elección y eficacia de la técnica diagnóstica más idónea se ven influenciadas en parte por la etapa de la infección, es decir, por la cantidad de días transcurridos desde la infección o el comienzo de los síntomas (Figura 23)²³⁷.

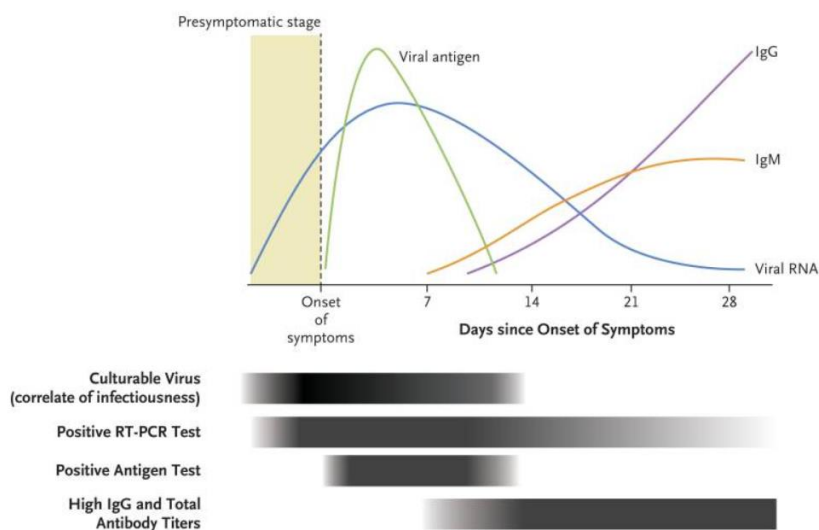


Figura 23. Evolución temporal de la viremia, antigenemia y respuesta inmunológica durante la infección aguda por SARS-CoV-2. De Drain PK²³⁷.

3.9.1. Detección de ácidos nucleicos mediante RT-PCR:

A las pocas semanas del descubrimiento del SARS-CoV-2 ya se había secuenciado su genoma completo, lo que permitió la rápida comercialización de diferentes técnicas de

detección de ácidos nucleicos. Dentro de estas técnicas, la de elección y más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) a tiempo real, que han demostrado tener una elevada sensibilidad y especificidad. Los *kits* de RT-PCR pueden estar diseñados para detectar diferentes genes del virus (ORF1ab, RdRp, N, Env y S). Para evitar las posibles reacciones cruzadas con otros CoV, todos los ensayos moleculares deben incluir al menos dos dianas²³⁸.

En las etapas iniciales de la pandemia la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en los laboratorios, requería procedimientos muy manuales y laboriosos, ya que primero se tenían que inactivar las muestras de forma individual para evitar el contagio del personal del laboratorio, después realizar la extracción manual del RNA de las muestras, la amplificación del RNA y por último el análisis e interpretación de los resultados. Esto hacía necesario la participación de mucho personal y tiempo para poder dar el resultado de una prueba. Además, al tener que procesar muchas muestras, existía la probabilidad de errores de procesamiento y contaminación entre muestras. Poco a poco, se han ido desarrollando diferentes *kits* comerciales cada vez más automáticos que integran la extracción de los ácidos nucleicos, la amplificación y la detección, por lo que requieren mínima manipulación de las muestras, y permiten obtener la interpretación del resultado directamente a partir de la muestra, en menos de 2 horas. Además, se han diseñado sistemas de alto rendimiento, capaces de procesar más de 1.000 muestras al día, para dar respuesta a la alta demanda de pruebas diagnósticas en los laboratorios. Esto supuso un gran cambio en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en los laboratorios clínicos ya que, además de optimizar flujo de trabajo y el personal, permiten obtener una trazabilidad total del procedimiento y la minimización de los errores analíticos^{232,238}.

Pese a la multitud de ventajas que ofrecen las técnicas de RT-PCR para el diagnóstico de la COVID-19, también presenta limitaciones. Estas técnicas se basan en la detección de RNA viral, y han sido ampliamente utilizadas no solo para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 sino también para tomar decisiones clínicas en pacientes infectados, controles de curación, finalización de los aislamientos o para las reincorporaciones laborales.

Aunque en muchos casos la RT-PCR de SARS-CoV-2 negativiza dentro de las dos primeras semanas desde la infección, se ha visto que no es raro detectar el RNA del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en muestras respiratorias durante semanas o incluso meses. La persistencia de RNA viral no siempre se relaciona con infección aguda o virus infectivo, por lo que las técnicas de RT-PCR no son útiles para hacer seguimiento ni controles en personas infectadas ya que pueden llevar confusión o aislamientos prolongados^{239,240}.

Conocer la duración de la infectividad después de la infección por SARS-CoV-2 y la búsqueda de indicadores que permitan identificar hasta cuándo una persona continúa siendo infectiva ha sido una de grandes cuestiones durante estos los primeros años de pandemia^{231,241,242}.

Con la intención de encontrar un parámetro que pudiese identificar de forma rápida y sencilla la relación entre una RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 e infectividad, se ha utilizado el valor del Ct (*cycle threshold*)²⁰⁴. El valor del Ct, proporcionado en las RT-PCR positivas, hace referencia al número de ciclos en un ensayo de RT-PCR necesarios para amplificar el RNA viral y alcanzar un nivel detectable. Su valor tiene una relación inversa con la CV, por lo que valores de Ct bajos son indicativos de alta carga del virus en la muestra procesada, y está descrito que cada aumento de 3,3 unidades en el valor del Ct se corresponde con una reducción aproximada de 10 veces la cantidad de RNA de SARS-CoV-2 en la muestra²⁴³. Sin embargo, el valor del Ct es muy variable y se puede ver afectado por múltiples factores tanto del huésped, de la muestra o del ensayo utilizado (Tabla 2)²⁴⁴. El Colegio Americano de Patólogos (CAP) encuestó a 700 laboratorios que utilizaron el mismo material de control y diferentes ensayos para realizar las RT-PCR de SARS-CoV-2. La mediana de los valores de Ct que reportaron todos ellos varió hasta 14 ciclos, entre los que usaban exactamente el mismo instrumento varió 3 ciclos y los que usaban el mismo gen como diana varió 12 ciclos²⁴⁵.

Tabla 2: factores que influyen en los valores del Ct de las RT-PCR. De Blake W. Buchan (adaptado)²⁴⁴

Factores del huésped	Factores de la muestra	Factores del ensayo
Sintomatología	Tipo (frotis nasal o nasofaríngeo, saliva, BAL...)	Genes diana
Estado inmune	Calidad (recogida)	“primers” y sondas
Edad	Medio de transporte	Eficacia de la extracción del RNA
Días desde la infección	Condiciones de conservación	Eficacia de la amplificación

Considerando la variedad metodológica presente en los laboratorios clínicos y considerando los factores previamente mencionados, no se recomienda en uso extendido del valor de Ct como único marcador de infectividad y debe interpretarse con cautela²⁴³⁻²⁴⁷. También se ha intentado buscar la utilidad del sgRNA como posible marcador de replicación activa del SARS-CoV-2, especialmente de aplicación en personas infectadas que presentan persistencia del RNA viral. El sgRNA del SARS-CoV-2 solo se transcribe durante la replicación del virus, y se puede detectar fácilmente mediante RT-PCR. Algunos estudios,

encontraron una buena concordancia entre la detección de sgRNA de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR y el cultivo como método de referencia de infectividad viral^{248,249}. Por el contrario, un estudio reveló que los sgRNAs eran detectables hasta 17 días después de la detección inicial y que pueden estar protegidos de la degradación de las nucleasas por vesículas de doble membrana, no observando ventajas respecto a la RT-PCR convencional²⁵⁰.

Dentro del ámbito de la investigación sobre el SARS-CoV-2, se destaca la utilización de técnicas moleculares adicionales a la RT-PCR. Entre ellas, las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) emergen como una valiosa herramienta. Aunque no se emplean como pruebas diagnósticas directas, las técnicas de NGS aportan información complementaria que enriquece nuestra comprensión del virus. Estas avanzadas técnicas permiten la identificación de mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2, lo que posibilita la caracterización precisa de las variantes del virus. Esta información reviste gran importancia en el ámbito epidemiológico, ya que brinda la capacidad de rastrear y monitorizar las variantes circulantes a tiempo real, lo que hace factible la aplicación de estrategias adecuadas y oportunas ante diversas situaciones que puedan surgir.

Además, la aplicación de la NGS encuentra relevancia en contextos clínicos específicos, como es el caso de pacientes inmunodeprimidos que padecen infecciones por SARS-CoV-2. En estas circunstancias, donde la persistencia viral es una preocupación frecuente, la NGS desempeña un papel crucial. Al monitorizar la evolución del virus a lo largo del tiempo, se obtiene una comprensión detallada sobre su evolución, lo que permite determinar si el virus detectado es idéntico al que inició la infección o si se ha producido una reinfección. Un aspecto de especial importancia es que la NGS posibilita la detección de mutaciones que podrían influir en la capacidad del virus para evadir la respuesta inmunológica.

Asimismo, esta tecnología facilita la identificación de mutaciones que pudieran disminuir la susceptibilidad a tratamientos farmacológicos, como los anticuerpos monoclonales o los antivirales. Estas revelaciones son esenciales para profundizar en la comprensión de la dinámica evolutiva del virus y para la formulación de estrategias terapéuticas más precisas y eficaces.

3.9.2. Detección de antígenos:

La expansión de la pandemia y la gran cantidad de personas infectadas ejercieron una presión significativa sobre los laboratorios de microbiología, generando una sobrecarga de trabajo que conllevó una demora del diagnóstico mediante RT-PCR y la posterior notificación de casos. Pese a que las técnicas de RT-PCR son las de elección por su mayor

sensibilidad, la urgente necesidad de diagnóstico masivo y la importancia de disponer de resultados en tiempos reducidos para mitigar la propagación del virus, conllevó la imperiosa demanda de pruebas rápidas para la detección de SARS-CoV-2²⁵⁰.

Rápidamente se comercializaron múltiples *test* rápidos de detección de antígeno (Ag) de SARS-CoV-2. La mayoría de ellos detectan la proteína N o S del virus y permiten obtener el resultado en aproximadamente 15 minutos. Además de la reducción del tiempo de respuesta respecto a las RT-PCR, permiten hacer el diagnóstico fuera de los laboratorios ya que no necesitan instalaciones especiales ni personal experto. Esto supuso la descongestión de los laboratorios y reducción del gasto económico²³⁸.

Los *test* de Ag se consideran menos sensibles y específicos que los ensayos de RT-PCR.

Existe elevada heterogeneidad de la sensibilidad y de la especificidad entre las diferentes estudios publicados y entre las marcas comerciales de *test* de Ag. Los estudios comparativos de diferentes *test* de Ag mostraron un valor medio de sensibilidad del 56,2% y de especificidad del 99,5%²⁵¹. Además de las diferencias entre las diferentes marcas, se observaron grandes diferencias de sensibilidad en función de la CV, la presencia o ausencia de síntomas, los días desde la infección, la gravedad de estos o el tipo de muestra empleada²⁵².

En muestras de personas sintomáticas con un valor de Ct <20 en la RT-PCR la sensibilidad del *test* de Ag reportada fue entre 93,6-97,9%, mientras que si el Ct >30, la sensibilidad se redujo considerablemente al 13-30,4%²⁵³. Por este motivo, varios estudios en pacientes sintomáticos relacionan la positividad del *test* de Ag con la presencia de virus infectivo y la negatividad del *test* de Ag con la ausencia de virus infectivo, aunque se ha demostrado que esta afirmación no siempre es cierta²⁵¹⁻²⁵³. También se observó mayor sensibilidad de los *test* de detección de Ag cuando se realizaron en primeros 7 días desde la aparición de síntomas²⁵⁴.

Los estudios que incluyen personas asintomáticas con RT-PCR positiva para SARS-CoV-2 muestran que los *test* de Ag tienen una baja sensibilidad (<50%), menor que en sintomáticos, por lo que esta técnica no está indicada para cribado en personas asintomáticas por el riesgo alto de falsos negativos^{254,255}.

3.9.3. Cultivo viral:

El cultivo es la técnica *gold standard* para detectar la presencia de virus con replicación activa y para evaluar su potencial infeccioso²⁵⁶⁻²⁵⁸. Esta técnica es de gran utilidad para adquirir un conocimiento más profundo de los virus, ya que permite comprender aspectos cruciales como duración de la infección activa y la capacidad de transmisión. Además, el

cultivo viral es fundamental para el desarrollo de vacunas y agentes terapéuticos, o también para el desarrollo y evaluación de pruebas de diagnóstico²⁵⁹.

En el caso de SARS-CoV-2, las células más utilizadas para el cultivo han sido las VERO E6²⁶⁰.

En la mayoría de los cultivos positivos, el ECP del SARS-CoV-2 en estas células suele manifestarse relativamente rápido, alrededor de las 48-72 horas después de su inoculación. La confirmación de los ECP observados en los cultivos positivos puede ser llevada a cabo mediante diversos enfoques, entre los que se incluyen la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra alguna proteína del SARS-CoV-2, así como la realización de una PCR al sobrenadante del cultivo. En este último caso, para confirmar que el cultivo es positivo para SARS-CoV-2 el Ct del cultivo debe ser inferior al Ct de la muestra²⁶¹.

Los estudios de cultivo de SARS-CoV-2 en centros de referencia han tenido un papel fundamental en la formulación de las recomendaciones para la prevención y control de la infección. Estos estudios han permitido conocer la duración de la infectividad del virus, así como monitorizar el comportamiento de las nuevas variantes del virus que han ido surgiendo a lo largo de la pandemia²⁶².

Los estudios en cultivo han proporcionado revelaciones importantes en relación con la RT-PCR del SARS-CoV-2. Han constatado que la RT-PCR de SARS-CoV-2 tiene una especificidad limitada en la detección de virus replicativos. Además, se estableció una relación inversa entre la probabilidad de obtener un cultivo positivo (indicador de virus infectivo) con el valor del Ct y los días transcurridos desde el inicio de los síntomas^{207,208}. La probabilidad de obtener un cultivo positivo (indicador de virus infectivo) disminuye un 32% por cada unidad que aumenta el Ct, a partir de valores de Ct >24²¹⁰. También se pudo relacionar la duración de la infectividad con los días desde el inicio de síntomas, que en personas inmunocompetentes con infecciones leves o asintomáticas no suele ser superior a 10 días, pero en inmunodeprimidos o aquellos con infección grave la presencia de virus replicativo puede ser más prolongada^{261,263}.

A pesar de ser considerado el *gold standard*, el cultivo viral no resulta una técnica apropiada para el diagnóstico rutinario de las infecciones por SARS-CoV-2. Esto se debe principalmente a que requiere un tiempo de respuesta más prolongado (más de 48 horas en la mayoría de los casos) en comparación con otras técnicas como la RT-PCR o la detección de antígenos, además de presentar un elevado nivel de complejidad que hacen necesario disponer de personal con experiencia en cultivo. Asimismo, necesita instalaciones BSL-3, que no están disponibles en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico. A pesar de ello y teniendo en cuenta las ventajas que ofrece esta

técnica, es imperativo continuar realizándola en laboratorios de referencia con experiencia en el cultivo o en centros de investigación²⁶⁴.

3.9.4. Detección de anticuerpos mediante serología:

Las técnicas serológicas de detección de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 también han tenido un papel muy valioso en el manejo de pandemia y en el conocimiento de la inmunidad frente al virus. La mayoría de las personas inmunocompetentes que se han infectado por el SARS-CoV-2, como consecuencia de la respuesta inmune adaptativa, presentan niveles detectables de IgG contra el virus en las primeras semanas después de la infección, incluso aunque esta haya cursado de forma asintomática. Esto también ocurre en aquellas personas inmunocompetentes que se han vacunado contra el virus. En ambos casos, los niveles de IgG se mantienen estables durante meses después de la infección, lo que ofrece una función potencialmente protectora contra futuras infecciones. Los niveles de IgG detectados y la duración de estos son variables entre individuos^{265,266}.

Las técnicas de detección de IgG permiten conocer quién ha pasado la infección de forma natural o la respuesta a la vacuna, además de poder realizar un seguimiento de la respuesta inmunológica²⁶⁷. Esto tiene gran relevancia para estudios epidemiológicos y en la planificación de estrategias de salud pública, especialmente en la evaluación de la eficacia de las vacunas frente al SARS-CoV-2, la duración de la protección y la necesidad de revacunaciones²⁶⁸. No se recomienda su uso como única prueba para el diagnóstico de la infección aguda por SARS-CoV-2.

Actualmente hay comercializadas multitud de pruebas para la detección de anticuerpos IgM, IgA e IgG, las cuales utilizan diferente metodología. Las proteínas S y N del SARS-CoV-2 han demostrado ser inmunogénicas, por lo que los anticuerpos dirigidos contra estos antígenos son la diana de las pruebas serológicas disponibles. Las pruebas rápidas cualitativas de inmunoensayos de flujo lateral se pueden realizar fácilmente a partir de una gota de sangre capilar, pero han mostrado una sensibilidad y especificidad muy variable entre las diferentes marcas, e inferiores a técnicas más sofisticadas basadas en la detección de anticuerpos mediante un Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) o Inmunoensayo Quimioluminiscente (CLIA)^{269,270}. Aunque también existen diferencias entre las marcas disponibles, las técnicas de ELISA y CLIA son más sensibles y específicas, y además permiten cuantificar el nivel de anticuerpos en sangre. Sin embargo, estas técnicas no permiten diferenciar qué anticuerpos detectados tienen realmente capacidad neutralizante, ya que para ello se requieren complejos estudios de

neutralización de anticuerpos (*gold standard*) que sólo están disponibles en centros de referencia²⁷¹.

3.10. Variantes del SARS-CoV-2

La tasa de mutación de los coronavirus, al igual que otros virus RNA, es relativamente elevada en comparación con los virus DNA¹⁶¹. Las mutaciones del SARS-CoV-2 se deben a cambios nucleotídicos del genoma, principalmente consecuencia de errores de la RNA polimerasa durante la replicación del virus en el interior de las células. Sin embargo, los coronavirus contienen una enzima exonucleasa que reduce su tasa de errores de replicación entre 15 y 20 veces *in vitro*, lo que se traduce en una tasa de mutación viral *in vivo* unas 10 veces inferior a la de la gripe. Otro fenómeno que también puede provocar cambios en el genoma del SARS-CoV-2 es la recombinación, que se produce en células infectadas con múltiples variantes, en las que el material genético de dos variantes se empaqueta en un único virión. Tanto los errores en la replicación como la recombinación son parte natural del proceso evolutivo de los virus. Como consecuencia de estos cambios en el material genético, aparecen diferentes variantes, que difieren genéticamente de la variante del origen^{272,273}. Por último, mediante el uso de vacunas, anticuerpos monoclonales o antivirales, también se favorece la aparición de nuevas variantes del SARS-CoV-2, como consecuencia de la presión selectiva sobre el virus.

El conjunto de variantes que tienen una relación genética estrecha y que derivan de una ancestro común se denomina linaje (Figura 24)^{274,275}.

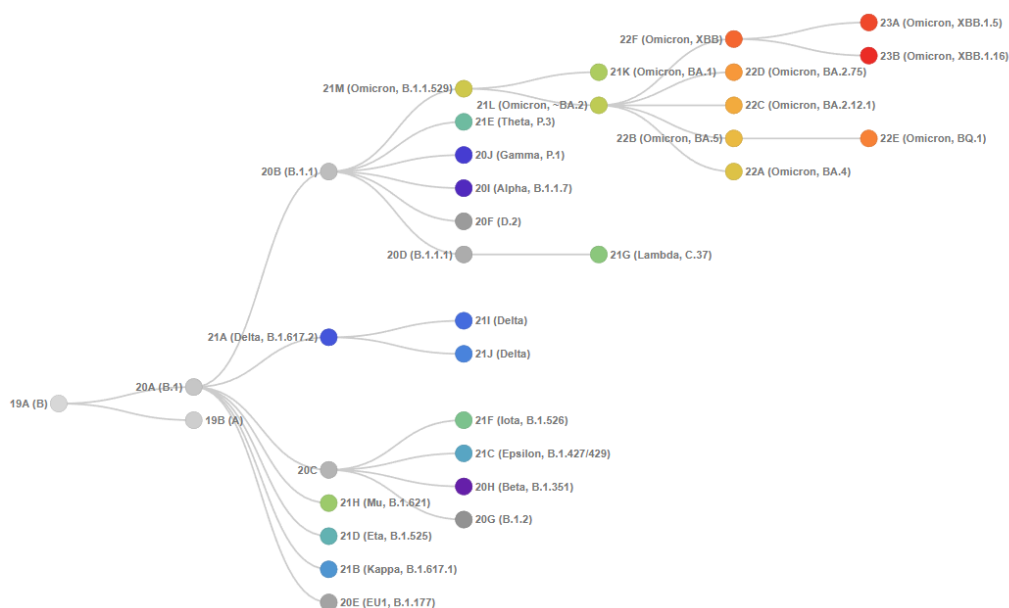


Figura 24. Relación filogenética de los linajes de SARS-CoV-2, definidos por Nexstrain, de CoVariants²⁷⁴

Los linajes del SARS-CoV-2 han sido objeto de interés y seguimiento desde el inicio de la pandemia. En junio de 2020 se creó el Grupo de Trabajo de la OMS sobre Evolución Viral, centrado específicamente en las variantes del SARS-CoV-2, su fenotipo y su impacto en las medidas de prevención, que más tarde se convirtió en el Grupo Consultivo Técnico sobre la Evolución del Virus SARS-CoV-2. La aparición de variantes que suponían un mayor riesgo para la salud pública mundial, a finales de 2020, hizo que la OMS empezara a caracterizar algunas de ellas como “variantes de interés” (VOI) y “variantes de preocupación” (VOC), con el fin de establecer prioridades en el seguimiento y la investigación a escala mundial, así como de orientar y adecuar la respuesta a la COVID-19. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) clasificó las variantes del SARS-CoV-2 en cuatro grupos²⁷⁵:

- Variantes de preocupación (VOC): los cambios confieren al virus un aumento demostrado de la transmisibilidad, causa enfermedad más grave, una reducción significativa de la neutralización por los anticuerpos generados durante la infección o vacunación previas y una reducción de la eficacia de los tratamientos o las vacunas, o fallos en las pruebas diagnósticas.
- Variantes de interés (VOI): cambios que podrían conferir una capacidad de neutralización reducida por anticuerpos generados contra una infección o vacunación previa, una eficacia reducida de tratamientos o pruebas diagnósticas o un aumento previsto de la transmisibilidad o de la gravedad de la enfermedad.
- Variantes bajo monitorización (VBM): propiedades similares que las VOC pero las pruebas son débiles y todavía están siendo evaluadas.
- Variantes con consecuencias elevadas (VOHC): las medidas de prevención tienen una eficacia significativamente reducida en relación con las variantes que circulaban anteriormente.

El virus original que se detectó en Wuhan desarrolló rápidamente la mutación D614G en el gen S, lo que provocó un aumento en su transmisibilidad. Desde ese momento, se han producido cientos de mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2, siendo las más frecuentes e importantes las que afectan al gen S²⁷⁶. Como consecuencia de las mutaciones, a lo largo de estos 3 años de pandemia han surgido diferentes VOC, todas ellas con un gran impacto en el aumento de la transmisibilidad del virus respecto a la variante que estaba circulando en este momento, y generando las diferentes olas pandémicas (Figura 25)²⁷⁷. La primera VOC, la variante *Alpha*,

surgió en el Reino Unido en septiembre del 2020, mientras que la última, es la variante *Omicron*, que surgió en Sudáfrica en noviembre del 2021 (Figura 26)²⁷⁷. Esta variante es la que acumula mayor número de mutaciones que la convierten en la variante más transmisible hasta el momento y la que más infecciones ha causado en la pandemia. Como consecuencia del gran número de mutaciones que acumula la variante *Omicron*, le han permitido evolucionar en diferentes subtipos o subvariantes (Figura 26)²⁷⁷.

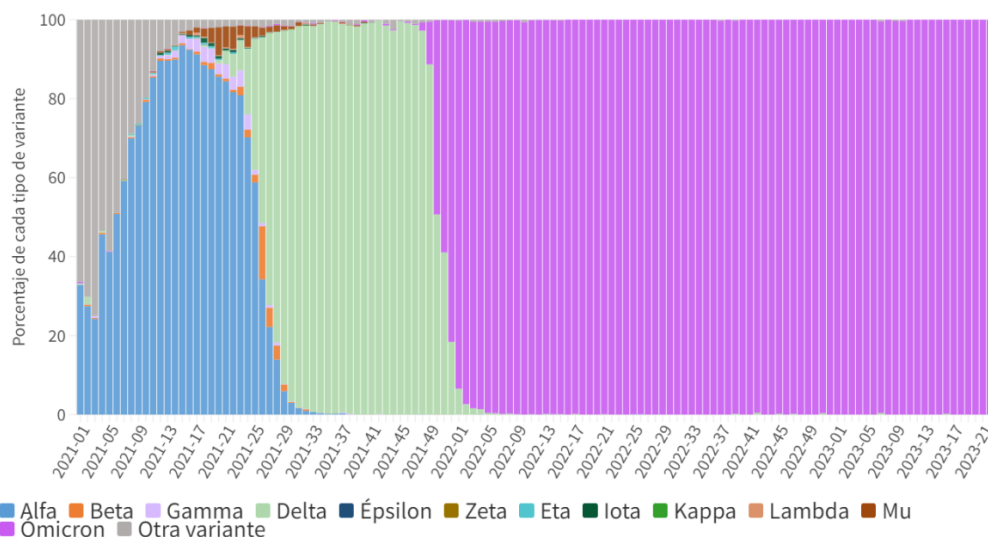


Figura 25. Evolución de las variantes de SARS-CoV-2 en España entre las semanas 1 de 2021 a 22 de 2023, según datos de SiViEs²⁷⁷

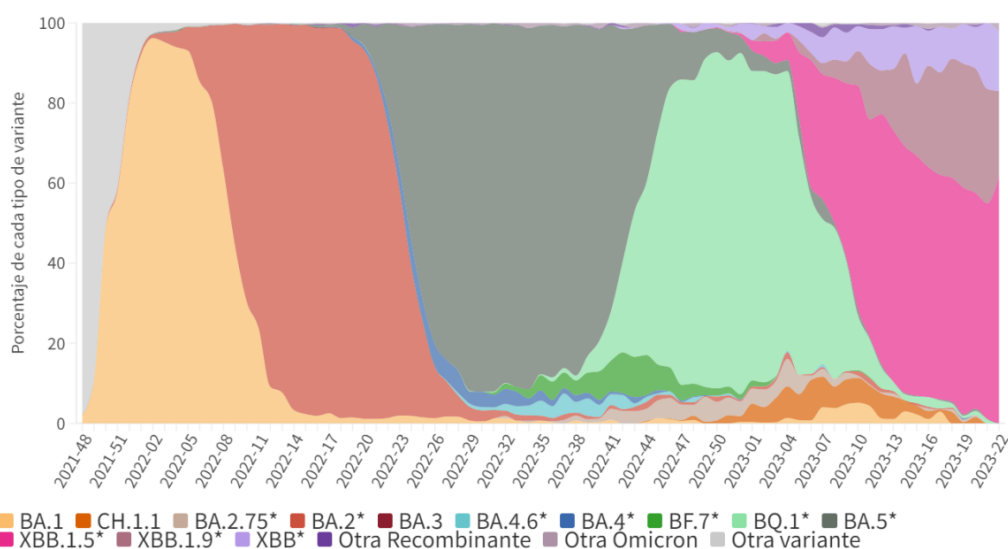


Figura 26. Evolución de los linajes de *Omicron* en España entre las semanas 48 de 2021 y 22 de 2023, según SiViEs²⁷⁷

La vigilancia virológica de las variantes mediante NGS ha sido fundamental para identificar rápidamente la aparición de nuevas variantes con propiedades fenotípicas relevantes para la transmisión, virulencia y escape de la inmunidad, así como ha permitido caracterizar la circulación de las diferentes variantes a lo largo de la pandemia. Además, los datos genéticos proporcionan información muy valiosa de cara a realizar revisiones de la composición de las vacunas, así como de la utilidad de los tratamientos disponibles^{276,277}.

3.11. Prevención y tratamiento de la infección por SARS-CoV-2

3.11.1. Prevención:

Desde el inicio de la pandemia se establecieron estrategias no farmacológicas con el fin de reducir el número de infecciones y la expansión del virus. Estas estrategias, como el distanciamiento social, las mascarillas, las cuarentenas y los confinamientos, mostraron ser relativamente eficaces para disminuir la transmisión del virus, pero por motivos socioeconómicos no pueden mantenerse indefinidamente. Además, sólo tienen impacto en la reducción de infecciones, pero no reducen la gravedad de la infección ni mortalidad en personas ya infectadas²⁷⁸.

Como consecuencia de un gran esfuerzo internacional, se consiguió disponer de vacunas eficaces unos meses después del descubrimiento del virus. Además de reducir el número de infecciones, han tenido un gran impacto en la reducción de casos graves y muertes²⁷⁹.

Para el desarrollo de vacunas se han utilizado diferentes tecnologías, como las vacunas RNA mensajero (mRNA), vacunas de vector viral no replicante o vacunas inactivadas, siendo las primeras las más eficaces. Inicialmente se empezó vacunando con dos dosis, pero ante la evidencia de que pasados 6 meses desde la segunda dosis se produce una reducción significativa de anticuerpos protectores, se administraron dosis de refuerzo²⁸⁰⁻²⁸². Asimismo, la eficacia de la vacuna ha ido disminuyendo con las nuevas variantes del SARS-CoV-2, por lo que algunas de ellas han tenido que reformularse, incorporando en su formulación variantes *Omicron*^{283,284}.

3.11.2. Tratamiento:

A lo largo de la pandemia, ante el desconocimiento y la falta de un tratamiento eficaz conocido, se han utilizado o considerando muchas terapias farmacológicas para el tratamiento de la COVID-19. Muchos de estos fármacos, como la hidroxicloroquina o la azitromicina, han demostrado no ser útiles, por lo que actualmente su uso está desaconsejado^{285,286}.

Sólo está aconsejado tratar las infecciones por SARS-CoV-2 en pacientes con enfermedad leve de alto riesgo (inmunosupresión severa, comorbilidades o mayores de 65 años) o en enfermedad grave^{285,286}. Las opciones actuales de tratamiento se diferencian en dos categorías en función de cuál sea su diana de actuación (Figura 27)²⁸⁷. Están los fármacos que actúan en el virus, que son los antivirales, y los tratamientos dirigidos al huésped, que incluyen principalmente la terapia con anticuerpos neutralizantes, plasma hiperinmune y los esteroides.

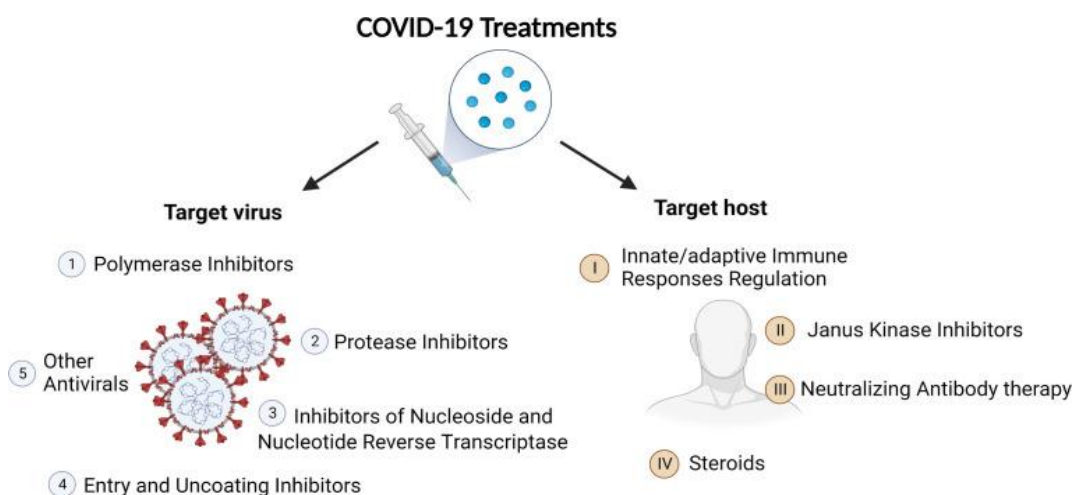


Figura 27. Tratamientos de la COVID-19: agentes antivirales y terapias dirigidas al huésped. De Yuan Y. et al.²⁸⁷

- a. **Antivirales:** los aprobados por la FDA y más utilizados en la actualidad son el Remdesivir intravenoso y el Nirmatrelvir/Ritonavir (Paxlovid) y, en mucha menor medida, el Molnupinavir²⁸⁸. La sensibilidad de SARS-CoV-2 a estos antivirales no se ha visto reducida con la aparición de nuevas variantes del virus^{289,290}.
- **Remdesivir:** es un profármaco del nucleótido adenosina, de administración intravenosa, que una vez activo en el interior de las células, actúa inhibiendo la RNA polimerasa y la replicación del virus. Fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la COVID-19, y su uso está indicado en pacientes con neumonía por SARS-CoV-2 que requieren oxígeno complementario. Ha demostrado una reducción de la progresión hacia enfermedad grave y en la mortalidad de los pacientes ingresados, así como una reducción de los días de hospitalización^{291,292}.
 - **Paxlovid:** Nirmatrelvir es un inhibidor peptidomimético de la proteasa principal del SARS-CoV-2 (M^{pro}), también conocida como proteasa nsp5. La inhibición de la M^{pro} del SARS-CoV-2 hace que la proteína sea incapaz de procesar precursores

poliproteicos, lo que impide la replicación viral. El Ritonavir inhibe el metabolismo de Nirmatrelvir mediado por el CYP3A, lo que aumenta sus las concentraciones plasmáticas. Se administra vía oral y está indicado para el tratamiento de la COVID-19 en adultos que no requieren aporte de oxígeno suplementario y que tienen un riesgo alto de progresar a COVID-19 grave. Ha demostrado disminuir la hospitalización y la mortalidad, pero presenta múltiples interacciones farmacológicas que deben de tenerse en cuenta antes de su administración^{293,294}.

- **Molnupinavir:** es un profármaco del nucleósido de la citidina, de administración oral, que induce la mutagénesis del SARS-CoV-2. El fármaco, una vez activo se fosforila y la RNA polimerasa lo incorpora al RNA del SARS-CoV-2. Como consecuencia de la acumulación de errores en el genoma se produce la inhibición de la replicación. Su uso está aprobado en pacientes con alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, incluida la hospitalización o la muerte, para quienes las opciones alternativas de tratamiento aprobadas por la FDA no son accesibles o clínicamente adecuadas. El tratamiento precoz con Molnupinavir ha demostrado una reducción del riesgo de hospitalización o muerte en adultos de riesgo^{295,296}. El Molnupinavir se ha empleado mucho menos que el Paxlovid.

- b. Anticuerpos monoclonales (mAb):** son proteínas sintéticas que imitan la capacidad de los anticuerpos naturales producidos por el sistema inmune. Durante la pandemia se han investigado y utilizado varios mAb como una estrategia terapéutica para combatir la infección por el virus SARS-CoV-2 especialmente en pacientes ingresados. Actúan principalmente uniéndose de forma específica a la proteína S del virus y por tanto bloqueando la entrada el virus en la célula. La eficacia clínica se limita especialmente a pacientes con estadios tempranos de la enfermedad²⁹⁷.

Se han probado diferentes estrategias con el fin de mejorar la eficacia de estos fármacos, como la administración combinada de dos mAb diferentes, como Casirivimab y Imdevimab, o la profilaxis preexposición en personas de alto riesgo mediante la mAb con elevada vida media (Tixagevimab y Cilgavimab)^{298,299}.

La adquisición de mutaciones por parte del SARS-CoV-2, especialmente en la proteína S, impiden la unión específica de los mAb al virus, lo que resulta en su capacidad para evadir la acción de los mAb. Como consecuencia, mAb que inicialmente mostraron una alta eficacia en ensayos clínicos han perdido su efectividad en cuestión de meses después de su autorización, ya que han perdido su capacidad neutralizante frente a las

nuevas variantes circulantes, las cuales difieren genéticamente de las variantes originales utilizadas en la evaluación del fármaco. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado con las últimas subvariantes Omicron (XBB y BQ), frente a las cuales todos los mAb comercializados hasta el momento han dejado de ser eficaces^{299,300}. Esto enfatiza la importancia de la aplicación de las técnicas de NGS para la monitorización de las variantes, especialmente en pacientes candidatos a recibir estos tratamientos.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo viral es la técnica diagnóstica de referencia en el campo de la virología. Permite detectar virus con capacidad de infectar las células del cultivo, lo que se correlaciona con replicación activa. Además, el cultivo viral proporciona una herramienta fundamental para comprender la patogénesis de los virus, investigar enfermedades causadas por virus emergentes, desarrollar estrategias de control de enfermedades virales, evaluar antivirales y vacunas, así como valorar nuevas herramientas diagnósticas. Sin embargo, su laboriosidad, la necesidad de disponer de infraestructuras especiales en el laboratorio, y elevado tiempo de respuesta limitan el uso del cultivo en la práctica asistencial rutinaria, sobre todo cuando se necesitan resultados rápidos para tomar decisiones clínicas.

A pesar de los múltiples beneficios que aportan las técnicas de cultivo, éstas han sido desplazadas en la mayoría de los laboratorios por técnicas más sencillas y rápidas, principalmente por las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos como las PCR en tiempo real. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas técnicas no permiten diferenciar si el virus detectado se está replicando o no, por lo que el uso extendido de estas técnicas y su incorrecta interpretación puede llevar a un sobrediagnóstico y sobretratamiento de determinadas infecciones virales.

El citomegalovirus humano (HCMV) es un virus ampliamente distribuido y con capacidad de establecer latencia después de la primoinfección, pudiendo reactivarse a lo largo de la vida. En personas inmunocompetentes, tanto la primoinfección, las reinfecciones y reactivaciones suelen causar infecciones leves o asintomáticas. Por el contrario, en pacientes inmunodeprimidos, el HCMV puede causar enfermedad grave en las tres situaciones mencionadas, llegando a afectar a varios órganos. La incidencia de la enfermedad por HCMV se ha reducido en los últimos años, gracias a las mejoras en el diagnóstico, profilaxis y tratamiento. A pesar de ello, sigue siendo uno de los patógenos oportunistas más temidos y afecta sobre todo a pacientes con deficiencias en la inmunidad mediada por células T. La neumonía por HCMV se considera una de las manifestaciones más graves de la infección por este virus, con una incidencia variable (1-30%) y una elevada mortalidad que llega al 70% en algunos casos. Para el diagnóstico de neumonía por HCMV probada es necesario que el paciente presente signos y/o síntomas de infección respiratoria, así como la detección del virus en tejido pulmonar (mediante técnicas de cultivo, histopatología, inmunohistoquímica o técnicas de hibridación del DNA). Teniendo en cuenta que la realización de biopsia pulmonar

para la obtención de tejido es una técnica invasiva contraindicada en muchos casos, se ha introducido el término de neumonía probable. Su diagnóstico se puede realizar utilizando muestras de lavado broncoalveolar (BAL) y detectando el virus mediante PCR cuantitativas (qPCR), además de por cualquiera de las técnicas citadas previamente. Actualmente la realización de qPCR en muestras de BAL es la estrategia más utilizada para diagnosticar la neumonía por HCMV. Sin embargo, no está definido un valor de carga viral en BAL que permita diferenciar si el virus se está replicando, está en forma latente o es DNA residual, por lo que interpretar el resultado de las qPCR en BAL y el diagnóstico de la neumonía por HCMV es un reto clínico.

El SARS-CoV-2, virus causante de la enfermedad COVID-19, se descubrió a finales del 2019 en China y rápidamente se extendió a todo el mundo, causando una pandemia. Durante los 3 primeros años se han notificado más de 675 millones de casos en el mundo y 6,8 millones de muertos. La mayoría de las infecciones cursan de forma asintomática o con síntomas respiratorios leves, pero en determinadas situaciones, como la falta de inmunidad previa, la edad avanzada o la inmunosupresión pueden favorecer el desarrollo de síntomas respiratorios o extrarespiratorios graves o mortales. El virus se transmite principalmente por vía respiratoria a través de gotas o aerosoles que generan las personas infectadas, por lo que conocer la duración de la infectividad de personas con COVID-19 es fundamental para desarrollar políticas de salud pública y evitar casos secundarios. Se ha visto que la duración de la infectividad depende de varios factores como la gravedad de la infección, la edad, el estado inmunológico del paciente o los días desde el inicio de la infección. La estrategia más utilizada para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 ha sido la realización de RT-PCR en muestras respiratorias. Estas técnicas se basan en la detección de RNA viral, y han sido ampliamente utilizadas no solo para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 sino también para tomar decisiones clínicas en pacientes infectados, controles de curación, finalización de los aislamientos o para las reincorporaciones laborales. El tiempo hasta la negativización de la RT-PCR de SARS-CoV-2 es variable y aunque en muchos casos negativiza dentro de las dos primeras semanas desde la infección, no es raro detectar el RNA del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en muestras respiratorias durante semanas o incluso meses después de la infección. La persistencia de RNA viral no siempre se relaciona con infección aguda o virus infectivo, por lo que las técnicas de RT-PCR no son útiles para hacer seguimiento ni controles en personas infectadas ya que pueden llevar a un manejo inadecuado o aislamientos prolongados. En determinadas situaciones se ha utilizado el valor del Ct (*cycle threshold*) de la RT-PCR como

marcador de infectividad, pero debido a su alta variabilidad se desaconseja su uso como único indicador.

HIPÓTESIS

Actualmente, en la mayoría de los laboratorios clínicos, el diagnóstico de las infecciones virales se basa casi exclusivamente en la utilización de técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos, destacando las PCR. El uso del cultivo viral para el diagnóstico rutinario ha quedado casi desplazando por completo. Sin embargo, la información que pueden ofrecer las técnicas de PCR muchas veces es limitada, por su incapacidad de diferenciar si el virus detectado se está replicando o no. Disponer del cultivo viral como técnica de referencia, permite aumentar o completar la información obtenida por las técnicas de PCR, especialmente por su capacidad de detectar sólo virus con capacidad infectiva.

En la mayoría de laboratorios, el diagnóstico microbiológico de la neumonía por HCMV se basa casi exclusivamente en la cuantificación de la carga de DNA de HCVM en BAL. Actualmente no existen valores de referencia que permitan distinguir si el virus se está replicando en el pulmón o no, lo que hace que la interpretación de los resultados y su diagnóstico sea un reto.

Para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones por SARS-CoV-2 se han utilizado de forma masiva las técnicas de RT-PCR. La posibilidad de que éstas se mantengan positivas durante semanas y su incapacidad de diferenciar si el virus sigue infectivo o no, así como la poca utilidad del valor Ct como marcador de infectividad, ha dificultado la toma de decisiones clínicas y de salud pública.

En las dos situaciones mencionadas anteriormente, la incorrecta interpretación de los resultados de las PCR, conlleva diagnósticos erróneos, el abuso de antivirales para su tratamiento, o aislamientos prolongados. Con ello, gracias al uso del cultivo como técnica de referencia, esta tesis permitirá ampliar el conocimiento a la hora de interpretar los resultados de las PCR en ambos casos clínicos, proporcionando así una información fundamental y práctica para aquellos centros en los que no se pueda realizar el cultivo viral.

OBJETIVOS

1. Recoger la bibliografía publicada sobre el uso de las PCR cuantitativas (qPCR) en muestras de lavado broncoalveolar (BAL) para el diagnóstico de la neumonía por citomegalovirus, así como analizar la metodología, los resultados y conclusiones obtenidas en estos estudios. (Trabajo 1)
2. Comparar las técnicas de cultivo viral y qPCR en BAL para el diagnóstico de neumonía en huéspedes inmunodeprimidos con signos y/o síntomas de infección respiratoria. (Trabajo 2)
3. Establecer un valor de corte de carga de HCMV en BAL que permita detectar los casos de replicación activa del virus, utilizando el cultivo como técnica de referencia. (Trabajo 2)
4. Evaluar la carga de HCMV en plasma en los pacientes con sospecha de neumonía y su correlación con la carga viral en BAL. (Trabajo 2)
5. Describir un protocolo detallado sobre el cultivo de SARS-CoV-2 y la confirmación mediante inmunofluorescencia de los cultivos positivos, para su aplicación en otros laboratorios con capacidad para realizarlo. (Trabajo 3)
6. Comparar los resultados obtenidos mediante cultivo viral y RT-PCR en muestras respiratorias positivas para SARS-CoV-2. (Trabajo 3)
7. Establecer la relación entre el valor del Ct, el número de días desde la aparición de los síntomas y la capacidad infectiva del SARS-CoV-2, utilizando el cultivo viral como técnica de referencia. (Trabajo 3)

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

El material, los métodos y los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral por compendio de artículos son los expuestos en los siguientes estudios publicados:

- **Primer Trabajo:**

Título: *Quantitative PCR for the Diagnosis of HCMV Pneumonia in HSCT Recipients and Other Immunocompromised Hosts.*

Autores: Carla Berengua, Rodrigo Martino.

Revista: *Hemato* 2023, 4(1), 76-89.

- **Segundo Trabajo:**

Título: *Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients with pneumonitis by viral culture and DNA quantification.*

Autores: Berengua C, Miró E, Gutiérrez C, Sánchez M, Mulero A, Ramos P, Del Cuerpo M, Torrego A, García-Cadenas I, Pajares V, Navarro F, Martino R, Rabella N.

Revista: *Journal of Virological Methods* 2023 Jul:317:114743

Factor Impacto (2022): 3,1

- **Tercer Trabajo:**

Título: *Viral culture and immunofluorescence for the detection of SARS-CoV-2 infectivity in RT-PCR positive respiratory samples.*

Autores: Berengua C, López M, Esteban M, Marín P, Ramos P, Cuerpo MD, Gich I, Navarro F, Miró E, Rabella N.

Revista: *Journal of Clinical Virology* 2022 Jul:152:105167

Factor Impacto (2021): 14,4

1. PRIMER TRABAJO: *Quantitative PCR for the Diagnosis of HCMV Pneumonia in HSCT Recipients and Other Immunocompromised Hosts*

Autores: Carla Berengua, Rodrigo Martino

Revista: *Hemato* 2023, 4(1), 76-89.

Resumen: La neumonía es una de las manifestaciones más graves de la infección por HCMV, con una elevada morbilidad y mortalidad. La neumonía probable se define como la detección de HCMV en lavado broncoalveolar (BAL) mediante aislamiento viral o cuantificación del ADN (qPCR) combinada con síntomas y/o signos de infección respiratoria. Sin embargo, en la actualidad no existe una carga viral (CV) reproducible y bien definida en BAL que permita diferenciar de forma fiable a los pacientes con neumonía de la detección mucho más común de DNA viral en pacientes seropositivos sin verdadera neumonía. Se han publicado varios estudios en con el objetivo de establecer una CV óptima para diferenciar la neumonía de la excreción viral pulmonar. El objetivo de esta revisión es recoger y analizar la metodología y las conclusiones obtenidas en los estudios cuyos objetivos incluían la correlación entre la CV de HCMV en el BAL y/o el plasma y la aparición de neumonía por HCMV. Para ello, se han incluido un total de 14 artículos. Hay algunas conclusiones en las que todos coinciden. Las técnicas de PCR eran más sensibles y tenían un VPN más alto que las técnicas de cultivo, pero eran menos específicas y tenían un bajo VPP. Las cargas medias de HCMV tanto en el BAL como en el plasma fueron significativamente mayores en los pacientes con neumonía que en aquellos sin neumonía. La carga de HCMV en pacientes con neumonía fue mayor en el BAL que en el plasma, lo que hace que la qPCR en el BAL sea un mejor predictor de la neumonía por HCMV que en plasma. No obstante, esta revisión pone de manifiesto la dificultad de establecer un valor universal de CV, tanto en el BAL como en la sangre, para diferenciar a los pacientes con neumonía por HCMV de los que no la padecen. Para completar la información disponible en estos estudios, serían necesarios estudios multicéntricos prospectivos. Desde el punto de vista metodológico, habría que incluir a un gran número de pacientes con neumonía por HCMV y realizar una subclasificación en función del tipo de inmunosupresión de cada paciente con el fin de obtener un umbral óptimo de CV en diferentes grupos de huéspedes.

Review

Quantitative PCR for the Diagnosis of HCMV Pneumonia in HSCT Recipients and Other Immunocompromised Hosts

Carla Berengua ^{1,2,3,*}  and Rodrigo Martino ^{3,4} ¹ Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain² Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain³ Sant Pau Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau) Barcelona, 08041 Barcelona, Spain⁴ Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain

* Correspondence: cberengua@santpau.cat

Abstract: Pneumonia is among the most serious manifestations of HCMV infection, with high morbidity and mortality. Probable pneumonia is defined as the detection of HCMV in bronchoalveolar lavage (BAL) by viral isolation or DNA quantification (qPCR) combined with symptoms and/or signs of respiratory infection. However, currently, there is no reproducible and well-defined viral load (VL) from BAL that can reliably differentiate patients with pneumonia from the much more common detection of viral DNA in seropositive patients without true HCMV pneumonia. Several studies have been published with the aim of establishing an optimal VL for differentiating pneumonia from viral lung shedding. The aim of this review is to collect and analyze the methodology and the conclusions obtained in studies whose objectives included the correlation between HCMV VL in BAL and/or the plasma and the occurrence of HCMV pneumonia. For this purpose, a total of 14 articles have been included. There are some conclusions on which they all agree. PCR techniques were more sensitive and had a higher NPV than culture techniques but were less specific and had a low PPV. The mean HCMV loads in both BAL and the plasma were significantly higher in patients with pneumonitis than in those without. The HCMV load in patients with pneumonitis was higher in BAL than in the plasma, making qPCR in BAL a better predictor of HCMV pneumonitis than in the plasma. Nevertheless, this review highlights the difficulty of establishing a universal VL value, both in BAL and in the blood, to differentiate patients with HCMV pneumonia from those without. To complete the information available in these studies, prospective multicentre studies would be required. Methodologically, a large number of patients with HCMV pneumonitis would have to be included, and a subclassification of the type of immunosuppression of each patient should be made in order to obtain an optimal VL threshold in different host groups.

Keywords: HCMV; Cytomegalovirus; HSCT; qPCR; bronchoalveolar lavage; viral culture; pneumonia



Citation: Berengua, C.; Martino, R. Quantitative PCR for the Diagnosis of HCMV Pneumonia in HSCT Recipients and Other Immunocompromised Hosts. *Hemato* **2023**, *4*, 76–89. <https://doi.org/10.3390/hemato4010008>

Academic Editor: Francesco Onida

Received: 31 January 2023

Revised: 22 February 2023

Accepted: 27 February 2023

Published: 2 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human Cytomegalovirus (HCMV) is a double-stranded DNA virus of the family Herpesviridae, subfamily Betaherpesvirinae. It is one of the largest viruses known to cause clinical disease (230 kb). The primary infection usually occurs in the first years of life, by direct contact with secretions of infected individuals, such as saliva, breast milk or urine. The seroprevalence in adults is between 50 and 98%, being higher in developing countries. In the immunocompetent host, the primary infection is usually asymptomatic or presents as a self-limited mononucleosis-like syndrome characterized by fever, lymphadenopathy and lymphocytosis. After primary infection, HCMV remains latent for life in different cells. In immunocompromised hosts (IMC), such as hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) or solid organ transplant (SOT) recipients or patients with HIV, uncontrolled viral replication can occur, both after a primary infection, but, most commonly, after reactivation of the latent virus. In these patients, HCMV can cause severe

clinical disease, mainly pneumonitis, colitis or retinitis. The incidence of HCMV disease has decreased in recent years thanks to strategies such as pre-emptive therapy and, more recently, due to prophylaxis in HSCT recipients. Nevertheless, HCMV remains one of the most feared opportunistic pathogens in IMC, especially in those with impaired T-cell mediated immunity [1,2], and is certainly one of the viruses for which HSCT clinicians screen for the most both before and after transplantation.

Pneumonia is among the most serious manifestations of HCMV infection, with high morbidity and mortality, even with antiviral treatment. Allogeneic HSCT recipients are particularly at high risk of HCMV pneumonia, with an extremely variable incidence nowadays (from <1% to 30% of patients with HCMV reactivation) and a mortality of up to 70% [1–4]. The radiological findings and symptoms are nonspecific, which makes diagnosis difficult and delayed. This is paradoxically a more important clinical conundrum nowadays since true HCMV pneumonia has decreased while the development of pneumonias of unknown origin has increased. In chest radiographs, HCMV pneumonitis typically manifests as diffuse interstitial infiltrates, although a nodular pattern may be observed, and completely nonspecific lung infiltrates may also be due to HCMV pneumonia [1,5].

To define and unify the concepts of HCMV infection and disease for use in clinical trials, a consensus report was developed at the Fourth International Conference on HCMV in Paris in 1993. Since then, significant advances have been made in the diagnosis and treatment of HCMV infection, leading to several guideline updates, the latest in 2017 [6]. It differentiates between proven and probable HCMV pneumonia. For proven pneumonia, symptoms and/or signs of respiratory infection are needed with the presence of HCMV identified in lung tissue (i.e., biopsy or autopsy) by virus isolation, rapid culture, histopathology, immunohistochemistry, or DNA hybridization techniques. Probable pneumonia is defined as the detection of HCMV in bronchoalveolar lavage (BAL) by viral isolation or DNA quantification (qPCR) combined with symptoms and/or signs of respiratory infection. However, currently, there is no reproducible and well-defined viral load (VL) from BAL to differentiate patients with pneumonitis from the much more common detection of viral DNA in seropositive patients without true HCMV pneumonia. This problem is, of course, not limited to HCMV but is also the case for other human herpesviruses, especially HHV-6, and *Pneumocystis jirovecii*, to cite only a few of the BAL “positive PCR” difficult-to-interpret pathogens. This makes it difficult to interpret the results of qualitative reverse-transcriptase PCR. At least in theory, a quantitative PCR (qPCR) would be more helpful in identifying patients at high risk of having true HCMV pneumonia for clinical decision-making. However, qPCR from BAL is far from being standardized.

Definitive pneumonia requires analyzing lung tissue, but obtaining lung biopsies for the detection of HCMV by immunohistochemistry requires invasive techniques, which are nearly always contraindicated, especially in HSCT recipients. Currently, the use of BAL samples for the diagnosis of pneumonia in these patients is already widely extended and accepted [7].

In the last 20 years, the laboratory methods used to detect the virus have also been changing with the development and introduction of molecular techniques. However, one should never forget that proving the presence of a viable, replicating virus is the only way of extrapolating active disease in the clinical sample tested. Thus, viral culture is considered the gold standard for the diagnosis of active HCMV disease, either by traditional tube culture or by culture through centrifugation (shell vial). These allow the recovery of the virus that is replicating and has a high correlation with the occurrence of disease [1,8]. The main limitation of traditional culture is the time needed to observe the characteristic cytopathic effect of HCMV replication, which can range from 1 to 4 weeks, which limits its usefulness in diagnosis and clinical decision-making. However, thanks to the centrifugation of the culture in a shell vial, it is possible to obtain results within 24–48 h, which increases its usefulness in clinical practice, as well as being more sensitive than the traditional tube [1,8]. The detection of the HCMV pp65 antigen expressed on leukocytes during the early period of infection (antigenemia) has also been a widely used technique for the

diagnosis and monitoring of HCMV infection. This technique has many limitations, such as a lack of standardization, laboriousness, and the need for samples with an adequate number of leukocytes in the blood (difficult in transplant patients) [8]. Both culture-based techniques and antigenemia have been displaced in most laboratories by simpler, faster, and more sensitive techniques, such as DNA detection by PCR. It should be kept in mind that HCMV persists latently in cells after primary infection without causing disease, and this non-replicating DNA may be detected by PCR techniques. This makes the detection of HCMV DNA a less specific indicator of active virus replication and disease than culture. The widespread use of PCR techniques and the possible misinterpretation of their results (possible detection of non-replicating DNA) may lead to the over-diagnosis of HCMV disease and, consequently, over-treatment [9,10].

Today, DNA quantification using qPCR is the most widely used PCR method for the diagnosis of HCMV infection or monitoring the patients' VL, especially in peripheral blood samples. Blood screening by qPCR for HCMV DNAemia is recommended at least once a week during the high-risk period after transplantation and to monitor response to pre-emptive antiviral treatment. The major limitation of qPCR is a lack of well-established VL thresholds to guide various clinical applications, a consequence, above all, of the variability between the assays marketed for this determination, despite their calibration to the WHO International Standard. This limitation applies to any sample analyzed, but in the case of HCMV pneumonia, its diagnosis using BAL faces further issues that complicate its interpretation. Thus, in addition to the lack of standardization in obtaining BAL samples, their subsequent processing also introduces variability when it comes to quantifying HCMV DNA. Finally, clinically relevant threshold BAL VL certainly varies depending on the type of the patient [8,11].

Several studies have been published with the aim of establishing the optimal VL of HCMV by qPCR in BAL samples for differentiating patients with pneumonia from those without. The quantification of HCMV in the blood (DNAemia) has also been studied for its potential role in diagnosing patients with pneumonia. In both cases, a universal conclusion has not been reached.

The aim of this review is to collect and analyze the methodology and the conclusions obtained in studies whose objectives included the correlation between HCMV VL in BAL and/or the plasma and the occurrence of HCMV pneumonia.

2. Materials and Methods

For this purpose, a search was carried out in the Pubmed database. This search consisted of three components: "cytomegalovirus", "bronchoalveolar lavage", and "viral load". "cytomegalovirus" [Title/Abstract] AND "bronchoalveolar lavage" [Title/Abstract] AND "viral load" [Abstract].

Only articles with full-text availability that were written in English between 1992 and October 2022 were included. This search generated 47 results as of 14 November 2022. After reviewing these articles, we excluded those that dealt with ventilator-associated pneumonia or nosocomial pneumonia and those whose primary objectives did not include the study of HCMV pneumonia. This resulted in 14 studies whose objective(s) included the relationship between HCMV DNA load in BAL and HCMV pneumonia.

3. Results

The results of the 14 studies analyzed are shown in detail in Table 1.

Table 1. Studies on the role of hCMV PCR from BAL in the diagnosis of hCMV pneumonia in immunocompromised patients, in descending chronological order from the date of publication (studies available as of December 2022).

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Saksirisampant et al., 2022. [12]	<ul style="list-style-type: none"> - Overall, 45 BALs and the plasma from 45 IMS adult patients with clinical and radiological findings compatible with pneumonia were tested by HCMV qPCR. 	<ul style="list-style-type: none"> - Eleven (24%) patients developed HCMV pneumonitis. All of these patients had detectable plasma HCMV VL (median VL 41,939 UI/mL) and detectable BAL HCMV VL (median VL 379,652 IU/mL) - Thirty-four (76%) patients without HCMV pneumonitis, with median plasma and BAL HCMV VL of 0 IU/mL. - A significant positive correlation was observed between plasma and BAL HCMV VL ($R^2 = 0.887$, $p < 0.001$). - A HCMV VL in BAL was established as an optimal cut-off value to distinguish between HCMV pneumonitis and non-pneumonitis: 831 IU/mL in the plasma and 24,565 IU/mL in BAL. - Undetectable plasma HCMV excluded HCMV pneumonitis. 	<ul style="list-style-type: none"> - BAL and plasma samples were collected in parallel, which were prospectively qPCR on fresh samples. - A fully automated and highly sensitive qPCR assay was used. 	<ul style="list-style-type: none"> - Small number of patients with HCMV pneumonitis (n = 11). - Viral culture was not used to establish virus replication. - Potential bias in selecting patients for bronchoscopy. - Heterogeneous group of immunocompromised patients included. - Not all patients could be studied by histopathology or cytology.
Leuzinger et al., 2020. [9]	<ul style="list-style-type: none"> - In 1109 BALs from 799 IMS patients (median age: 61 years), the presence of HCMV was tested by viral culture, specific immunofluorescence, and qPCR. - Overall, 76 patients with a HCMV-positive load in BAL were also tested by HCMV qPCR in the plasma. 	<ul style="list-style-type: none"> - Median HCMV VL was significantly higher in culture-positive than in culture-negative BAL. - The likelihood for HCMV detection by culture in BAL increased with higher VL (85% for VL >10,000 copies/mL). - BAL HCMV VL of 10,000 copies/mL was indicative of relevant replication. - HCMV VL cut-off is likely to vary depending on BAL procedure and processing or the assay used for qPCR. - One-third of patients with HCMV-positive BAL had undetectable plasma loads, indicating local HCMV replication in the lung. 	<ul style="list-style-type: none"> - High number of patients and samples studied. - Viral culture performed on all BAL as a significantly relevant indicator of replication. - In a group of patients (112), BALs were prospectively analyzed (in parallel culture and qPCR of fresh samples) to assess the effect of sample freezing on virus DNA degradation. 	<ul style="list-style-type: none"> - Most BALs (997) were tested by qPCR retrospectively from frozen samples. - Heterogeneous group of immunocompromised patients included. - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction). - Non-availability of lung biopsy to be able to define more accurately the cases of HCMV pneumonia.

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Piñana et al., 2019. [11]	<ul style="list-style-type: none"> Overall, 144 BALs and the plasma from 123 allogenic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT) with signs and/or symptoms of pneumonia were tested by HCMV qPCR in 2 different hospitals 	<ul style="list-style-type: none"> The detection of HCMV DNA in BAL is a very common finding in allo-HSCT, since HCMV DNA was detected in 56 (38.9%) of BALs. Overall, 60% of the patients had non-proven HCMV pneumonia, having VL >500 IU/mL. Furthermore, 500 IU/mL is unlikely to be discriminative between pneumonia and pulmonary DNA HCMV shedding. HCMV VL cut-off is likely to vary depending on patients' characteristics, BAL procedure and processing or the assay used for qPCR. Differences in HCMV VL in BAL provided by qPCR assays used in each centre. 	<ul style="list-style-type: none"> BALs were included consecutively, and fresh samples were tested (prospective). A highly sensitive real-time qPCR assay was used. 	<ul style="list-style-type: none"> Reference techniques, such as viral culture, were not used to establish virus replication. Two hospitals with different qPCR assays are included. Retrospective data analysis. qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction).
Beam et al., 2018. [13]	<ul style="list-style-type: none"> Thirty-eight BALs and the plasma from 38 IMS patients (the majority were transplant recipients, median age: 55.9 years) were tested by HCMV qPCR. In BAL, VL results were adjusted for the number of cells in each BAL (normalized VL) 	<ul style="list-style-type: none"> There were 17 (44.7%) patients with HCMV pneumonia (6 proven) and 21 (55.3%) without HCMV pneumonia. Higher HCMV median VL in BAL was observed in patients with proven pneumonitis (>18,200,000 IU/mL), followed by probable cases (1,305,000 IU/mL) and lower VL in possible cases (32,400 IU/mL). HCMV VL threshold in BAL of 34,800 IU/mL would identify patients with pneumonitis. 	<ul style="list-style-type: none"> Normalization results in VL by cells in BAL. 	<ul style="list-style-type: none"> Small number of proven pneumonitis (6). Heterogeneous group of immunocompromised patients included. Viral culture was not used to establish virus replication. qPCR performed on BAL samples stored at −80 °C (not fresh). qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction).

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Lodding et al., 2017. [14]	<ul style="list-style-type: none"> - Overall, 972 BALs and the plasma from 141 lung transplant recipients were tested by HCMV qPCR. - In 859 lung biopsies, HCMV was studied by IHC. 	<ul style="list-style-type: none"> - In 145 (15%) BALs, HCMV was detected by qPCR, of which 34 had pneumonia criteria and 111 without. - BAL HCMV VL was consistently higher in episodes with HCMV pneumonia in lung transplant recipients. Median VL in BAL was 32,940 IU/mL in HCMV pneumonia and 1260 IU/mL without pneumonia ($p < 0.001$). - Optimal cut-off HCMV VL in BAL for diagnosing HCMV pneumonia is 4545 IU/mL (91% sensitivity and 77% specificity). - qPCR in BAL had high diagnostic accuracy for diagnosing HCMV pneumonia and was better than qPCR in plasma. BAL HCMV VL was log₁₀ 1.4-fold higher than the corresponding positive HCMV VL in plasma. - Episodes of HCMV pneumonia were more likely to be HCMV-positive in the plasma (63%) compared with those without pneumonia (24%) ($p < 0.001$). - Overall, 37% of the HCMV pneumonia episodes had a negative PCR in the plasma; thus plasma HCMV PCR had limited sensitivity for the diagnosis of pneumonia. 	<ul style="list-style-type: none"> - High number of patients and samples studied. - BAL and plasma samples collected consecutively and in parallel, which were prospectively qPCR on fresh samples. - Lung biopsies were included for histological study. 	<ul style="list-style-type: none"> - Viral culture was not used to establish virus replication. - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction).

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Iglesias et al., 2017. [15]	<ul style="list-style-type: none"> - Fifty-six recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT, median age: 51 years, range 17–68) were studied. 16 (28.6%) of these patients presented symptoms of lung disease, and a BAL and plasma sample was collected. BAL was tested by HCMV culture and qPCR, and plasma by qPCR. 	<ul style="list-style-type: none"> - VL of CMV in BAL was positive in 10 (62.5%) patients (in 7 VL >150 copies/mL and in 3 VL <150 copies/mL). - Of the 7 patients with BAL VL >150 copies/mL, 6 (85.7%) were diagnosed with probable HCMV pneumonia, and in 1 (14.3%) case, HCMV disease was discounted. - In 6 patients with HCMV pneumonia (10.7% of all patients), the median BAL VL was 53,250 copies/mL. In 5 cases, the plasma VL was positive, with a median of 538 copies/mL. - Only one BAL sample was positive for CMV by virological culture, with a VL >10,000,000 copies/mL. - All patients' plasma VL was lower than in BAL. - Any value of CMV VL in BAL, with compatible signs or symptoms, should be considered suggestive of CMV pneumonia in allo-HSCT. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fresh BAL samples were used and tested by viral culture. - BAL and plasma samples were collected in parallel, which were prospectively qPCR on fresh samples. - A fully automated and highly sensitive qPCR assay was used. 	<ul style="list-style-type: none"> - Small number of patients with HCMV pneumonitis (6). - Not all patients underwent BAL (only 16).
Young Lee et al., 2017. [16]	<ul style="list-style-type: none"> - In 565 BALs from 565 adult patients (median age: 48 years) with hematologic malignancies and signs and/or symptoms of pneumonia who underwent bronchoscopy, HCMV was tested by qPCR, Shell-vial culture and IHC. - Additional assays such as blood HCMV qPCR and lung biopsies were also reviewed. 	<ul style="list-style-type: none"> - There were 464 (82.1%) patients negative for HCMV or <380 copies/mL in BAL. - There were 101 (17.9%) patients with HCMV qPCR >380 copies/mL in BAL. 24 (23.8%) of them were diagnosed with HCMV pneumonia. - Patients with HCMV pneumonia had significantly higher VL in BAL than patients without (7,378,508 vs. 10,899 copies/mL). - Patients with HCMV pneumonia had significantly higher VL in plasma than patients without (683,659 vs. 20,915 copies/mL). - Cut-off value of 28,774 copies/mL HCMV in BAL was correlated with HCMV pneumonia. 	<ul style="list-style-type: none"> - High number of patients and samples studied. - Fresh BAL samples were used, which were tested by reference techniques such as shell vial culture and immunohistochemical (IHQ). - Lung biopsies were included for histological study. 	<ul style="list-style-type: none"> - Retrospective data analysis. - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction).

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Govender et al., 2017. [17]	<ul style="list-style-type: none"> - Eighty-seven infants (median age: 3.7 months) with suspected HCMV infection and severe pneumonia requiring ventilation, included in the intensive care unit, were tested for HCMV by qPCR on BAL and plasma samples. 	<ul style="list-style-type: none"> - Twenty-nine patients (33.3%) were HCMV-infected and diagnosed with HCMV pneumonitis. - Twenty-five patients (28.7%) were HCMV-infected without HCMV pneumonitis. - Thirty-three patients (37.9%) were HCMV-uninfected. - There was a significant difference in mean HCMV VL in BAL between patients HCMV-infected without pneumonitis (3.78 log₁₀ IU/mL) and those with HCMV pneumonitis (5 log₁₀ IU/mL). - There was a significant difference in mean HCMV VL in plasma between patients HCMV-infected without pneumonitis (3.5 log₁₀ IU/mL) and those with HCMV pneumonitis (4.17 log₁₀ IU/mL). - The threshold of 4.03 log₁₀ IU/mL in BAL was chosen for predicting HCMV pneumonitis. - qPCR in BAL is more predictive of HCMV pneumonitis than in plasma. 	<ul style="list-style-type: none"> - BAL and plasma samples were collected in parallel, and fresh samples were used for qPCR. 	<ul style="list-style-type: none"> - Viral culture was not used to establish virus replication. - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction) and less sensitive than current qPCR.
Boeckh et al., 2017. [18]	<ul style="list-style-type: none"> - Overall, 271 BALs and plasma samples from 271 hematopoietic stem cell transplant recipients (132 patients with HCMV pneumonitis and 139 controls) were tested by HCMV qPCR. - All BAL were also tested for the presence of B-globin DNA by PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> - Median HCMV VL in BAL of patients with HCMV pneumonitis (2.9 log₁₀ IU/mL) was significantly higher than in the 3 control groups (0 log₁₀ IU/mL in patients with non-CMV pneumonia and idiopathic pneumonia syndrome, and 1.63 log₁₀ IU/mL in asymptomatic patients). - HCMV VL in BAL > 500 IU/mL reliably differentiates HCMV disease, good PPV and excellent NPV. - BAL storage time did not appear to affect VL. - Pulmonary haemorrhage, co-pathogens and radiographic presentation do not seem to affect BAL VL. 	<ul style="list-style-type: none"> - High number of cases of HCMV pneumonitis (132). - Fresh BAL samples were used and tested by viral culture. - Analysis of the effect of pulmonary haemorrhage, co-pathogens, and radiological presentation on HCMV VL in BAL. - Analysis of BAL cellularity and quality of DNA extraction by BAL B-globin amplification. 	<ul style="list-style-type: none"> - qPCR performed on BAL samples stored at −80 °C (not fresh). - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction). - Plasma samples separated up to 7 days from the performance of the bronchoscopy are included.

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
K. Tan et al., 2015. [10]	<ul style="list-style-type: none"> - Retrospective analysis of 1074 BALs from 699 IMS patients (range 18–92.6 years old), testing HCMV by qPCR and culture (conventional and shell vial). - In 20 cases with positive BAL for HCMV, a lung biopsy was performed for histopathological study. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ninety (12.9%) patients were HCMV-positive (PCR and/or culture) in BAL, and 609 (87.1%) were HCMV-negative. - Sensitivity of qPCR (91.3%) was significantly higher than both SV-culture (54.4%) and conventional-culture (28.3%). - Specificity of qPCR (94.6%) was significantly lower than both SV-culture (97.4%) and conventional-culture (96.5%). - NPV of qPCR (99.6%) was significantly higher than both SV-culture (97.9%) and conventional-culture (96.9%). - VL HCMV in BAL not statistically different between patients with or without pneumonitis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fresh BAL samples were used and tested by traditional culture and shell-vial. - High number of cases of HCMV pneumonitis were included. 	<ul style="list-style-type: none"> - Retrospective data analysis. - Heterogeneous group of immunocompromised patients included. - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction) and less sensitive than current qPCR. - Not all patients underwent HCMV analysis in blood by qPCR. - Not all patients could be studied by histopathology or cytology.
Westall et al., 2004. [19]	<ul style="list-style-type: none"> - Overall, 182 paired samples (BAL and plasma) from 41 lung transplant recipients (range 18–64 years old) were tested by HCMV qPCR. - In the BAL samples, qPCR was undertaken using the supernatant and the cell pellet. - Fourty-two patients also underwent a transbronchial biopsy for a histological study of HCMV. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fourteen samples (8.1%) had HCMV DNA detected in both BAL and plasma. - Overall, in 123 (71.5%) samples, HCMV DNA was not detected in either BAL or plasma. - In 35 samples (20.3%), HCMV DNA was detected in BAL but not in the plasma. - Qualitative HCMV PCR in BAL low specificity (76%). - Mean VL HCMV in BAL with proven HCMV pneumonitis was significantly higher than those without pneumonitis ($19,460 \pm 4917$ vs. 5873 ± 1543 copies/mL). - Mean VL HCMV in plasma with proven HCMV pneumonitis was significantly higher than those without pneumonitis (6791 ± 2942 vs. 561 ± 445 copies/mL). - All episodes of histologically proven HCMV infection were associated with VL in BAL > 46,000 copies/mL. - The detection of HCMV DNA in BAL, compared with detection in plasma, was better correlated with HCMV pneumonitis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Patients were enrolled consecutively and prospectively. - BAL and plasma samples were collected in parallel, and fresh samples were used for qPCR. - Lung biopsies were included for histological study. 	<ul style="list-style-type: none"> - Small number of histologically proven HCMV disease (8). - Viral culture was not used to establish virus replication. - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction).

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Chemaly et al., 2004. [20]	<ul style="list-style-type: none"> - Overall, 43 BALs from 27 lung transplant recipients (range 21–65 years old) were tested by shell vial culture and quantitative hybrid capture assay (Q-HCA). - In patients with positive BAL for HCMV, IHC of the transbronchial biopsy was performed. - HCMV was also studied in 18 blood samples using Q-HCA 	<ul style="list-style-type: none"> - 15 (27%) patients had both positive BAL culture and Q-HCA. - 5 (33%) of these 15 were diagnosed as HCMV pneumonitis (positive lung biopsy), all with VL > 500,000 copies/mL in BAL (mean of 1,638,457 copies/mL). - The remaining 10 (66%) without HCMV pneumonitis, all with VL < 500,000 copies/mL in BAL (mean of 81,820 copies/mL). - Significantly higher VL in BAL in patients with HCMV pneumonitis compared to those without HCMV pneumonitis (0.002). - Patients with HCMV pneumonitis (5) had a mean VL in the blood of 347,515 copies/mL, while those without pneumonitis (5) had a mean VL in the blood of 3151 copies/mL ($p < 0.02$). - HCMV VL in BAL was more predictive of pneumonitis than the blood VL. 	<ul style="list-style-type: none"> - Patients were enrolled consecutively and prospectively. - Fresh BAL samples were used and tested by traditional culture and shell vial. - All patients underwent lung biopsy for cytological and histological study. 	<ul style="list-style-type: none"> - Small number of patients with HCMV pneumonitis (5). - The quantitative hybrid capture assay (Q-HCA) was used, a less sensitive and automated technique than qPCR. - Not all patients underwent HCMV analysis in blood by qPCR.
Chemaly et al., 2003. [21]	<ul style="list-style-type: none"> - Overall, 42 BALs from 27 lung transplant recipients were tested by HCMV quantitative hybrid capture assay (Q-HCA). - In addition, the presence of HCMV in 39 lung biopsies was studied by histology and IHC. - HCMV was also studied in 32 blood samples using Q-HCA. 	<ul style="list-style-type: none"> - HCMV was detected in lung biopsy samples by H&E in 3 (8%) and by IHC in 13 (33%). - VL in BAL was significantly higher than in blood. - HCMV VL in both BAL and blood in patients with histological evidence of HCMV disease was significantly higher than in those without evidence. - Median HCMV VL in BAL was 0 copies/mL in patients with IHQ-negative biopsy, 47,678 copies/mL in biopsy positive-atypical straining and 1,548,827 copies/mL biopsy positive-typical straining ($p < 0.001$). 	<ul style="list-style-type: none"> - Patients were enrolled consecutively and prospectively. - Fresh BAL samples were used. - All patients underwent lung biopsy for cytological and histological study. 	<ul style="list-style-type: none"> - Small number of patients with HCMV pneumonitis. - Viral culture was not used to establish virus replication. - The quantitative hybrid capture assay (Q-HCA) was used, a less sensitive and automated technique than qPCR. - Not all patients underwent HCMV analysis in blood by qPCR.

Table 1. Cont.

Article	Material and Methods	Results and Conclusions	Strengths	Limitations
Riise et al., 2000. [22]	- Overall, 340 BALs from 35 consecutive lung transplant recipients (adults and infants) were tested by HCMV qPCR and culture	- Seventeen (49%) of the patients developed HCMV pneumonitis. - Patients that developed HCMV disease had a significantly higher mean VL in BAL (1120 ± 4.379 copies/mL) compared with those without (180 ± 1177 copies/mL). - qPCR HCMV in BAL is not useful as a diagnostic tool for HCMV disease.	- Patients were enrolled consecutively and prospectively. - Fresh BAL samples were used and tested by viral culture.	- Small number of patients with HCMV pneumonitis (17). - qPCR assay not fully automated (requires prior DNA extraction).

4. Conclusions

As shown in this review, in recent years, several studies have been carried out to determine the relationship between the HCMV VL in BAL and the plasma with HCMV pneumonia.

There are some conclusions on which they all agree. PCR techniques were more sensitive and had a higher NPV than culture techniques but were less specific. HCMV DNA detection in BAL does not always imply disease, so quantifying VL should, in theory, be important for clinical interpretation. The mean HCMV load in both BAL and plasma was significantly higher in patients with pneumonitis than in those without. The HCMV load in patients with pneumonitis was higher in BAL than in the plasma, making qPCR in BAL a better predictor of HCMV pneumonitis than in plasma.

Nevertheless, this review highlights the difficulty of establishing a universal VL value, both in BAL and in blood, to differentiate patients with HCMV pneumonia from those without (HCMV DNA shedding). The results and conclusions obtained in these studies are quite different, partly because of the methodological variability of the different studies. In addition, only a few studies used the reference techniques (HCMV detection in biopsy or isolation by culture) to compare viral load results and define HCMV pneumonia cases [16,20]. In each of them, a different value of VL in BAL indicative of active replication in the lung was obtained, ranging from 500 IU/mL [18] to >500,000 copies/mL [20]. On the other hand, some authors concluded that it is not possible to obtain a VL threshold that allows the identification of patients with HCMV pneumonitis [11,22]. Regarding the value of DNAemia testing in the diagnosis of HCMV pneumonia, there are also discrepancies. Some authors found that in up to one-third of patients with pneumonia, HCMV DNA was not detected in the blood [9,19]. Conversely, others claim that in patients in whom HCMV is not detected in plasma, pneumonia can be ruled out [12].

These authors reflect in their work that there are many factors that may influence the VL value in BAL. The first and most important of these is the dilutional effect of bronchoscopy. The serum instilled in the procedure is distributed heterogeneously, and both the volume of lung bathed and the amount of fluid recovered are highly variable among individuals. This makes the quantification in the BAL highly variable. Another important factor is related to the lack of standardization of the tests available in the different laboratories for the quantification of HCMV DNA. In the studies included in the review, it can be observed that different protocols and tests are used in each of them for this purpose. Aspects such as assay performance (limits of detection and quantification), the method for DNA extraction, gene target, and amplicon size contribute to VL variability. In addition, clinically relevant VL values are likely to differ depending on the type of patients and their risk profiles.

Additional caveats include the small number of patients with HCMV pneumonitis in each study. In addition, not all studies used direct diagnostic tests such as viral culture or histology in lung biopsies to establish the level of evidence for CMV pneumonia. Finally, some studies used qPCR assays that were not fully automated and required previous sample handling prior to the extraction of the DNA.

To complete the information available in these studies, prospective multicenter studies would be required. Methodologically, a large number of patients with HCMV pneumonitis would have to be included, and a subclassification of the type of immunosuppression of each patient should be made in order to obtain a VL value in BAL according to the risk of each group. Such a study is, of course, logistically impossible to perform. In addition, in an ideal world, the BAL-related variability would have to be reduced by using a common BAL procedure, another impossible objective. Finally, uniform virologic tests would be needed with all centers participating in the study using the same qPCR assay, which should be as sensitive and automated as possible, and HCMV cultures should be performed on all BAL samples. Of course, concomitant plasma qPCR should be performed, which is the only feasible test currently available in all centers. However, certainly, the most problematic

issue would be the very few cases of histologically proven disease that would be available due to the very low rate of lung biopsies performed, especially in alloHSCT recipients.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dioverti, M.V.; Razonable, R.R. Cytomegalovirus. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Boeckh, M.; Geballe, A.P. Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 1673–1680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ibrahim, A.; Gautier, E.; Roittmann, S.; Bourhis, J.H.; Fajac, A.; Charnoz, I.; Terrier, P.; Salord, J.M.; Tancrède, C.; Hayat, M.; et al. Should cytomegalovirus be tested for in both blood and bronchoalveolar lavage fluid of patients at a high risk of CMV pneumonia after bone marrow transplantation? *Br. J. Haematol.* **1997**, *98*, 222–227. [[CrossRef](#)]
4. Boivin, G.; Olson, C.A.; Quirk, M.R.; Kringstad, B.; Hertz, M.I.; Jordan, M.C. Quantitation of cytomegalovirus DNA and characterization of viral gene expression in bronchoalveolar cells of infected patients with and without pneumonitis. *J. Infect. Dis.* **1996**, *173*, 1304–1312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Franquet, T.; Lee, K.S.; Müller, N.L. Thin-section CT findings in 32 immunocompromised patients with cytomegalovirus pneumonia who do not have AIDS. *Am. J. Roentgenol.* **2003**, *181*, 1059–1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ljungman, P.; Boeckh, M.; Hirsch, H.H.; Josephson, F.; Lundgren, J.; Nichols, G.; Pikis, A.; Razonable, R.R.; Miller, V.; Griffiths, P.D. Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 87–91. [[CrossRef](#)]
7. Stover, D.E.; Zaman, M.B.; Hajdu, S.I.; Lange, M.; Gold, J.; Armstrong, D. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann. Intern. Med.* **1984**, *101*, 1–7. [[CrossRef](#)]
8. Razonable, R.R.; Inoue, N.; Pinninti, S.G.; Boppana, S.B.; Lazzarotto, T.; Gabrielli, L.; Simonazzi, G.; Pellett, P.E.; Schmid, D.S. Clinical Diagnostic Testing for Human Cytomegalovirus Infections. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221* (Suppl. 1), S74–S85. [[CrossRef](#)]
9. Leuzinger, K.; Stolz, D.; Gosert, R.; Naegele, K.; Prince, S.S.; Tamm, M.; Hirsch, H.H. Comparing cytomegalovirus diagnostics by cell culture and quantitative nucleic acid testing in broncho-alveolar lavage fluids. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 3804–3812. [[CrossRef](#)]
10. Tan, S.K.; Burgener, E.B.; Waggoner, J.J.; Gajurel, K.; Gonzalez, S.; Chen, S.F.; Pinsky, B.A. Molecular and Culture-Based Bronchoalveolar Lavage Fluid Testing for the Diagnosis of Cytomegalovirus Pneumonitis. *Open Forum. Infect. Dis.* **2016**, *3*, ofv212. [[CrossRef](#)]
11. Piñana, J.L.; Giménez, E.; Gómez, M.D.; Pérez, A.; González, E.M.; Vinuesa, V.; Hernández-Boluda, J.C.; Montoro, J.; Salavert, M.; Tormo, M.; et al. Pulmonary cytomegalovirus (CMV) DNA shedding in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: Implications for the diagnosis of CMV pneumonia. *J. Infect.* **2019**, *78*, 393–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Saksirisampant, G.; Kawamatawong, T.; Promsombat, K.; Sukkasem, W.; Liamsombut, S.; Pasomsub, E.; Bruminhent, J. A Prospective Study of Plasma and Bronchoalveolar Lavage Fluid CMV DNA Load Quantification for the Diagnosis and Outcome of CMV Pneumonitis in Immunocompromised Hosts. *J. Clin. Virol.* **2022**, *155*, 105243. [[CrossRef](#)]
13. Beam, E.; Germer, J.J.; Lahr, B.; Yao, J.D.C.; Limper, A.H.; Binnicker, M.J.; Razonable, R.R. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in bronchoalveolar lavage fluid of immunocompromised patients with CMV pneumonia. *Clin. Transplant.* **2018**, *32*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lodding, I.P.; Schultz, H.H.; Jensen, J.U.; Kirkby, N.; Perch, M.; Andersen, C.; Lundgren, J.D.; Iversen, M. Cytomegalovirus Viral Load in Bronchoalveolar Lavage to Diagnose Lung Transplant Associated CMV Pneumonia. *Transplantation* **2018**, *102*, 326–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Iglesias, L.; Perera, M.M.; Torres-Miñana, L.; Pena-López, M.J. CMV viral load in bronchoalveolar lavage for diagnosis of pneumonia in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2017**, *52*, 895–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lee, H.Y.; Rhee, C.K.; Choi, J.Y.; Lee, H.Y.; Lee, J.W.; Lee, D.G. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by quantitative polymerase chain reaction using bronchial washing fluid from patients with hematologic malignancies. *Oncotarget* **2017**, *8*, 39736–39745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Govender, K.; Jeena, P.; Parboosing, R. Clinical utility of bronchoalveolar lavage cytomegalovirus viral loads in the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis in infants. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 1080–1087. [[CrossRef](#)]
18. Boeckh, M.; Stevens-Ayers, T.; Travi, G.; Huang, M.L.; Cheng, G.S.; Xie, H.; Leisenring, W.; Erard, V.; Seo, S.; Kimball, L.; et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA Quantitation in Bronchoalveolar Lavage Fluid From Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients with CMV Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 1514–1522. [[CrossRef](#)]
19. Westall, G.P.; Michaelides, A.; Williams, T.J.; Snell, G.I.; Kotsimbos, T.C. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: A longitudinal study of lung transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1076–1083. [[CrossRef](#)]

20. Chemaly, R.F.; Yen-Lieberman, B.; Chapman, J.; Reilly, A.; Bekele, B.N.; Gordon, S.M.; Procop, G.W.; Shrestha, N.; Isada, C.M.; Decamp, M.; et al. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2005**, *5*, 544–548. [[CrossRef](#)]
21. Chemaly, R.F.; Yen-Lieberman, B.; Castilla, E.A.; Reilly, A.; Arrigain, S.; Farver, C.; Avery, R.K.; Gordon, S.M.; Procop, G.W. Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 2168–2172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Riise, G.C.; Andersson, R.; Bergström, T.; Lundmark, A.; Nilsson, F.N.; Olofsson, S. Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: A longitudinal study in lung transplant recipients. *Chest* **2000**, *118*, 1653–1660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

2. SEGUNDO TRABAJO: *Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients with pneumonitis by viral culture and DNA quantification.*

Autores: C. Berengua, E. Miró, C. Gutiérrez, M. Sánchez, A. Mulero, P. Ramos, M. del Cuerpo, A. Torrego, I. García-Cadenas, V. Pajares, F. Navarro, R. Martino, N. Rabella.

Revista: *Journal of Virological Methods* 2023 Jul:317:114743

Resumen:

- **Objetivo:** Comparar la detección del citomegalovirus humano (HCMV) en el líquido de lavado broncoalveolar (BAL) mediante cultivo viral y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), y establecer un umbral de carga viral que pueda identificar los casos de replicación del HCMV indicativos de neumonía. En la actualidad no existe un punto de corte universal de la carga viral para para diferenciar entre pacientes con y sin neumonía, y la interpretación de los resultados de la qPCR es un reto.
- **Métodos:** Se estudiaron prospectivamente 176 muestras consecutivas de BAL procedentes de huéspedes inmunodeprimidos con signos y/o síntomas de infección respiratoria, mediante cultivo viral y qPCR.
- **Resultados:** Se obtuvieron resultados concordantes en el 81,25% de las muestras de BAL. El resto fueron discordantes, ya que sólo el 34% de las muestras de BAL positivas por qPCR lo fueron por cultivo. La mediana de la carga de HCMV fue significativamente mayor en las muestras BAL con cultivo positivo respecto a las de cultivo negativas (5.038 frente a 178 UI/mL). Utilizando un valor de 1258 UI/mL de HCMV en BAL, la neumonía se diagnosticó con una sensibilidad del 76%, una especificidad del 100%, un VPP del 100% y un VPN del 98%, y el HCMV se aisló en el 100% de los cultivos de BAL.
- **Conclusiones:** Encontramos que una qPCR negativa era una forma rápida y fiable de descartar neumonía por HCMV, pero un resultado positivo no siempre indicaba una replicación clínicamente significativa en el pulmón. Sin embargo, una carga de HCMV en BAL de ≥ 1.258 UI/mL se asociaba siempre con enfermedad, mientras que < 200 UI/mL raramente lo hacía.



Protocols

Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients with pneumonitis by viral culture and DNA quantification

C. Berengua^{a,b,e,*}, E. Miró^{a,b,e}, C. Gutiérrez^b, M. Sánchez^b, A. Mulero^b, P. Ramos^b, M. del Cuerpo^b, A. Torrego^{c,e}, I. García-Cadenas^{d,e}, V. Pajares^{c,e}, F. Navarro^{a,b,e}, R. Martino^{d,e}, N. Rabella^{a,b,e}

^a Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^b Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^c Pneumology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

^e Sant Pau Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Cytomegalovirus
HCMV
Viral culture
Quantitative PCR
Viral load
Pneumonitis
Immunosuppressed

ABSTRACT

Purpose: To compare the detection of human cytomegalovirus (HCMV) in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid by viral culture and quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and to establish a viral load threshold that can identify cases of HCMV replication indicative of pneumonitis. There is currently no universal viral load cut-off to differentiate between patients with and without pneumonitis, and the interpretation of qPCR results is challenging.

Methods: 176 consecutive BAL samples from immunosuppressed hosts with signs and/or symptoms of respiratory infection were prospectively studied by viral culture and qPCR.

Results: Concordant results were obtained in 81.25% of the BAL samples. The rest were discordant, as only 34% of the qPCR-positive BAL samples were positive by culture. The median HCMV load was significantly higher in culture-positive than in culture-negative BAL samples (5038 vs 178 IU/mL). Using a cut-off value of 1258 IU/mL of HCMV in BAL, pneumonia was diagnosed with a sensitivity of 76%, a specificity of 100%, a VPP of 100% and VPN of 98%, and HCMV was isolated in 100% of the BAL cultures.

Conclusion: We found that a qPCR-negative was a quick and reliable way of ruling out HCMV pneumonitis, but a positive result did not always indicate clinically significant replication in the lung. However, an HCMV load in BAL fluid of ≥ 1258 IU/mL was always associated with disease, whereas < 200 IU/mL rarely so.

1. Background

Human cytomegalovirus (HCMV) is a DNA virus belonging to the family *Herpesviridae*, subfamily *Betaherpesvirinae*. The seroprevalence in adults is between 50% and 98%, being higher in developing countries (Boeckh and Geballe, 2011). After primary infection, the virus may remain latent in different cells and tissues and reactivate throughout life. In immunocompetent hosts, primary infection very rarely causes severe disease, usually being asymptomatic, although it can present clinically

as a mononucleosis-like syndrome. In immunosuppressed hosts, it can cause severe systemic or end-organ disease, such as pneumonitis, colitis, or retinitis, both after primary infection and upon reactivation of the latent virus. Despite the reduction in the incidence of HCMV disease, due to pre-emptive antiviral therapy or prophylaxis and better diagnostic tools, HCMV remains the most important and feared opportunistic pathogen associated with transplant patients, especially those with impaired T-cell-mediated immunity (Boeckh and Geballe, 2011).

HCMV pneumonitis causes significant morbidity and mortality in

* Correspondence to: Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Sant Quintí Street, 89, 08041 Barcelona, Spain.

E-mail address: cberengua@santpau.cat (C. Berengua).

¹ ORCID: 0000-0001-9963-3809

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114743>

Available online 26 April 2023

0166-0934/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

immunosuppressed patients (transplant recipients, HIV-positive, or receiving immunosuppressive drug therapy), even with the correct antiviral treatment. In allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients, HCMV pneumonitis is one of the most dangerous infectious complications, with a mortality rate of up to 70% (Boeckh and Geballe, 2011; Ibrahim et al., 1997; Erard et al., 2015; Boivin et al., 1996). The symptoms and radiological findings of HCMV pneumonitis are non-specific, which hinders and delays diagnosis (Franquet et al., 2003).

At the Fourth International Conference on HCMV in Paris in 1993, a report was drawn up to define and unify the concepts of HCMV infection and disease, with a recent update in 2017 (Ljungman et al., 2017). Accordingly, it defines proven HCMV pneumonitis as the detection of the virus in lung tissue (by culture, histopathology, immunohistochemistry or DNA hybridisation techniques), accompanied by signs and/or symptoms of pneumonia. However, this requires a lung biopsy, which is invasive and often contraindicated, limiting the possibility of making this diagnosis. Fortunately, bronchoalveolar lavage (BAL) has become a widely accepted alternative to lung biopsy for the evaluation of lung disease (Stover et al., 1984), whereby probable HCMV pneumonitis can be diagnosed by virus detection in BAL fluid by culture or DNA quantification, accompanied by signs and/or symptoms of pneumonia.

Viral culture is considered the gold standard for the diagnosis of HCMV infection and positive cultures are highly correlated with disease (Razonable et al., 2002; Kotton, 2013). In the late 1980 s, culture-centrifugation (shell vial) was introduced and became the mainstay of HCMV diagnosis, providing faster results than traditional culture, and reducing the turnaround time from several weeks to one day (Rabella and Drew, 1990). Despite being the reference techniques for the diagnosis of viral infections, in most laboratories culture-based methods have been replaced, due to their laboriousness and longer turnaround time, by molecular techniques such as qPCR. However, although qPCR analysis is more sensitive and rapid than viral culture, it is limited in that it detects viral genetic material without being able to distinguish between clinically relevant HCMV replication (disease) and viral shedding or latent HCMV infection (Leuzinger et al., 2021 Jun). Due to this lack of specificity, guidelines recommend quantification of the viral load (VL) of HCMV in BAL fluid as an aid to interpret the positive qPCRs (Ljungman et al., 2017). Nevertheless, a universal VL cut-off value that discriminates between patients with and without HCMV pneumonitis has not been established to date. This is partly due to the pathogenesis of the virus itself (potentially establishing latency or asymptomatic replication without causing disease) and also to the numerous variables that can affect DNA quantification in BAL samples (type of patient, the BAL procedure and subsequent processing, or the DNA quantification assay) (Ljungman et al., 2017; Razonable et al., 2002; Piñana et al., 2019; Chemaly et al., 2004; Lodding et al., 2018).

Several studies have sought to establish whether the HCMV load in blood (DNAemia) is useful for the diagnosis of pneumonitis, and whether the blood VL has a cut-off value indicative of clinically significant replication in the lung. Again, no unanimous conclusions have been reached. While some reports indicate that it has a high predictive value for lung disease (Meyers et al., 1990; Saksirisampant et al., 2022; Lee et al., 2017), others found that a considerable percentage of pneumonitis patients have undetectable HCMV in the blood as a consequence of local replication in the lung, concluding that a negative-DNAemia does not exclude pneumonitis (Leuzinger et al., 2021 Jun; Beam et al., 2018; Westall et al., 2004).

This lack of consensus in interpreting VL values in both BAL fluid and blood renders the diagnosis of pneumonitis a challenge. Therefore, more well-designed prospective studies, ideally based on reference microbiological techniques, are needed (Piñana et al., 2019).

2. Objective

The primary objectives were to compare HCMV detection in BAL

fluid by viral culture and qPCR for the diagnosis of pneumonitis in immunosuppressed hosts, as well as to establish a cut-off value for the HCMV load in BAL samples that discriminates between cases of active virus replication and viral shedding, using culture as the reference technique. The secondary objective was to assess plasma HCMV load in patients with suspected pneumonitis and its correlation with the VL in BAL fluid.

3. Study design

3.1. Clinical samples

A prospective study was carried out between 1 January 2021 and 31 July 2022 at the Microbiology Department of a tertiary level university hospital in Barcelona.

Consecutive BAL samples (n = 176) from immunosuppressed patients with signs and/or symptoms of respiratory infection, received in our laboratory for virological study, were included.

The reference methods for HCMV detection in BAL samples in our laboratory are traditional viral culture (in tubes) and centrifugation culture (shell vial). In addition, an HCMV qPCR assay was performed on these samples.

Retrospectively, we established whether these patients had been tested for the HCMV load in plasma (DNAemia) in the week before or after BAL fluid collection.

3.2. BAL fluid collection by bronchoscopy

Bronchoscopy was performed using standard procedures in accordance with the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) protocol no. 28, "Quality plan for the collection and processing of endoscopic specimens" (Manual 28 de procedimientos SEPAR). The technique consists of inserting the bronchoscope into the subsegment of the lung pre-selected by radiological criteria until the tip is wedged in a bronchiole with visualization of the distal airway in the center of the image. Sterile normal saline (room temperature) is injected via a handheld syringe and then gradually withdrawn back into the syringe. A total of up to 150 cc of sterile saline was injected in 3 aliquots of 50 cc syringes. The first fraction recovered was discarded due to risk of contamination. After collection, the sample was placed in the corresponding specific sterile microbiological recipients and sent to the Microbiology Department within minutes of collection. From collection to processing (always less than 72 h) the samples were stored at 2–6°C.

3.3. BAL viral culture

To avoid culture contamination, each sample was first treated with a mixture of antibiotics (vancomycin 500 µL/mL and gentamycin 2.5 mg/mL) and an antifungal agent (amphotericin 0.05 mg/mL) in a 10% volume/volume ratio, for 30 min.

- **Tube culture.** 0.3 mL of the pre-treated sample was inoculated into a cylindrical tube containing a monolayer of human MRC5 cells (RD-Biotech, France) with maintenance medium (Minimal Essential Medium x10 with fetal bovine serum 2.5%), and incubated in a horizontal position at 36 ± 2°C for up to 21 days. Cell monolayers were examined daily with an inverted microscope (x40). A culture was considered positive when a characteristic cytopathic effect was observed.
- **Centrifugation culture (shell vial).** This method is used to detect immediate early HCMV antigen and is based on the centrifugation of samples on a cell monolayer (MRC5 cells) arranged on a 12 mm diameter lens. Thus, 0.3 mL of each pre-treated sample was inoculated into two vials with the cell monolayer. To increase viral absorption, the vials were centrifuged at 700 x g for 30 min. The sample was then decanted and 1 mL of growth medium (Minimal Essential

Medium x10 with fetal bovine serum 10%) was added and incubated at 36 ± 2°C (one vial for 16 h and the other for 40 h). Then, specific monoclonal antibodies and a fluorescein conjugate (Vircell, Spain) were added, and each culture was observed under a fluorescence microscope (x400) at 16 h or 40 h. The shell vial was considered positive if one or more fluorescent nuclei of MRC5 cells were observed.

- Samples were considered culture-positive if either the tube culture or shell vial were positive.

3.4. Quantification of HCMV DNA (VL)

ELITE MGB® Kit CMV reagent in an ELITE InGenius® instrument (ELITechGroup, France) was used for this assay. This fully automated system performs the extraction and amplification directly from the sample, and the results are interpreted by the instrument software. The primers and HCMV probe are specific for the exon 4 region of the HCMV MIEA gene (major immediate early antigen, HCMV UL123). The primers and probe for the internal control are specific for the promoter and 5' UTR region of the human beta-globin gene to ensure that both the BAL cell number and extraction-amplification processes occur correctly.

For both BAL fluid and plasma, 0.2 mL of sample was used. HCMV DNA quantification was expressed as IU/mL in BAL and plasma. According to manufacturer's indications 1 IU/mL = 5 copies/mL ("1st WHO International Standard for HCMV for Nucleic Acid Amplification Techniques").

The system considered these samples to be positive if the HCMV load was above the detection limit of the reagent (178 IU/mL for BAL and plasma). The test was considered invalid if the internal control was not detected.

3.5. Statistical analysis

Results are presented as the number of cases and percentages for categorical data and as medians and the other two quartiles for ordinal data. Comparison of cycle threshold (Ct) values and VL between positive and negative cultures was performed with the nonparametric Mann-Whitney test. The statistical significance level was 5% (α=0.05), and two-tailed tests were used throughout. All analysis was performed using IBM-SPSS software (version 26; SPSS. Armonk, NY).

3.6. Ethical approval

The study protocol was evaluated and approved by the HSCSP Ethics Committee (IIBSP-VIR-2014-41).

4. Results

A total of 176 BAL samples from 158 immunosuppressed patients with signs and/or symptoms of respiratory infection were tested for HCMV by culture and qPCR during this period. The results of viral culture and qPCR are shown in Table 1. Concordant results were obtained in 81.25% of the BAL samples, the remaining 18.75% giving discordant results. Of the 50 BAL samples positive for HCMV by qPCR, only 17 (34%) were positive by culture. Fifteen (88.2%) of them were positive by tube culture and shell-vial, while the other two (11.8%) were only positive by shell-vial and negative by tube culture. Fig. 1.

Table 1

HCMV culture and qPCR results obtained from BAL samples (PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value).

n = 176	Positive culture	Negative culture	
Positive qPCR	17 (9.7%)	33 (18.7%)	PPV 34%
Negative qPCR	0	126 (71.6%)	NPV 100%
Total	S 100%	E 79.2%	

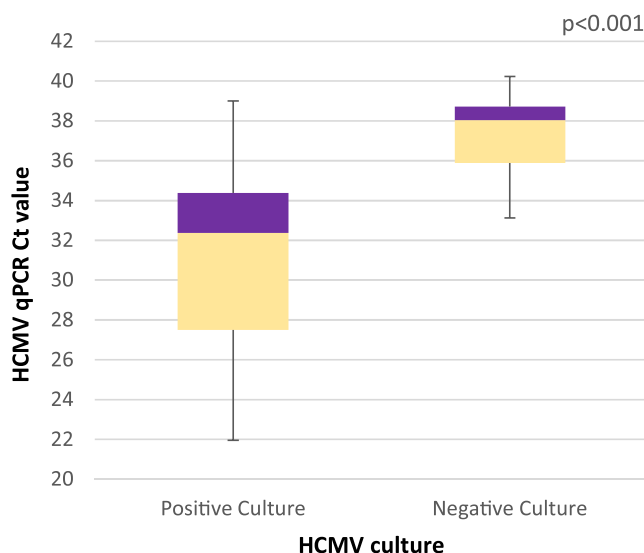


Fig. 1. Boxplot analysis of HCMV qPCR Ct values showing differences in distribution and median values between BAL samples with positive and negative culture results.

The median HCMV load and qPCR Ct values of culture-positive and -negative BAL samples were compared (Table 2, Picture 1). In culture-positive samples, the median VL was 4860 IU/mL (24,298 copies/mL) higher and the Ct value lower by 6.17 units compared to those culture-negative, both differences being statistically significant ($p < 0.005$). When the HCMV load in BAL samples was < 200 IU/mL (< 1000 copies/mL), the probability of virus isolation in culture was 4.3%, as only one positive culture was obtained from the 24 BAL samples with this VL value. However, with > 900 IU/mL (> 4500 copies/mL), the probability increased to 100%, as all 13 BAL samples with this HCMV load tested positive by culture (Fig. 2). Using a qPCR cut-off value of 1258 IU/mL (6290 copies/mL) HCMV in BAL, pneumonia was diagnosed with a sensitivity of 76%, a specificity of 100%, a VPP of 100% and VPN of 98% (AUC of 0.987) (Fig. 3).

In all qPCR assays, the internal control (human beta-globin gene) was amplified to ensure that both DNA extraction and amplification were performed correctly.

Retrospective analysis of DNAemia values, obtained in 58 patients in the week before or after BAL fluid collection (Table 3), revealed that 100% of patients whose BAL samples yielded positive results by both qPCR and culture analysis also tested positive by qPCR in plasma. This percentage dropped to 93% in patients with BAL samples positive by qPCR but negative by culture, and to 33% in those with negative results by both techniques. The median value of HCMV load in plasma of the first group of patients (4805 IU/mL) was more than 4000 IU/mL higher compared to the other two groups (222.5 IU/mL and 178 IU/mL respectively).

Table 2

Median viral load (VL) and qPCR cycle threshold (Ct) value in BAL of HCMV qPCR-positive samples according to the culture result.

	Positive culture (17)	Negative culture (33)	p value
Median VL	5038	178	$p < 0.001$
(Q1; Q3) BAL (IU/mL)	(1008; 39,594)	(178; 248)	
Median VL	25,188	890	$p < 0.001$
(Q1; Q3) BAL (copies/mL)	(5042; 197,974.5)	(890; 1239)	
Median qPCR Ct value	32.10	38.27	$p < 0.001$
(Q1; Q3) BAL	(27.22; 34.11)	(36.11; 38.97)	

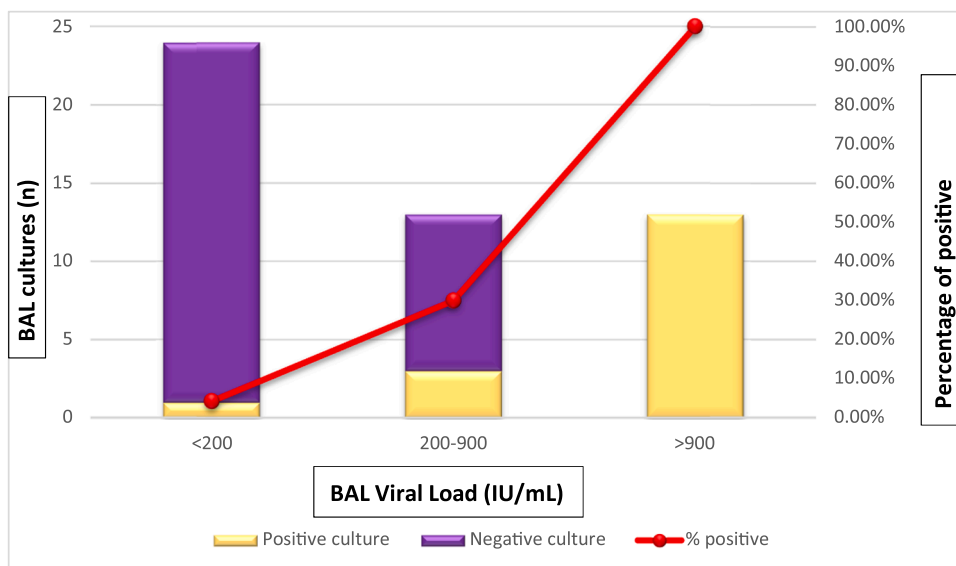


Fig. 2. HCMV culture results in BAL samples as a function of viral load value (IU/mL), and percentage of culture positivity as a function of viral load value.

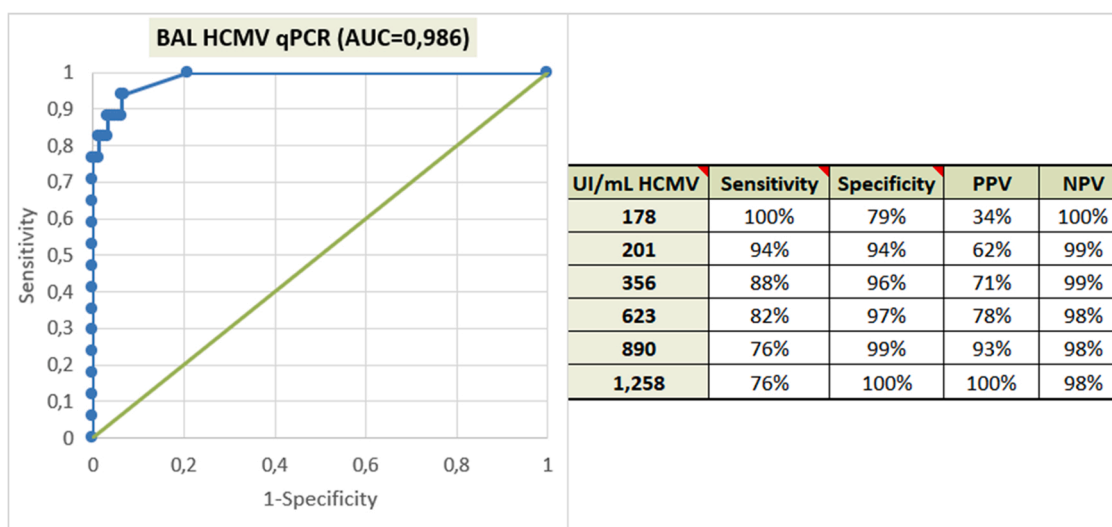


Fig. 3. ROC curve for BAL HCMV qPCR for diagnosis of HCMV pneumonia. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) values as a function of HCMV load in BAL.

Table 3

Results of the HCMV DNAemia study and median HCMV viral load (IU/mL) as a function of BAL culture and qPCR result.

DNAemia study	BAL Positive culture and positive qPCR (17)	BAL Negative culture and positive qPCR (33)	BAL Negative culture and negative qPCR (126)
Not done (n)	23.5% (4)	54.5% (18)	76.2% (96)
Negative (n)	0	3% (1)	15.9% (20)
Positive (n)	76.5% (13)	42.5% (14)	7.9% (10)
• Median VL (Q1; Q3) (IU/mL)	• 4805 (461; 35,998)	• 222.5 (178; 982)	• 178 (178; 314.25)

5. Discussion

In the last years there have been major advances in the diagnosis and management of HCMV infection, which has led to a reduction in its incidence and mortality. Despite this, HCMV pneumonitis continues to

be a highly feared disease in immunosuppressed patients (Erard et al., 2015). Currently, the diagnosis of proven HCMV pneumonitis is much less common than that of probable pneumonitis. Performing lung biopsies is contraindicated in many cases, and less invasive methods such as BAL are preferred. Likewise, reference techniques for the diagnosis of HCMV infection such as culture have been displaced in most laboratories by simpler, faster, and more sensitive methods such as qPCR. Despite these improvements, diagnosis of pneumonitis and the interpretation of results remains challenging (Ljungman et al., 2017).

Viral culture is recognized as a reliable technique capable of detecting clinically relevant HCMV involvement in the lower respiratory tract, as HCMV isolation is highly correlated with the disease (Razonable et al., 2002; Kotton, 2013). Since the introduction of molecular techniques in the 1990 s, several studies have compared the results of HCMV DNA quantification in BAL fluid with those obtained by culture-based techniques, and have attempted to establish an HCMV load in BAL fluid indicative of clinically significant virus replication (pneumonitis). Most have concluded that qPCR in BAL fluid is more sensitive and has a higher negative predictive value compared to culture but has less

specificity and positive predictive value (Razonable et al., 2002; Leuzinger et al., 2021 Jun; Boeckh et al., 2017; Liesnard et al., 1994; Riise et al., 2000; Chemaly et al., 2005; Tan et al., 2016).

To date, defining a universal VL threshold in BAL fluid that allows differentiation between patients with or without pneumonitis has proved elusive (Ljungman et al., 2017; Piñana et al., 2019). Several factors are responsible, such as the pathogenesis of HCMV itself (its ability to establish latency or asymptomatic replication without causing disease), or the lack of standardized procedures for qPCR analysis in BAL samples (BAL fluid extraction and processing or the qPCR assay used). The inherent variability of the bronchoscopy technique and the dilutional effect also make it difficult to obtain conclusive results. To collect BAL fluid, the instilled serum is distributed heterogeneously in the lung, and both the bathed lung area and the amount of sample recovered varies greatly between patients. Additionally, the abandonment of culture techniques by most laboratories means that many studies do not compare qPCR results with those of gold standard techniques and base their conclusions on statistical analysis and clinical interpretation.

Despite attempts by the WHO to standardize HCMV qPCR results, establishing HCMV threshold values to facilitate clinical decisions has also proved difficult for plasma or blood samples. In this case, standardization is hindered by the variability of HCMV qPCR protocols, which differ in assay performance (detection and quantification limits), DNA extraction methods, target genes, and amplicon size (Razonable et al., 2020).

The results of our study show that shell-vial was more sensitive than tube culture, as 11.8% of positive cultures were only detected by shell-vial. Furthermore, qPCR analysis of BAL fluid was shown to have a sensitivity and negative predictive value of 100% for the diagnosis of pneumonitis, using culture as the reference method, which indicates that qPCR is an efficient technique to rule out this disease. However, due to its low specificity (79.2%) and positive predictive value (34%), a positive result by qPCR in BAL fluid should be treated with caution, and other values should be considered to avoid overdiagnosis and unnecessary treatment. The HCMV load and the qPCR Ct value in BAL samples may be helpful to interpret the results. In our study, in line with published literature, significantly higher median VL and significantly lower qPCR Ct values were obtained in culture-positive compared to culture-negative BAL samples. In addition, the probability of virus isolation in culture increased with higher loads.

Based on our results, an HCMV load of 1258 IU/mL (6290 copies/mL) or higher in BAL fluid may be considered as indicative of clinically relevant replication in the lower respiratory tract, with high sensitivity and NPV, and full specificity and PPV. Virus was isolated in culture in 100% of these cases. In the literature, the VL values in BAL fluid reported to be diagnostic of pneumonitis vary widely from 500 IU/mL to > 500,000 copies/mL (Leuzinger et al., 2021 Jun; Piñana et al., 2019; Lodding et al., 2018; Saksirisampant et al., 2022; Lee et al., 2017; Beam et al., 2018; Westall et al., 2004; Boeckh et al., 2017; Riise et al., 2000; Chemaly et al., 2005; Tan et al., 2016).

Three studies published in recent years also compare the results of viral culture and qPCR for HCMV detection in BAL fluid. Based on an analysis of 1109 BAL samples from immunosuppressed patients, Leuzinger et al. (2020) determined that > 10,000 copies/mL was an indicator of active replication. A limitation compared with the present study is that only shell vial culture was used, and not traditional culture; also, some of the samples (88%) were frozen and processed for qPCR analysis retrospectively, and the qPCR assay used was not fully automated (it required prior DNA extraction), which can reduce the reproducibility of the results. After analyzing 565 BAL samples, Young et al. (2017) reported that 28,774 copies/mL was diagnostic of HCMV pneumonitis, whereas Boeckh et al. (2017), in a study of 271 BAL samples, proposed a much lower cut-off point of 500 IU/mL. The latter two studies only included patients with hematologic malignancies, so their conclusions are limited to this type of patient. They also used less automated qPCR assays than here, and did this assay on frozen samples (~80%).

Two recent studies of lung transplant recipients, which did not use culture, propose 4545 IU/mL (Lodding et al., 2018) and 46,000 copies/mL (Westall et al., 2004) as VL threshold values. In both cases, HCMV DNA quantification was carried out by manual qPCR, which requires prior DNA extraction and, as mentioned, provides less reproducible results. In contrast, several studies have concluded that it is not possible to establish a cut-off point that allows patients with pneumonitis to be differentiated from those without (Piñana et al., 2019; Riise et al., 2000; Tan et al., 2016).

In the present study, DNAemia was not measured in all patients, which limits the conclusions that can be drawn. All patients with HCMV-positive BAL fluid (by culture and qPCR) also had HCMV-positive DNAemia, and their plasma VL was significantly higher than in patients with culture-negative BAL samples. These results agree with other reports (Ibrahim et al., 1997; Chemaly et al., 2004; Meyers et al., 1990; Saksirisampant et al., 2022; Lee et al., 2017; Beam et al., 2018) of a significant positive correlation between HCMV DNAemia and pneumonitis. However, it should be noted that the absence of HCMV DNA in plasma does not exclude pneumonitis. Recently, two studies found that approximately one third of patients with HCMV pneumonitis had an undetectable plasma VL, demonstrating that local replication of the virus can occur in the lower respiratory tract without systemic involvement (Leuzinger et al., 2021 Jun; Lodding et al., 2018; Westall et al., 2004).

One of the strengths of this study is its use of both traditional viral and shell vial culture as reference techniques, both of which are fully established in our laboratory routine, to compare the results of qPCR analysis in BAL samples. Furthermore, the samples were selected consecutively and prospectively, and submitted to culture and qPCR analysis as soon as they arrived at the laboratory. Finally, for optimum reproducibility and accuracy, each step, from bronchoscopy procedure to sample processing for culture and qPCR, was protocolized and standardised as much as possible. Moreover, a fully automated assay for HCMV DNA quantification was used, including DNA extraction and amplification and interpretation of the results. Additionally, the inclusion of human beta-globin as the internal control target in the qPCR assay ensured that BAL samples tested contained a sufficient number of cells. The internal control was detected in all qPCR, indicating that samples were of sufficient quality (and reaction occurred correctly), while if it was not detected (the number of cells was deemed insufficient or an incorrect reaction) the test was declared invalid to avoid false negatives. Finally, our study reports the results of VL in BAL in IU/mL and copies/mL, according to "1st WHO International Standard for HCMV for Nucleic Acid Amplification Techniques", allowing comparison with other studies.

The main limitation of the study was that various types of immunosuppressed patients were included, which could limit the generalizability of the VL threshold values obtained. Additionally, although we have controlled that all BAL fluids had an adequate number of cells to consider the results valid (using B-globin as an internal control), this does not eliminate the impact that the number of cells contained in each BAL fluid may have on the VL detected. For this, the number of cells in each sample should be quantified to obtain normalised VL, as has been done for other viral infections (Santos Bravo et al., 2021). Lastly, the number of culture-positive BAL samples was low, and not all patients had undergone a DNAemia study, which limits the conclusions that can be drawn on this subject.

6. Conclusion

A negative qPCR for HCMV in BAL fluid quickly rules out pneumonitis, but a positive qPCR in BAL is not always an indicator of the disease. An HCMV load in BAL fluid of ≥ 1258 IU/mL (6290 copies/mL) would be indicative of clinically relevant viral replication in the lung, whereas with < 200 IU/mL (<1000 copies/mL) the probability that the virus is replicating in the lungs is less than 5%. Even though this is a single-

center experience, and the data cannot be directly extrapolated to other scenarios, the consistency of our results could be a guide for other centers that do not apply viral culture.

Funding

This work was supported by own funding.

Declaration of Competing Interest

None of the authors report any conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Ignasi Gich from Epidemiology Department (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona) for his contribution to the statistical analysis and Luzy Brzoska for her contribution to the English edition.

References

- Beam, E., Germer, J.J., Lahr, B., Yao, J.D.C., Limper, A.H., Binnicker, M.J., Razonable, R. R., Cytomegalovirus. C.M.V., 2018. DNA quantification in bronchoalveolar lavage fluid of immunocompromised patients with CMV pneumonia (Jan). *Clin. Transpl.* 32 (1). <https://doi.org/10.1111/ctr.13149>.
- Boeckh, M., Geballe, A.P., 2011. Cytomegalovirus: pathogen paradigm and puzzle (May). *J. Clin. Investig.* 121 (5), 1673–1680. <https://doi.org/10.1172/JCI45449>. PMID: 21659716; PMCID: PMC3083799.
- Boeckh, M., Stevens-Ayers, T., Travi, G., Huang, M.L., Cheng, G.S., Xie, H., Leisenring, W., Erard, V., Seo, S., Kimball, L., Corey, L., Pergam, S.A., Jerome, K.R., 2017. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in bronchoalveolar lavage fluid from hematopoietic stem cell transplant recipients with CMV pneumonia. *May 15 J. Infect. Dis.* 215 (10), 1514–1522. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix048>. PMID: 28181657; PMCID: PMC5461426.
- Boivin, G., Olson, C.A., Quirk, M.R., Kringstad, B., Hertz, M.I., Jordan, M.C., 1996. Quantitation of cytomegalovirus DNA and characterization of viral gene expression in bronchoalveolar cells of infected patients with and without pneumonitis. *J. Infect. Dis.* 173 (6), 1304–1312. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.6.1304>.
- Chemaly, R.F., Yen-Lieberman, B., Castilla, E.A., Reilly, A., Arrigain, S., Farver, C., Avery, R.K., Gordon, S.M., Procop, G.W., 2004. Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry (May). *J. Clin. Microbiol.* 42 (5), 2168–2172. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2168-2172.2004>. PMID: 15131185; PMCID: PMC404658.
- Chemaly, R.F., Yen-Lieberman, B., Chapman, J., Reilly, A., Bekele, B.N., Gordon, S.M., Procop, G.W., Shrestha, N., Isada, C.M., Decamp, M., Avery, R.K., 2005. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients (Mar). *Am. J. Transpl.* 5 (3), 544–548. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00747.x>.
- Erard, V., et al., 2015. Reduced mortality of cytomegalovirus pneumonia after hematopoietic cell transplantation due to antiviral therapy and changes in transplantation practices. *Clin. Infect. Dis.* 61 (1), 31–39. Jul 1.
- Franquet, T., Lee, K.S., Müller, N.L., 2003. Thin-section CT findings in 32 immunocompromised patients with cytomegalovirus pneumonia who do not have AIDS. *Ajr. Am. J. Roentgenol.* 181 (4), 1059–1063. <https://doi.org/10.2214/ajr.181.4.1811059>.
- Ibrahim, A., Gautier, E., Roittmann, S., Bourhis, J.H., Fajac, A., Charnoz, I., Terrier, P., Salord, J.M., Tancrede, C., Hayat, M., Bernaudin, J.F., Pico, J.L., 1997. Should cytomegalovirus be tested for in both blood and bronchoalveolar lavage fluid of patients at a high risk of CMV pneumonia after bone marrow transplantation? (Jul). *Br. J. Haematol.* 98 (1), 222–227. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.1752987.x>.
- Kotton C.N. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant.* 2013 Feb;13 Suppl 3:24–40; quiz 40. doi: 10.1111/ajt.12006. PMID: 23347212.
- Lee, H.Y., Rhee, C.K., Choi, J.Y., Lee, H.Y., Lee, J.W., Lee, D.G., 2017. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by quantitative polymerase chain reaction using bronchial washing fluid from patients with hematologic malignancies. *Jun 13 Oncotarget* 8 (24), 39736–39745. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14504>.
- Leuzinger, K., Stolz, D., Gosert, R., Naegele, K., Prince, S.S., Tamm, M., Hirsch, H.H., 2021. Comparing cytomegalovirus diagnostics by cell culture and quantitative nucleic acid testing in broncho-alveolar lavage fluids. *J. Med. Virol.* 93 (6), 3804–3812. <https://doi.org/10.1002/jmv.26649>. Epub 2020 Nov 10.
- Liesnard, C., De Wit, L., Motte, S., Brancart, F., Content, J., 1994. Rapid diagnosis of cytomegalovirus lung infection by DNA amplification in bronchoalveolar lavages (Aug). *Mol. Cell Probes* 8 (4), 273–283. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1994.1039>.
- Ljungman, P., Boeckh, M., Hirsch, H.H., Josephson, F., Lundgren, J., Nichols, G., Papis, A., Razonable, R.R., Miller, V., Griffiths, P.D., 2017. Disease definitions working group of the cytomegalovirus drug development forum. definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Jan 1 Clin. Infect. Dis.* 64 (1), 87–91. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw668>.
- Lodding, I.P., Schultz, H.H., Jensen, J.U., Kirkby, N., Perch, M., Andersen, C., Lundgren, J.D., Iversen, M., 2018. Cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage to diagnose lung transplant associated cmv pneumonia (Feb). *Transplantation* 102 (2), 326–332. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001927>.
- Manual 28 de procedimientos SEPAR. Plan de calidad para la toma y procesado de las muestras endoscópicas. (https://issuu.com/separ/docs/manual_28).
- Meyers, J.D., Ljungman, P., Fisher, L.D., 1990. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia (Aug). *J. Infect. Dis.* 162 (2), 373–380. <https://doi.org/10.1093/infdis/162.2.373>.
- Piñana, J.L., Giménez, E., Gómez, M.D., Pérez, A., González, E.M., Vinuesa, V., Hernández-Boluda, J.C., Montoro, J., Salavert, M., Tormo, M., Amat, P., Moles, P., Carretero, C., Balaguer-Roselló, A., Sanz, J., Sanz, G., Solano, C., Navarro, D., 2019. Pulmonary cytomegalovirus (CMV) DNA shedding in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: implications for the diagnosis of CMV pneumonia (May). *J. Infect.* 78 (5), 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.02.009>.
- Rabella, N., Drew, W.L., 1990. Comparison of conventional and shell vial cultures for detecting cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 28 (4), 806–807. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.4.806-807.1990>.
- Razonable, R.R., Paya, C.V., Smith, T.F., 2002. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients (Mar). *J. Clin. Microbiol.* 40 (3), 746–752. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.746-752.2002>. PMID: 11880387; PMCID: PMC120290.
- Razonable, R.R., Inoue, N., Pinninti, S.G., Boppana, S.B., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Simonazzi, G., Pellett, P.E., Schmid, D.S., 2020. Clinical diagnostic testing for human cytomegalovirus infections. *J. Infect. Dis.* 221 (Suppl 1), S74–S85. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz601>.
- Riise, G.C., Andersson, R., Bergström, T., Lundmark, A., Nilsson, F.N., Olofsson, S., 2000. Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: a longitudinal study in lung transplant recipients (Dec). *Chest* 118 (6), 1653–1660. <https://doi.org/10.1378/chest.118.6.1653>.
- Saksirisampant, G., Kawamatawong, T., Promsombat, K., Sukkasem, W., Liamsombut, S., Pasomsub, E., Bruminhent, J., 2022. A prospective study of plasma and bronchoalveolar lavage fluid cmv dna load quantification for the diagnosis and outcome of cmv pneumonitis in immunocompromised hosts (Oct). *J. Clin. Virol.* 155, 105243. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105243>.
- Santos Bravo, M., Nicolás, D., Berengua, C., Fernandez, M., Hurtado, J.C., Tortajada, M., Barroso, S., Vilella, A., Mosquera, M.M., Vila, J., Marcos, M.A., 2021. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 normalized viral loads and subgenomic RNA detection as tools for improving clinical decision making and work reincorporation. *Oct 28 J. Infect. Dis.* 224 (8), 1325–1332. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab394>.
- Stover, D.E., Zaman, M.B., Hajdu, S.I., Lange, M., Gold, J., Armstrong, D., 1984. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann. Intern. Med.* 101 (1), 1–7. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-101-1-1>.
- Tan, S.K., Burgener, E.B., Waggoner, J.J., Gajurel, K., Gonzalez, S., Chen, S.F., Pinsky, B. A., 2016. Molecular and culture-based bronchoalveolar lavage fluid testing for the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis. *Feb 10 Open Forum Infect. Dis.* 3 (1), ofv212. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv212>.
- Westall, G.P., Michaelides, A., Williams, T.J., Snell, G.I., Kotsimbos, T.C., 2004. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: a longitudinal study of lung transplant recipients. *Sep 15 J. Infect. Dis.* 190 (6), 1076–1083. <https://doi.org/10.1086/422327>.

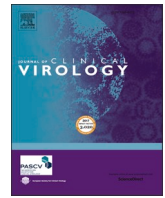
3. TERCER TRABAJO: *Viral culture and immunofluorescence for the detection of SARS-CoV-2 infectivity in RT-PCR positive respiratory samples.*

Autores: Carla Berengua, Marina López, Montserrat Esteban, Pilar Marín, Paula Ramos, Margarita Cuerpo, Ignasi Gich, Ferran Navarro, Elisenda Miró, Núria Rabella.

Revista: *Journal of Clinical Virology* 2022 Jul;152:105167

Resumen:

- **Introducción:** Para diseñar estrategias de prevención y control de la infección es crucial saber cuánto tiempo pueden seguir siendo infecciosos los individuos infectados por SARS-CoV-2. El cultivo viral es el método de referencia para detectar virus con replicación activa y evaluar su potencial infeccioso.
- **Objetivo:** Evaluar la correlación de la infectividad del SARS-CoV-2 con el número de días desde el inicio de los síntomas y el valor Ct, utilizando el cultivo como método de referencia. Asimismo, describir un protocolo detallado para el cultivo de SARS-CoV-2 y la confirmación por inmunofluorescencia basado en nuestra experiencia con otros virus respiratorios.
- **Diseño del estudio:** 100 muestras respiratorias consecutivas positivas para SARSCoV-2 por RT-PCR procedentes de diferentes sujetos se inocularon en células VERO E6.
- **Resultados:** El aislamiento viral se consiguió en el 58% de las muestras. La mediana del número de días transcurridos desde el inicio de los síntomas en las muestras con cultivo positivo fue de 2, y de 15 en las muestras con cultivo negativo. Se obtuvieron seis cultivos positivos en pacientes ≥ 14 días después del inicio de los síntomas, todos ellos inmunodeprimidos o con COVID-19 grave. El valor medio de Ct fue 12,64 unidades superior en las muestras con cultivo negativo que en las muestras con cultivo positivo. La probabilidad de aislar con éxito el SARS-CoV-2 en muestras con un valor Ct < 22 fue del 100%, disminuyendo al 3,1% cuando era Ct > 27 .
- **Conclusiones:** Nuestros hallazgos muestran una correlación positiva significativa entre la probabilidad de aislar SARS-CoV-2 en cultivo, menos días de síntomas y un valor Ct de RT-PCR más bajo. La infectividad del SARS-CoV-2 no dura más de 14 días desde el inicio de los síntomas en individuos inmunocompetentes. Por el contrario, en pacientes inmunodeprimidos o con COVID-19 grave la infectividad puede permanecer después de 14 días. Un valor de Ct < 22 siempre indica infectividad.



Paper from the 21st ESCV meeting



Viral culture and immunofluorescence for the detection of SARS-CoV-2 infectivity in RT-PCR positive respiratory samples

Carla Berengua^{a,*}, Marina López^a, Montserrat Esteban^a, Pilar Marín^a, Paula Ramos^a, Margarita del Cuerdo^a, Ignasi Gich^b, Ferran Navarro^a, Elisenda Miró^a, Núria Rabella^a

^a Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Sant Pau Biomedical Research Institute (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

^b CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Clinical Epidemiology and Public Health Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Pau Biomedical Research Institute (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2
COVID-19
Viral culture
Viral isolation
Infectivity
VERO E6 cells

ABSTRACT

Background: Knowing how long SARS-CoV-2-positive individuals can remain infective is crucial for the design of infection prevention and control strategies. Viral culture is the gold standard for detecting an active-replicative virus and evaluating its infectious potential.

Objective: To assess the correlation of SARS-CoV-2 infectivity with the number of days from symptom onset and the Ct value, using culture as a reference method. Also, to describe a detailed protocol for SARS-CoV-2 culture and immunofluorescence confirmation based on our experience with other respiratory viruses.

Study design: 100 consecutive respiratory samples positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR from different subjects were inoculated into VERO E6 cells.

Results: Viral isolation was successful in 58% of samples. The median number of days from symptom onset for culture-positive samples was 2, and 15 for culture-negative samples. Six positive cultures were obtained in patients ≥ 14 days after symptom onset, all of whom were immunocompromised or with severe COVID-19. The mean Ct value was 12.64 units higher in culture-negative than in culture-positive samples. The probability of successfully isolating SARS-CoV-2 in samples with a Ct value < 22 was 100%, decreasing to 3.1% when > 27 .

Conclusions: Our findings show a significant positive correlation between the probability of isolating SARS-CoV-2 in culture, fewer days of symptoms and a lower RT-PCR Ct value. SARS-CoV-2 infectivity lasts no more than 14 days from symptom onset in immunocompetent individuals. In contrast, in immunocompromised patients or those with severe COVID-19 infectivity may remain after 14 days. Ct value < 22 always indicates infectivity.

1. Background

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a zoonotic enveloped RNA virus, responsible for coronavirus infectious disease 2019 (COVID-19), which emerged in Wuhan, China, in late 2019 and quickly spread worldwide, causing a global pandemic [1]. Vaccination, early diagnosis, contact tracing and isolation of suspected and confirmed cases are crucial for pandemic control [2,3].

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in respiratory samples is the most sensitive and the most frequently used method for COVID-19 diagnosis and in infection control precautions [4, 5]. Long-term shedding of viral RNA (≥ 14 days from symptom onset) has been reported in COVID-19 patients [6, 7, 8]. SARS-CoV-2 RT-PCR

can remain positive for weeks, as it cannot distinguish between infective virus and viral fragments without infectious potential, leading to prolonged periods of isolation or work leave [6,9,10]. Determining how long SARS-CoV-2-positive individuals remain infective is thus crucial for the design of effective infection prevention and control strategies [11].

The cycle threshold (Ct) value obtained in the RT-PCR is inversely related to the viral load and has been employed as a semi-quantitative marker of infectivity and for clinical decision-making [12, 13, 14]. However, the use of Ct values to infer SARS-CoV-2 transmissibility has many limitations, as they can be influenced by a multitude of factors, including sample type, the adequacy of sample collection, transport and storage, or the variety of platforms for RNA extraction and amplification [15, 16].

* Corresponding author at: Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí Street, 89, Barcelona, 08041, Spain.

E-mail address: cberengua@santpau.cat (C. Berengua).

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105167>

Received 30 November 2021; Received in revised form 6 February 2022; Accepted 20 April 2022

Available online 28 April 2022

1386-6532/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Viral culture is the gold standard for the detection of an active-replicative virus and the assessment of its infectious potential [17, 18, 19]. As this technique requires laboratory biosafety level 3 facilities (BSL3), experienced staff and a longer turnaround time than RT-PCR, it is not used in routine diagnostic algorithms. Nevertheless, the culture of SARS-CoV-2 plays an important role in providing a more complete understanding of its transmissibility and duration of infectivity. As well as guiding recommendations for infection prevention and control, this information is essential for the development and validation of therapeutic agents and vaccines, and to assess the sensitivity and specificity of molecular detection methods [20]. Monitoring the behaviour of SARS-CoV-2 has become even more urgent with the emergence of new variants, as the impact of each mutation needs to be understood [21].

2. Objective

To gain new insights into the behaviour of SARS-CoV-2 by comparing the results obtained by culture (gold standard) with those of RT-PCR, and to establish the relationship between the Ct value, the number of days from symptom onset, and the infectious potential of the virus. Based on our group's experience in the diagnosis of respiratory viruses by conventional techniques, another objective was to describe a protocol for SARS-CoV-2 culture and confirmation by immunofluorescence.

3. Material and methods

3.1. Samples

A total of 100 consecutive respiratory samples positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR (nasopharyngeal aspirates and swabs, bronchoalveolar lavage), collected in a viral transport medium from different subjects between November 6, 2020 and May 25, 2021 in the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP), were selected. Diagnostic RT-PCR in our hospital was performed as soon as the sample was collected using different commercial platforms. All samples were stored at 4 °C until inoculation, which was always performed within 48 h of collection.

3.2. Culture

Sample handling and cell culture procedures were performed in BSL3.

VERO E6 cells (Vircell, Spain) were used for SARS-CoV-2 culture. Before inoculation, each sample was pre-treated with 10% of a mixture of antibiotics (vancomycin-gentamicin) and amphotericin B for 30 min. 300µL of pre-treated sample was inoculated and incubated at 37 °C for up to 10 days.

Cell monolayers were examined daily with an inverted microscope (x40). A positive culture was suspected when a characteristic cytopathic effect (CPE) was observed. Every CPE (clear or doubtful) was confirmed by indirect immunofluorescence (IFI) using a specific monoclonal antibody AntiSARS-CoV-2 (CertTest-BIOTEC, Spain). Culture was considered negative when there was no CPE 10 days after the inoculation or a CPE was not confirmed by IFI.

The complete protocol is provided in the Supplementary Material (S1).

3.3. Statistical analysis

The results are given as number of cases and percentage for categorical data and as median and the other two quartiles for ordinal one. The comparison of Ct values and days of symptoms between positive and negative cultures was done with the nonparametric Mann-Whitney test. The statistical significance level was 5% ($\alpha = 0.05$), and two-tailed tests were used throughout. All analysis was performed using IBM-SPSS software (version26; SPSS. Inc. Armonk, NY).

3.4. Ethical approval

The study protocol was evaluated and approved by HSCSP Ethics Committee (IIBSP-VIR-2014–41).

4. Results

A total of 100 consecutive RT-PCR positive SARS-CoV-2 respiratory samples from 100 patients were processed by culture; 46 (46%) of them were from paediatric subjects (<18 years) and 54 (54%) from adults (≥ 18 years). Eleven (11%) samples were from asymptomatic subjects, 59 (59%) corresponded to patients with <14 days from symptom onset and 30 (30%) to patients with ≥ 14 days from symptom onset. The median number of days (first quartile [Q1]; third quartile [Q3]) from symptom onset was 4 (1; 15). The presence of symptomatology and the number of days from symptom onset refer to the time the samples were collected for RT-PCR.

Viral isolation was successful in 58% samples. The percentage of positivity in persons <18 years was 60.9%, and ≥ 18 years, 55.6%. The median number of days (Q1; Q3) from the inoculation of the sample to positive culture was 3 (2; 4). The median (Q1; Q3) RT-PCR Ct value was 23.08 (17.2; 29.45). The overall results are summarised in Table 1.

4.1. Correlation between culture-days of symptoms

Out of the culture-positive samples, 6 (10.3%) were from asymptomatic subjects, 46 (79.3%) corresponded to patients with <14 days from symptom onset and 6 (10.4%) to patients with ≥ 14 days from symptom onset. Out of the culture-negative samples, 5 (11.9%) were from asymptomatic subjects, 13 (31%) corresponded to patients with <14 days from symptom onset and 24 (57.1%) to patients with ≥ 14 days from symptom onset. The median number of days from symptom onset (Q1; Q3) for culture-positive samples was 2 (1; 5.75), and for culture-negative samples, 15 (4.5; 22).

Long-term viral shedding was detected by RT-PCR in 30 samples, but only 6 (20%) of them were culture-positive. Three of these culture-positive samples were from patients who had presented symptoms for more than 30 days (33, 41, 44 days).

4.2. Correlation between culture-RT-PCR Ct value

The median RT-PCR Ct value (Q1; Q3) in culture-positive samples was 18.15 (15.88; 21.26), and in culture-negative samples, 30.79 (26.79; 34), being 12.64 units higher in the latter.

The probability of successfully isolating SARS-CoV-2 in samples with a Ct value <22 was 100%. This probability decreased to 3.1% in samples with a Ct value > 27 , as virus isolation was only achieved in one sample with a Ct value of 31.4. The probability of SARS-CoV-2 isolation according to RT-PCR Ct value is shown in Table 2.

Table 1

Comparative association of SARS-CoV-2 viral culture results with RT-PCR Ct values and days from symptom onset.

	Total	Positive culture	Negative culture	P-value
N	100	58	42	
Median RT-PCR Ct value (Q1; Q3)	23.08 (17.2; 29.45)	18.15 (15.88; 21.26)	30.79 (26.79; 34)	<0.001
Asymptomatic (n)	11	6	5	
Days of symptoms (median)	4	2	15	<0.001
1–2 days (n)	39	32	7	
3–7 days (n)	15	10	5	
8–13 days (n)	5	4	1	
14–30 days (n)	22	3	19	
> 30 days (n)	8	3	5	

Table 2
Probability of isolating SARS-CoV-2 in culture in function of RT-PCR Ct value.

RT-PCR Ct value (n)	Positive culture (%)	Negative culture (%)
<22 (45)	45 (100%)	0
22–27 (23)	12 (52.2%)	11 (47.8%)
>27 (32)	1 (3.1%)	31 (96.9%)

In [Table 3](#), the Ct values are broken down by the number of days with symptoms and culture. The correlation between culture and days of symptoms is shown in [Fig. 1](#), and between culture, Ct value and days of symptoms in [Fig. 2](#).

5. Discussion

VERO E6 cells were selected for the present work as they have been previously found optimal for SARS-CoV-2 multiplication [22, 23]. These cells provide a versatile medium for the recovery of most viruses, including those that are difficult to isolate [24]. They were used to isolate SARS-CoV-2 from the first patients admitted to a Wuhan hospital for COVID-19 pneumonia in December 2019 [1], and for isolation and investigation of SARS-CoV in 2003–2004 [25, 26].

The cytopathic effect of SARS-CoV-2 in VERO E6 cells is easily recognisable and appears relatively quickly. In most cases, small syncytia begin to be observed in the monolayer in the first 48–72 h post-inoculation. As the days pass, the number of syncytia and their size increases, until the entire monolayer is affected, and the cells are destroyed.

One of the main limitations in drawing conclusions from published studies on SARS-CoV-2 culture is the lack of standardisation and the great variability in culture protocols [27], which makes it difficult to compare the results obtained. When implementing SARS-CoV-2 culture, we rely on our own established protocols; the reference technique for the diagnosis of respiratory viruses in our laboratory has been based on culture and immunofluorescence for more than 40 years.

In this study, SARS-CoV-2 was successfully isolated from 58% of the inoculated samples, notably higher than the percentage of culture positivity reported in other studies [28, 29] which ranges mainly from 20 to 40%. An explanation for this higher percentage of positivity is the long experience of our laboratory in the study of respiratory viruses by culture, which has allowed us to optimise this technique and successfully implement it in our diagnostic routine.

When optimizing viral culture, an important point is to store the sample correctly and inoculate it as soon as possible after collection. The longer the period between collection and inoculation, the lower the chances of recovering the virus, due to degradation, especially if optimal storage conditions are not maintained [30]. In our laboratory, all samples were stored at 4 °C and inoculated within 48 h of collection. Another significant aspect is how long the sample should be incubated before the culture can be considered negative. In this work, all samples

Table 3
Ct value according to days after symptom onset and the viral culture result.

Days of symptoms	Global Ct value	Ct value culture positive	Ct value culture negative
Asymptomatic	22.74 (16.48; 27.79)	16.51 (15.75; 21.19)	24.17 (23.05; 23.61)
1–2 days	19.3 (15.95; 23.08)	17.53 (15.64; 19.68)	31 (25.96; 32.95)
3–7 days	22.9 (17.37; 27.48)	18.89 (16.68; 22.61)	29 (27.86; 29.2)
8–13 days	19.7 (19.67; 21.6)	19.69 (19.67; 20.18)	32.1 (32.1; 32.1)
14–30 days	29.75(25.78; 34.88)	24.43 (20.82; 25.53)	30.58 (26.83; 35.08)
>30 days	29.95 (21.88; 33.13)	18.2 (16.7; 20.65)	32.8 (32.6; 34.1)

were incubated for 10 days; although most CPE were observed within 72 h post-inoculation, in some cases positive cultures were obtained after 6 days. Some studies have classified cultures as negative before 6 days [6, 31], which entails a risk of missing positive cultures. A notable difference between our approach and those of other SARS-CoV-2 culture studies is that, instead of confirming CPE with an RT-PCR of the supernatant, the verification was done by immunofluorescence, using a specific monoclonal antibody. RT-PCR of the supernatant can detect RNA from the inoculated sample without the need for virus multiplication, but IFI allows the direct observation of virus-infected cells. The last point to note about this work is that it includes samples taken over a long period of time (more than 6 months), in contrast to 2 months or less in other studies [28, 29].

Besides their differences in viral culture techniques, the studies are also quite diverse in the type of individuals involved (age, symptomatology, days of evolution), which is a further hindrance when attempting to draw conclusions. The majority include only adult and symptomatic patients, with only a few small-scale studies of SARS-CoV-2 in paediatric patients [13, 32]. In the present work, 46% of samples were taken from a paediatric age group and like [Singanayagam et al., 2020](#), a higher percentage of culture positivity was found in paediatric individuals (60.9%) compared to adults (55.6%), although the difference was not significant.

Likewise, there are very few published studies involving individuals who were asymptomatic when testing positive for RT-PCR [13, 33]. We included 11 samples from asymptomatic individuals at the time of sample collection, 6 (54.5%) of which were culture-positive. These individuals were tested because of close contact with positive cases or for hospital pre-admission screening. In agreement with the literature [13, 32, 33], our results show that a high percentage of asymptomatic and paediatric individuals with a positive SARS-CoV-2 RT-PCR are infective, which probably plays an important role in the spread of the virus.

Also in agreement with the literature [28], a significant positive correlation was found between the likelihood of isolating SARS-CoV-2 in culture, fewer days of symptoms and a lower RT-PCR Ct value. A significant difference (13 days) was observed in the median number of symptom days between culture-negative and culture-positive samples (15 days vs. 2 days, respectively). The highest percentage of culture positivity was obtained in samples from people with 1–2 days of symptoms (82.1%). In samples collected within the first 7 days of symptoms, successful virus isolation was achieved in 77.8% of cases, but this percentage decreased to 20% at 14 days or more of symptom onset, with positive cultures obtained in only 6 out of 30 inoculated samples. All 6 were immunocompromised patients who required admission to the Critical Care Unit due to severe complications of COVID-19 (3 patients with haematological malignancies, an untreated HIV patient, a morbidly obese diabetic patient, and a 101-year-old man). Our data are in agreement with most studies [28, 29], which could not detect an infectious virus after 10 days of symptom onset, except in immunosuppressed individuals [34] or those with severe COVID-19 [35]. In these cases, virus isolation was achieved 70 days and 32 days after symptom onset, respectively.

It is well established that the Ct value is inversely related to the probability of obtaining a positive culture, which decreases to 32% for each Ct unit from a Ct of 24 [31]. The mean Ct value was 12.64 units higher in culture-negative than in culture-positive samples, which represents a significant increase. Virus isolation was successful in all samples with a Ct value <22, but not achieved when the Ct value was >27, except in one case with a Ct value of 31.4. This sample was from a 2-year-old girl with acute lymphoid leukaemia who was tested by RT-PCR for pre-admission screening. However, another study [13] found that up to 25% of samples with a Ct>30 corresponded to a potentially infectious virus. Despite these results, the use of the Ct value as an indicator of infectivity is not recommended due to its high variability, mainly conditioned by sample and technical factors [15, 16]. The correlation between the Ct value and culture observed here is

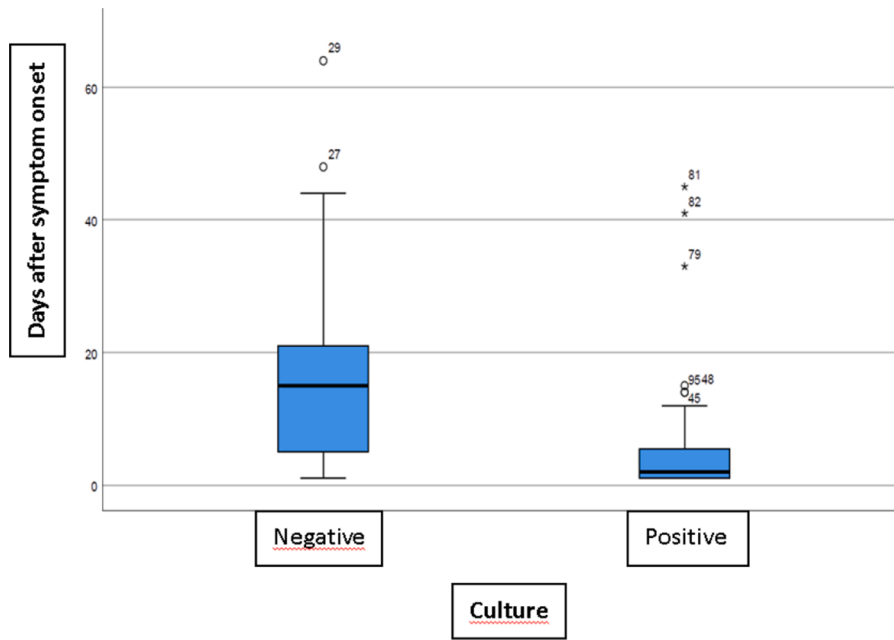


Fig. 1. Viral culture results plotted by days after symptom onset: most of the positive cultures are concentrated within the first 13 days from symptom onset, but 6 outliers are observed beyond 14 days, all of them patients with severe COVID-19 or immunodepressed.

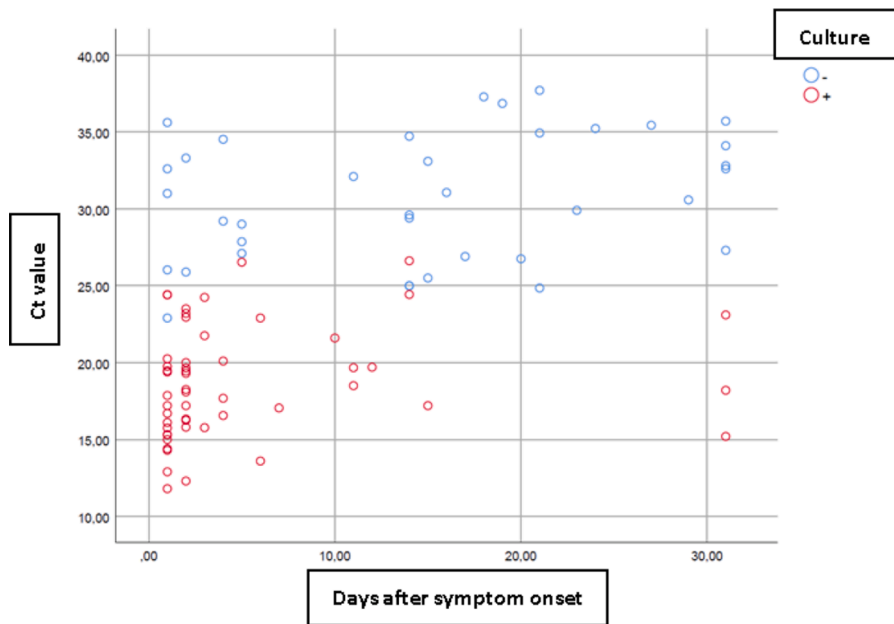


Fig. 2. Viral culture results plotted by Ct values and days after symptom onset. Most positive cultures (red dots) are concentrated at low Ct values and within a few days of symptom onset. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

specific to our laboratory, and therefore cannot be extrapolated elsewhere.

In summary, culture remains the gold standard for determining the infectious capacity of viruses [17], but its laboriousness, turnaround time and the need for special biosafety facilities make it unsuitable for routine COVID-19 diagnosis. However, specialized laboratories equipped for viral culture and with the relevant expertise are needed to i) increase our knowledge of virus transmissibility and duration of infectivity; ii) monitor changes in the behaviour of emerging variants; and iii) conduct research on treatments, vaccines, or diagnostic techniques. Also required is a single defined protocol for SARS-CoV-2 culture, based on experience of culturing other respiratory viruses, and preferably

including confirmation by visual identification via immunofluorescence [17]. Our findings show that the probability of isolating SARS-CoV-2 in culture is significantly and positively correlated with fewer days of symptoms and a lower RT-PCR Ct value. However, due to its high variability, use of the Ct value as a general marker of infectivity is not recommended, and the number of symptom days is a more reliable indicator.

Based on the results, it can be concluded that in immunocompetent individuals with mild-moderate COVID-19, SARS-CoV-2 infectivity does not last more than 14 days from symptom onset. In contrast, in immunocompromised patients or those with severe COVID-19, infectivity may remain beyond 14 days, after which the Ct value can be taken into

consideration. A Ct value <22 always indicates infectivity, but when Ct value ≥ 22 it is inconclusive and culture is recommended.

Funding support

This work was supported by own funding.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work presented in this paper.

Acknowledgements

We thank the staff of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau for their contribution to the diagnosis of SARS-CoV-2, as well as to Lucy Brzoska for her contribution to English language editing.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jcv.2022.105167.

References

- N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G.F. Gao, W. Tan, China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019, *N. Engl. J. Med.* 382 (8) (2020) 727–733, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>. Feb 20Epub 2020 Jan 24. PMID: 31978945; PMCID: PMC7092803.
- A.J. Kucharski, P. Klepac, A.J.K. Conlan, S.M. Kissler, M.L. Tang, H. Fry, J.R. Gog, W.J. Edmunds, CMMID COVID-19 working group, Effectiveness of isolation, testing, contact tracing, and physical distancing on reducing transmission of SARS-CoV-2 in different settings: a mathematical modelling study, *Lancet Infect. Dis.* 20 (10) (2020) 1151–1160, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30457-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30457-6). OctEpub 2020 Jun 16. PMID: 32559451; PMCID: PMC7511527.
- O. Alagoz, A.K. Sethi, B.W. Patterson, M. Churpek, G. Alhanaee, E. Scaria, N. Safdar, The impact of vaccination to control COVID-19 burden in the United States: a simulation modeling approach, *PLoS One.* 16 (7) (2021), e0254456, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254456>. Jul 14PMID: 34260633.
- V.M. Corman, O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D.K. Chu, T. Bleicker, S. Brünink, J. Schneider, M.L. Schmidt, D.G. Mulders, B.L. Haagmans, B. van der Veer, S. van den Brink, L. Wijsman, G. Goderski, J.L. Romette, J. Ellis, M. Zambon, M. Peiris, H. Goossens, C. Reusken, M.P. Koopmans, C. Drosten, Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, *Euro Surveill.* 25 (3) (2020), 2000045, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>. JanErratum in: *Euro Surveill.* 2020 Apr;25(14): Erratum in: *Euro Surveill.* 2020 Jul;25(30): Erratum in: *Euro Surveill.* 2021 Feb;26(5): PMID: 31992387; PMCID: PMC6988269.
- CDC. Discontinuation of Transmission-Based Precautions and Disposition of Patients with COVID-19 in Healthcare Settings (Interim Guidance). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/disposition-hospitalized-patients.html>.
- R. Wölfel, V.M. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M.A. Müller, D. Niemeyer, T.C. Jones, P. Vollmar, C. Rothe, M. Hoelscher, T. Bleicker, S. Brünink, J. Schneider, R. Ehmann, K. Zwirgmaier, C. Drosten, C. Wendtner, Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019, *Nature* 581 (7809) (2020) 465–469, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>. MayEpub 2020 Apr 1. Erratum in: *Nature.* 2020 Dec;588(7839):E35. PMID: 32235945.
- N. Sethuraman, S.S. Jeremiah, A. Ryo, Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2, *JAMA* 323 (22) (2020) 2249–2251, <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>. Jun 9PMID: 32374370.
- Y. Ling, S.B. Xu, Y.X. Lin, D. Tian, Z.Q. Zhu, F.H. Dai, F. Wu, Z.G. Song, W. Huang, J. Chen, B.J. Hu, S. Wang, E.Q. Mao, L. Zhu, W.H. Zhang, H.Z. Lu, Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients, *Chin Med J. (Engl)* 133 (9) (2020) 1039–1043, <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000774>. May 5PMID: 32118639; PMCID: PMC7147278.
- W.D. Liu, S.Y. Chang, J.T. Wang, M.J. Tsai, C.C. Hung, C.L. Hsu, S.C. Chang, Prolonged virus shedding even after seroconversion in a patient with COVID-19, *J. Infect.* 81 (2) (2020) 318–356, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.063>. AugEpub 2020 Apr 10. PMID: 32283147; PMCID: PMC7151379.
- Basile K., McPhie K., Carter I., Alderson S., Rahman H., Donovan L., Kumar S., Tran T., Ko D., Sivaruban T., Ngo C., Toi C., O'Sullivan M.V., Sintchenko V., Chen S.C., Maddocks S., Dwyer D.E., Kok J. Cell-based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Oct 24;ciaa1579. doi: 10.1093/cid/ciaa1579. Epub ahead of print. PMID: 33098412; PMCID: PMC7665383.
- C. Rhee, S. Kanjilal, M. Baker, M. Klompas, Duration of Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infectivity: when is it safe to discontinue isolation? *Clin. Infect. Dis.* 72 (8) (2021) 1467–1474, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1249>. Apr 26PMID: 33029620; PMCID: PMC7499497.
- M.R. Tom, M.J. Mina, To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value, *Clin. Infect. Dis.* 71 (16) (2020) 2252–2254, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa619>. Nov 19PMID: 32435816; PMCID: PMC7314112.
- A. Singanayagam, M. Patel, A. Charlett, J. Lopez Bernal, V. Saliba, J. Ellis, S. Ladhani, M. Zambon, R. Gopal, Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020, *Euro Surveill* 25 (32) (2020), 2001483, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>. AugErratum in: *Euro Surveill.* 2021 Feb;26(7): PMID: 32794447; PMCID: PMC7427302.
- S.N. Rao, D. Manissero, V.R. Steele, J. Pareja, A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19, *Infect. Dis. Ther.* 9 (3) (2020) 573–586, <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00324-3>. SepEpub 2020 Jul 28. Erratum in: *Infect Dis Ther.* 2020 Aug 18; PMID: 32725536; PMCID: PMC7386165.
- D. Rhoads, D.R. Peaper, R.C. She, F.S. Nolte, C.M. Wojewoda, N.W. Anderson, B. S. Pritt, College of American pathologists (CAP) microbiology committee perspective: caution must be used in interpreting the cycle threshold (Ct) value, *Clin. Infect. Dis.* 72 (10) (2021) e685–e686, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1199>. May 18PMID: 32785682.
- IDSA and AMP statement on the use of SARS-CoV-2 PCR cycle threshold (Ct) values for clinical decision-making. IDSA (infectious Diseases Society of America) and AMP (Association for Molecular Pathology). Updated March 12, 2021.
- A. Hematian, N. Sadeghifard, R. Mohebi, M. Taherikalani, A. Nasrolahi, M. Amraei, S. Ghafourian, Traditional and modern cell culture in virus diagnosis, *Osong Public Health Res. Perspect.* 7 (2) (2016) 77–82, <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>. AprEpub 2016 Jan 8. Erratum in: *Osong Public Health Res Perspect.* 2020 Aug;11(4):266. PMID: 27169004; PMCID: PMC4850366.
- Hudu S.A., Alshrari A.S., Syahida A., Sekawi Z. Cell culture, technology: enhancing the culture of diagnosing human diseases. *J. Clin. Diagn. Res.* 2016 Mar;10(3): DE01–DE05. doi: 10.7860/JCDR/2016/15837.7460. Epub 2016 Mar 1. PMID: 27134874; PMCID: PMC4843260.
- D.S. Leland, C.C. Ginocchio, Role of cell culture for virus detection in the age of technology, *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (1) (2007) 49–78, <https://doi.org/10.1128/CMR.0002-06>. JanPMID: 17223623; PMCID: PMC1797634.
- T.L. Dao, V.T. Hoang, P. Colson, J.C. Lagier, M. Million, D. Raoult, A. Levasseur, P. Gautret, SARS-CoV-2 infectivity and severity of COVID-19 according to SARS-CoV-2 variants: current evidence, *J. Clin. Med.* 10 (12) (2021) 2635, <https://doi.org/10.3390/jcm10122635>. Jun 15PMID: 34203844; PMCID: PMC8232800.
- Young B.E., Ong S.W.X., Ng L.F.P., Anderson D.E., Chia W.N., Chia P.Y., Ang L.W., Mak T.M., Kalimuddin S., Chai L.Y.A., Pada S., Tan S.Y., Sun L., Parthasarathy P., Fong S.W., Chan Y.H., Tan C.W., Lee B., Röttschke O., Ding Y., Tambyah P., Low J. G.H., Cui L., Barkham T., Lin R.T.P., Leo Y.S., Renia L., Wang L.F., Lye D.C.; Singapore 2019 Novel Coronavirus Outbreak Research team. Viral dynamics and immune correlates of COVID-19 disease severity. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Aug 28: ciaa1280. doi: 10.1093/cid/ciaa1280. Epub ahead of print. PMID: 32856707; PMCID: PMC7499509.
- N.S. Ogando, T.J. Dalebout, J.C. Zevenhoven-Dobbe, R.W.A.L. Limpens, Y. van der Meer, L. Caly, J. Druce, J.J.C. de Vries, M. Kikkert, M. Bárcena, I. Sidorov, E. J. Snijder, SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology, *J. Gen. Virol.* 101 (9) (2020) 925–940, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001453>. SepPMID: 32568027; PMCID: PMC7654748.
- J. Harcourt, A. Tamin, X. Lu, S. Kamili, S.K. Sakhthivel, J. Murray, K. Queen, Y. Tao, C.R. Paden, J. Zhang, Y. Li, A. Uehara, H. Wang, C. Goldsmith, H.A. Bullock, L. Wang, B. Whitaker, B. Lynch, R. Gautam, C. Schindewolf, K.G. Lokugamage, D. Scharton, J.A. Plante, D. Mirchandani, S.G. Widen, K. Narayanan, S. Makino, T. G. Ksiazek, K.S. Plante, S.C. Weaver, S. Lindstrom, S. Tong, V.D. Menachery, N. J. Thornburg, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patient with coronavirus disease, United States, *Emerg. Infect. Dis.* 26 (6) (2020) 1266–1273, <https://doi.org/10.3201/eid2606.200516>. JunEpub 2020 Jun 17. PMID: 32160149; PMCID: PMC7258473.
- S.A. Hudu, A.S. Alshrari, A. Syahida, Z. Sekawi, Cell culture, technology: enhancing the culture of diagnosing human diseases, *J. Clin. Diagn. Res.* 10 (3) (2016) DE01–DE05, <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15837.7460>. MarEpub 2016 Mar 1. PMID: 27134874; PMCID: PMC4843260.
- T.G. Ksiazek, D. Erdman, C.S. Goldsmith, S.R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J.A. Comer, W. Lim, P.E. Rollin, S.F. Dowell, A.E. Ling, C.D. Humphrey, W.J. Shieh, J. Guarner, C.D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J.Y. Yang, N. Cox, J.M. Hughes, J.W. LeDuc, W.J. Bellini, L.J. Anderson, SARS Working Group, A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348 (20) (2003) 1953–1966, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>. May 15Epub 2003 Apr 10. PMID: 12690092.
- Z. Qinfen, C. Jiming, H. Xiaojun, Z. Huanying, H. Jicheng, F. Ling, L. Kungpeng, Z. Jingqiang, The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells, *J. Med. Virol.* 73 (3) (2004) 332–337, <https://doi.org/10.1002/jmv.20095>. JulPMID: 15170625; PMCID: PMC7166737.
- N. Cimolai, Not all viral culture approaches are equal, *Clin. Infect. Dis.* 73 (7) (2021) e1787–e1788, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1632>. Oct 5PMID: 33104181.
- Jefferson T., Spencer E.A., Brassey J., Heneghan C. Viral cultures for COVID-19 infectious potential assessment - a systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Dec 3:

- ciaa1764. doi: 10.1093/cid/ciaa1764. Epub ahead of print. PMID: 33270107; PMCID: PMC7799320.
- [29] K.A. Walsh, S. Spillane, L. Comber, K. Cardwell, P. Harrington, J. Connell, C. Teljeur, N. Broderick, C.F. de Gascun, S.M. Smith, M. Ryan, M O'Neill, The duration of infectiousness of individuals infected with SARS-CoV-2, *J. Infect.* 81 (6) (2020) 847–856, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.10.009>. DecEpub 2020 Oct 10. PMID: 33049331; PMCID: PMC7547320.
- [30] N.J. Schmidt, *Cell culture techniques for diagnostic virology*, in: EH Lennette, Schmidt (Eds.), *Diagnostic Procedures For viral, rickettsial, and Chlamydial Infections*, 5th ed, American Public Health Association, Washington, DC, 1979.
- [31] Bullard J., Dust K., Funk D., Strong J.E., Alexander D., Garnett L., Boodman C., et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* 2020 May 22;ciaa638. doi: 10.1093/cid/ciaa638.
- [32] A.G. L'Huillier, G. Torriani, F. Pigny, L. Kaiser, I. Eckerle, Culture-competent SARS-CoV-2 in nasopharynx of symptomatic neonates, children, and adolescents, *Emerg. Infect. Dis.* 26 (10) (2020) 2494–2497, <https://doi.org/10.3201/eid2610.202403>. OctEpub 2020 Jun 30. PMID: 32603290; PMCID: PMC7510703.
- [33] M.M. Arons, K.M. Hatfield, S.C. Reddy, A. Kimball, A. James, J.R. Jacobs, J. Taylor, K. Spicer, A.C. Bardossy, L.P. Oakley, S. Tanwar, J.W. Dyal, J. Harney, Z. Chisty, J. M. Bell, M. Methner, P. Paul, C.M. Carlson, H.P. McLaughlin, N. Thornburg, S. Tong, A. Tamin, Y. Tao, A. Uehara, J. Harcourt, S. Clark, C. Brostrom-Smith, L. C. Page, M. Kay, J. Lewis, P. Montgomery, N.D. Stone, T.A. Clark, M.A. Honein, J. S. Duchin, J.A. Jernigan, Public health–seattle and king county and CDC COVID-19 investigation team. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility, *N. Engl. J. Med.* 382 (22) (2020) 2081–2090, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2008457>. May 28Epub 2020 Apr 24. PMID: 32329971; PMCID: PMC7200056.
- [34] V.A. Avanzato, M.J. Matson, S.N. Seifert, R. Pryce, B.N. Williamson, S.L. Anzick, K. Barbian, S.D. Judson, E.R. Fischer, C. Martens, T.A. Bowden, E. de Wit, F. X. Riedo, V.J Munster, Case study: prolonged infectious SARS-CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer, *Cell.* 183 (7) (2020) 1901–1912, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.049>. Dec 23e9Epub 2020 Nov 4. PMID: 33248470; PMCID: PMC7640888.
- [35] M.D. Folgueira, J. Luczkowiak, F. Lasala, A. Pérez-Rivilla, R. Delgado, Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19, *Clin. Microbiol. Infect.* 27 (6) (2021) 886–891, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.014>. JunEpub 2021 Feb 22. PMID: 33631334; PMCID: PMC7898982.

S1. Complete protocol for cell preparation, sample inoculation and confirmation by immunofluorescence.

Cell preparation:

VERO E6 cells (ATCC CRL-1586. VIRCEL), which have an epithelial morphology and originate from African monkey kidneys, were used for SARS-CoV-2 culture. Cells were maintained at 37°C in cylindrical tubes with Basal Medium Eagle supplemented with 1% L-glutamine, 10% foetal calf serum, 0.1% penicillin-streptomycin and 0.1% neomycin. *Mycoplasma* testing was performed, and no *Mycoplasma* was detected. Tubes are ready for inoculation when a monolayer of cells is fully formed (Photo 1: uninoculated monolayer).

Sample inoculation:

Sample handling and cell culture procedures were performed in biosafety level 3 facilities, following all the required safety standards. Before inoculation, each sample was pre-treated with 10% of a mixture of antibiotics (vancomycin and gentamicin) and an antifungal (amphotericin B) for 30 minutes at 4°C.

Culture inoculation protocol:

- a. Check that the cell monolayer of the tubes selected for inoculation is in a suitable condition.
Leave one tube from each pass uninoculated as a control.
- b. Remove the medium from the tube of VERO E6 cells and inoculate 300 µL of the pre-treated sample.
- c. Leave for 1 hour at 37°C to facilitate virus contact with the cell monolayer.
- d. Add 3 mL of Minimum Essential Medium + 2.5 % foetal calf serum.
- e. Incubate the inoculated tubes at 37°C for up to 10 days.

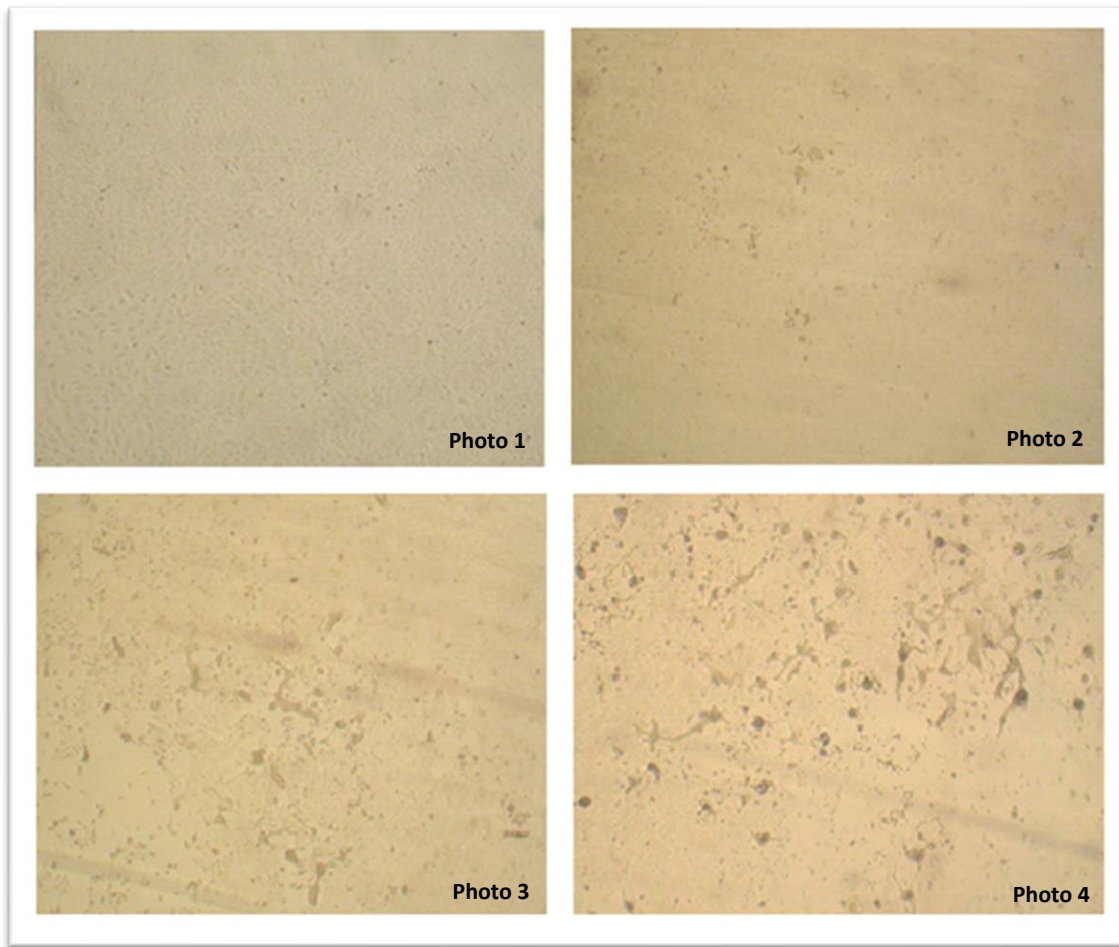
Virus isolation and identification

Cell monolayers were examined daily with an inverted microscope (x40). Tubes with uninoculated VERO E6 cells were used as a cell culture control. A positive culture was suspected when a characteristic cytopathic effect (CPE) was observed. Usually within 48-72 hours post-inoculation, small syncytia begin to be observed in the monolayer ([Photo 2](#)). As the days pass, syncytia increase in size and number ([Photo 3](#)), until the entire monolayer is affected, and the cells are destroyed ([Photo 4](#)).

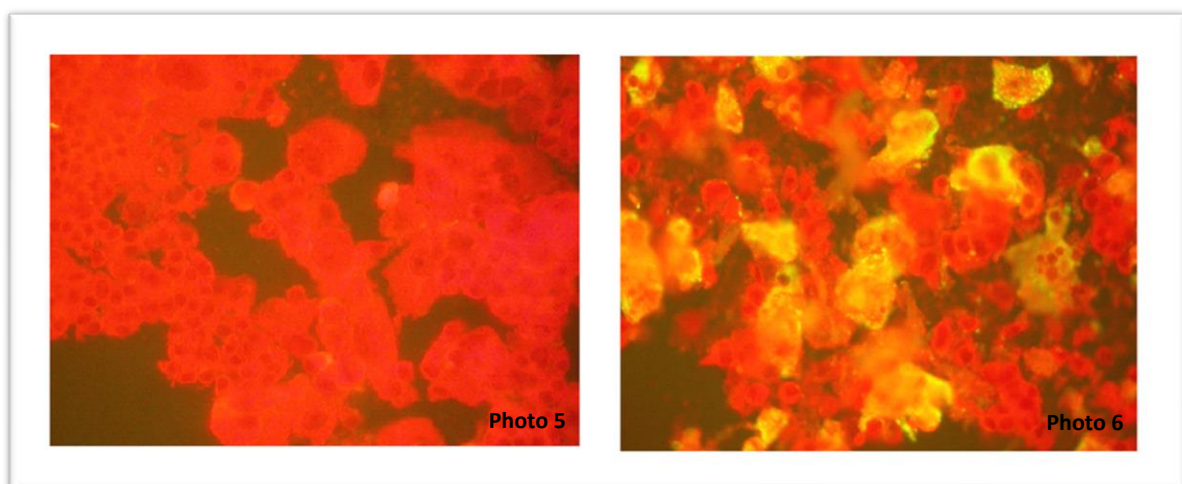
Every CPE (clear or doubtful) was confirmed by indirect immunofluorescence (IFI) using a specific AntiSARS-CoV-2 monoclonal antibody ([Photos 5 and 6](#): IFI negative and positive, respectively). Viral culture was considered negative when there was no CPE 10 days after inoculation or the CPE was not confirmed by IFI.

Immunofluorescence protocol:

- a. Remove the medium from the tube of VERO E6 cells and rinse twice with saline solution.
- b. Scrape the cell monolayer from the tube wall with a pipette, homogenize and place 50 µL of the suspension on a slide. Leave to dry on a hotplate for 10 minutes at 90°C.
- c. Fix with acetone for 10 minutes and leave to dry.
- d. Add 50 µL of the Anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody (MT-16CV10, CertTest BIOTEC, Spain) previously diluted 1/2000. Incubate for 30 minutes at 37°C.
- e. Rinse first with PBS and then with distilled water.
- f. Add 50 µL of the fluorescein-labelled conjugate (Goat Anti-Mouse IgG Antibody FITC Reagent. LIGHT DIAGNOSTICS, USA). Incubate for 30 minutes at 37°C.
- g. Rinse first with PBS and then with distilled water.
- h. Add mounting fluid (Diagnostic HYBRIDS, USA), place a coverslip on the slide and observe under a fluorescence microscope (x400).



Photos 1-4: Condition of VERO E6 monolayer observed under inverted microscope (x40). Photo 1: VERO E6 monolayer uninoculated. Photo 2: VERO E6 monolayer 2 days postinfection. Photo 3: VERO E6 monolayer 4 days postinfection. Photo 4: VERO E6 monolayer 5 days postinfection.



Photos 5-6: Indirect immunofluorescence (IFI) on VERO E6 using a specific AntiSARS-CoV-2 monoclonal antibody, observed under a fluorescence microscope (x400) with negative and positive results respectively.

DISCUSIÓN

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son en la actualidad las más empleadas en los laboratorios de microbiología clínica para el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias. En consecuencia, las técnicas de referencia como el cultivo viral han ido desapareciendo sucesivamente en la mayoría de estos laboratorios, quedando reducido su uso en algunos centros de referencia.

Resulta evidente que el diagnóstico de las infecciones respiratorias mediante PCR ofrece numerosas ventajas en comparación con el cultivo viral en algunos aspectos. Esta técnica ha representado un gran avance en el diagnóstico de dichas infecciones, ya que permite identificar el agente causal en pocas horas, así como descartar la presencia de los virus incluidos en la PCR. Además, la mayoría de las pruebas de PCR utilizadas en los laboratorios clínicos en la actualidad son PCR a tiempo real sencillas de realizar y no requieren de instalaciones especiales ni de personal altamente especializado, tanto para su procesamiento como para la interpretación de los resultados. Estas PCR a tiempo real poseen una elevada sensibilidad y permiten la detección de los virus más comunes responsables de las infecciones respiratorias en nuestro entorno, existiendo incluso PCR a tiempo real múltiples que permiten detectar en una única reacción varios virus respiratorios. Por último, en algunos casos es posible, mediante PCR cuantitativas (qPCR), conocer la carga viral (CV) presente en la muestra clínica.

Todo ello hace que las técnicas de PCR a tiempo real superen las principales limitaciones del cultivo, entre las que se incluye el elevado tiempo que necesitan la mayoría de los virus para positivar en cultivo, la necesidad de disponer de unas instalaciones y materiales especiales o la laboriosidad de la técnica, lo que dificulta su realización en la mayor parte de laboratorios clínicos y restringe su utilidad en la práctica clínica rutinaria.

Es importante destacar que, a pesar de su elevada utilidad, las técnicas de PCR también presentan una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados. En primer lugar, estas técnicas permiten amplificar y detectar secuencias o fragmentos específicos de material genético, pero esto no garantiza necesariamente que este material genético detectado provenga de un microorganismo viable o con replicación activa. Así mismo, para que se produzca la amplificación y detección de un microorganismo mediante PCR, es necesario conocer su genoma y disponer de cebadores específicos frente a ese microorganismo, por lo tanto, las PCR no permiten detectar microorganismos nuevos ni

aquellos no incluidos específicamente en esa PCR. Además, si se producen mutaciones en la región del genoma del microorganismo a la que se deben unir los cebadores de la PCR, es posible que estos no se puedan unir correctamente y la amplificación no ocurra, lo que puede llevar a falsos negativos. Por último, como consecuencia de la elevada sensibilidad de la técnica, las contaminaciones cruzadas son un punto crítico, por lo que se deben seguir estrictas medidas de manipulación y control para evitar falsos positivos.

Las infecciones respiratorias son extremadamente frecuentes y constituyen la principal causa de muerte de etiología infecciosa en el mundo, incluso antes de la pandemia de la COVID-19. Estas infecciones pueden estar causadas por diferentes agentes infecciosos, siendo los virus los más frecuentes³⁰¹. La mayoría de las veces causan cuadros leves y autolimitados, que no necesitan diagnóstico de laboratorio ni tratamiento específico. Sin embargo, en personas en situación de inmunosupresión, como los trasplantados o personas en edades extremas de la vida, pueden causar enfermedad grave o mortal. En estos pacientes vulnerables es importante identificar de forma precoz y precisa el virus causal, para poder realizar así un correcto manejo de estas infección, preferiblemente antes de que evolucionen a enfermedad grave. Aunque los tratamientos antivirales para las infecciones respiratorias son escasos, existe la posibilidad de tratamiento antiviral específico para algunos virus cuando hay riesgo de complicaciones graves, como es el caso del HCMV o del SARS-CoV-2. Además, el diagnóstico precoz de las infecciones víricas respiratorias facilita la instauración de medidas preventivas como el aislamiento de personas infectadas y poder reducir así la propagación del virus. Por último, permite hacer vigilancia epidemiológica para conocer los patrones de propagación de los virus, la prevalencia y etiología de las infecciones respiratorias, e incluso planificar estrategias de salud pública como las estrategias de vacunación.

Como ya se ha mencionado, la técnica de laboratorio ideal para realizar la detección de virus en muestras respiratorias es la PCR a tiempo real, ya que permite identificar la mayoría de los virus respiratorios de nuestro medio de una forma rápida, sencilla y sensible. Sin embargo, la detección de un virus mediante PCR a tiempo real en muestras respiratorias no siempre se correlaciona con infección activa ni enfermedad actual, ya que puede ser consecuencia de la presencia de material genético residual de una infección pasada. Además, en el caso de los virus que establecen latencia después de la primoinfección, como es el caso del HCMV, también es posible detectar el virus en estado latente, es decir, sin replicación activa. Hay que tener en cuenta que no se considera adecuado realizar controles de curación de las infecciones respiratorias virales mediante PCR, ya que es posible detectar DNA residual del virus en las

muestras respiratorias durante periodos prolongados de tiempo, sin que esto se correlacione necesariamente con infección activa ni infectividad.

Por todo ello, la interpretación de la detección de virus mediante PCR en muestras respiratorias no siempre es fácil, y muchas veces pueden llevar a conclusiones inadecuadas. Si estas pruebas se realizan cuando no están indicadas y/o se interpretan los resultados de forma errónea, se puede producir el incorrecto diagnóstico y manejo de determinadas infecciones respiratorias, la administración de tratamientos antivirales innecesarios o el aislamiento prolongado de los infectados.

Para establecer la relación entre el resultado de una PCR y la presencia de virus con replicación activa, es necesario utilizar la técnica microbiológica de referencias, que es el cultivo viral. Este fue el objetivo principal de la presente tesis, conocer la contribución del cultivo viral a la hora de interpretar los resultados obtenidos a través de la PCR a tiempo real en muestras respiratorias. Específicamente, esta investigación se dirigió hacia dos virus con características virológicas y patogenia muy diferente: el HCMV y SARS-CoV-2.

El HCMV es un virus que se descubrió hace más de 100 años y su papel en la infección respiratoria está bien descrito desde entonces, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, en los que mayoritariamente la neumonía aparece como consecuencia de la reactivación del virus latente en personas seropositivas. La neumonía por HCMV es una enfermedad cuya incidencia se ha reducido en los últimos años, pero continúa siendo uno de los patógenos oportunistas más temidos¹⁰⁷. En los pacientes receptores de alo-TPH, que son los de mayor riesgo, la mortalidad se sitúa en torno al 70%. Su diagnóstico se ha basado tradicionalmente en las técnicas de referencia como el cultivo viral o la inmunohistoquímica, pero en los últimos años ha pasado a realizarse casi en exclusiva mediante PCR.

Desafortunadamente, la mayoría de los laboratorios clínicos ya no tienen disponible el cultivo viral como herramienta diagnóstica, por lo que las técnicas de PCR se han incorporado a la rutina de los laboratorios sin la posibilidad de hacer estudios comparativos con las técnicas de referencia. Por ello, no ha sido posible conocer realmente el papel de las PCR en el diagnóstico de la neumonía por HCMV ni la relación entre la detección de DNA de HCMV por PCR y la enfermedad. Esto sería posible mediante estudios comparativos de estos resultados con los obtenidos en cultivo.

La situación del SARS-CoV-2 es diferente. Este virus se descubrió hace algo más de 3 años gracias a la aplicación de las técnicas moleculares de secuenciación masiva en una muestra respiratoria del primer paciente infectado. Esto permitió conocer el genoma del virus

rápidamente y diseñar diferentes RT-PCR a tiempo real para su detección, convirtiéndose en la principal herramienta diagnóstica de la infección por SARS-CoV-2 durante estos años. Por contra, el cultivo viral no ha sido una técnica de aplicación para su diagnóstico rutinario, y su uso se ha restringido a estudios de investigación en centros de referencia. Esto se debe a que cuando apareció el SARS-CoV-2, el número de laboratorios con posibilidad de realizar cultivo viral era muy limitado, pero sobre todo por las características del virus y de la situación epidemiológica que provocó. La OMS lo clasificó como un agente de riesgo biológico nivel 3 (RB3), por lo que para su manipulación en cultivo se necesitan instalaciones de contención especiales, es decir, un laboratorio de BSL-3, lo que limita todavía más su realización. Además, al tratarse de una infección respiratoria aguda y altamente contagiosa, es necesario disponer del resultado microbiológico lo antes posible, por lo que el cultivo no se considera adecuado para el diagnóstico rutinario. El uso de RT-PCR a tiempo real en muestras respiratorias para el diagnóstico de casos infectados por SARS-CoV-2 ha sido de gran utilidad durante la pandemia, pero no permite conocer cuánto dura la infección activa ni la contagiosidad desde que se produce la infección, cuestiones que tienen mucha repercusión e interés, especialmente para establecer la duración del aislamiento de los infectados y evitar casos secundarios²³⁹⁻²⁴¹. Gracias a algunos estudios llevados a cabo en las fases iniciales de la pandemia, en los que se compararon los resultados obtenidos por las RT-PCR de SARS-CoV-2 y por cultivo viral, se fueron respondiendo muchas de dudas en este aspecto, lo que ha servido para ir adaptando los procedimientos de gestión de casos y guiar diferentes estrategias de salud pública.

Recientemente, se ha aceptado la posibilidad de realizar el diagnóstico de neumonía probable por HCMV utilizando muestras de lavados broncoalveolares (BAL), ya que la obtención de muestra de tejido pulmonar no siempre es posible¹²³. A pesar del desconocimiento del papel de la detección del HCMV en BAL mediante PCR y su relación con la enfermedad, las guías también aceptan como criterio para el diagnóstico de neumonía probable la cuantificación de DNA del virus por qPCR. Sin embargo, no se ha conseguido definir el valor de carga viral (CV) universal de HCMV en BAL a partir del cual se puedan diferenciar los pacientes con infección activa, es decir, virus replicativo, de aquellos en los que se detecta virus latente o fragmentos de DNA residual⁴⁶.

Para conocer la situación actual sobre este tema, inicialmente hicimos una revisión bibliográfica sobre los trabajos publicados hasta el momento (14 noviembre del 2022) sobre el

uso de las qPCR en BAL para el diagnóstico de la neumonía por HCMV, en la que analizamos la metodología, los resultados y las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios (**Objetivo 1**). Encontramos 14 artículos que cumplían los criterios requeridos en la búsqueda, y a raíz de esta revisión surgió el **primer trabajo** que compone la tesis³⁰². Se encontraron bastantes diferencias en cuanto a la metodología empleada en cada uno de estos estudios, que se discutirá a continuación.

La mayoría de estos estudios se llevaron a cabo incluyendo población adulta^{125-131,133-135,137,138}, a excepción de uno que se centró únicamente en niños¹³² y otro que incluyó pacientes de ambos grupos de edad¹³⁶. Como consecuencia de la baja incidencia global de esta enfermedad, muchos de los trabajos se realizaron incluyendo un número limitado de casos (la mitad de ellos incluyeron menos de 20 pacientes con neumonía probada por HCMV)^{128,129,134-138}. En lo referente al perfil clínico de los pacientes incluidos, algunos de los estudios se limitaron exclusivamente a un grupo específico con características muy definidas, como sólo pacientes receptores de trasplante hematológico^{126,131,133,137} o trasplantados de pulmón^{130,134-136,138}. En contraste, el resto de trabajos agruparon a pacientes con diversos tipos de inmunosupresión^{125,127-129,132}.

Con relación a las muestras clínicas utilizadas en estos estudios, además de las muestras de BAL empleadas para la cuantificación de la carga del virus de los casos incluidos, únicamente en cinco estudios se recogieron adicionalmente muestras de tejido pulmonar, considerada la muestra óptima para el diagnóstico de la neumonía probada por HCMV^{130,131,134,135,138}. La mayoría de los estudios utilizaron muestras de BAL “frescas” para la cuantificación del DNA viral, es decir, la qPCR se realizó de forma prospectiva al momento de recolección de la muestra; no obstante, tres trabajos utilizaron muestras de BAL congeladas, a las que se les realizó la qPCR de forma retrospectiva^{127,129,133}. Por último, muchos de los autores incluyeron también en sus trabajos la cuantificación del HCMV en muestras de plasma, de manera simultánea a la cuantificación realizada en BAL^{128,130,132,137,138}. No obstante, en algunos casos ambas muestras no fueron obtenidas al mismo tiempo, lo que limita las conclusiones obtenidas de la comparación¹³³.

Respecto a las técnicas utilizadas para cuantificar la carga de HCMV en los BAL, la mayoría de los estudios emplearon pruebas de qPCR que no eran completamente automatizadas, es decir, requerían una extracción manual previa del DNA de la muestra, seguida de otro paso independiente para la amplificación y cuantificación de la CV^{125-127,129-133,136,138}. Por otro lado, dos de los trabajos utilizaron la técnica molecular manual de captura de híbridos^{134,135}, la cual

se considera menos sensible y automatizada en comparación con las qPCR actuales. Adicionalmente, no en todos los trabajos se utilizaron adicionalmente las técnicas de referencia como indicadores de replicación del virus en BAL, como el cultivo viral^{125,127,131,133,136,137} o la inmunohistoquímica^{130,131,134,135,138}, para validar y comparar los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares.

Dada la amplia variabilidad metodológica presente en los catorce estudios, no es sorprendente encontrar resultados y conclusiones discrepantes entre ellos. No obstante, es importante destacar que hay una serie de conclusiones en las que coincidieron. Se encontró que las técnicas qPCR fueron más sensibles y mostraron un valor predictivo negativo (VPN) superior en comparación con las técnicas de cultivo para el diagnóstico de la neumonía por HCMV, pero fueron menos específicas. Cabe resaltar que la detección de DNA de HCMV en BAL no siempre indicó enfermedad. Sin embargo, se observó que la mediana de la carga de HCMV fue significativamente superior en los pacientes con neumonía en comparación con aquellos que no presentaban la enfermedad, tanto en las muestras de BAL como en plasma. Además, se observó que la mediana de la CV de HCMV en muestras de BAL fue a su vez significativamente superior que en plasma. Estos hallazgos indicaron que el análisis por qPCR de las muestras de BAL es más útil para el diagnóstico de la neumonía por HCMV que el plasma.

Todos los autores resaltaron la complejidad de establecer un valor universal de CV de HCMV en muestras de BAL que permita diferenciar entre los pacientes con neumonía y aquellos que no la padecen. Este desafío también se ha presentado de manera similar en las muestras de plasma, donde tampoco hay definidos valores de CV que permitan guiar las diferentes estrategias terapéuticas.

A pesar de los esfuerzos realizados por todos los estudios para abordar esta situación, los valores de CV indicativos de replicación activa del HCMV en el pulmón obtenidos en cada trabajo, difieren significativamente entre ellos. Los valores obtenidos en estos trabajos muestran un amplio rango de CV, que oscila desde 500 UI/mL¹³³ hasta >500.000 copias/mL¹³⁴. Es importante destacar que no todos los estudios utilizaron plataformas de qPCR calibradas con el calibrador estándar internacional de la OMS, lo que conlleva que no todas las CV de HCMV estén expresadas en unidades internacional por mililitro (UI/mL), tal y como recomienda la OMS para estandarizar los resultados y facilitar la comparación entre diferentes investigaciones. En estos casos, los resultados de CV se expresaron en copias/mL^{127,131,134-136}. Esta disparidad en las unidades utilizadas para expresar los resultados de los estudios dificulta la comparación entre los mismos. Por otro lado, algunos autores concluyeron que no es

posible establecer este valor universal con el que diferenciar a los pacientes que realmente tienen neumonía por HCMV^{126,136}.

Las limitaciones metodológicas mencionadas anteriormente podrían explicar, en parte, las dificultades para encontrar el valor de CV de HCMV en BAL y las discrepancias entre los resultados obtenidos. No obstante, existen otros factores que también contribuyen a esta dificultad. La propia patogénesis del HCMV, es decir, su capacidad de establecer latencia, de replicarse de forma asintomática o de causar enfermedad, dificulta la interpretación de su detección en determinadas muestras clínicas¹²⁷. Además, las muestras respiratorias, especialmente los BAL, son altamente variables debido al efecto dilucional de la técnica utilizada en la obtención de la muestra durante la broncoscopia. El suero instilado en el procedimiento se distribuye de forma heterogénea por el tracto respiratorio inferior, y tanto el volumen de pulmón bañado como la cantidad de líquido recuperado son muy cambiantes entre los diferentes individuos sometidos a una broncoscopia. Esto hace que los resultados de la cuantificación en BAL sean muy fluctuantes. Por otra parte, no existe una estandarización de las pruebas disponibles en los laboratorios clínicos para la cuantificación de DNA de HCMV. Existen múltiples opciones comerciales para realizar esta determinación, cada una de ellas con características diferentes. Factores como el rendimiento de la prueba (límite de detección y cuantificación), el método de extracción del DNA de la muestra, la región del genoma del HCMV utilizada como diana o el tamaño del amplicón, interfieren en la variabilidad de la CV detectada. Finalmente, es importante considerar que es posible que los valores de CV de HCMV en BAL clínicamente relevantes difieran entre pacientes, especialmente en relación con su perfil de riesgo. Por tanto, es probable que no sea posible establecer un único valor de CV de HCMV en BAL que sea aplicable a toda la población, siendo necesario individualizarlo¹²⁷.

Además de la cuantificación del DNA del HCMV en BAL como herramienta diagnóstica para la neumonía, también se ha investigado el papel de la cuantificación del HCMV en la sangre (DNAemia) en el diagnóstico de esta enfermedad. Algunos de los estudios incluidos en esta revisión también analizaron muestras de plasma para evaluar la utilidad de la DNAemia del HCMV en el diagnóstico de la neumonía. Sin embargo, al igual que sucedió con el BAL, se encontraron discrepancias en los resultados obtenidos y no se llegaron a conclusiones claras.

La mayoría de los estudios llegaron a la conclusión de que la carga de HCMV en sangre era significativamente superior en pacientes con neumonía en comparación con los que no padecían esta enfermedad. Asimismo, se observó que la CV de HCMV en los pacientes con neumonía fue significativamente superior en el BAL que en la sangre, lo que sugiere que la

realización de la qPCR de HCMV en el BAL es mejor predictor de neumonía en comparación con la sangre^{130,131,132,134,137,138}.

Algunos autores encontraron que en un tercio de los pacientes con neumonía probada por HCMV, el virus no se detectó en sangre^{127,138}. Esto evidencia la posibilidad de una replicación local del HCMV en el pulmón sin replicación sistémica, lo cual indica que el uso exclusivo de técnicas de qPCR en sangre como herramienta diagnóstica para la neumonía por HCMV no es apropiado. En contraposición, en el estudio más reciente publicado, se concluyó que en los pacientes en los que no se detecta DNA del HCMV en sangre, se puede descartar la neumonía por HCMV¹²⁸. Sin embargo, esta conclusión es muy debatible debido a que sólo se incluyeron 11 pacientes con neumonía por HCMV, en los que podría existir un sesgo en la selección de pacientes sometidos a broncoscopia, y además, no se utilizaron las técnicas de referencia para la detección de replicación viral.

En conclusión, existen varios factores que han impedido hasta el momento obtener un valor de CV universal de HCMV en BAL que permita diferenciar a los pacientes con neumonía de aquellos que no presentan la enfermedad. Los estudios realizados hasta ahora presentan diversas limitaciones metodológicas, como un bajo número de pacientes con neumonía por HCMV incluidos, la falta de uso de técnicas diagnósticas de referencia en tejido pulmonar para establecer los casos de neumonía probada, o el uso de pruebas de qPCR no totalmente automatizadas. Además, la propia patogénesis del HCMV, las limitaciones inherentes de las muestras de BAL y la variabilidad de las pruebas de qPCR disponibles en los laboratorios también influyen en la dificultad de obtener un valor universal de CV. Es probable que dicho valor deba ajustarse en función del riesgo de cada paciente.

Con la intención de completar la información disponible respecto a este tema, se llevó a cabo el **segundo trabajo** de esta tesis³⁰³, en el que se realizó de forma prospectiva y en paralelo el cultivo viral y la qPCR de HCMV en muestras de BAL de pacientes inmunodeprimidos con signos y/o síntomas de infección respiratoria. El objetivo principal de este trabajo fue comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas (**objetivo 2**).

Los resultados obtenidos revelaron una elevada concordancia entre ambas técnicas (81,25%); sin embargo, en algunos casos (18,75%) no se observó coincidencia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas. Esta discordancia se debió a que en 33 de las 176 muestras de BAL se detectó la presencia de HCMV mediante qPCR, pero no mediante cultivo. En línea con la bibliografía publicada hasta el momento, se encontró que la qPCR fue más sensible (100%) para detectar el HCMV en muestras de BAL que el cultivo viral. Sin embargo, la qPCR presentó

una especificidad baja (79%) y un valor predictivo positivo muy bajo (34%) para identificar casos de replicación activa del virus en los pulmones, tomando el cultivo viral como técnica de referencia. Por lo tanto, la detección de HCMV en BAL mediante qPCR debe abordarse con precaución, ya que en muchas ocasiones no se correlaciona con replicación activa del virus. Esto es de suma importancia para evitar diagnósticos incorrectos y tratamientos innecesarios.

No obstante, en todos los casos en los que la qPCR resultó negativa en las muestras de BAL, también se obtuvieron resultados negativos en el cultivo viral, lo que indica un valor predictivo negativo máximo (100%) para esta técnica. En consecuencia, se pudo concluir que cuando la qPCR de BAL es negativa, se puede descartar rápidamente y de manera segura la neumonía por HCMV. Esta afirmación está respaldada por la mayoría de la bibliografía publicada, a excepción de un estudio¹²⁷, en el que se observó un pequeño porcentaje de muestras de BAL (6/303) con cultivo positivo para HCMV, pero qPCR negativa. Este resultado contradictorio podría explicarse por la realización de un pretratamiento y dilución de la muestra de BAL antes de la extracción del DNA, así como por el hecho de que la qPCR utilizada no fue totalmente automatizada. Ambas situaciones podrían haber reducido el rendimiento de la qPCR y haber causado falsos negativos.

Cabe mencionar que en nuestro estudio se llevó a cabo el cultivo viral en todos los casos utilizando dos métodos: el cultivo tradicional en tubo y cultivo shell-vial. Se observó que el cultivo shell-vial fue más sensible para la detección de virus replicativo, como ya se había descrito anteriormente⁸⁶. Por lo tanto, debido a su mayor sensibilidad y menor tiempo de respuesta, se considera que el cultivo shell-vial es la técnica más adecuada para realizar el cultivo viral en estos casos. Sin embargo, es relevante tener en cuenta que mediante este tipo de cultivo no es posible aislar el virus para realizar estudios posteriores.

Teniendo en cuenta la baja especificidad y valor predictivo positivo de la qPCR en muestras de BAL para el diagnóstico de la neumonía por HCMV, se planteó el siguiente objetivo de la tesis, también incluido dentro del **segundo trabajo**³⁰³. El **objetivo 3** fue establecer un valor de corte de carga de HCMV en BAL que permita detectar los casos de replicación activa del virus, utilizando también el cultivo como técnica de referencia.

Como se ha mencionado anteriormente, la detección de HCMV en las muestras de BAL mediante qPCR por sí sola no es suficiente para realizar un diagnóstico preciso de esta enfermedad. Por lo tanto, la cuantificación del DNA del virus en BAL podría resultar más útil para interpretar los resultados obtenidos. Las guías actuales incluyen la cuantificación de la carga del virus en BAL como una posible herramienta diagnóstica para la neumonía probable

causada por HCMV. Sin embargo, aún no se han definido valores de referencia que permitan distinguir entre la detección de HCMV relacionada con una infección activa y casos en los que se trata de una infección latente o la presencia de DNA residual.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la cuantificación de la CV de HCMV en BAL mediante qPCR y también se registró el valor del Ct (threshold cycle) de las pruebas de qPCR positivas. Los resultados de la CV obtenidos se expresaron tanto en copias/mL como en UI/mL, y se compararon con los resultados obtenidos en el cultivo viral.

En consonancia con la literatura previa, los resultados obtenidos revelaron que la mediana de la CV de HCMV en BAL fue significativamente superior, mientras que el valor de Ct de la qPCR fue significativamente inferior, en los casos de neumonía en comparación con aquellos sin la enfermedad. Estos resultados proporcionan un respaldo adicional a la utilidad de la cuantificación de la carga del HCMV en BAL como un marcador diagnóstico de la neumonía.

En este estudio de las muestras de BAL, se encontró una relación directa entre el valor de carga de HCMV y la probabilidad de detectar el virus en cultivo. Se observó que, cuando las CV en BAL eran inferiores a 200 UI/mL, el porcentaje de cultivos positivos fue inferior al 5%. Por el contrario, en todos los casos en los que la carga de HCMV superaba los 900 UI/mL, se logró aislar el virus en cultivo.

Basándonos en los resultados obtenidos en el cultivo y en la qPCR de las muestras de BAL, se realizó un análisis para construir una curva ROC con el objetivo de determinar un valor de carga de HCMV que indique la replicación activa del virus en el pulmón. La curva ROC nos proporcionó un área bajo la curva (AUC) muy cercana a 1, lo que demostró que el modelo desarrollado fue altamente preciso y presenta una excelente capacidad de discriminación.

Utilizando este modelo de la curva ROC, se evaluaron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en relación con de diferentes valores de carga de HCMV en BAL. A partir de este análisis, se determinó que una carga de HCMV en BAL igual o superior a 1.258 UI/mL (equivalente a 6.290 copias/mL) puede considerarse como un indicador fiable de replicación viral. Esta condición presentó valores máximos de especificidad y VPP, y valores elevados de VPN y sensibilidad.

Como demostramos en el primer trabajo de esta tesis, los estudios previamente publicados presentan una notable variabilidad en los valores de CV en BAL propuestos para el diagnóstico de la neumonía, abarcando un rango desde 500 UI/mL hasta más de 500,000 copias/mL. De todos estos trabajos, sólo en tres de ellos se utilizó una metodología similar a la de nuestro

estudio, basando los resultados obtenidos en la realización del cultivo viral y la qPCR de HCMV en las muestras de BAL.

En el primero de ellos¹²⁷, basándose en el análisis de 1.109 muestras de BAL de pacientes inmunosuprimidos, los investigadores determinaron que una CV superior a 10.000 copias/mL en el BAL se correlacionaba con replicación activa del HCMV. Es interesante observar que este valor de CV no difiere mucho del obtenido en nuestro propio trabajo. Sin embargo, es importante señalar algunas diferencias metodológicas entre su estudio y el nuestro. En este trabajo¹²⁷ no se realizó el cultivo viral tradicional en tubo en todas las muestras, y en un alto porcentaje de casos (88%), las muestras de BAL utilizadas para cuantificar el DNA viral estaban congeladas. Además, otra diferencia importante fue que el ensayo de PCR qPCR utilizado en su estudio no era totalmente automatizado, ya que requería una extracción previa del DNA en un paso independiente, lo que podría afectar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

En los otros dos artículos en los que se llevaron a cabo tanto cultivo como qPCR para detectar el HCMV en muestras de BAL, se encontraron valores de CV indicativos de neumonía considerablemente diferentes a los obtenidos en nuestro propio trabajo. En el estudio de Young et al., 2017¹³¹, que analizó 565 muestras de BAL, se estableció un punto de corte de carga de HCMV igual o superior a 28.774 copias/mL para diagnosticar la neumonía. En contraste, el trabajo de Boeckh et al., 2017¹³³, que estudió 271 muestras de BAL, propuso un punto de corte significativamente más bajo para la CV, fijándolo en 500 UI/mL. En cuanto a estos dos estudios mencionados, cabe resaltar que ambos se centraron exclusivamente en pacientes con enfermedad hematológica, lo que sugiere que sus conclusiones serían aplicables sólo a este grupo de pacientes. Es importante tener en cuenta esta limitación al extrapolar los resultados a otras poblaciones con diferentes condiciones clínicas. Otro aspecto para considerar es que ambos también utilizaron una prueba de qPCR poco automatizada para cuantificar la CV en las muestras de BAL, lo que podría tener implicaciones en la reproducibilidad y precisión de los resultados. Además, las muestras de BAL utilizadas en ambos estudios fueron congeladas, lo que podría introducir ciertas variabilidades preanalíticas que podrían afectar los resultados de las pruebas de qPCR.

En otros dos estudios en los que sólo se incluyeron pacientes sometidos a un trasplante de pulmón, los valores de CV propuestos fueron de 4.545 UI/mL¹³⁰ y 46.000 copias/mL¹³⁸, ambos superiores al de nuestro estudio. En ninguno de ellos se realizó cultivo viral y la qPCR utilizada tampoco era automatizada, lo que podría limitar las conclusiones obtenidas.

Contrariamente a lo propuesto en nuestro trabajo y en los anteriormente mencionados, en varios trabajos concluyeron que no es posible establecer un valor de CV universal que permita diferenciar a los pacientes con neumonía de los que no la tienen^{126,136}.

En el **segundo trabajo**³⁰³ de la tesis, también abordamos el **objetivo 4**, que consistió en evaluar la carga de HCMV en plasma (DNAemia) en los pacientes con sospecha de neumonía y su relación con la CV en las muestras de BAL. Para lograr esto, llevamos a cabo una búsqueda retrospectiva para identificar si los pacientes incluidos en el estudio habían sido sometidos a una determinación de la carga de HCMV en plasma durante la semana previa o posterior a la realización de la broncoscopia para la recolección de la muestra de BAL. Es importante señalar que la determinación de la DNAemia de HCMV se había realizado únicamente en un tercio de los pacientes incluidos en este estudio. Esta limitación en la disponibilidad de datos sobre DNAemia puede influir en la generalización y alcance de las conclusiones obtenidas en relación con la evaluación de la carga de HCMV en plasma y su relación con la CV en las muestras de BAL. A pesar de esta limitación, los resultados revelaron varios hallazgos interesantes. Entre los pacientes en los que el BAL fue positivo para HCMV en el cultivo, se observó que se habían realizado más determinaciones de DNAemia en comparación con los pacientes en los que el BAL resultó negativo para HCMV, probablemente porque la sospecha de enfermedad por HCMV era mayor en los primeros.

Otros resultados relevantes que arrojaron luz sobre la relación entre la carga de HCMV en plasma y la presencia del virus en muestras de BAL en pacientes con sospecha de neumonía, fue que en todos los pacientes cuyo BAL tuvo un cultivo positivo para HCMV y a los cuales se les realizó el estudio de DNAemia, ésta fue también positiva. Por el contrario, en el grupo de pacientes en los que no se detectó la presencia de HCMV en muestras de BAL, el porcentaje de pacientes en los que se detectó DNA de HCMV en plasma fue inferior. Además, se encontró que la carga de HCMV en plasma fue significativamente superior, más de 4.000 UI/mL, en aquellos pacientes con un resultado positivo de HCMV en la muestra de BAL mediante cultivo y qPCR, en comparación con aquellos en los que el virus no fue detectado en BAL mediante el cultivo, pero sí por qPCR o aquellos en los que el HCMV no se detectó en las muestras de BAL por ninguna de las técnicas utilizadas. Estos hallazgos coinciden con lo descrito en investigaciones previas, en la que se encontró una correlación positiva entre la presencia de DNAemia de HCMV y la neumonía. No obstante, es esencial tener en cuenta que, aunque en nuestro estudio no se haya demostrado esta situación, posiblemente debido al número limitado de pacientes con neumonía incluidos, está bien descrita la posibilidad de que el HCMV pueda replicarse en el pulmón sin presentar una replicación sistémica^{127,138}. Por lo tanto,

aunque la detección del HCMV en plasma puede ser útil como apoyo en el diagnóstico de la neumonía, la ausencia del virus en la sangre no debe considerarse como la única prueba para descartar la enfermedad.

En el presente estudio, también se pudo observar que en los pacientes con neumonía por HCMV, determinada mediante la detección de HCMV en muestras de BAL mediante cultivo, la mediana de la carga de HCMV fue mayor (233 UI/mL) en las muestras de BAL en comparación con las de plasma, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística. Estos hallazgos también están en línea con lo reportado por en otros estudios, aunque algunos encontraron diferencias más notables entre las CV de ambas muestras. Es importante destacar que en muchos de estos trabajos se emplearon pruebas de qPCR diferentes para determinar la carga de HCMV de ambas muestras. Sin embargo, en nuestro caso, se utilizó la misma plataforma de qPCR tanto para las muestras de BAL como para las de plasma, lo que da solidez y coherencia de los resultados obtenidos en este estudio.

Este **segundo trabajo**³⁰³ presenta varias fortalezas en comparación con estudios previos. En primer lugar, es importante destacar que todas las muestras de BAL fueron sometidas en paralelo a cultivo viral utilizando dos métodos diferentes: el cultivo tradicional en tubo y el shell-vial. Ambas técnicas llevan más de 30 años establecidas en la rutina diagnóstica del laboratorio para el diagnóstico de la neumonía por HCMV, lo que confirma la robustez y validez de los resultados obtenidos. La selección de muestras incluidas fue realizada de manera prospectiva y consecutiva, lo que constituye una fortaleza en el diseño del estudio, ya que permite evitar el sesgo de selección en la muestra. Además, las muestras de BAL fueron recibidas en el laboratorio pocos minutos después de su obtención mediante la broncoscopia. Posteriormente, fueron procesadas de manera inmediata y de forma simultánea para el cultivo viral y para la qPCR, evitando así la pérdida del título viral y su infectividad. Este manejo rápido de las muestras desde su obtención es clave para asegurar el éxito del aislamiento del virus en el cultivo, y proporcionar así resultados más precisos y confiables.

En el presente estudio, se cuantificaron de las CV en BAL y en plasma utilizando la misma plataforma de qPCR, lo que permitió unificar los resultados. Esta plataforma representa una prueba completamente automatizada, en la que la muestra original fue utilizada sin requerir ningún procesamiento previo. Se llevó a cabo la extracción de DNA, la amplificación y el cálculo y expresión de la CV, sin manipulación de la muestra original en los pasos intermedios. Una ventaja adicional de esta prueba de qPCR fue su capacidad para obtener los resultados expresados en UI/mL, siguiendo las pautas establecidas en el "1st WHO International Standard

for HCMV for Nucleic Acid Amplification Techniques". Esta característica facilita la comparación de los resultados con otros estudios, mejorando así la interpretación y la validez de los hallazgos obtenidos.

Por último, en este estudio se destaca otra ventaja crucial al utilizar la beta-globina como marcador de control interno en las reacciones de qPCR. En todas las muestras incluidas en el estudio, se detectó exitosamente el control interno mediante la amplificación de la beta-globina. La beta-globina es un gen constitutivo presente en todas las células nucleadas humanas, lo que lo convierte en un indicador fiable para verificar la presencia y calidad del DNA humano de la muestra. Particularmente, en el caso de las muestras respiratorias como el BAL que tienden a experimentar una dilución significativa debido al suero instilado durante la recolección, la presencia detectable de la beta-globina desempeña un papel crucial. Esta presencia asegura un recuento celular adecuado en la muestra, lo cual resulta esencial para alcanzar una interpretación sólida de los resultados obtenidos. La omisión de la detección y amplificación de la beta-globina podría sugerir la degradación de la muestra o la presencia de una cantidad insuficiente de células, signos de una muestra de baja calidad.

Además de evaluar la calidad de la muestra, la presencia de la beta-globina también permite identificar la posible presencia de inhibidores de la reacción de qPCR. Si el control interno no amplifica correctamente, es una señal de que la qPCR no ha funcionado de manera adecuada debido a estos inhibidores. En última instancia, el uso de la beta-globina como control interno y la obligación de detectarla para considerar los resultados obtenidos válidos, brinda la capacidad de validar los resultados negativos. Si una muestra da un resultado negativo para el gen diana pero amplifica adecuadamente la beta-globina, se puede descartar que el resultado negativo se deba a un error técnico durante la reacción o a la falta de DNA humano en la muestra, proporcionando mayor confianza en los hallazgos obtenidos.

En resumen, la utilización de la beta-globina como control interno en las reacciones de qPCR ofrece múltiples beneficios, entre ellos, la verificación de la calidad de la muestra, la detección de inhibidores, la validación de resultados negativos y la garantía de resultados confiables y precisos en el estudio.

Por otro lado, el **segundo trabajo**³⁰³ también presenta ciertas limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados obtenidos. El estudio incluyó pacientes con diversos tipos de inmunosupresión, lo que implica que los valores de CV obtenidos no sean generalizables a todos los grupos y requieran ajustes posteriores en función del riesgo asociado a cada grupo específico. A pesar de que se analizó un número relativamente elevado

de muestras de BAL (176), superando así a la mayoría de los estudios similares, únicamente se detectaron resultados positivos para HCMV por cultivo en 17 muestras. Esta limitación restringe las conclusiones que pueden extraerse de nuestros hallazgos. Además, los datos de DNAemia se obtuvieron retrospectivamente, y sólo se contaba con información de este estudio en un tercio de los pacientes, lo cual también afecta al análisis de los resultados obtenidos. Por último, a pesar de que el uso de la beta-globina como marcador de la cantidad adecuada de células en la muestra tiene ventajas, no se elimina el efecto que tiene el número de células presentes en la muestra en la CV. Una mejora en este sentido habría sido cuantificar el número de células (mediante la cuantificación de la beta-globina) y, a partir de ello, obtener la CV normalizada en función del número de células de la muestra. De hecho, en un experimento similar (segundo trabajo del **Anexo 1**)³⁰⁴, ya llevamos a cabo esta normalización para calcular la CV normalizada del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias.

La repentina aparición del SARS-CoV-2, un virus totalmente desconocido, y su impacto en la salud a nivel mundial durante la pandemia de COVID-19, desencadenaron una serie de incertidumbres iniciales. Entre estas, destacaba el deseo de comprender el período de infectividad de las personas contagiadas, con el objetivo primordial de orientar diversas estrategias de salud pública para el control de la pandemia, como los periodos de aislamiento recomendados.

Desde el inicio, la técnica más ampliamente utilizada para diagnosticar las infecciones por SARS-CoV-2 ha sido la RT-PCR de muestras respiratorias. Sin embargo, como ya se ha mencionado previamente, la detección del virus mediante esta técnica no siempre se correlaciona con la presencia de virus viable o con su capacidad infectiva. Por consiguiente, para abordar esta cuestión fue necesario llevar a cabo estudios de viabilidad del SARS-CoV-2 mediante cultivos virales.

En relación con el estudio de la viabilidad del SARS-CoV-2, y aprovechando nuestra experiencia en el cultivo de otros virus respiratorios, llevamos a cabo el **tercer trabajo** de esta tesis³⁰⁵. En él, desarrollamos el **objetivo 5**, que consistió en describir un protocolo detallado de cultivo de SARS-CoV-2. Esta iniciativa fue de gran importancia, dado que hasta ese momento la información disponible acerca de este tema era muy limitada. Además, se incluyó en el protocolo la confirmación de los cultivos positivos mediante inmunofluorescencia.

Para el cultivo del SARS-CoV-2, se optó por utilizar las células VERO E6 debido a su extensa y reconocida utilidad en la investigación y aislamiento de diversos virus, incluso aquellos de

mayor complejidad, así como en la producción de vacunas y terapias médicas. Estas células son una variante de las células VERO, las cuales son derivadas de las células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*). Las células VERO E6 fueron especialmente modificadas para mejorar su capacidad de replicar virus y expresar receptores celulares específicos que las hacen más susceptibles a la infección viral. Estas adaptaciones resultan particularmente útiles para el cultivo de ciertos virus, incluidos algunos virus respiratorios y patógenos humanos.

Al iniciar esta investigación, nos basamos en la evidencia de varios artículos que recientemente habían demostrado la óptima habilidad de multiplicación del SARS-CoV-2 en las células VERO E6²⁶⁰. Esta capacidad ya se evidenció con el primer paciente de Wuhan ingresado por neumonía, y también se habían utilizado estas células con éxito en el pasado para el aislamiento e investigación del SARS-CoV. A pesar de que, en algunos estudios iniciales, se emplearon otras líneas celulares para el aislamiento del SARS-CoV-2, las células VERO E6 destacaron al exhibir los mejores resultados para la recuperación de este virus²⁶⁰.

Inicialmente, en nuestro trabajo, también utilizamos las células LLC-MK2. En algunos casos, se logró aislar el virus en estas células, pero en menor medida que en las células VERO E6. Además, la lectura e interpretación de los cultivos resultaron ser más complicadas en el caso de las células LLC-MK2. Por todo ello, se decidió no utilizar estas células para el cultivo de SARS-CoV-2.

Según se describe en el material suplementario del **tercer trabajo**³⁰⁵, la metodología empleada para el cultivo del SARS-CoV-2 siguió una pauta similar a la utilizada en nuestro laboratorio para el aislamiento de otros virus respiratorios. El proceso consistió en la preparación previa de las células VERO E6 del cultivo para su inoculación, el pretratamiento de las muestras respiratorias para evitar la contaminación del cultivo y, posteriormente, la inoculación de las muestras en las células, siempre y cuando la monocapa celular esté en perfectas condiciones para permitir el aislamiento viral.

Un aspecto clave para optimizar el aislamiento de los virus en cultivo es garantizar una conservación adecuada de las muestras desde su recogida hasta su inoculación. Es fundamental que, desde el momento en que se obtiene la muestra, se proceda a su inoculación lo antes posible, ya que con el tiempo, el título infectivo viral puede disminuir debido a su degradación^{5,6}. En la mayoría de los casos del presente trabajo, las muestras fueron procesadas e inoculadas tan pronto como llegaron laboratorio. Sin embargo, en alguna ocasión, la muestra llegó fuera del horario de trabajo de la sección, lo que hizo necesario

guardarla a una temperatura de 4°C hasta su inoculación. Cabe destacar que, en todos los casos, la inoculación se realizó dentro de las primeras 48 horas desde su recogida, garantizando así la viabilidad de los virus presentes en la muestra.

Las observaciones de los cultivos inoculados se llevaron a cabo diariamente mediante el uso de un microscopio óptico invertido. En aquellas muestras con cultivo positivo, el efecto citopático en la monocapa de VERO E6 fue fácilmente identificable y se manifestó relativamente rápido. Se determinó que la mediana de días transcurridos desde la inoculación hasta la aparición del efecto citopático en las muestras positivas fue de 3 días. Este resultado destacó la eficiencia del proceso de cultivo y la capacidad de replicación del virus SARS-CoV-2 en las células utilizadas.

Tal y como recogieron en una revisión sobre los artículos publicados hasta entonces acerca del cultivo de SARS-CoV-2²⁵⁹, se han observado notables diferencias en diversos aspectos de los protocolos empleados. Estas diferencias abarcan desde los procedimientos técnicos seguidos durante el proceso del cultivo, los tiempos de incubación, la metodología para confirmar cultivos positivos, las líneas celulares empleadas y hasta la inclusión de distintos tipos de pacientes. Esta diversidad ha planteado un desafío sustancial en la comparación de los resultados entre los diversos estudios, ya que las diferencias metodológicas pueden ejercer influencia en los hallazgos obtenidos³⁰⁶. Además, no se dispone de un protocolo universal y uniforme para llevar a cabo el cultivo viral, lo que da lugar a la adopción de enfoques distintos en cada laboratorio.

En particular, el número de días de incubación de los cultivos inoculados mostró una considerable variabilidad entre las investigaciones, abarcando un amplio rango de tiempo, desde 3 a 14 días^{259,306}. Durante el proceso de instauración de nuestra técnica de cultivo del SARS-CoV-2, inicialmente fijamos un periodo de incubación de 14 días antes de descartar los cultivos. No obstante, optamos por acortarlo a 10 días debido a que durante esos 4 días extras no conseguimos recuperar ningún virus adicional. La elección del tiempo de incubación adecuado reviste una importancia crucial, ya que puede incidir significativamente en el éxito del cultivo y la cantidad de aislados virales obtenidos. Esto deriva de la eliminación de cultivos identificados como negativos, en los cuales el tiempo de incubación no resultó adecuado para permitir la multiplicación viral.

Algunos investigadores optaron por realizar pases o subcultivos durante la incubación con el propósito de estimular la multiplicación viral²⁴⁸. Por ejemplo, en el estudio realizado por Scola et al., 2020²⁴¹, llevaron a cabo dos subcultivos ciegos cada semana, lo que solo resultó en la

obtención de 5 aislados adicionales de las 183 muestras inoculadas. En nuestro caso, optamos por realizar subcultivos solo cuando observamos toxicidad en la monocapa celular durante la incubación. El objetivo principal de esta práctica fue preservar la viabilidad de las células, asegurándonos de mantener un ambiente propicio para el crecimiento y multiplicación viral sin comprometer la integridad celular.

Respecto a la metodología empleada para confirmar los cultivos positivos, se han utilizado diversas técnicas o estrategias. En la mayoría de los estudios, se llevó a cabo una RT-PCR de SARS-CoV-2 del sobrenadante del cultivo, tanto durante la incubación como al final de esta^{259,306}. No obstante, esta metodología presenta ciertas limitaciones, ya que es posible detectar restos del RNA del virus provenientes de la muestra inoculada, sin que necesariamente se haya producido la multiplicación e infección de las células del cultivo. Para abordar esta cuestión, algunos autores, como Basile et al., 2020³⁰⁷, han propuesto un criterio para demostrar que un cultivo es verdaderamente positivo. Según este criterio, se debe observar una diferencia de al menos 3 ciclos entre los valores de Ct de la RT-PCR de la muestra y los obtenidos de la RT-PCR del cultivo al cuarto día ($Ct \text{ muestra} - Ct \text{ cultivo} \geq 3$). Esta diferencia sugiere una replicación significativa del virus dentro de las células cultivadas y, por lo tanto, brinda mayor confianza en la positividad del resultado. En ese contexto, para complementar sus hallazgos, Basile et al., 2020³⁰⁷, también incorporaron el uso de microscopía electrónica para confirmar la positividad de los cultivos. La microscopía electrónica no solo fue empleada por ellos, sino que también ha sido utilizada en otros trabajos de investigación con el mismo objetivo²⁶⁰. En otros trabajos se emplearon diferentes anticuerpos monoclonales frente al SARS-CoV-2 para la confirmación de los cultivos²⁶¹, como también fue nuestro caso.

En el desarrollo de nuestra investigación, inicialmente nos enfrentamos al desafío de desconocer las características morfológicas del ECP provocado por la infección del SARS-CoV-2 en las células VERO E6. Para abordar esta incertidumbre y con el fin de determinar la positividad de todos los cultivos inoculados, realizamos a todos ellos una pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando un anticuerpo monoclonal específico marcado con fluoresceína. En aquellos casos en los que los cultivos mostraron claros signos de positividad, se realizó la IFI cuando al menos el 50% de la monocapa del cultivo mostraba afectación. Se confirmó que el ECP observado era causado por el SARS-CoV-2 al observar las células del cultivo fluorescentes bajo el microscopio, indicando así que estaban infectadas por el virus. Por otro lado, en los cultivos en los que no se observaron alteración de la monocapa al final de la incubación, también se llevó a cabo la IFI antes de descartar el cultivo e informarlo

como negativo. Con este enfoque, buscamos comprender y caracterizar el ECP inducido por el SARS-CoV-2 en las células VERO E6, obteniendo información relevante para nuestro estudio.

Tras realizar las primeras pruebas e ir adquiriendo experiencia, observamos que el ECP del SARS-CoV-2 era fácilmente identificable y que no tuvimos ninguna IFI positiva en cultivos en los que no habíamos observado ECP. Inicialmente, el ECP del SARS-CoV-2 se manifiesta formando pequeños sincitios en la monocapa, los cuales, con el paso de los días van aumentando de tamaño hasta finalmente destruir el cultivo por completo. Por ese motivo, después de las pruebas iniciales, decidimos no realizar IFI en los cultivos en los que no se observaba alteración de la monocapa al final de la incubación, considerándolo directamente como negativos. Sí que se continuó realizando la IFI para la confirmación de los ECP claros o dudosos.

Hubo varias razones que nos llevaron a escoger la opción de confirmar los cultivos mediante IFI en lugar de utilizar la RT-PCR. En nuestro laboratorio, la confirmación de los cultivos de otros virus respiratorios se lleva a cabo mediante IFI, lo que hizo más fácil adaptar esta metodología a nuestra rutina de trabajo. Además, como ya se ha mencionado previamente, la RT-PCR puede detectar material genético de la muestra inoculada, lo que significa que una prueba positiva para SARS-CoV-2 realizada mediante RT-PCR realizada a partir de un cultivo no siempre indica que la células del cultivo estén realmente infectadas. La consideración de que un cultivo es positivo si existe una diferencia de tres unidades entre los valores del Ct de la RT-PCR de la muestra y del cultivo, debe ser utilizada con precaución, ya que el valor del Ct depende de múltiples factores y es altamente variable. En el caso específico del valor del Ct de la RT-PCR del cultivo, este depende significativamente de los días de incubación del cultivo, lo que puede introducir cierta variabilidad y complicar la interpretación de los resultados.

Basándonos en todas estas razones, llegamos a la conclusión de que la confirmación mediante IFI resultó ser una opción más adecuada para nuestro estudio. Esta técnica proporciona resultados más fiables, al permitir observar directamente al microscopio las células infectadas por el virus. Todo ello nos brindó una mejor comprensión del efecto citopático inducido por el SARS-CoV-2 en las células VERO E6.

En este **tercer trabajo**³⁰⁵ también abordamos el **objetivo 6**, que consistió en comparar los resultados obtenidos mediante cultivo viral y RT-PCR en muestras respiratorias positivas para SARS-CoV-2. Para ello, se incluyeron 100 muestras respiratorias previamente identificadas como positivas para SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, a las cuales les realizamos el cultivo viral en

paralelo. El cultivo viral de estas muestras se llevó a cabo según el protocolo discutido anteriormente.

En un 58% de las muestras con resultado positivo en la RT-PCR para SARS-CoV-2, se consiguió aislar con éxito el virus en cultivo. Este porcentaje superó lo reportado en otros trabajos, donde la tasa de éxito de aislamiento en cultivo oscilaba entre el 20% y el 40%. Esta diferencia puede explicarse por diversas razones, algunas de las cuales ya han sido mencionadas anteriormente. Entre ellas destaca la amplia experiencia de nuestro laboratorio en el cultivo de otros virus respiratorios, lo cual ha sido parte de nuestra rutina diagnóstica durante más de 40 años y podría haber influido positivamente en el éxito del aislamiento del SARS-CoV-2.

Además, otra posible explicación para la diferencia en los resultados podría estar relacionada con el tiempo de incubación del cultivo. De acuerdo con nuestros datos, la mayoría de los cultivos positivos se obtuvieron en las primeras 72 horas después de la inoculación, aunque en algunos casos, el cultivo positivo se manifestó más allá del día 6. Algunos de los trabajos que obtuvieron una tasa de positivos menor a la nuestra, informaron los cultivos como negativos antes de los 6 días desde la inoculación^{210,247}, lo que sugiere que posiblemente perdieron cultivos positivos debido a la falta de tiempo suficiente para que el virus infectase el cultivo.

Más allá de las diferencias metodológicas mencionadas, también encontramos diferencias en el tipo de pacientes incluidos en los estudios previos, considerando factores como la edad, sintomatología y días transcurridos desde la infección. En particular, en nuestro estudio, el 46% de las muestras correspondieron a personas en edad pediátrica (<18 años), mientras que en la mayoría de los estudios previos solo abordaban a adultos. Singanayagam et al., 2020²⁰⁴, en su investigación, consideraron pacientes de ambos grupos de edad, y observaron un porcentaje mayor de cultivos positivos en el grupo individuos de edad pediátrica (60,9%) en comparación con los adultos (55,6%). Aunque estas diferencias no alcanzaron significancia estadística, el hecho de haber incluido pacientes pediátricos podría justificar, en parte, por qué obtuvimos un mayor porcentaje de positividad de cultivo en nuestro estudio respecto a aquellos que sólo incluyeron adultos. Con ello, también pudimos afirmar que la población pediátrica tenía un papel importante en la propagación del virus, resolviendo así una cuestión que hasta ese momento estaba en duda.

Otra característica interesante de nuestro trabajo que permitió arrojar luz sobre la infectividad del SARS-CoV-2, fue el hecho de que un 11% de las muestras incluidas en este trabajo correspondían a personas con infección asintomática. Estos individuos se sometieron a la prueba de RT-PCR como parte de un cribaje previo al ingreso hospitalario o debido a su

contacto con otra persona infectada. Hasta ese momento, la mayoría de los estudios se habían enfocado casi exclusivamente en pacientes sintomáticos, lo que suscitaba muchas incertidumbres sobre si las personas con resultados positivos en la RT-PCR pero sin síntomas aparentes, podían transmitir la infección a sus contactos. En este sentido, la información recopilada en nuestro estudio proporcionó datos relevantes que contribuyeron significativamente al entendimiento de la transmisión del virus en individuos asintomáticos. De manera sorprendente, el 54,5% de las muestras con RT-PCR positiva de este grupo de individuos resultaron positivas en el cultivo viral, obteniendo un porcentaje similar al de los pacientes sintomáticos. Estos hallazgos nos llevaron a concluir que los individuos infectados asintomáticos pueden transmitir el virus de forma similar a aquellos con síntomas, lo que indicó la necesidad de considerarlos también como candidatos a medidas de aislamiento para frenar la propagación de nuevos casos de COVID-19. Estos resultados, junto con otros similares^{204,242} tuvieron implicaciones cruciales para el manejo de la pandemia contribuyendo de manera significativa al conocimiento sobre la dinámica de la transmisión del virus y en la implementación de estrategias más efectivas en la contención de la COVID-19, ya que resaltaron la importancia de detectar y controlar a los portadores asintomáticos para prevenir la propagación del virus, incluso en ausencia de síntomas manifiestos.

Por último, en el **tercer trabajo**³⁰⁵ también resolvimos el **objetivo 7** de la presente tesis, que fue establecer la relación entre el valor del Ct de la RT-PCR del SARS-CoV-2, el número de días desde la aparición de los síntomas y la capacidad infectiva del virus, utilizando el cultivo viral como técnica de referencia.

De acuerdo con la literatura existente hasta la fecha, observamos una correlación positiva entre la probabilidad de aislar el virus en cultivo y dos factores: el menor número de días transcurridos desde el inicio de los síntomas y valores más bajos de Ct de la RT-PCR²⁶⁴.

Con respecto a la sintomatología, se encontró una diferencia estadísticamente significativa de 13 días en la mediana del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. Para las muestras con cultivo positivo, la mediana fue de 2 días desde el inicio de síntomas, mientras que para aquellas muestras con cultivo negativo se elevó a 15 días. El análisis reveló que el mayor porcentaje de positividad en los cultivos (82,1%) se obtuvo en las muestras tomadas entre 1-2 días desde el inicio de los síntomas. Estos resultados sugieren que existe un mayor riesgo de transmisión a contactos durante este período temprano de la infección. Por otro lado, el porcentaje de aislamiento en cultivo disminuyó al 77,8% para las muestras recogidas dentro de los primeros 7 días de síntomas. Sin embargo, este porcentaje se redujo drásticamente al 20%

cuando la duración de los síntomas superó los 14 días. En consecuencia, estos hallazgos resaltan la importancia de la detección temprana de la infección, preferiblemente dentro de los primeros 1-2 días de síntomas, para limitar la transmisión del virus a contactos y controlar su propagación, ya que es cuando un individuo es más infeccioso. No obstante, también se identificó una pequeña posibilidad de generar secundarios después de 14 días desde la infección.

En personas infectadas por el SARS-CoV-2, se ha observado un fenómeno conocido como “eliminación prolongada” del virus o “*long-term shedding*”, que implica la detección del virus durante 14 días o más desde el inicio de los síntomas. En el presente estudio, se detectó esta eliminación prolongada de SARS-CoV-2 en 30 muestras mediante RT-PCR, pero sólo en 6 de ellas (20%) se detectó también mediante cultivo viral, lo que sugiere que únicamente en estos 6 casos el virus tenía la capacidad de infectar a otros individuos. Es relevante destacar que todos estos casos de eliminación prolongada detectados mediante cultivo se observaron exclusivamente en pacientes inmunodeprimidos que requirieron ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos debido a complicaciones graves de la COVID-19. Entre estas muestras, tres pertenecían a personas con síntomas que persistieron por más de 30 días (33, 41 y 44 días).

Nuestros datos concuerdan con otros estudios que han demostrado que, por lo general, no es posible detectar virus viable más allá del séptimo día desde el inicio de los síntomas^{259,264}, excepto en pacientes inmunosuprimidos o con infecciones graves^{261,263}. En estas circunstancias particulares, se ha logrado aislar el virus infeccioso incluso hasta un mes después del inicio de los síntomas. Este fenómeno también lo abordamos en dos investigaciones que se incluyen en el **Anexo 2** de esta tesis (que aún están pendientes de publicación), en las cuales examinamos a diversos pacientes que presentaban una inmunosupresión grave y una prolongada persistencia de virus viables en cultivo. En algunos casos, esta persistencia se extendió más allá del período de un mes.

Todos estos descubrimientos derivados de los estudios basados en el cultivo viral y su relación con la duración de la infectividad del SARS-CoV-2, han tenido una importancia vital en la elaboración de los protocolos de aislamiento para personas contagiadas, permitiendo una adaptación más precisa de los periodos de aislamiento, especialmente en determinadas poblaciones de riesgo.

En el marco del **objetivo 7** de nuestro **tercer trabajo**³⁰⁵, también examinamos el valor del Ct de las RT-PCR positivas para SARS-CoV-2 y exploramos su asociación con los resultados del cultivo viral. Los resultados obtenidos nos condujeron a la conclusión de que existe una relación

inversa entre el valor del Ct de la RT-PCR y la probabilidad de obtener un resultado positivo en el cultivo viral. Estos hallazgos coinciden con investigaciones previamente publicadas²¹⁰, en la que demostraron que la probabilidad de obtener un resultado positivo en el cultivo viral disminuye en un 32% por cada incremento de una unidad en el valor de Ct por encima de 24.

Nuestro análisis reveló que la mediana de los valores de Ct en las muestras con resultados negativos en el cultivo viral fue significativamente mayor que la mediana correspondiente a las muestras con resultados positivos en el cultivo (12,64 unidades de diferencia). Adicionalmente, observamos que todas las muestras con un valor de Ct inferior a 22 presentaron un aislamiento exitoso del virus en cultivo, obteniendo un resultado positivo en cultivo en el 100% de los casos. Este hallazgo contrasta de manera notable con aquellas muestras cuyo valor de Ct fue superior a 27, ya que en estos casos la probabilidad de aislar el virus fue significativamente inferior, ya que sólo se logró en el 3,1% de los casos, resultando en un único cultivo positivo con un valor de Ct de 31,4. Esta excepcional muestra correspondió a una niña de 2 años diagnosticada con leucemia linfocítica aguda, sometida a la prueba de RT-PCR de SARS-CoV-2 como parte de un cribado rutinario previo a su ingreso hospitalario, sin que existiera sospecha clínica alguna. No obstante, la interpretación de los resultados de las muestras con valores de Ct intermedios (entre 22 y 27) se vuelve más complicada, dado que en esta franja existe aproximadamente la mitad de probabilidades de que el virus detectado se multiplique en cultivo o no.

Nuestros hallazgos concuerdan con la tendencia predominante observada en estudios similares, donde la capacidad de detectar virus infeccioso en muestras con valores de Ct próximos a 30 es prácticamente insignificante, pero en algunos casos sí es posible^{259,306}. A pesar de estos resultados que respaldan el uso del valor del Ct como marcador de infectividad del SARS-CoV-2 en determinados casos, es importante resaltar que en algunos trabajos, como el estudio realizado por Singanayagam et al., 2020²⁰⁴, han identificado la presencia de virus infecciosos en un 25% de las muestras con valores de Ct superiores a 30. Estos resultados cuestionarían la aplicabilidad universal del valor de Ct con respecto a la infectividad. Esta variabilidad se deriva de la amplia gama de factores relacionados con la técnica, la muestra y el paciente, que pueden influir en el valor del Ct de una RT-PCR, generando así una considerable posibilidad de variación^{244,245}.

La relación observada en el actual estudio entre el valor de Ct y los resultados del cultivo viral es específica de nuestro laboratorio y no debe extrapolarse de manera generalizada a otros centros que empleen enfoques metodológicos diferentes para el diagnóstico de la COVID-19.

Es fundamental tener en cuenta que el valor del Ct no debe ser considerado como el único indicador de la capacidad de infectar, y que se deben considerar también otros elementos de mayor importancia, como el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas o desde la exposición al virus, así como las particularidades clínicas de cada paciente, entre otros aspectos.

A modo de resumen integral del **tercer trabajo**, destacamos que, a pesar de que cultivo viral continúa siendo el método de referencia para evaluar la capacidad infectiva de los virus, su complejidad, el prolongado tiempo de respuesta y la necesidad de infraestructura y materiales especializados, lo hacen impracticable e inadecuado para el diagnóstico rutinario de la COVID-19. Sin embargo, la existencia de laboratorios de referencia especializados en cultivo viral sigue siendo de suma importancia. Estos laboratorios permiten avanzar en la comprensión de virus emergentes, como se ha evidenciado durante la reciente pandemia, al permitir responder interrogantes cruciales para su gestión. Además, permite conocer la transmisibilidad y la duración de la infectividad de los virus, el monitoreo de cambios virales en nuevas variantes, así como la investigación de tratamientos, vacunas y técnicas de diagnóstico.

Para lograr resultados coherentes y reducir la variabilidad entre distintos estudios, resulta imprescindible establecer un protocolo estandarizado y unificado para el cultivo del SARS-CoV-2. La experiencia previa en el cultivo de otros virus respiratorios, que incluía la confirmación visual de cultivos positivos mediante inmunofluorescencia, ha sido esencial al diseñar una metodología eficaz para el cultivo de este nuevo virus.

Los resultados de nuestra investigación exhibieron una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la probabilidad de aislar el SARS-CoV-2 en cultivo y la menor cantidad de días desde el inicio de los síntomas, así como con valores de Ct más bajos en la RT-PCR. No obstante, debido a su considerable variabilidad, no se recomienda emplear el valor de Ct como un marcador universal de la capacidad infectiva del virus. En cambio, en la mayoría de los casos, el número de días desde el inicio de los síntomas se considera un indicador más fiable para este propósito.

Basándonos en nuestros resultados, llegamos a la conclusión de que en individuos inmunocompetentes con casos leves o moderados de COVID-19, que constituyen la mayoría de las infecciones por este virus, la capacidad infecciosa del SARS-CoV-2 no persiste más allá de los primeros 14 días desde el inicio de los síntomas. En estos escenarios, no es necesario considerar el valor del Ct para determinar el fin del período de aislamiento ni llevar a cabo pruebas adicionales de RT-PCR para verificar la curación.

Por otro lado, en pacientes inmunodeprimidos o aquellos que han experimentado una infección grave por SARS-CoV-2, la capacidad infectiva del virus puede extenderse más allá del periodo de 14 días. En estas situaciones excepcionales, se puede tener en consideración el valor del Ct obtenido en la RT-PCR para tomar decisiones clínicas específicas si la RT-PCR sigue siendo positiva después de dos semanas. Es importante resaltar que valores bajos de Ct, que en nuestro caso fue inferior a 22, siempre es indicativo de la presencia de virus con capacidad infectiva. Por consiguiente, en estos casos, se debe mantener el aislamiento del paciente y se podría considerar la administración de terapias antivirales con el propósito de atenuar la replicación viral en aquellos pacientes propensos a sufrir complicaciones graves. Por el contrario, si el valor del Ct es superior a 22, la interpretación es más compleja. A pesar de que un valor de Ct más elevado se correlaciona con una probabilidad reducida de infectividad viral, es esencial considerar que no siempre es así, ya que estos valores elevados del Ct podrían estar condicionados por diversos factores, que abarcan desde una toma inadecuada de la muestra y retrasos en su procesamiento, hasta posibles problemas en la extracción o amplificación del material genético, entre otras posibilidades. Por consiguiente, la presencia de un valor de Ct elevado no siempre garantiza la exclusión de la infectividad viral. En aquellas situaciones en las que la muestra corresponde a un paciente con inmunosupresión o que ha experimentado una infección grave, y que han transcurrido más de dos semanas desde la infección, junto con valores de Ct en la RT-PCR por encima de 22, nuestra recomendación es considerar la realización de un cultivo viral de la muestra respiratoria. Esta evaluación proporcionará la información necesaria para determinar la persistencia de la replicación viral, lo cual a su vez permitirá tomar decisiones fundamentales respecto a la finalización del período de aislamiento o la implementación de un tratamiento antiviral.

En el **Anexo 1** de la presente tesis, se incluyeron otros trabajos relacionados con los objetivos de la misma. En el primer trabajo del Anexo 1³⁰⁸, buscamos la correlación entre el sgRNA del SARS-CoV-2 y el cultivo viral, para verificar si el sgRNA puede usarse como marcador subrogado de replicación activa del SARS-CoV-2, como alternativa al uso del cultivo viral y al Ct de la RT-PCR.

Teniendo en cuenta las limitaciones previamente expuestas tanto en relación con el valor del Ct de la RT-PCR como del cultivo viral, se ha explorado la búsqueda de posibles alternativas prácticas para determinar de forma rápida y sencilla la capacidad de replicación del SARS-CoV-2 en las muestras respiratorias. Este enfoque cobra particular relevancia en el caso de individuos que muestran una persistente detección de RNA viral en las pruebas de RT-PCR, como son los pacientes con inmunosupresión. En estas situaciones, con frecuencia es un

desafío determinar si la presencia del RNA detectado se corresponde con replicación activa del virus. Dentro de este contexto, ya en las fases iniciales de la pandemia, Wölfel et al., 2020²⁴⁷, propusieron el sgRNA del SARS-CoV-2 como un candidato prometedor. Esta elección se fundamentó en la ya conocida característica del sgRNA de transcribirse únicamente durante la fase de replicación viral.

Un interrogante que consideramos a la hora de diseñar nuestra investigación fue el tipo de sgRNA a utilizar, dado que no todos se generan en la misma proporción. El sgRNA de la nucleocápside (N sgRNA) se produce en mayor cantidad y persiste durante periodos más largos. Por otro lado, el sgRNA de la envuelta (Env sgRNA) experimenta una degradación más rápida y podría reflejar mejor la transcripción reciente. Fue por esa razón que optamos por emplear este último sgRNA en nuestro estudio

En nuestra investigación, llevamos a cabo una comparación entre los resultados obtenidos de la detección del Env sgRNA con los del cultivo viral. Ambas determinaciones se realizaron en paralelo en 105 muestras respiratorias que habían dado positivo para SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Se obtuvieron resultados concordantes entre el sgRNA y el cultivo viral en 99 de las 105 muestras compradas. Los descubrimientos de nuestro estudio indicaron que el Env sgRNA demostró una sensibilidad del 97% y un valor predictivo positivo del 94% al detectar virus con capacidad infectiva. Además, obtuvimos un coeficiente de concordancia de 0,88 en relación con el cultivo viral, considerado como el estándar de referencia, lo que fortalece aún más la validez de nuestras conclusiones. Resulta relevante señalar que, en un estudio que se comparó la detección del N sgRNA con el cultivo viral, se obtuvo un coeficiente de correlación entre ambas técnicas de 0,467, cifra significativamente inferior a la que alcanzamos en nuestro trabajo. Este resultado evidenció que el Env sgRNA es una opción más sólida como marcador subrogado de replicación viral activa, lo que refuerza la validez de nuestra elección en el diseño de la investigación.

Otras conclusiones destacadas de este trabajo fueron que la detección de Env sgRNA mediante RT-PCR se correlacionó con valores más bajos del Ct de la RT-PCR genómica y con un menor número de días desde el inicio de los síntomas. Asimismo, la capacidad de aislar el SARS-CoV-2 en cultivo viral mostró una correlación con valores más bajos de Ct del sgRNA. Todas estas conclusiones presentaron significancia estadística.

Las conclusiones obtenidas en este trabajo respaldan y se encuentran en consonancia con diversos estudios previos, que abarcan tanto investigaciones en primates como análisis de muestras clínicas humanas^{192,248}. Estos estudios, que preceden a nuestro trabajo, ya apoyaban

al empleo del sgRNA con este propósito específico. Además, en otro trabajo previamente realizado y también incluido en el **Anexo 1** de la tesis³⁰⁴, observamos que el sgRNA presentaba una buena correlación tanto con la CV normalizada como con los días transcurridos desde el inicio de síntomas. Nuestros hallazgos mostraron que el sgRNA era detectable principalmente en muestras recogidas ≤ 7 días después del inicio de los síntomas.

No obstante, algunos estudios han postulado que el sgRNA no constituye un buen indicador de la infectividad, sugiriendo que la pérdida de detección de sgRNA se debe a la menor concentración total de transcritos de RNA en comparación con el ARN genómico^{249,309}. Un aspecto a tener en cuenta es que la mayoría de los estudios realizados hasta ese momento en torno al sgRNA, carecían de la inclusión del cultivo viral como técnica de referencia para comparar los resultados obtenidos, lo que arrojaba dudas sobre las conclusiones alcanzadas hasta entonces. Además, muchos estudios incluían un número limitado de muestras clínicas²⁴⁷, siendo este también un factor limitante. Ambos obstáculos fueron superados en nuestro trabajo.

En términos generales, con este trabajo concluimos que la detección del Env sgRNA permite determinar de forma rápida y fiable la capacidad infecciosa del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias, siendo factible de llevar a cabo en cualquier laboratorio que disponga de la capacidad de realizar pruebas de RT-PCR. La RT-PCR dirigida al sgRNA supera tanto las limitaciones asociadas al uso del valor de Ct como las del cultivo. La capacidad de determinar de manera rápida y precisa la infectividad del SARS-CoV-2 reviste una importancia crítica para optimizar la monitorización de los pacientes, establecer políticas de reintegración laboral, evaluar la eficacia de tratamientos y vacunas, así como para permitir una reducción segura de las precauciones de aislamiento de los contagiados. La última guía de consenso, publicada en el 2023 por el “Grupo para el estudio de la infección en el trasplante y otros huéspedes inmunocomprometidos” (GESITRA-IC) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), referente al tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 en TOS y otros pacientes inmunosuprimidos, ha incorporado la detección del sgRNA mediante RT-PCR, con el propósito de identificar a pacientes que presentan una eliminación prolongada del SARS-CoV-2. Esto resulta crucial para orientar la implementación de diversas estrategias terapéuticas en este grupo de pacientes³¹⁰.

CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR en muestras de BAL demostró una mayor sensibilidad y un valor predictivo negativo superior que el cultivo viral para el diagnóstico de la neumonía por HCMV. En consecuencia, la obtención de un resultado negativo en una PCR para HCMV en BAL permite descartar de forma rápida y eficaz la presencia de esta enfermedad.
2. La técnica de PCR en muestras de BAL exhibió una especificidad reducida y un valor predictivo positivo bajo, utilizando el cultivo viral como técnica de referencia, para el diagnóstico de la neumonía por HCMV. Por lo tanto, la detección de HCMV en las muestra de BAL mediante PCR no siempre es indicativo de la presencia de esta enfermedad.
3. La cuantificación de la carga viral de HCMV en BAL es de gran valor para la interpretación de los resultados de las PCR positivas. Se observó que la carga viral de HCMV en BAL fue significativamente más elevada en los pacientes con neumonía en comparación con aquellos que no presentaban la presentaban.
4. Una carga viral de HCMV en muestra de BAL igual o superior a 1.258 UI/mL (6.290 copias/mL) se correlacionó con la presencia de replicación viral clínicamente relevante en los pulmones, mientras que una carga viral inferior a 200 UI/mL (1.000 copias/mL) sugirió que la probabilidad de que exista replicación viral en los pulmones era menor al 5%.
5. La carga viral de HCMV en la sangre fue significativamente superior en pacientes con neumonía por HCMV en comparación con aquellos que no la tenían. No obstante, se considera que el empleo de muestras de BAL es más útil para el diagnóstico de la neumonía por HCMV en comparación con la sangre, dado que la falta de detección del HCMV en la sangre no garantiza la exclusión de la neumonía.
6. Dada la multiplicidad de factores que inciden en los resultado de la cuantificación del HCMV, junto con la inherente variabilidad de las muestras de BAL y complejidad de la patogénesis del HCMV, se presenta un desafío considerable establecer un valor universal de carga viral de HCMV en BAL que permitan discernir con claridad los casos de enfermedad por HCMV. Asimismo, es posible que este valor deba ajustarse en función del perfil de riesgo de cada paciente.

7. El efecto citopático del SARS-CoV-2 en las células VERO E6 se manifiesta de manera rápida y es fácilmente identificable.
8. De las muestras respiratorias positivas para SARS-CoV-2 mediante RT-PCR inoculadas, se logró aislar SARS-CoV-2 en cultivo en el 58% de ellas.
9. La positividad en cultivo fue similar tanto en individuos adultos como pediátricos, así como en los que presentaban síntomas en el momento de la recogida de la muestra y los asintomáticos. Esto indicó que ambas poblaciones pueden ser infecciosas, incluso en ausencia de síntomas.
10. Se encontró una correlación positiva entre la probabilidad de aislar SARS-CoV-2 en cultivo, la menor cantidad de días transcurridos desde el inicio de los síntomas y valores bajos de Ct en la RT-PCR.
11. En individuos inmunocompetentes con infección por SARS-CoV-2 leve o moderada, no se detectó virus infectivo después de los 14 días desde el inicio de los síntomas. Por lo tanto, no se deben realizar RT-PCR de SARS-CoV-2 para el control de la infección ni de los aislamientos.
12. Los pacientes inmunosuprimidos o con infección grave por SARS-CoV-2 pueden ser infectivos durante periodos más prolongados. En esta población, se sugiere que, si la RT-PCR sigue siendo positiva más allá de los 14 días desde el inicio de los síntomas, se considere el uso del valor del Ct de RT-PCR como alternativa al cultivo viral en las RT-PCR de seguimiento. Un valor de Ct inferior a 22 siempre indicó infectividad, mientras que cuanto el valor del Ct fue superior a 27 la probabilidad de detectar virus infectivo fue mínima.

REFERENCIAS

1. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4th ed. Wiley-Liss Inc.; 2004.
2. Castaño O, ME, Zapata J, JC. Cultivos celulares. En: Principios de Virología. 3.a ed. Fondo Editorial Biogénesis; 2000.
3. Doyle A, Griffiths JB, Newell DG. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. John Wiley & Sons; 2010.
4. Mather JP, Roberts PE. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. John Wiley & Sons; 1998.
5. Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
6. Burke, Donald S., Grace L. Rovozzo. A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice-Hall; 1973.
7. John Mitchell Hoskins. Virological Procedures. Butterworth & Co; 1967.
8. Polio laboratory manual—World Health Organization (2004) WHO/IVB/04.10, 2004. 4th ed.
9. Landry ML, Mayo DR, Hsiung GD. Rapid and accurate viral diagnosis. *Pharmacol Ther.* 1989;40(2):287-328
10. Paya CV, Smith TF, Ludwig J, Hermans PE. Rapid shell vial culture and tissue histology compared with serology for the rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in liver transplantation. *Mayo Clin Proc.* 1989; 64(6):670-675.
11. Ribbert H. Uber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl All Pathol.* 1904; 945–948.
12. Jesionek A, Jesionek A, Kiolemenoglou B. Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditar-luetischen Foetus – *ScienceOpen. Muenchner Med Wochenschr.* 1904; 51:1905–1907.
13. Smith MG. Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Experimental Biology and Medicine.* 1956; 92(2):424–430
14. Nelson JA, Fleckenstein B, Jahn G, Galloway DA, McDougall JK. Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD169. *Journal of Virology.* 1984; 49(1):109–115.

15. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1990; 154:125–169.
16. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*. 2003; 98(3):269-297.
17. Britt WJ, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol*. 2004; 65(5):395-402.
18. Spaete RR, Gehrz RC, Landini MP. Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol*. 1994; 75 (Pt 12):3287-3308.
19. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, Wang D, Camp DG 2nd, Rodland K, Wiley S, Britt W, Shenk T, Smith RD, Nelson JA. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*. 2004; 78(20):10960-10966.
20. Kalejta RF. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 325:101-115.
21. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008; 72(2):249-265.
22. Ha S, Li F, Troutman MC, Freed DC, Tang A, Loughney JW, et al. Neutralization of Diverse Human Cytomegalovirus Strains Conferred by Antibodies Targeting Viral gH/gL/pUL128-131 Pentameric Complex. *Journal of Virology*. 2017; 91(7): e02033-16.
23. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 325:85-100.
24. The Bumpy Road to a Cytomegalovirus Vaccine. (2020). Recuperado 26 de diciembre de 2022, de The Native Antigen Company website: <http://thenativeantigencompany.com/the-bumpy-road-to-a-cytomegalovirus-vaccine/>
25. Murphy E, Shenk TE. Human Cytomegalovirus Genome. 2008; 1–19.
26. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990; 154:125-169.
27. Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*. 1981; 16(4):201-217.

28. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 325:63-83.
29. Bissinger AL, Sinzger C, Kaiserling E, Jahn G. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J Med Virol*. 2002; 67(2):200-206.
30. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*. 1996; 39(5-6):302-319.
31. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014; 11(6):697-711.
32. Compton T, Feire A. Early events in human cytomegalovirus infection. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 16.
33. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 325:85-100.
34. Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*. 1992; 191(1):387-395.
35. Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol*. 2006; 80(2):710-722.
36. Döhner K, Sodeik B. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 285:67-108.
37. Mocarski E. S., Courcelle C. T. Cytomegaloviruses and their replication. *Fields Virology*, 4th Edn, eds Knipe D. M., Howley P. M. (Philadelphia, PA: Lippincott/The Williams & Wilkins Co.). 2001; 2629–2674.
38. Fortunato EA, Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res*. 1999; 54:61-128.
39. Johnson RA, Wang X, Ma XL, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J Virol*. 2001; 75(13):6022-6032.
40. Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, Guo H, Jiang Y, Wan JS, Bittner A, Frueh K, Jackson MR, Peterson PA, Erlander MG, Ghazal P. DNA microarrays of the complex

- human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol.* 1999; 73(7):5757-5766.
41. Britt B. Maturation and egress. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006: 308-320.
 42. Ahlqvist J, Mocarski E. Cytomegalovirus UL103 controls virion and dense body egress. *J Virol.* 2011; 85(10):5125-5135.
 43. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 2002; 76(4):1537-1547.
 44. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology.* 2010; 20(4):202–213.
 45. Adland E, Klenerman P, Goulder P, Matthews PC. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Frontiers in Microbiology;* 2015; 6:1016.
 46. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, Pikis A, Razonable RR, Miller V, Griffiths PD; Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis.* 2017; 64(1):87-91.
 47. Griffiths, P. D. Cytomegalovirus. In A. J. Zuckerman, J. E. Banatvala, & J. R. Pattison (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Virology* (London: John Wiley and Sons). 2000; 79 – 116.
 48. Pass RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis.* 1985; 152(2):243-248.
 49. Prince AM, Szmunes W, Millian SJ, David DS. A serologic study of cytomegalovirus infections associated with blood transfusions. *N Engl J Med* 1971; 284:1125-1131.
 50. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Alford CA Jr. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol.* 1982; 25(3):563-576.
 51. Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, Schall TJ. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(17):9839-9844.
 52. Ho, M. Cytomegalovirus. In G. L. Mandell, J. E. Bennet, & R. Dolin (Eds.), *Principles and Practices of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone. 1991; 1351-1364.
 53. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res.* 2011; 157(2):151-160.

54. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(1):76-98, Table of Contents.
55. Pass, R. F. Cytomegalovirus. In D. Knipe, & P. Howley (Eds.), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 2001; 2675-2705.
56. Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40(9):865-869.
57. Reddehase MJ, Balthesen M, Rapp M, Jonjić S, Pavić I, Koszinowski UH. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med.* 1994; 179(1):185-193.
58. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:130.
59. Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol.* 2002; 25 (Suppl 2):S123-S136.
60. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4):778-809, table of contents.
61. Pinto AK, Hill AB. Viral interference with antigen presentation to CD8+ T cells: lessons from cytomegalovirus. *Viral Immunol.* 2005;18(3):434-444.
62. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol.* 1997; 71(1):267-275.
63. Nesmith JD, Pass RF. Cytomegalovirus Infection in Adolescents. *Adolesc Med.* 1995; 6(1):79-90.
64. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015; 235(2):288-297.
65. Kabani N, Ross SA. Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 2020; 221(Suppl 1):S9-14.
66. Roman A, Manito N, Campistol JM, Cuervas-Mons V, Almenar L, Arias M, Casafont F, del Castillo D, Crespo-Leiro MG, Delgado JF, Herrero JI, Jara P, Morales JM, Navarro M, Oppenheimer F, Prieto M, Pulpón LA, Rimola A, Serón D, Ussetti P. The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando).* 2014; 28(2):84-91.
67. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007; 357(25):2601-2614.

68. Klemola E, Von Essen R, Henle G, Henle W. Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J Infect Dis.* 1970; 121(6):608-614.
69. Pannuti CS, Vilas Boas LS, Angelo MJ, Amato Neto V, Levi GC, de Mendonca JS, de Godoy CV. Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. *Scand J Infect Dis.* 1985;17(2):153-156.
70. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology.* 2008; 5:47.
71. Eddleston M, Peacock S, Juniper M, Warrell DA. Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis.* 1997; 24(1):52-56.
72. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, Lazzarotto T, Alain S, Daly K, Doutré S, Gibson L, Giles ML, Greenlee J, Hamilton ST, Harrison GJ, Hui L, Jones CA, Palasanthiran P, Schleiss MR, Shand AW, van Zuylen WJ. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(6): e177-e188.
73. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2013; 57 Suppl 4(Suppl 4):S178-181.
74. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001; 21(5):362-277.
75. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.* 1992; 326(10):663-667.
76. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J.* 1992; 11(2):93-99.
77. Devonshire AL, Makhija M. Approach to primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Proc.* 2019; 40(6):465-469.
78. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(12):759-773.
79. Van der Bij W, Speich R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (Suppl 1):S32-37.

80. Cho SY, Lee DG, Kim HJ. Cytomegalovirus Infections after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Current Status and Future Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(11):2666.
81. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9(9):543-558.
82. Raffi F. Infections à cytomégalo­virus au cours du SIDA [Cytomegalovirus infections in AIDS]. *Rev Prat.* 1995; 45(6):733-738.
83. Arribas JR, Clifford DB, Fichtenbaum CJ, Commins DL, Powderly WG, Storch GA. Level of cytomegalovirus (CMV) DNA in cerebrospinal fluid of subjects with AIDS and CMV infection of the central nervous system. *J Infect Dis.* 1995; 172(2):527-531.
84. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3):746-752.
85. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant.* 2013; 13 (Suppl 3):24-40; quiz 40.
86. Rabella N, Drew WL. Comparison of conventional and shell vial cultures for detecting cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(4):806-807.
87. Telenti A, Smith TF. Screening with a shell vial assay for antiviral activity against cytomegalovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1989; 12(1):5-8.
88. Murrell I, Wilkie GS, Davison AJ, Statkute E, Fielding CA, Tomasec P, Wilkinson GW, Stanton RJ. Genetic Stability of Bacterial Artificial Chromosome-Derived Human Cytomegalovirus during Culture In Vitro. *J Virol.* 2016; 90(8):3929-3943.
89. Sabbaghian E, Roodbari F, Amani J, Rafiei A. In vitro evaluation of a polytope DNA construct as a novel DNA vaccine strategy against human cytomegalovirus-associated diseases. *Acta Virol.* 2017; 61(1):97-104.
90. The TH, van der Bij W, van den Berg AP, van der Giessen M, Weits J, Sprenger HG, van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia. *Rev Infect Dis.* 1990; 12 (Suppl 7):S734-744.
91. van den Berg AP, Klomp­maker IJ, Haagsma EB, Scholten-Sampson A, Bijleveld CM, Schirm J, van der Giessen M, Slooff MJ, The TH. Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J Infect Dis.* 1991; 164(2):265-270.
92. Azevedo LS, Pierrotti LC, Abdala E, Costa SF, Strabelli TM, Campos SV, Ramos JF, Latif AZ, Litvinov N, Maluf NZ, Cai­affa Filho HH, Pannuti CS, Lopes MH, Santos VA, Linardi

- Cda C, Yasuda MA, Marques HH. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015; 70(7):515-523.
93. Vincent E, Gu Z, Morgenstern M, Gibson C, Pan J, Hayden RT. Detection of cytomegalovirus in whole blood using three different real-time PCR chemistries. *J Mol Diagn*. 2009; 11(1):54-59.
94. Razonable RR, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, Kremers W, Wilson J, Groettum C, Smith TF, Paya CV. Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(12):4472-4476.
95. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3):533-554.
96. Roberts TC, Brennan DC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Sternhell KE, Garlock KA, Singer GG, Storch GA. Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients. *J Infect Dis*. 1998; 178(3):626-635.
97. Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis*. 2000; 181(2):717-720.
98. Razonable RR, Inoue N, Pinninti SG, Boppana SB, Lazzarotto T, Gabrielli L, Simonazzi G, Pellett PE, Schmid DS. Clinical Diagnostic Testing for Human Cytomegalovirus Infections. *J Infect Dis*. 2020; 221(Suppl 1):S74-S85.
99. Hayden RT, Yan X, Wick MT, Rodriguez AB, Xiong X, Ginocchio CC, Mitchell MJ, Caliendo AM; College of American Pathologists Microbiology Resource Committee. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(2):337-345.
100. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK; American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice; Canadian Society of Transplantation. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant*. 2009; 9(2):258-268.
101. Hayden RT, Preiksaitis J, Tong Y, Pang X, Sun Y, Tang L, Cook L, Pounds S, Fryer J, Caliendo AM. Commutability of the First World Health Organization International Standard for Human Cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(10):3325-3333.
102. Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y, Pang XL, Fryer JF, Heath AB, Cook L, Petrich AK, Yu B, Caliendo AM. Are We There Yet? Impact of the First International Standard

- for Cytomegalovirus DNA on the Harmonization of Results Reported on Plasma Samples. *Clin Infect Dis*. 2016; 63(5):583-589.
103. Dioverti MV, Lahr BD, Germer JJ, Yao JD, Gartner ML, Razonable RR. Comparison of Standardized Cytomegalovirus (CMV) Viral Load Thresholds in Whole Blood and Plasma of Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients with CMV Infection and Disease. *Open Forum Infect Dis*. 2017; 4(3):ofx143.
104. Naegele K, Lautenschlager I, Gosert R, Loginov R, Bir K, Helantera I, Schaub S, Khanna N, Hirsch HH. Cytomegalovirus sequence variability, amplicon length, and DNase-sensitive non-encapsidated genomes are obstacles to standardization and commutability of plasma viral load results. *J Clin Virol*. 2018; 104:39-47.
105. Suárez-Lledó M, Marcos MÁ, Cuatrecasas M, Bombi JA, Fernández-Avilés F, Magnano L, Martínez-Cibrián N, Llobet N, Rosiñol L, Gutiérrez-García G, Jorge S, Martínez C, Rovira M, Urbano-Ispizua Á. Quantitative PCR Is Faster, More Objective, and More Reliable Than Immunohistochemistry for the Diagnosis of Cytomegalovirus Gastrointestinal Disease in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(11):2281-2286.
106. National Cancer Institute, National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.0. NIH publication 09-7473. 2009.
107. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*. 2011; 121(5):1673-1680.
108. Green ML, Leisenring W, Stachel D, Pergam SA, Sandmaier BM, Wald A, Corey L, Boeckh M. Efficacy of a viral load-based, risk-adapted, preemptive treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18(11):1687-1699.
109. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24(2):319-337.
110. Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(1):22-48.
111. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2009; 113(23):5711-5719.
112. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic

- hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*. 2003; 102(8):3060-3067.
113. Travi G, Pergam SA. Cytomegalovirus pneumonia in hematopoietic stem cell recipients. *J Intensive Care Med*. 2014; 29(4):200-212.
 114. Pergam SA, Xie H, Sandhu R, Pollack M, Smith J, Stevens-Ayers T, Ilieva V, Kimball LE, Huang ML, Hayes TS, Corey L, Boeckh MJ. Efficiency and risk factors for CMV transmission in seronegative hematopoietic stem cell recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18(9):1391-1400.
 115. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A, Motokura T, Chiba S, Kurokawa M. Clinical features of late cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2008; 87(3):310-318.
 116. Guglieri-Lopez B, Perez-Pitarch A, Garcia-Cadenas I, Gimenez E, Barba P, Rabella N, Hernandez-Boluda JC, Fox L, Valcarcel D, Esquirol A, Ferriols-Lisart R, Sierra J, Solano C, Navarro D, Martino R, Piñana JL. Effect of Sirolimus Exposure on the Need for Preemptive Antiviral Therapy for Cytomegalovirus Infection after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(5):1022-1030.
 117. Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(1):83-121.
 118. Sanchez JL, Kruger RM, Paranjothi S, Trulock EP, Lynch JP, Hicks C, Shannon WD, Storch GA. Relationship of cytomegalovirus viral load in blood to pneumonitis in lung transplant recipients. *Transplantation*. 2001; 72(4):733-735.
 119. Almaghrabi RS, Omrani AS, Memish ZA. Cytomegalovirus infection in lung transplant recipients. *Expert Rev Respir Med*. 2017; 11(5):377-383.
 120. Kocher AA, Bonaros N, Dunkler D, Ehrlich M, Schlechta B, Zweytick B, Grimm M, Zuckermann A, Wolner E, Laufer G. Long-term results of CMV hyperimmune globulin prophylaxis in 377 heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2003; 22(3):250-257.
 121. Turgeon N, Fishman JA, Doran M, Basgoz N, Tolckoff-Rubin NE, Cosimi AB, Rubin RH. Prevention of recurrent cytomegalovirus disease in renal and liver transplant recipients: effect of oral ganciclovir. *Transpl Infect Dis*. 2000; 2(1):2-10.

122. Franquet T, Lee KS, Müller NL. Thin-section CT findings in 32 immunocompromised patients with cytomegalovirus pneumonia who do not have AIDS. *AJR Am J Roentgenol.* 2003; 181(4):1059-1063.
123. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr.* 2016 Aug;4(4).
124. Stover DE, Zaman MB, Hajdu SI, Lange M, Gold J, Armstrong D. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Intern Med.* 1984; 101(1):1-7.
125. Tan SK, Burgener EB, Waggoner JJ, Gajurel K, Gonzalez S, Chen SF, Pinsky BA. Molecular and Culture-Based Bronchoalveolar Lavage Fluid Testing for the Diagnosis of Cytomegalovirus Pneumonitis. *Open Forum Infect Dis.* 2016; 3(1):ofv212.
126. Piñana, J.L.; Giménez, E.; Gómez, M.D.; Pérez, A.; González, E.M.; Vinuesa, V.; Hernández-Boluda, J.C.; Montoro, J.; Salavert, M.; Tormo, M.; et al. Pulmonary cytomegalovirus (CMV) DNA shedding in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: Implications for the diagnosis of CMV pneumonia. *J. Infect.* 2019; 78, 393–401.
127. Leuzinger, K.; Stolz, D.; Gosert, R.; Naegele, K.; Prince, S.S.; Tamm, M.; Hirsch, H.H. Comparing cytomegalovirus diagnostics by cell culture and quantitative nucleic acid testing in broncho-alveolar lavage fluids. *J. Med. Virol.* 2021; 93, 3804–3812.
128. Saksirisampant, G.; Kawamatawong, T.; Promsombat, K.; Sukkasem, W.; Liamsombut, S.; Pasomsub, E.; Bruminhent, J. A Prospective Study of Plasma and Bronchoalveolar Lavage Fluid CMV DNA Load Quantification for the Diagnosis and Outcome of CMV Pneumonitis in Immunocompromised Hosts. *J. Clin. Virol.* 2022, 155, 105243.
129. Beam, E.; Germer, J.J.; Lahr, B.; Yao, J.D.C.; Limper, A.H.; Binnicker, M.J.; Razonable, R.R. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in bronchoalveolar lavage fluid of immunocompromised patients with CMV pneumonia. *Clin. Transplant.* 2018, 32(1).
130. Lodding, I.P.; Schultz, H.H.; Jensen, J.U.; Kirkby, N.; Perch, M.; Andersen, C.; Lundgren, J.D.; Iversen, M. Cytomegalovirus Viral Load in Bronchoalveolar Lavage to Diagnose Lung Transplant Associated CMV Pneumonia. *Transplantation* 2018, 102, 326–332.
131. Lee, H.Y.; Rhee, C.K.; Choi, J.Y.; Lee, H.Y.; Lee, J.W.; Lee, D.G. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by quantitative polymerase chain reaction using bronchial washing fluid from patients with hematologic malignancies. *Oncotarget* 2017, 8, 39736–39745.

132. Govender, K.; Jeena, P.; Parboosing, R. Clinical utility of bronchoalveolar lavage cytomegalovirus viral loads in the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis in infants. *J. Med. Virol.* 2017, 89, 1080–1087.
133. Boeckh, M.; Stevens-Ayers, T.; Travi, G.; Huang, M.L.; Cheng, G.S.; Xie, H.; Leisenring, W.; Erard, V.; Seo, S.; Kimball, L.; et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA Quantitation in Bronchoalveolar Lavage Fluid From Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients with CMV Pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2017, 215, 1514–1522.
134. Chemaly, R.F.; Yen-Lieberman, B.; Chapman, J.; Reilly, A.; Bekele, B.N.; Gordon, S.M.; Procop, G.W.; Shrestha, N.; Isada, C.M.; Decamp, M.; et al. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2005, 5, 544–548.
135. Chemaly, R.F.; Yen-Lieberman, B.; Castilla, E.A.; Reilly, A.; Arrigain, S.; Farver, C.; Avery, R.K.; Gordon, S.M.; Procop, G.W. Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 2168–2172.
136. Riise, G.C.; Andersson, R.; Bergström, T.; Lundmark, A.; Nilsson, F.N.; Olofsson, S. Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: A longitudinal study in lung transplant recipients. *Chest* 2000, 118, 1653–1660.
137. Iglesias, L.; Perera, M.M.; Torres Miñana, L.; Pena López, M.J. CMV viral load in bronchoalveolar lavage for diagnosis of pneumonia in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017, 52, 895-897.
138. Westall, G.P.; Michaelides, A.; Williams, T.J.; Snell, G.I.; Kotsimbos, T.C. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: A longitudinal study of lung transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 2004, 190, 1076-1083.
139. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, Hubacek P, Navarro D, Cordonnier C, Ward KN; 2017 European Conference on Infections in Leukaemia group. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019; 19(8):e260-e272.
140. Torre-Cisneros J, Aguado JM, Caston JJ, Almenar L, Alonso A, Cantisán S, Carratalá J, Cervera C, Cordero E, Fariñas MC, Fernández-Ruiz M, Fortún J, Frauca E, Gavaldá J, Hernández D, Herrero I, Len O, Lopez-Medrano F, Manito N, Marcos MA, Martín-Dávila P, Monforte V, Montejo M, Moreno A, Muñoz P, Navarro D, Pérez-

- Romero P, Rodriguez-Bernot A, Rumbao J, San Juan R, Vaquero JM, Vidal E; Spanish Society of Transplantation (SET); Group for Study of Infection in Transplantation of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (GESITRA-SEIMC); Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplant Rev (Orlando)*. 2016; 30(3):119-143.
141. Babady NE, Cheng C, Cumberbatch E, Stiles J, Papanicolaou G, Tang YW. Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(4):1252-1257.
142. Piret J, Boivin G. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res*. 2019 Mar;163:91-105.
143. Ahmed A. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2011; 11(5):475-503.
144. Marschall M, Stamminger T. Molecular targets for antiviral therapy of cytomegalovirus infections. *Future Microbiol*. 2009; 4(6):731-742.
145. Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, Sgarabotto D, Tuncer M, Noronha IL, Hartmann A; VICTOR Study Group. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007; 7(9):2106-2113.
146. European Medicines Agency (EMA). European Public Assessment Report (EPAR): Prevmis® (letermovir). [Internet]. Londres: EMA; Nov 2017. Procedure number: EMEA/H/C/004536/0000. (Consultado 01/06/23). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/human/medicines/004536/human_med_002200.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
147. Saullo JL, Miller RA. Cytomegalovirus Therapy: Role of Letermovir in Prophylaxis and Treatment in Transplant Recipients. *Annu Rev Med*. 2023; 74:89-105.
148. Avery RK, Alain S, Alexander BD, Blumberg EA, Chemaly RF, Cordonnier C, Duarte RF, Florescu DF, Kamar N, Kumar D, Maertens J, Marty FM, Papanicolaou GA, Silveira FP, Witzke O, Wu J, Sundberg AK, Fournier M; SOLSTICE Trial Investigators. Maribavir for Refractory Cytomegalovirus Infections With or Without Resistance Post-Transplant: Results From a Phase 3 Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis*. 2022; 75(4):690-701.
149. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. A

- new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798):265-269.
150. 2019-nCoV outbreak is an emergency of international concern. World Health Organization. Available <http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/international-health-regulations/news/news/2020/2/2019-ncov-outbreak-is-an-emergency-of-international-concern> (accessed 27 May 2020).
 151. Hannah A. Bullock and Azaibi Tamin. Electron microscopic image of a negatively stained particle of SARS-CoV-2 (ID: 23641). CDC Public Health Image Library. 2021. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23641>.
 152. Aydrogdu MO, Altun E, Chung E, Ren G, Homer-Vanniasinkam S, Chen B, Edirisinghe M. Surface interactions and viability of coronaviruses. *J R Soc Interface*. 2021; 18(174):20200798.
 153. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2018; 100:163-188.
 154. Drexler JF, Corman VM, Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res*. 2014; 101:45-56.
 155. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Cramer G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310(5748):676-679.
 156. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224):565-574.
 157. Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog*. 2020; 16(5):e1008536.
 158. Li Q, Shah T, Wang B, Qu L, Wang R, Hou Y, Baloch Z, Xia X. Cross-species transmission, evolution and zoonotic potential of coronaviruses. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023; 12:1081370.
 159. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol*. 2020; 30(8):1578.
 160. Leao JC, Gusmao TPL, Zarzar AM, Leao Filho JC, Barkokebas Santos de Faria A, Morais Silva IH, Gueiros LAM, Robinson NA, Porter S, Carvalho AAT. Coronaviridae-Old friends, new enemy! *Oral Dis*. 2022; 28 (Suppl 1):858-866.

161. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016; 24(6):490-502.
162. Stadler K, Massignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol.* 2003; 1(3):209-18.
163. Mackay IM, Arden KE. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology.* 2015; 12:222.
164. Gong YN, Lee KM, Shih SR. Evolution and Epidemiology of SARS-CoV-2 Virus. *Methods Mol Biol.* 2022; 2452:3-18.
165. Koelle K, Martin MA, Antia R, Lopman B, Dean NE. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. *Science.* 2022; 375(6585):1116-1121.
166. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal.* 2020; 10(2):102-108.
167. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382(8):727-733.
168. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel A, Mehra MR, Scholkmann F, Schüpbach R, Ruschitzka F, Moch H. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task - Authors' reply. *Lancet.* 2020; 395(10238):e100.
169. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:587269.
170. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, Chaudhary PK, Khanra S, Dhamija P, Sharma A, Kumar A, Handu S. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells.* 2021; 10(4):821.
171. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol.* 2021; 61(3):180-202.
172. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, Atif SM, Hariprasad G, Hasan GM, Hassan MI. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866(10):165878.
173. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23(1):3-20.

174. Kumavath R, Barh D, Andrade BS, Imchen M, Aburjaile FF, Ch A, Rodrigues DLN, Tiwari S, Alzahrani KJ, Góes-Neto A, Weener ME, Ghosh P, Azevedo V. The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. *Front Immunol.* 2021; 12:663912.
175. Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, Meng X. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Sci.* 2021; 30(6):1114-1130.
176. Liao Y, Tam JP, Liu DX. Viroporin activity of SARS-CoV E protein. *Adv Exp Med Biol.* 2006; 581:199-202.
177. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, Yui M, Kono N, Aoki J, Ikeguchi M, Noda T, Iwata S, Ohto U, Shimizu T. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun.* 2022; 13(1):4399.
178. Peng Y, Du N, Lei Y, Dorje S, Qi J, Luo T, Gao GF, Song H. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *EMBO J.* 2020; 39(20):e105938.
179. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483):1260-1263.
180. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020; 181(2):271-280.e8.
181. Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides.* 2005; 26(7):1270-1277.
182. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020; 41(12):1100-1115.
183. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(3):155-170.
184. Hussain M, Jabeen N, Amanullah A, Baig AA, Aziz B, Shabbir S, Raza F, Uddin N. Molecular docking between human TMPRSS2 and SARS-CoV-2 spike protein: conformation and intermolecular interactions. *AIMS Microbiol.* 2020; 6(3):350-360.
185. Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, Kratzat H, Hayn M, Mackens-Kiani T, Cheng J, Straub JH, Stürzel CM, Fröhlich T, Berninghausen O, Becker T, Kirchhoff F, Sparrer KMJ, Beckmann R. Structural basis for

- translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020; 369(6508):1249-1255.
186. Young M, Crook H, Scott J, Edison P. Covid-19: virology, variants, and vaccines. *BMJ Med*. 2022; 1(1):e000040.
187. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci*. 2022; 65(2):280-294.
188. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol*. 2015; 2(1):265-288.
189. Zhang L, Li L, Yan L, Ming Z, Jia Z, Lou Z, Rao Z. Structural and Biochemical Characterization of Endoribonuclease Nsp15 Encoded by Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*. 2018; 92(22):e00893-18.
190. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020; 181(4):914-921.e10.
191. 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.
192. Dagotto G, Mercado NB, Martinez DR, Hou YJ, Nkolola JP, Carnahan RH, Crowe JE Jr, Baric RS, Barouch DH. Comparison of Subgenomic and Total RNA in SARS-CoV-2 Challenged Rhesus Macaques. *J Virol*. 2021; 95(8):e02370-20.
193. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020; 395(10223):470-473.
194. 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(4):536-544.
195. Cheng H, Peng Z, Luo W, Si S, Mo M, Zhou H, Xin X, Liu H, Yu Y. Efficacy and Safety of COVID-19 Vaccines in Phase III Trials: A Meta-Analysis. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(6):582.
196. Mohamed K, Rzymiski P, Islam MS, Makuku R, Mushtaq A, Khan A, Ivanovska M, Makka SA, Hashem F, Marquez L, Cseprekal O, Filgueiras IS, Fonseca DLM, Mickael E, Ling I, Arero AG, Cuschieri S, Minakova K, Rodríguez-Román E, Abarikwu SO, Faten AB, Grancini G, Cabral-Marques O, Rezaei N. COVID-19 vaccinations: The unknowns, challenges, and hopes. *J Med Virol*. 2022; 94(4):1336-1349.
197. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. [citado 2023 octubre 15]. Disponible en: <https://covid19.who.int/>

198. Actualización nº 672. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 30.06.2023. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad. [Internet]. [citado 2023 agosto 23]. Disponible en: [Ministerio de Sanidad - Profesionales - Situación actual Coronavirus](#)
199. Informe nº 181. Situación de COVID-19 en España. Informe COVID-19 a 30 de junio de 2023. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [Internet]. [Citado 2023 agosto 23]. Disponible en: [Informes COVID-19 \(isciii.es\)](#)
200. Ong SWX, Tan YK, Chia PY, Lee TH, Ng OT, Wong MSY, Marimuthu K. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. *JAMA*. 2020; 323(16):1610-1612.
201. Gale C, Quigley MA, Placzek A, Knight M, Ladhani S, Draper ES, Sharkey D, Doherty C, Mactier H, Kurinczuk JJ. Characteristics and outcomes of neonatal SARS-CoV-2 infection in the UK: a prospective national cohort study using active surveillance. *Lancet Child Adolesc Health*. 2021; 5(2):113-121.
202. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, Ren R, Leung KSM, Lau EHY, Wong JY, Xing X, Xiang N, Wu Y, Li C, Chen Q, Li D, Liu T, Zhao J, Liu M, Tu W, Chen C, Jin L, Yang R, Wang Q, Zhou S, Wang R, Liu H, Luo Y, Liu Y, Shao G, Li H, Tao Z, Yang Y, Deng Z, Liu B, Ma Z, Zhang Y, Shi G, Lam TTY, Wu JT, Gao GF, Cowling BJ, Yang B, Leung GM, Feng Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020; 382(13):1199-1207.
203. Rocklöv J, Sjödin H, Wilder-Smith A. COVID-19 outbreak on the Diamond Princess cruise ship: estimating the epidemic potential and effectiveness of public health countermeasures. *J Travel Med*. 2020; 27(3):taaa030.
204. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, Ladhani S, Zambon M, Gopal R. 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.
205. Luo L, Liu D, Liao X, Wu X, Jing Q, Zheng J, Liu F, Yang S, Bi H, Li Z, Liu J, Song W, Zhu W, Wang Z, Zhang X, Huang Q, Chen P, Liu H, Cheng X, Cai M, Yang P, Yang X, Han Z, Tang J, Ma Y, Mao C. Contact Settings and Risk for Transmission in 3410 Close Contacts of Patients With COVID-19 in Guangzhou, China : A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2020; 173(11):879-887.
206. Meyerowitz EA, Richterman A. SARS-CoV-2 Transmission and Prevention in the Era of the Delta Variant. *Infect Dis Clin North Am*. 2022; 36(2):267-293.

207. Kandel C, Lee Y, Taylor M, Llanes A, McCready J, Crowl G, Powis J, Li AX, Shigayeva A, Yip L, Katz K, Kozak R, Mubareka S, McGeer A. Viral dynamics of the SARS-CoV-2 Omicron Variant among household contacts with 2 or 3 COVID-19 vaccine doses. *J Infect.* 2022 ;85(6):666-670.
208. Rhee C, Kanjilal S, Baker M, Klompas M. Duration of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infectivity: When Is It Safe to Discontinue Isolation? *Clin Infect Dis.* 2021; 72(8):1467-1474.
209. Sung A, Bailey AL, Stewart HB, McDonald D, Wallace MA, Peacock K, Miller C, Reske KA, O'Neil CA, Fraser VJ, Diamond MS, Burnham CD, Babcock HM, Kwon JH. Isolation of SARS-CoV-2 in Viral Cell Culture in Immunocompromised Patients With Persistently Positive RT-PCR Results. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:804175.
210. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, Boodman C, Bello A, Hedley A, Schiffman Z, Doan K, Bastien N, Li Y, Van Caesele PG, Poliquin G. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(10):2663-2666.
211. Ashraf UM, Abokor AA, Edwards JM, Waigi EW, Royfman RS, Hasan SA, Smedlund KB, Hardy AMG, Chakravarti R, Koch LG. SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion. *Physiol Genomics.* 2021; 53(2):51-60.
212. Yang R, Gui X, Xiong Y. Comparison of Clinical Characteristics of Patients with Asymptomatic vs Symptomatic Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Netw Open.* 2020; 3(5):e2010182.
213. Men K, Li Y, Wang X, Zhang G, Hu J, Gao Y, Han A, Liu W, Han H. Estimate the incubation period of coronavirus 2019 (COVID-19). *Comput Biol Med.* 2023; 158:106794.
214. Ravi V, Saxena S, Panda PS. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian J Med Microbiol.* 2022; 40(2):182-186.
215. Cevik M, Bamford CGG, Ho A. COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 26(7):842-847.
216. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395:1054–1062.
217. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20(5):270-284.
218. Elrobaa IH, New KJ. COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. *Front Public Health.* 2021; 9:711616.

219. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, Bikdeli B, Ahluwalia N, Ausiello JC, Wan EY, Freedberg DE, Kirtane AJ, Parikh SA, Maurer MS, Nordvig AS, Accili D, Bathon JM, Mohan S, Bauer KA, Leon MB, Krumholz HM, Uriel N, Mehra MR, Elkind MSV, Stone GW, Schwartz A, Ho DD, Bilezikian JP, Landry DW. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26(7):1017-1032.
220. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15):762-768.
221. Dong M, Chen S, Lin S, Han F, Zhong M. Insights into COVID-19-associated critical illness: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2023; 11(5):220.
222. Zhang JJ, Dong X, Liu GH, Gao YD. Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023; 64(1):90-107.
223. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, Gan H, Sun YL, Fu W, Li W, Liang HL, Cao YY, Yan Q, Cao C, Gao HY, Brügggen MC, van de Veen W, Sokolowska M, Akdis M, Akdis CA. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy.* 2021; 76(2):428-455.
224. Pijls BG, Jolani S, Atherley A, Derckx RT, Dijkstra JIR, Franssen GHL, Hendriks S, Richters A, Venemans-Jellema A, Zalpuri S, Zeegers MP. Demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies. *BMJ Open.* 2021; 11(1):e044640.
225. Bae S, Kim SR, Kim MN, Shim WJ, Park SM. Impact of cardiovascular disease and risk factors on fatal outcomes in patients with COVID-19 according to age: a systematic review and meta-analysis. *Heart.* 2021; 107(5):373-380.
226. Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis.* 2021; 21(1):855.
227. DeWolf S, Laracy JC, Perales MA, Kamboj M, van den Brink MRM, Vardhana S. SARS-CoV-2 in immunocompromised individuals. *Immunity.* 2022; 55(10):1779-1798.
228. Uzun O, Akpolat T, Varol A, Turan S, Bektas SG, Cetinkaya PD, Dursun M, Bakan N, Ketencioglu BB, Bayrak M, Baris SA, Guner R, Gunal O, Nural S, Deniz PP, Toprak OB, Ozkan G, Gumus A, Kerget F, Ercelik M, Ataoglu O, Yuksel A, Ates G, Kutsoylu OE, Kose N, Kizilirmak D, Keskin S, Gultekin O, Coskun N, Yilmaz ES, Uslu S, Basyigit İ, Ergan B, Deveci F, Yakar MN, Zuhur C, Sagcan G, Yuce ZT, Kuluozturk M, Sezgin ME, Sezgin ENA, Havlucu Y, Cuhadaroglu C, Kilinc O, Boyaci H, Altunay H, Akti M, Dursun ZB, Kalem AK,

- Isik SA, Akyildiz L, Aykac N, Almaz MS, Kokturk N, Itil O. COVID-19: vaccination vs. hospitalization. *Infection*. 2022; 50(3):747-752.
229. Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, Hernán MA, Lipsitch M, Reis B, Balicer RD. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N Engl J Med*. 2021; 384(15):1412-1423.
230. Altarawneh HN, Chemaitelly H, Hasan MR, Ayoub HH, Qassim S, AlMukdad S, Coyle P, Yassine HM, Al-Khatib HA, Benslimane FM, Al-Kanaani Z, Al-Kuwari E, Jeremijenko A, Kaleeckal AH, Latif AN, Shaik RM, Abdul-Rahim HF, Nasrallah GK, Al-Kuwari MG, Butt AA, Al-Romaihi HE, Al-Thani MH, Al-Khal A, Bertollini R, Tang P, Abu-Raddad LJ. Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med*. 2022; 386(13):1288-1290.
231. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58(7):1070-1076.
232. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, Sagan SM, Jahanshahi-Anbuhi S. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev*. 2021; 34(3):e00228-20.
233. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, Soni D, Das S, Hasan M, Patel M, Senan AM, Gorantla S, McMillan J, Edagwa B, Eisenberg R, Gurumurthy CB, Reid SPM, Punyadeera C, Chang L, Gendelman HE. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater*. 2021; 20(5):593-605.
234. Mawaddah A, Gendeh HS, Lum SG, Marina MB. Upper respiratory tract sampling in COVID-19. *Malays J Pathol*. 2020; 42(1):23-35.
235. 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(18):1843-1844.
236. Giacomelli A, Righini E, Micheli V, Pinoli P, Bernasconi A, Rizzo A, Oreni L, Ridolfo AL, Antinori S, Ceri S, Rizzardini G. SARS-CoV-2 viremia and COVID-19 mortality: A prospective observational study. *PLoS One*. 2023; 18(4):e0281052.
237. Drain PK. Rapid Diagnostic Testing for SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2022; 386(3):264-272.
238. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol*. 2020; 58(6):e00512-20.
239. Li N, Wang X, Lv T. Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: Not a rare phenomenon. *J Med Virol*. 2020; 92(11):2286-2287.

240. Sun J, Xiao J, Sun R, Tang X, Liang C, Lin H, Zeng L, Hu J, Yuan R, Zhou P, Peng J, Xiong Q, Cui F, Liu Z, Lu J, Tian J, Ma W, Ke C. Prolonged Persistence of SARS-CoV-2 RNA in Body Fluids. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(8):1834-1838.
241. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, Gautret P, Raoult D. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(6):1059-1061.
242. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, Kimball A, James A, Jacobs JR, Taylor J, Spicer K, Bardossy AC, Oakley LP, Tanwar S, Dyal JW, Harney J, Chisty Z, Bell JM, Methner M, Paul P, Carlson CM, McLaughlin HP, Thornburg N, Tong S, Tamin A, Tao Y, Uehara A, Harcourt J, Clark S, Brostrom-Smith C, Page LC, Kay M, Lewis J, Montgomery P, Stone ND, Clark TA, Honein MA, Duchin JS, Jernigan JA; Public Health–Seattle and King County and CDC COVID-19 Investigation Team. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N Engl J Med.* 2020; 382(22):2081-2090.
243. Tom MR, Mina MJ. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(16):2252-2254.
244. Buchan B. Important Issues to Consider Before Interpreting and Applying Ct Values in Clinical Practice. [Internet] Association for Molecular Pathology [cited 2023 April 06] Available from: [[https:// www.amp.org/about/news-room/amp-blog-content/ important-issues-to-consider-before-interpreting-andapplying-ct-values-in-clinicalpractice](https://www.amp.org/about/news-room/amp-blog-content/important-issues-to-consider-before-interpreting-andapplying-ct-values-in-clinicalpractice)]. 2021.
245. Rhoads D, Peaper DR, She RC, Nolte FS, Wojewoda CM, Anderson NW, Pritt BS. 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.
246. Bustin S, Mueller R, Shipley G, Nolan T. COVID-19 and Diagnostic Testing for SARS-CoV-2 by RT-qPCR-Facts and Fallacies. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(5):2459.
247. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmann R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C. Author Correction: Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020; 588(7839):E35.
248. Perera RAPM, Tso E, Tsang OTY, Tsang DNC, Fung K, Leung YWY, Chin AWH, Chu DKW, Cheng SMS, Poon LLM, Chuang VWM, Peiris M. SARS-CoV-2 Virus Culture

- and Subgenomic RNA for Respiratory Specimens from Patients with Mild Coronavirus Disease. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(11):2701-2704.
249. Verma R, Kim E, Martínez-Colón GJ, Jagannathan P, Rustagi A, Parsonnet J, Bonilla H, Khosla C, Holubar M, Subramanian A, Singh U, Maldonado Y, Blish CA, Andrews JR. SARS-CoV-2 Subgenomic RNA Kinetics in Longitudinal Clinical Samples. *Open Forum Infect Dis.* 2021; 8(7):ofab310.
250. Nordgren J, Sharma S, Olsson H, Jämtberg M, Falkeborn T, Svensson L, Hagbom M. SARS-CoV-2 rapid antigen test: High sensitivity to detect infectious virus. *J Clin Virol.* 2021; 140:104846.
251. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeftang MM, Spijker R, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020; 8(8):CD013705.
252. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlemann B, Zuchowski M, Jo WK, Tscheak P, Möncke-Buchner E, Müller MA, Krumbholz A, Drexler JF, Drosten C. 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.
253. Nordgren J, Sharma S, Olsson H, Jämtberg M, Falkeborn T, Svensson L, Hagbom M. SARS-CoV-2 rapid antigen test: High sensitivity to detect infectious virus. *J Clin Virol.* 2021; 140:104846.
254. Boum Y, Fai KN, Nikolay B, Mboringong AB, Bebell LM, Ndifon M, Abbah A, Essaka R, Eteki L, Luquero F, Langendorf C, Mbarga NF, Essomba RG, Buri BD, Corine TM, Kameni BT, Mandeng N, Fanne M, Bisseck AZ, Ndongmo CB, Eyangoh S, Hamadou A, Ouamba JP, Koku MT, Njouom R, Claire OM, Easo L, Epée E, Mballa GAE. Performance and operational feasibility of antigen and antibody rapid diagnostic tests for COVID-19 in symptomatic and asymptomatic patients in Cameroon: a clinical, prospective, diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21(8):1089-1096.
255. Jegerlehner S, Suter-Riniker F, Jent P, Bittel P, Nagler M. Diagnostic accuracy of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in real-life clinical settings. *Int J Infect Dis.* 2021; 109:118-122.
256. Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M, Ghafourian S. Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect.* 2016; 7(2):77-82.

257. Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(3):DE01-5.
258. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1):49-78.
259. Walsh KA, Spillane S, Comber L, Cardwell K, Harrington P, Connell J, Teljeur C, Broderick N, de Gascun CF, Smith SM, Ryan M, O'Neill M. The duration of infectiousness of individuals infected with SARS-CoV-2. *J Infect.* 2020; 81(6):847-856.
260. Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens RWAL, van der Meer Y, Caly L, Druce J, de Vries JJC, Kikkert M, Bárcena M, Sidorov I, Snijder EJ. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J Gen Virol.* 2020; 101(9):925-940.
261. 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(6):886-891.
262. Dao TL, Hoang VT, Colson P, Lagier JC, Million M, Raoult D, Levasseur A, Gautret P. SARS-CoV-2 Infectivity and Severity of COVID-19 According to SARS-CoV-2 Variants: Current Evidence. *J Clin Med.* 2021; 10(12):2635.
263. Sung A, Bailey AL, Stewart HB, McDonald D, Wallace MA, Peacock K, Miller C, Reske KA, O'Neil CA, Fraser VJ, Diamond MS, Burnham CD, Babcock HM, Kwon JH. Isolation of SARS-CoV-2 in Viral Cell Culture in Immunocompromised Patients With Persistently Positive RT-PCR Results. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:804175.
264. Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. Viral Cultures for Coronavirus Disease 2019 Infectivity Assessment: A Systematic Review. *Clin Infect Dis.* 2021; 73(11):e3884-e3899.
265. Anichini G, Terrosi C, Gandolfo C, Gori Savellini G, Fabrizi S, Miceli GB, Cusi MG. SARS-CoV-2 Antibody Response in Persons with Past Natural Infection. *N Engl J Med.* 2021; 385(1):90-92.
266. Kang YM, Choe KW, Lee KD, Kim KN, Kim MJ, Lim J. SARS-CoV-2 Antibody Response to the BNT162b2 mRNA Vaccine in Persons with Past Natural Infection. *J Korean Med Sci.* 2021; 36(35):e250.
267. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, Mills R, Teng E, Kamruzzaman M, Garcia-Beltran WF, Astudillo M, Yang D, Miller TE, Oliver E, Fischinger S, Atyeo C, Iafrate AJ, Calderwood SB, Lauer SA, Yu J, Li Z, Feldman J, Hauser BM, Caradonna TM, Branda JA, Turbett SE, LaRocque RC, Mellon G, Barouch DH, Schmidt AG, Azman AS, Alter G, Ryan ET, Harris JB, Charles RC. 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.
268. Desmecht S, Tashkeev A, El Moussaoui M, Marechal N, Perée H, Tokunaga Y, Fombellida-Lopez C, Polese B, Legrand C, Wéry M, Mni M, Fouillien N, Toussaint F, Gillet L, Bureau F, Lutteri L, Hayette MP, Moutschen M, Meuris C, Vermeersch P, Desmecht D, Rahmouni S, Darcis G. Kinetics and Persistence of the Cellular and Humoral Immune Responses to BNT162b2 mRNA Vaccine in SARS-CoV-2-Naive and - Experienced Subjects: Impact of Booster Dose and Breakthrough Infections. *Front Immunol.* 2022; 13:863554.
269. Owen SI, Williams CT, Garrod G, Fraser AJ, Menzies S, Baldwin L, Brown L, Byrne RL, Collins AM, Cubas-Atienzar AI, de Vos M, Edwards T, Escadafal C, Ferreira DM, Fletcher T, Hyder-Wright A, Kay GA, Kontogianni K, Mason J, Mitsi E, Planche T, Sacks JA, Taylor J, Todd S, Tully C, Cuevas LE, Adams ER. Twelve lateral flow immunoassays (LFAs) to detect SARS-CoV-2 antibodies. *J Infect.* 2022; 84(3):355-360.
270. Yassine HM, Al-Jighefee H, Al-Sadeq DW, Dargham SR, Younes SN, Shurrab F, Marei RM, Hssain AA, Taleb S, Alhussain H, Al-Nesf MA, Al-Khal A, Qotba H, Althani AA, Tang P, Abu-Raddad LJ, Nasrallah GK. Performance evaluation of five ELISA kits for detecting anti-SARS-COV-2 IgG antibodies. *Int J Infect Dis.* 2021; 102:181-187.
271. Saker K, Pozzetto B, Escuret V, Pitiot V, Massardier-Pilonchéry A, Mokdad B, Langlois-Jacques C, Rabilloud M, Alfaiate D, Guibert N, Fassier JB, Bal A, Trouillet-Assant S, Trabaud MA. Evaluation of commercial Anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody assays in seropositive subjects. *J Clin Virol.* 2022; 152:105169.
272. Zhang Y, Zhang H, Zhang W. SARS-CoV-2 variants, immune escape, and countermeasures. *Front Med.* 2022; 16(2):196-207.
273. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, Fera D, Shafer RW. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet.* 2021; 22(12):757-773.
274. Covariants.org. Accessed 24 June 2023. [Internet] Recuperado de: <https://covariants.org/>.
275. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-COV-2 variant classifications and definitions. [Internet] [cited 2023 Mar 30] Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications>.
276. GISAID - hCov19 Variants [Internet] [cited 2023 Mar 30]. Available from: <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/>

277. Ministerio de Sanidad. (2023, 19 de junio). COVID-19: Actualización de variantes [Documento PDF] [cited 2023 Jun 24]. Recuperado de https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCoV/documentos/COVID19_Actualizacion_variantes_20230619.pdf
278. Bollyky TJ, Gostin LO, Hamburg MA. The Equitable Distribution of COVID-19 Therapeutics and Vaccines. *JAMA*. 2020; 323(24):2462-2463.
279. Graña C, Ghosn L, Evrenoglou T, Jarde A, Minozzi S, Bergman H, Buckley BS, Probyn K, Villanueva G, Henschke N, Bonnet H, Assi R, Menon S, Marti M, Devane D, Mallon P, Lelievre JD, Askie LM, Kredt T, Ferrand G, Davidson M, Riveros C, Tovey D, Meerpohl JJ, Grasselli G, Rada G, Hróbjartsson A, Ravaud P, Chaimani A, Boutron I. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022; 12(12):CD015477.
280. Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, Andrews N, Araos R, Goldberg Y, Groome MJ, Huppert A, O'Brien KL, Smith PG, Wilder-Smith A, Zeger S, Deloria Knoll M, Patel MK. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet*. 2022; 399(10328):924-944.
281. Notarte KI, Guerrero-Arguero I, Velasco JV, Ver AT, Santos de Oliveira MH, Catahay JA, Khan MSR, Pastrana A, Juszczak G, Torrelles JB, Lippi G, Martinez-Sobrido L, Henry BM. Characterization of the significant decline in humoral immune response six months post-SARS-CoV-2 mRNA vaccination: A systematic review. *J Med Virol*. 2022; 94(7):2939-2961.
282. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, Doolman R, Asraf K, Mendelson E, Ziv A, Rubin C, Freedman L, Kreiss Y, Regev-Yochay G. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *N Engl J Med*. 2021; 385(24):e84.
283. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol*. 2022; 32(5):e2381.
284. Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, Walsh SR, Essink B, Brosz A, McGhee N, Tomassini JE, Chen X, Chang Y, Sutherland A, Montefiori DC, Girard B, Edwards DK, Feng J, Zhou H, Baden LR, Miller JM, Das R. A Bivalent Omicron-Containing Booster Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 2022; 387(14):1279-1291.
285. Infectious Diseases Society of America. IDSA COVID-19 Treatment and Management Guidelines [documento en PDF]. Disponible en:

- https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/practice-guidelines/covid-19/treatment/idsa-covid-19-tx-and-mgmt_version-10.2.1.pdf. Consultado en: 26 de junio de 2023.
286. SEIMC - Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recomendaciones COVID [documento en PDF]. Disponible en: <https://covid19.seimc.org/wp-content/uploads/2023/06/SEIMC-Recomendaciones-COVID-16-junio-2023.pdf>. Consultado en: 26 de junio de 2023.
287. Yuan Y, Jiao B, Qu L, Yang D, Liu R. The development of COVID-19 treatment. *Front Immunol.* 2023; 14:1125246.
288. Lamontagne F, Agarwal A, Rochweg B, Siemieniuk RA, Agoritsas T, Askie L, Lytvyn L, Leo YS, Macdonald H, Zeng L, Amin W, da Silva ARA, Aryal D, Barragan FAJ, Bausch FJ, Burhan E, Calfee CS, Cecconi M, Chacko B, Chanda D, Dat VQ, De Sutter A, Du B, Freedman S, Geduld H, Gee P, Gotte M, Harley N, Hashimi M, Hunt B, Jehan F, Kabra SK, Kanda S, Kim YJ, Kissoon N, Krishna S, Kuppalli K, Kwizera A, Lado Castro-Rial M, Lisboa T, Lodha R, Mahaka I, Manai H, Mendelson M, Migliori GB, Mino G, Nsutebu E, Preller J, Pshenichnaya N, Qadir N, Relan P, Sabzwari S, Sarin R, Shankar-Hari M, Sharland M, Shen Y, Ranganathan SS, Souza JP, Stegemann M, Swanstrom R, Ugarte S, Uyeki T, Venkatapuram S, Vuyiseka D, Wijewickrama A, Tran L, Zeraatkar D, Bartoszko JJ, Ge L, Brignardello-Petersen R, Owen A, Guyatt G, Diaz J, Kawano-Dourado L, Jacobs M, Vandvik PO. A living WHO guideline on drugs for covid-19. *BMJ.* 2020; 370:m3379.
289. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Fujisaki S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Halfmann P, Watanabe S, Maeda K, Imai M, Mitsuya H, Ohmagari N, Takeda M, Hasegawa H, Kawaoka Y. Efficacy of Antiviral Agents against the SARS-CoV-2 Omicron Subvariant BA.2. *N Engl J Med.* 2022; 386(15):1475-1477.
290. Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, Maes P, Slechten B, Raymenants J, André E, Leyssen P, Neyts J, Jochmans D. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Res.* 2022; 198:105252.
291. Langerbeins P, Hallek M. COVID-19 in patients with hematologic malignancy. *Blood.* 2022; 140(3):236-252.
292. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, Oguchi G, Ryan P, Nielsen BU, Brown M, Hidalgo A, Sachdeva Y, Mittal S, Osiyemi O, Skarbinski J, Juneja K, Hyland RH, Osinusi A, Chen S, Camus G, Abdelghany M, Davies S, Behenna-Renton N, Duff F, Marty FM, Katz MJ, Ginde AA, Brown SM, Schiffer JT, Hill JA; GS-US-540-9012

- (PINETREE) Investigators. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* 2022; 386(4):305-315.
293. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, Boras B, Cardin RD, Carlo A, Coffman KJ, Dantonio A, Di L, Eng H, Ferre R, Gajiwala KS, Gibson SA, Greasley SE, Hurst BL, Kadar EP, Kalgutkar AS, Lee JC, Lee J, Liu W, Mason SW, Noell S, Novak JJ, Obach RS, Ogilvie K, Patel NC, Pettersson M, Rai DK, Reese MR, Sammons MF, Sathish JG, Singh RSP, Steppan CM, Stewart AE, Tuttle JB, Updyke L, Verhoest PR, Wei L, Yang Q, Zhu Y. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science.* 2021; 374(6575):1586-1593.
294. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, Abreu P, Bao W, Wisemandle W, Baniecki M, Hendrick VM, Damle B, Simón-Campos A, Pypstra R, Rusnak JM; EPIC-HR Investigators. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med.* 2022; 386(15):1397-1408.
295. Kabinger F, Stiller C, Schmitzová J, Dienemann C, Kokic G, Hillen HS, Höbartner C, Cramer P. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2021; 28(9):740-746.
296. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, Martín-Quirós A, Caraco Y, Williams-Diaz A, Brown ML, Du J, Pedley A, Assaid C, Strizki J, Grobler JA, Shamsuddin HH, Tipping R, Wan H, Paschke A, Butterson JR, Johnson MG, De Anda C; MOVE-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med.* 2022; 386(6):509-520.
297. Focosi D, McConnell S, Casadevall A, Cappello E, Valdiserra G, Tuccori M. Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis.* 2022; 22(11):e311-e326.
298. Benotmane I, Velay A, Gautier-Vargas G, Olagne J, Thauinat O, Fafi-Kremer S, Caillaud S. Pre-exposure prophylaxis with 300 mg Evusheld elicits limited neutralizing activity against the Omicron variant. *Kidney Int.* 2022; 102(2):442-444.
299. Cox M, Peacock TP, Harvey WT, Hughes J, Wright DW; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium; Willett BJ, Thomson E, Gupta RK, Peacock SJ, Robertson DL, Carabelli AM. SARS-CoV-2 variant evasion of monoclonal antibodies based on in vitro studies. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21(2):112-124.
300. Wang Q, Iketani S, Li Z, Liu L, Guo Y, Huang Y, Bowen AD, Liu M, Wang M, Yu J, Valdez R, Lauring AS, Sheng Z, Wang HH, Gordon A, Liu L, Ho DD. Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. *Cell.* 2023; 186(2):279-286.e8.

301. Tyrrell CSB, Allen JLY, Carson G. Influenza and other emerging respiratory viruses. *Medicine (Abingdon)*. 2017; 45(12):781-787.
302. Berengua C, Martino R. Quantitative PCR for the Diagnosis of HCMV Pneumonia in HSCT Recipients and Other Immunocompromised Hosts. *Hemato*. 2023; 4:76-89.
303. Berengua C, Miró E, Gutiérrez C, Sánchez M, Mulero A, Ramos P, Del Cuerpo M, Torrego A, García-Cadenas I, Pajares V, Navarro F, Martino R, Rabella N. Detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients with pneumonitis by viral culture and DNA quantification. *J Virol Methods*. 2023; 317:114743.
304. Santos Bravo M, Nicolás D, Berengua C, Fernandez M, Hurtado JC, Tortajada M, Barroso S, Vilella A, Mosquera MM, Vila J, Marcos MA. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Normalized Viral Loads and Subgenomic RNA Detection as Tools for Improving Clinical Decision Making and Work Reincorporation. *J Infect Dis*. 2021; 224(8):1325-1332.
305. Berengua C, López M, Esteban M, Marín P, Ramos P, Cuerpo MD, Gich I, Navarro F, Miró E, Rabella N. Viral culture and immunofluorescence for the detection of SARS-CoV-2 infectivity in RT-PCR positive respiratory samples. *J Clin Virol*. 2022; 152:105167.
306. Nevio Cimolai, Not All Viral Culture Approaches Are Equal, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 73, Issue 1. 2021; 1787–1788.
307. Basile K, McPhie K, Carter I, Alderson S, Rahman H, Donovan L, Kumar S, Tran T, Ko D, Sivaruban T, Ngo C, Toi C, O'Sullivan MV, Sintchenko V, Chen SC, Maddocks S, Dwyer DE, Kok J. Cell-based Culture Informs Infectivity and Safe De-Isolation Assessments in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2021; 73(9):e2952-e2959.
308. Santos Bravo M, Berengua C, Marín P, Esteban M, Rodriguez C, Del Cuerpo M, Miró E, Cuesta G, Mosquera M, Sánchez-Palomino S, Vila J, Rabella N, Marcos MÁ. Viral Culture Confirmed SARS-CoV-2 Subgenomic RNA Value as a Good Surrogate Marker of Infectivity. *J Clin Microbiol*. 2022; 60(1):e0160921.
309. Dimcheff DE, Valesano AL, Rumpfelt KE, Fitzsimmons WJ, Blair C, Mirabelli C, Petrie JG, Martin ET, Bhambhani C, Tewari M, Luring AS. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Total and Subgenomic RNA Viral Load in Hospitalized Patients. *J Infect Dis*. 2021; 224(8):1287-1293.

310. Herrera S, Aguado JM, Candel FJ, Cordero E, Domínguez-Gil B, Fernández-Ruiz M, Arcos IL, Len Ò, Marcos MÁ, Muñoz E, Muñoz P, Rodríguez-Goncer I, Sánchez-Céspedes J, Valerio M, Bodro M. Executive summary of the consensus statement of the group for the study of infection in transplantation and other immunocompromised host (GESITRA-IC) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) on the treatment of SARS-CoV-2 infection in solid organ transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando)*. 2023; 37(4):100788.

ANEXOS

Anexo 1: Otros trabajos relacionados con la tesis ya publicados en revistas:

- Santos Bravo M, **Berengua C***, Marín P, Esteban M, Rodríguez C, Del Cuerpo M, Miró E, Cuesta G, Mosquera M, Sánchez-Palomino S, Vila J, Rabella N, Marcos MÁ. **Viral Culture Confirmed SARS-CoV-2 Subgenomic RNA Value as a Good Surrogate Marker of Infectivity.** J Clin Microbiol. 2022 Jan 19;60(1): e0160921.
Factor impacto (2022): 9,4
*Corresponding author
- Santos Bravo M, Nicolás D, **Berengua C**, Fernández M, Hurtado JC, Tortajada M, Barroso S, Vilella A, Mosquera MM, Vila J, Marcos MA. **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Normalized Viral Loads and Subgenomic RNA Detection as Tools for Improving Clinical Decision Making and Work Reincorporation.** J Infect Dis. 2021 Oct 28;224(8):1325-1332.
Factor impacto (2022): 6,4
- Santos Bravo M, Plault N, Sánchez-Palomino S, Rodríguez C, Navarro Gabriel M, Mosquera MM, Fernández Avilés F, Suarez-Lledó M, Rovira M, Bodro M, Moreno A, Linares L, Cofan F, **Berengua C**, Esteva C, Cordero E, Martin-Davila P, Aranzamendi M, Pérez Jiménez AB, Vidal E, Fernández Sabé N, Len O, Hantz S, Alain S, Marcos MÁ; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) and the Group for the Study of Infection in Transplantation (GESITRA). **Genotypic and Phenotypic Study of Antiviral Resistance Mutations in Refractory Cytomegalovirus Infection.** J Infect Dis. 2022 Nov 1;226(9):1528-1536.
Factor impacto (2022): 6,4

Anexo 2: Otros trabajos relacionados la tesis pendientes de publicación (enviados).

- Marc Colomé, Antonella Simonetti, Joaquín López-Contreras, Ana Caballero, Sara Miqueleiz, Silvana Novelli, **Carla Berengua**, Alexander Rombauts. **Protracted COVID-19 and persistent viral replication in a severely immunocompromised patient treated with 30-day nirmaltrevir-ritonavir plus convalescent plasma.**
- Alexander Rombauts, Isabel Depoorter Ruelle, Antonella Francesca Simonetti, Ana Arrufat-Bel, **Carla Berengua**, Nuria Rabella, Ana Feliu-Ribera, Laura Villamarin-Vallejo, Albert Esquirol, Jorge Sierra, Sonia Mirabet-Pérez, Laura Escolà-Vergé, Irene García-Cadenas, Rodrigo Martino, Joaquín López-Contreras. **Characteristics and response to remdesivir of profoundly immunocompromised patients with prolonged symptomatic SARS-CoV-2 replication: a retrospective cohort study.**

Anexo 3: Otros trabajos relacionados con la tesis presentados en congresos nacionales e internacionales:

- **C. Berengua Pereira, M. Del Cuerpo Casas, P. Marín López, P. Ramos Elorriaga, M. Esteban Salas, C. Roig Mombrú, E. García Losilla, V. Pajares Ruiz, N. Rabella García. Citomegalovirus en lavados broncoalveolares. Experiencia de cinco años.** LIBRO DE ABSTRAC VIRTUAL SEIMC 2020, editado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en agosto de 2020 (ISBN - 978-84-09-22864-5). Póster.
- **C. Berengua, M. Santos, P. Marín, M. Esteban, P. Ramos, M. López, M.M. Mosquera, M.A. Marcos, F. Navarro, N. Rabella. Cultivo del SARS-CoV-2 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Relación entre la multiplicación del virus y el Ct de la RT-PCR.** XXIV Congreso de la SEIMC 2021. Online. Poster.
- **M. Santos, C. Berengua, G. Cuesta, P. Marín, M. Esteban, P. Ramos, M. López, M. Del Cuerpo, C. Rodríguez, M.D.M. Mosquera, E. Miró, F. Navarro, N. Rabella, M.A. Marcos. Correlation between SARS-CoV-2 subgenomic RNA and viral culture.** 31st Congreso ECCMID 2021. Online. Sesión oral.
- **Carla Berengua, Pilar Marín, Marina López, Montserrat Esteban, Margarita Del Cuerpo, Elisenda Miró, Ferran Navarro, Núria Rabella. Detection of SARS-CoV-2 by conventional methods.** 23rd Annual Conference of ESCV 2021. Online. Póster.
- **C. Berengua Pereira, C. Gutiérrez Vilalta, M.C. Sánchez, P. Marín López, M. López Ruiz, M. Del Cuerpo, P. Ramos Elorriaga, F. Navarro Risueño, N. Rabella García. Aportación del cultivo virológico a la interpretación de las pruebas moleculares en el diagnóstico de neumonitis por citomegalovirus.** XXV Congreso de la SEIMC 2022. Granada. Póster.
- **Carla Berengua, Marta Sánchez, Cristina Gutiérrez, Marina López, Paula Ramos, Alicia Mulero, Pilar Marín, Rodrigo Martino, Núria Rabella. Cytomegalovirus pneumonitis: contribution of viral culture to the interpretation of molecular tests for diagnosis.** 24th Annual Conference of ESCV 2022. Manchester. Póster.

- Alexandra Arias, Isabel Depoorter-Ruelle, Antonella Francesca Simonetti, Marc Colomé, Alexander Rombauts, Anna Feliu-Ribera, Laura Villamarin Vallejo, **Carla Berengua**, Núria Rabella, Albert Esquirol, Anna Arrufat, Rodrigo Martino-Bufarull, Sonia Mirabet-Pérez, Virginia Pomar, Sara Grillo, Joaquín López-Contreras, Laura Escolà-Vergé.
Descripción de las características clínicas y evolutivas de una serie de pacientes inmunodeprimidos con infección por SARS-CoV-2 persistente/recidivante. XXVI Congreso de la SEIMC 2023. Santiago de Compostela. Póster.
- Isabel Depoorter-Ruelle, Alexandra Arias, Antonella Francesca Simonetti, Marc Colomé, Alexander Rombauts, Anna Feliu-Ribera, Laura Villamarin Vallejo, **Carla Berengua**, Núria Rabella, Albert Esquirol, Irene Garcia-Cadenas, Rodrigo Martino-Bufarull, Sonia Mirabet-Pérez, Virginia Pomar, Sara Grillo, Joaquín López-Contrera, Laura Escolà-Vergé.
Características basales, clínicas y evolutivas de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes inmunodeprimidos en la era ómicron: estudio de una cohorte retrospectiva de un hospital terciario. XXVI Congreso de la SEIMC 2023. Santiago de Compostela. Póster.