

Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2 durante la pandemia en Navarra

Ana Miqueleiz Zapatero^{1,2}, Ana Navascués Ortega^{1,2}, Irati Arregui García³, Marta Adelantado Lacasa^{2,4}, Estibaliz Erviti Machain¹, Iosu Razquin Olazarán¹, Cristina Bayo Sánchez¹, Carmen Ezpeleta Baquedano^{1,2,5}

1. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario de Navarra. Servicio navarro de Salud-Osasunbidea. Pamplona. Navarra.
2. Instituto de investigación Sanitaria de Navarra.
3. Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario San Millan y San Pedro. Logroño. La Rioja.
4. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Reina Sofía. Servicio navarro de Salud-Osasunbidea Tudela. Navarra.
5. Universidad Pública de Navarra (Profesora asociada). Pamplona. Navarra.

Correspondencia: Carmen Ezpeleta Baquedano [cezpeleb@navarra.es]

Resumen

El diagnóstico microbiológico es esencial en el conocimiento y manejo de las enfermedades infecciosas, tanto en los procesos habituales de la práctica clínica como en la aparición de nuevos microorganismos, como en los próximos que puedan aparecer con el cambio climático y la nueva situación de los vectores que transmiten enfermedades en nuestro medio.

El 11 de marzo 2020 la Organización Mundial de la Salud declaró la alerta por pandemia mundial por SARS-CoV-2 que se descubrió y se aisló por primera vez en Wuhan, China, en un brote de neumonía de etiología desconocida vinculada a un mercado. Es una infección que tiene un origen zoonótico, se transmitió de un huésped animal a uno humano. Actualmente no se conoce de forma clara de dónde proviene el SARS-CoV-2.

A principios de enero de 2020, científicos chinos anunciaron que habían aislado y secuenciado completamente el virus y lo publicaron; esto permitió disponer de técnicas de PCR para realizar el diagnóstico de la infección por SARS Cov2 en todo el mundo. El objetivo de este trabajo es revisar el papel llevado a cabo desde el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario de Navarra en la pandemia de COVID-19 y, en concreto, en nuestra comunidad, Navarra.

Más de dos años después y, sin dejar de lado el profundo impacto sanitario, familiar y social que ha tenido, debemos quedarnos con lo positivo del aprendizaje profesional y personal adquirido para aplicarlo en nuestro día a día, así como para las futuras pandemias que vengan.

Palabras clave. SARS-CoV-2. Pandemia. Diagnóstico microbiológico. Secuenciación masiva. COVID-19.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico microbiológico es esencial en el conocimiento y correcto manejo de las enfermedades infecciosas tanto en la rutina diaria (sepsis, bacteriemias, infecciones respiratorias, infecciones de trasmisión)

sión sexual o infecciones congénitas) como ante la aparición de nuevos microorganismos como el virus de viruela del mono o los próximos que puedan surgir en nuestro medio a consecuencia del cambio climático y la situación de los vectores que transmiten virus causantes de enfermedades (dengue, *West Nile*, fiebre hemorrágica de Crimea Congo), que pueden presentarse en nuestro medio. También tiene un importante valor a nivel epidemiológico, para conocer los patógenos circulantes, la gravedad asociada, y el posible desarrollo de antivirales o vacunas. Un bien dotado Servicio de Microbiología Clínica es fundamental para conseguir ambos objetivos.

La pandemia mundial por SARS-CoV-2 ha supuesto todo un reto a diferentes niveles: sanitario, microbiológico, social y económico¹. La *enfermedad X* es el nombre que adoptó la Organización Mundial de la Salud (OMS) en febrero de 2020 en su lista de enfermedades prioritarias para definir un patógeno hipotético y desconocido que podría causar una epidemia futura.

El objetivo de este trabajo es revisar el papel llevado a cabo desde el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario de Navarra (HUN) en la pandemia de COVID-19 y, en concreto, en la Comunidad Foral de Navarra.

ANTECEDENTES SARS-COV-2

SARS-CoV-2 es un virus RNA de unos 29.900 nucleótidos perteneciente a la familia *Coronaviridae* que está constituida por cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gammacoronavirus*. Además del virus SARS-CoV-2, se han descrito en humanos otros seis coronavirus: dos *Alphacoronavirus* (229E y NL63) y cuatro *Betacoronavirus* (OC43, HKU-1, SARS-CoV y MERS-CoV). Todos se asocian a infecciones respiratorias en general leves, salvo SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV, que han producido infecciones graves y con capacidad para diseminarse en diferentes países².

SARS-CoV-2 se descubrió y se aisló por primera vez en Wuhan, China, en un brote de neumonía de etiología desconocida vinculada a un mercado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el nombre de la enfermedad como COVID-19 (*coronavirus disease-2019*) y se denominó provisionalmente 2019-nCoV al agente etiológico, que posteriormente fue renombrado SARS-CoV-2.

Tiene un origen zoonótico, es decir, que se transmitió de un huésped animal a uno humano. A día de hoy se desconoce su procedencia, aunque

diversas investigaciones descartan casi por completo la posibilidad de que surgiera en un laboratorio debido a la acción humana. Análisis genéticos realizados hasta el momento, tomando como base otros coronavirus conocidos, sugieren que el murciélago o el pangolín pudieron ser los animales que lo transmitieron a humanos³. Existen dos teorías sobre este origen: 1) la primera señala que el virus reunió sus actuales características genéticas por selección natural en el animal que lo transmitió a los humanos, convirtiéndose en patógeno para el ser humano antes de propagarse entre las personas; 2) la segunda sugiere que esta selección natural que confiere al virus sus señas de identidad se dio ya en humanos, después de producirse la transferencia zoonótica; según esto, un ancestro del SARS-CoV-2 habría pasado de animales a personas antes de mutar y convertirse en el virus que ahora conocemos. Ninguna de las dos teorías ha podido confirmarse hasta el momento⁴.

ESTRUCTURA DEL VIRUS

La estructura del coronavirus, que recibe este nombre por la apariencia característica de las proteínas de su cubierta, es un virus esférico de 100-160 nm de diámetro, con envuelta lipídica y que contiene ARN. El genoma del virus SARS-CoV-2 codifica cuatro proteínas estructurales: proteína S (espicula), proteína E (envoltura), proteína M (membrana) y proteína N (nucleocápside) y proteínas no estructurales (Nsp1-16) codificadas por ORF1a y ORF1ab.

La proteína S se encuentra en la superficie de la envoltura del virus y tiene un papel relevante en la infección porque contiene el dominio de unión al receptor (RBD) de las células que infecta y, por lo tanto, es la proteína determinante del tropismo del virus. Además, es la proteína que tiene la actividad de fusión de la membrana viral con la celular que permite liberar el genoma viral en el interior de la célula que va a infectar. Se trata del principal antígeno viral al que van dirigidos la mayoría de anticuerpos.

El primer paso de la infección por coronavirus es la entrada del virus en las células. El coronavirus SARS-CoV-2 entra en las células a través de la unión de una proteína de su superficie, la proteína S, con el receptor ACE-2 (enzima convertidora de angiotensina de las células huésped). ACE-2 forma parte de una ruta bioquímica que interviene en la regulación de procesos como la inflamación o la presión sanguínea, y su función habitual es modular la actividad de la angiotensina 2 para contrarrestar sus efectos dañinos⁵.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE SARS-CoV-2

RT-PCR

A principios de enero de 2020, un grupo de científicos chinos envió los datos de secuenciación del SARS-CoV-2 para publicarlos en *Virological.org*, un centro de datos previos a la publicación, diseñado para ayudar con las actividades de salud pública y la investigación. Anunciaron que habían aislado y secuenciado completamente el virus, lo que provocó una demanda para la publicación completa de los detalles. La secuencia fue depositada en GenBank el 5 de enero de 2020 (número de acceso MN908947 y su versión actual como MN908947). La publicación fue comunicada por Edward Holmes (PhD, Universidad de Sydney), en nombre del grupo dirigido por Yong-Zhen Zhang (PhD, Universidad de Fudan, Shanghai)⁶.

Desde el lanzamiento de las secuencias de genes, los expertos en coronavirus han estado investigando en busca de pistas sobre el origen de SARS-CoV-2 de Wuhan, cómo podrían probarlo y cómo podría comportarse.

Vineet Menachery (PhD, Universidad de Texas UTMB) dijo que el SARS-CoV-2 parece ser un coronavirus del grupo 2B, lo que lo coloca en la misma familia que el virus del SARS causante del síndrome respiratorio agudo severo. Ambos se encuentran dentro del grupo sarbecovirus, bastante estudiado por ser en el que se encuentran coronavirus similares de murciélago.

Con la publicación de la secuencia genética ya pudieron diseñar sondas y *primers*, lo que supuso disponer en poco tiempo de una herramienta diagnóstica en los servicios de Microbiología Clínica de todo el mundo, aunque al principio solo era posible el diagnóstico de unos pocos pacientes y no se podía realizar un diagnóstico masivo de la población.

En el caso de España, y concretamente de Navarra, fue Roche *Diagnostics* la compañía que en enero de 2020 nos permitió disponer de reactivos para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de identificación de SARS-CoV-2. El resto de casas comerciales tardaron meses en obtener el reactivo.

Inicialmente se siguieron los protocolos validados por diferentes organismos internacionales como el *Centre for Disease Control* (CDC) de EEUU, el *German Consiliary Laboratory for Coronavirus* del Hospital Charité de Berlín, que recomendaban diferentes métodos de cribado; CDC indicaba detectar dos dianas genéticas del gen de la nucleocápside (N1 y N2) y el Hospital Charité de Berlín recomendaba la detección del gen E de la envoltura como cribado y una posterior confirmación con el gen RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN). Posteriormente fueron adaptados

por las casas comerciales y fueron evolucionando con la detección de diferentes dianas.

En Microbiología Clínica del HUN a finales de enero 2020 adquirimos el reactivo TIOBIOMOL (ROCHE *Diagnostics*) que detectaba el gen E, común a los sabercovirus, y el gen N específico de SARS-CoV-2 con el objetivo de ofrecer un resultado rápido y ágil a nuestros pacientes en vez de remitir la muestra al Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda). Para su uso empleamos el termociclador z480 situado en el servicio de Anatomía Patológica del HUN, que nos lo cedió durante la pandemia

El primer caso de diagnóstico de SARS-CoV-2 se realizó un sábado 29 de febrero de 2020 a una paciente de 39 años de origen nigeriano que volvía de Bélgica de una reunión religiosa que presentaba una coinfección con virus de la gripe B. Un acompañante también fue diagnosticado de infección por SARS-CoV-2. Este proceso costó muchas horas de trabajo, hasta 12 horas, y de confirmación ante el primer caso diagnosticado. Sorprendentemente el bebé de cinco meses de la paciente que viajó con ella no tuvo una infección por SARS-CoV2, pero si tenía la infección por virus de Gripe B. Gracias al Servicio de Anatomía patológica que nos prestó el equipo de Roche se pudieron realizar los primeros diagnósticos en Navarra, estuvimos varios meses realizando el diagnóstico en su laboratorio y después en el servicio de Microbiología Clínica con el mismo equipo que amablemente nos prestaron.

En Microbiología del HUN, al principio y durante meses, contamos solo con la técnica diagnóstica de la casa comercial Roche. Posteriormente, en cuanto estuvieron disponibles los reactivos de otras casas comerciales, apostamos por trabajar con cuatro o cinco casas comerciales diferentes con sus diferentes plataformas. Esto fue un gran acierto. Esta estrategia de diversificación hizo que en ningún momento Navarra se viera desabastecida de reactivos a pesar de que nos costó mucho trabajo conseguirlos. Hay que recordar que, en marzo 2020, no solo había escasez de mascarillas, guantes, o respiradores, sino de todo tipo de material sanitario, y una falta de material derivado del plástico a nivel mundial. Para realizar el diagnóstico microbiológico es necesario disponer del reactivo de amplificación, pero también son imprescindibles puntas de pipeteo, placas de extracción, tubos de amplificación y una gran cantidad de material: si falta uno de ellos ya no puede llevarse a cabo la prueba. Además de las soluciones comerciales, pusimos a punto una *real time RT-PCR* (PCR *in-house*) y una extracción de material genético por calor, sin necesidad de utilizar reactivos como alternativa en caso de que rotura de *stock* por parte de las casas comerciales.

Tiempo después, en el diagnóstico microbiológico por PCR ha habido una amplia gama de opciones, que van desde sistemas para hacer de for-

ma individualizada PCR *Point-of Care*-POC hasta sistemas robotizados que pueden trabajar hasta 96 muestras o más o sistemas tipo *auto analizadores*. Además, meses después se añadió la opción de RT-PCR multiplex comercial para detectar en una misma PCR SARS-CoV-2 y otros virus respiratorios como el virus de la gripe y el virus respiratorio sincitial.

La muestra recomendable para realizar el diagnóstico es del tracto respiratorio (principalmente del tracto respiratorio superior), exudado nasofaríngeo, exudado orofaríngeo y, en caso de alta sospecha clínica y resultado negativo en 24h, tracto respiratorio inferior. Los aspirados, lavados nasales y esputos inducidos plantean la dificultad de su obtención en condiciones de bioseguridad adecuadas, debido a los aerosoles que se pueden generar⁷.

Para facilitar la auto-toma, o en situaciones en las que no es posible tomar muestra del tracto respiratorio superior, la saliva también se ha considerado una buena alternativa. En nuestro centro decidimos no instaurar su uso debido al menor rendimiento respecto a muestra nasofaríngea⁸.

La automatización, con el empleo de robots extractores y dispensadores para la realización de mezclas para la PCR (*master mix*) y la adquisición de nuevos equipos, estuvo disponible a partir de finales de marzo de 2020. A lo largo de la pandemia dispusimos de cuatro robots Starlet (Seegene) y, desde julio de 2020, de dos sistemas totalmente automatizados desde que se introduce la muestra hasta que se obtiene el resultado (Cobas 6800 de Roche y Alinity-M de Abbott). Esto permitió asumir la alta demanda generada en el ámbito hospitalario, así como la generada cuando empezó a realizarse diagnóstico microbiológico en pacientes de Atención Primaria y de cribados.

SARS-CoV-2 es un agente clasificado como de grupo de riesgo 3. En este contexto, las muestras para detección de ácidos nucleicos, se pueden procesar utilizando, al menos, normas de nivel 2 de bioseguridad. Las muestras deben llegar al área de recepción del laboratorio en embalajes que respeten las medidas de bioseguridad y, para realizar las PCR, las muestras que no vengán en medios de transporte con sustancias inactivantes deben someterse a un proceso de lisis externa con un buffer adecuado durante aproximadamente 15 minutos. Toda manipulación de las muestras antes de la inactivación se realizará en cabina de seguridad biológica tipo IIA utilizando el equipo de protección individual adecuado, a fin de evitar el contagio por salpicaduras y/o aerosoles. Posteriormente, las muestras se trabajarán en cada caso siguiendo las instrucciones de los fabricantes de los equipos que se vayan a utilizar.

La bioseguridad y protección del personal siempre es un aspecto presente en todo servicio de Microbiología pero más si cabe en esta pandemia

o ante la aparición y manejo de nuevos microorganismos. Desde finales de enero de 2020 añadimos a nuestra infraestructura un laboratorio nivel 3, lo que amplió nuestra capacidad de trabajo.

Los protocolos de cribado han ido cambiando a lo largo de estos dos años y medio. Se realizaron cribados masivos en distintos pueblos y colectivos, empresas, residencias de ancianos y dependientes, lo que hizo que, independientemente de las olas epidemiológicas, nuestro servicio tuviera una elevada carga de trabajo de manera constante. Los mayores picos ocurrieron en octubre y noviembre de 2020, con >4.500 muestras/día y manteniendo tiempos de respuesta inferiores a 24 horas.

En julio de 2020 se inició el trabajo en sistema *pool* para las muestras procedentes de cribados masivos y de Atención Primaria, que consiste en mezclar hasta 10 muestras diferentes y realizarles la PCR; si el resultado del *pool* es negativo, todas las muestras que contiene se consideran negativas; por el contrario, si el *pool* es positivo hay que realizar PCR por separado a cada una de las muestras para saber cuáles son positivas. Esto supuso un gran avance para la realización de cribados, así como un reto de organización que además conllevó una optimización de recursos. A partir de febrero de 2021 se dispuso de un robot *pooleador* (mezclador de muestras) automatizado.

Las muestras de pacientes de ámbito hospitalario siempre se trabajaron de forma individual y, según criterio, de forma urgente o no. Los *pools* se realizaban de más o menos muestras en función de la tasa de positividad de cada área de salud.

Se contó con el desarrollo propio de un *software* desarrollado por TRACASA para la gestión, creación y emisión de resultados que fue implantado en octubre 2020 y que supuso una disminución de la carga de trabajo para el Servicio de Microbiología Clínica.

DetECCIÓN DE ANTÍGENOS

Esta técnica se basa en la detección de la nucleoproteína (N) y requiere un pretratamiento de la muestra con un buffer de extracción que consigue liberar la proteína N, permitiendo la reacción con los anticuerpos específicos del ensayo.

Existen dos grupos de técnicas para la detección de antígenos (Ag): la inmunocromatografía, o inmunoensayo de flujo lateral (IEFL) es la más usada; y la que se realiza de forma automatizada por inmunoensayo por quimioluminiscencia (CLIA) o por enzimunoensayo (EIA). Para su realiza-

ción se dispuso de test de Ag comerciales en agosto de 2020 (cuya venta fue autorizada posteriormente en oficinas de farmacia para su realización por parte del paciente). Son técnicas que presentan una excelente especificidad, y una sensibilidad menor que la PCR pero condicionada por la carga viral: a mayor Ct (umbral de ciclo, *cycle threshold*), menor probabilidad de detección por Ag.

El Servicio de Microbiología Clínica del HUN probó y evaluó una técnica de detección de Ag de la casa CERTEST⁹ y una técnica automatizada de detección y cuantificación de antígeno de SARS-CoV-por CLIA. El CLIA de antígeno mostró una sensibilidad del 70,5% y una especificidad del 78,9%, por lo que decidimos no apostar por esta técnica.

Existe una gran variedad de test de detección de Ag en el mercado que presentan diferentes valores de sensibilidad. Dicha sensibilidad no se ha visto en principio comprometida con el discurrir de las nuevas variantes surgidas, debido a que la región N está sometida a menos mutaciones que la S.

Cultivo celular

El cultivo celular es la técnica que mejor indica la viabilidad del virus SARS-CoV-2 y durante cuánto tiempo puede transmitirlo una persona infectada, así como para estudio de nuevos antivirales. Es una técnica muy laboriosa y, en la actualidad, son muy pocos los laboratorios de Microbiología que la realizan. En el caso de SARS-CoV-2 el cultivo celular ha quedado prácticamente relegado al plano de la investigación. Todas las líneas celulares de riñón de dos especies de mono (cercopiteco verde y macaco Rhesus) son susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, observándose un efecto citopático temprano (48 h).

Como ocurre con otros virus respiratorios, los trabajos publicados han demostrado que el virus se mantiene viable un periodo de tiempo muy inferior al de la positividad de la detección por PCR¹⁰, con resultados discrepantes respecto a su viabilidad que pueden ser debidas al tipo de línea celular empleada, a la gravedad del cuadro clínico, al tiempo transcurrido hasta la toma de la muestra o al estado de inmunocompetencia del paciente, entre otras. Por lo general, se ha demostrado que, en pacientes inmunocompetentes con COVID leve, el virus permanece viable menos de una semana, mientras que en pacientes con neumonía grave o inmunodeprimidos el virus puede permanecer viable más de 20 días. Respecto a la correlación entre la viabilidad del virus y el Ct, se ha descrito que la viabilidad es >90% en muestras con Ct<25, tanto en pacientes leves como graves, mientras que la viabilidad es tan solo del 5% en pacientes leves y del 15% en graves en muestras con Ct>35¹¹.

Serología

El genoma del SARS-CoV-2 codifica cuatro proteínas estructurales principales: la espícula (S), la nucleocápside (N), la envoltura (E) y la membrana (M). De estas, las proteínas S y N presentan inmunogenicidad y los anticuerpos IgM e IgG frente a estos antígenos son la diana de las pruebas serológicas de la infección por SARS-CoV-2 disponibles en la actualidad.

En la mayoría de los pacientes, la seroconversión ocurre durante las dos primeras semanas tras el inicio de los síntomas. Se ha descrito que los anticuerpos frente a la proteína N aparecen antes que los generados frente a la proteína S y que tienen tendencia a disminuir e incluso desaparecer antes que los anticuerpos frente a la proteína S^{12,13}.

En la actualidad las técnicas serológicas más frecuentes son las ya mencionadas para la detección de Ag: IEFL y las plataformas automatizadas de gran capacidad basadas en EIA o en CLIA. Los IEFL, inmunoensayos *de flujo lateral* también llamados inmunocromatografías, son técnicas que solo requieren una gota de sangre obtenida por punción en el dedo, la cual se deposita en una tira reactiva y cuya lectura de resultados se realiza tras 15-30 minutos. Su principal ventaja es la facilidad de uso, lo que resulta de gran utilidad para realizar pruebas en zonas con difícil acceso a material y técnicas más sofisticadas. Sin embargo, presentan desventajas como una sensibilidad limitada, falta de cuantificación y la subjetividad de su lectura. Las plataformas automatizadas basadas en enzimoimmunoensayo (EIA) o en inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA) poseen gran capacidad, alto rendimiento y sensibilidad, por lo que son consideradas de elección para realizar la serología de SARS-COV-2. La muestra requerida es suero o plasma.

En el Servicio de Microbiología Clínica del HUN contamos desde mayo de 2020 con un inmunoensayo CLIA para la detección cualitativa de anticuerpos totales anti proteína N del SARS-COV-2: Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (*Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Switzerland*). Hasta agosto de 2022 hemos realizado 65.933 determinaciones de anticuerpos totales anti N con este reactivo en la plataforma Cobas e801. Para esta misma plataforma también contamos con otro inmunoensayo CLIA para la cuantificación de anticuerpos totales anti proteína S (Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S); ello permite cuantificar los anticuerpos producidos tras la vacunación en aquellas personas que no se han infectado por el virus, ya que la vacuna induce la producción de anticuerpos anti S, no anti N. La cuantificación es expresada en UI/mL, siendo 250 UI/mL la cantidad máxima de anticuerpos anti S que es capaz de detectar este reactivo. Hasta agosto de 2022 hemos realizado 6.808 determinaciones de anticuerpos totales anti S.

Para la detección cuantitativa diferenciada de anticuerpos IgM e IgG anti S contamos con dos inmunoensayos CLIA: LIAISON® SARS-CoV-2 IgM y LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (DiaSorin, Saluggia, Italia). Estos dos reactivos se utilizan en la plataforma LIAISON XL y el resultado es expresado en unidades arbitrarias (AU/mL), considerándose positivos los valores >15. Hasta agosto de 2022 hemos realizado 18.121 determinaciones de anticuerpos IgG y 18.004 de IgM.

Las pruebas serológicas tienen una utilidad limitada en el diagnóstico de la infección aguda por SARS-COV-2 debido a su baja sensibilidad en las primeras dos semanas de infección; por ello se recomiendan como pruebas diagnósticas de elección la PCR o la detección de antígenos⁷. Solamente se recomienda la serología como prueba de primera línea en el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico, trastorno que se ha relacionado con la infección por SARS-CoV-2 y que puede tener lugar semanas después de la infección aguda.

El principal y más importante uso de la serología son los estudios de seroprevalencia. A través de estos estudios se puede conocer el porcentaje de población que ha pasado la infección porque presentan anticuerpos anti N. También permiten conocer, en aquellas personas que no han pasado la infección pero están vacunadas, si han producido anticuerpos anti S y en qué cantidad. Estos estudios de seroprevalencia son una herramienta de gran utilidad para salud pública.

En el ámbito sanitario, la serología también se ha utilizado en ocasiones como criterio de apoyo para la reincorporación de trabajadores sanitarios con PCR positiva y Ct elevado.

Una aplicación aún muy poco extendida de la serología es el estudio de la respuesta inmune celular específica frente a SARS-COV-2 desarrollada tras la infección o la vacunación. Se han desarrollado algunos ensayos comerciales de tipo *quantiferon* basados en la estimulación celular de los linfocitos T plasmáticos con un pool de antígenos de SARS-COV-2. La producción de interferón γ por parte de estos linfocitos T es detectada por lo general mediante un ELISA. Su principal utilidad es el estudio de la respuesta vacunal en pacientes que tienen su inmunidad humoral comprometida.

A lo largo de estos años de pandemia hemos participado en diferentes estudios de seroprevalencia.

Hemos realizado la serología del estudio nacional de sero-epidemiología de la infección por SARS-CoV-2 en España (Estudio ENE-COVID) financiado por el Ministerio de Sanidad y coordinado por el Instituto de Salud Carlos III 2020. Se trató de un amplio estudio longitudinal cuyo objetivo era estimar la prevalencia de la infección por SARS-CoV-2 en la población

española mediante la determinación de anticuerpos y evaluar su evolución temporal. Para ello, se realizaron tres rondas de ENE-COVID en 2020 (27/04-11/05, 18/05-01/06 y 08/06-22/06), incluyendo a un total de 68.296 participantes de toda España. Los participantes completaron un cuestionario sobre características demográficas, factores de riesgo, si habían sido caso confirmado de COVID-19 y si presentaban síntomas¹⁴. Para la detección de anticuerpos IgG, a todos ellos se les realizó un test rápido inmunocromatográfico con una gota de sangre del dedo y también se les tomó muestra de sangre por venopunción, para ser analizado el suero mediante un ensayo de quimioluminiscencia (SARS-CoV-2 IgG Architect, Abbott Laboratories) en 29 laboratorios de Microbiología de España. Los resultados del estudio mostraron que la seroprevalencia de anticuerpos IgG en España fue de un 4,6%. Respecto a la Comunidad Foral de Navarra, participaron 1.744 personas y la seroprevalencia fue de un 5,7 (primera ronda), 6,3 (segunda ronda) y 6,6 (tercera ronda)¹⁴.

También hemos realizado el Estudio de seroprevalencia realizado a los profesionales sanitarios-sociosanitarios de Navarra (SEPROSANA), coordinado y financiado por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra y el Servicio Navarro de Salud-Osasunbidea (SNS-O) en 2020. Su objetivo fue conocer el nivel de seroprevalencia en los profesionales sanitarios y sociosanitarios de Navarra, proporcionando información para evaluar los cambios de la prevalencia a lo largo del tiempo en estos profesionales. Se realizó en dos etapas: junio-julio y noviembre. Participaron 14.636 profesionales en la primera ronda y 14.562 en la segunda, lo que supuso aproximadamente un 75% del total de profesionales. Para la detección de anticuerpos frente a SARS-Cov-2 se tomó una muestra de sangre por venopunción a los participantes que se analizó mediante quimioluminiscencia, primero midiendo anticuerpos totales (Elecys® Anti-SARS-CoV-2, Roche) y, si estos eran positivos, se realizaba la diferenciación IgM/IgG (LIAISON® SARS-CoV-2 IgM/IgG, DiaSorin). Los resultados de este estudio reflejaron que la seroprevalencia de IgG en los profesionales del Sistema Navarro de Salud en la primera ronda fue de un 7,2% y aumentó a un 9,4% en la segunda. Respecto a la IgM, fue positiva en el 3,9% de profesionales en la primera ronda y en el 3,8% en la segunda.

Otro estudio realizado fue la Encuesta de seroprevalencia de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 en pacientes de Atención Primaria de Navarra, coordinado y financiado por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra y el Servicio Navarro de Salud-Osasunbidea en 2022. Su objetivo fue estimar la prevalencia de anticuerpos anti N y anti S del SARS-CoV-2 en la población de Navarra mayor de 5 años¹⁵. Se llevó a cabo entre el 26/04/22 y el 03/06/2022 y se incluyeron un total de 1.461 participantes, a los que se les

tomo muestra de sangre por venopunción que se analizó con dos ensayos de quimioluminiscencia, uno para la detección de anticuerpos totales anti N (Elecys® Anti-SARS-CoV-2, Roche) y otro para la detección de anticuerpos totales anti S (Elecys® Anti-SARS-CoV-2 S, Roche). Los resultados han mostrado que el 97,4% de las personas analizadas presentaba algún tipo de anticuerpo frente a SARS-CoV-2: el 61,9% presentaban anticuerpos anti N, lo que indica que han pasado la infección, el 92,3% presentaba anticuerpos anti S por encima de 250 U/mL, y un 56,9% presentaba ambos tipos de anticuerpos¹⁵.

VARIANTES DE SARS-CoV-2

Los virus como el SARS-CoV-2 evolucionan constantemente a medida que se producen cambios en el código genético provocados por mutaciones genéticas o por la recombinación viral durante la replicación del genoma.

Una variante comprende diferentes linajes y sublinajes con características antigénicas comunes y determinadas mutaciones consideradas como definitorias. La clasificación de linajes y sublinajes correspondientes a una variante se asignan atendiendo a la prevalencia de las secuencias virales con mutaciones definitorias, la localización geográfica y la fecha de aparición. Las variantes son asignadas por la OMS cuando un determinado linaje alcanza un umbral de circulación suficiente para ser monitorizado.

En estos casos, un linaje o grupo de linajes puede ser designado por las organizaciones de salud pública como variante bajo monitorización (VUM), variante de preocupación (VOC) o variante de interés (VOI) debido a atributos y características compartidas que pueden requerir medidas de salud pública. A lo largo de la pandemia han ido evolucionando las variantes a medida que el virus ha mutado. Las variantes se han producido en cualquier lugar del mundo y desde allí algunas se han diseminado a nivel global y otras han permanecido en un lugar concreto donde se originaron¹⁶. Tanto las variantes *Alpha* como *Beta* fueron designadas por la OMS en la misma fecha, sin embargo, el impacto de *Alpha* fue mayor antes que el de *Beta* por lo que fue la primera en ser una variante de preocupación (VOC). La OMS asigna el nombre siguiendo el orden del alfabeto griego, no solo en función de la fecha de aparición sino también atendiendo al nivel de preocupación que alcanza. La OMS subraya que las nuevas variantes emergentes deberían ser objeto de seguimiento por las autoridades de salud pública, y deberían realizarse evaluaciones comparativas de sus características virales, así como evaluar la inmunidad conferida

por las vacunas frente a ellas. A día de hoy, verano 2022, la variante predominante es *Ómicron*.

El estudio del virus debe realizarse por secuenciación masiva (NGS) para obtener todo el genoma con sus diferentes mutaciones y poder asignar tanto el linaje como la variante de la que se trate. También puede hacerse secuenciación por Sanger del gen S, pero es una aproximación dado que es una secuenciación parcial que no permite asignación de linaje. En Navarra hemos realizado 23 *runs* de NGS (384 muestras/*run*) a lo largo de la pandemia en colaboración con la empresa Nasertic, así como otros en otras plataformas del HUN. También formamos parte de la red española de laboratorios para la secuenciación de SARS-CoV-2 (RELECOV) y hemos participado en el proyecto europeo HERA *Incubator* coordinados por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. En este momento disponemos de 8.978 virus secuenciados y 161 linajes diferentes que han circulado en Navarra (Tabla 1). Hay que destacar la variante a la que apodamos coloquialmente como *Carriquiri* (denominada oficialmente como linaje B.1.575) de la que secuenciamos 203 virus en Navarra; fue un linaje que no se extendió por el resto del mundo. Comenzó en un taller en la comarca de Pamplona y posteriormente se difundió en una mezquita¹⁷.

A nivel mundial, todas las secuencias de SARS-CoV-2 son útiles para el diseño de nuevas vacunas, y nuevos antivirales. Algunas mutaciones pueden provocar grandes cambios en el comportamiento de los virus: puede facilitar la transmisión entre personas (se extiende rápidamente en una comunidad y, por ejemplo, empieza en la India y rápidamente se propaga a Europa), agravar la enfermedad (requerir más ingresos, causar más mortalidad) o disminuir la eficacia de las vacunas (los virus pueden escapar a las mismas).

La OMS, ha estado vigilando y evaluando la evolución del SARS-CoV-2. La aparición de variantes que suponen un mayor riesgo para la salud pública mundial, a finales de 2020, hizo que se empezaran a utilizar las categorías VOI y VOC. La OMS y sus redes internacionales de expertos llevan a cabo un seguimiento de los cambios que experimenta el SARS-CoV-2 para que, en caso de que se detecten sustituciones significativas en aminoácidos, se pueda informar a los países y a la población acerca de las medidas que se deban adoptar a fin de reaccionar ante la variante y de prevenir su propagación. Además, las autoridades deben reforzar la capacidad de vigilancia y de secuenciación, adoptar un enfoque sistemático para proporcionar una indicación representativa de la amplitud de la transmisión de las variantes del virus basada en los contextos locales y detectar cualquier suceso epidemiológico inusual.

Tabla 1. Relación de linajes detectados por secuenciación masiva en Navarra hasta septiembre de 2022

Linaje Pango	Muestras N	Países más frecuentes
AY.4	120	Reino Unido 67%, Estados Unidos de América 13%, Dinamarca 3%, España 2%, Francia 2%
AY.43	506	Alemania 16 %, Francia 10 %, Turquía 10 %, Reino Unido 8 %, Dinamarca 8 %
B.1	312	Estados Unidos de América 32 %, Emiratos Árabes Unidos 11 %, China 8 %, Alemania 8 %, Australia 4 %
B.1.1.7	2.304	Reino Unido 51%, Estados Unidos de América 13%, Alemania 9%, Suecia 4%, Países Bajos 3%
B.1.177	1.017	Importante linaje mayoritariamente europeo, resultado de la apertura de fronteras verano 2020
B.1.351	107	Sudáfrica 28 %, Bélgica 10 %, Alemania 9 %, Francia 6 %, Mayotte 6 %
B.1.575	203	Estados Unidos de América 90%, España 4%, República Dominicana 2%, Bonaire 1%, Aruba 1%
B.1.617.2	1.206	Reino Unido 65%, India 13%, Estados Unidos de América 10%, Alemania 3%, Japón 1%
BA.1	179	Reino Unido 57 %, Sudáfrica 13 %, Estados Unidos de América 5 %, Australia 4 %, Dinamarca 3 %
BA.2	1.123	Reino Unido 39%, Dinamarca 29%, Alemania 7%, India 6%, Suecia 4%
BA.2.9	126	Dinamarca 43%, Reino Unido 20%, Alemania 13%, Suecia 7%, Francia 3%
BA.5.1	380	Reino Unido 14%, Francia 13%, Alemania 11%, Dinamarca 10%, Estados Unidos de América 10%
Otros	1.395	
161 diferentes	8.978	

En el servicio de Microbiología Clínica del HUN se realizaron secuenciaciones periódicas aproximadamente cada mes. Además, desde enero 2021 se realiza a diario un estudio de mutaciones que hemos ido adaptando en función de la prevalencia de variantes y la aparición de nuevas^{18,19}. Esta es una recomendación emitida por los organismos internacionales con el objetivo de tener una aproximación rápida de las variantes circulantes (que luego es confirmada mediante la secuenciación NGS) y anticipar la toma de decisiones que se consideren oportunas. Este *screening* tiene importancia epidemiológica porque nos permite disponer de información actualizada al día, sin demoras, de nuestra situación epidemiológica, pero también condiciona qué antiviral pautar, dado que no todos los antivirales son óptimos

para todas las variantes. Se realiza generalmente por PCR específica para diferentes mutaciones o SNP. También hay reactivos (como TaqPath) que permiten estudiar la deleción 69/70 (característica de variante *Alpha*) porque dicha deleción causa que no se detecte el gen S, lo que se descubrió de manera casual en diciembre 2020; también se han observado cambios en las diferentes dianas de otros reactivos que permitían extrapolar de forma aproximada la variante.

Más de dos años después, y sin dejar de lado el profundo impacto sanitario, familiar y social que ha tenido, debemos quedarnos con lo positivo del aprendizaje realizado a todos los niveles para aplicarlo en nuestro día a día, así como para las futuras pandemias que vengan. Las vacunas han sido un elemento clave en la pandemia para disminuir la incidencia de infección por SARS-CoV2, los ingresos y la mortalidad en Navarra²⁰.

LECCIONES APRENDIDAS

Durante esta pandemia hemos aprendido algunas lecciones, unas cosas las hemos resuelto bien y otras las debemos mejorar para la próxima pandemia, ya que no dudamos de que habrá una nueva.

Entre las cosas que hemos desarrollado bien y que vale la pena recordar está el reconocer lo antes posible la presencia de la pandemia, aunque esté todavía muy lejos, por ejemplo en China, y estudiar cómo se van produciendo los hechos, para así poder anticiparnos y prepararnos con tiempo para cuando llegue a Navarra.

Tiene que haber una persona que lidere el servicio de Microbiología Clínica, que esté disponible mañana, tarde y noche de lunes a domingo. Esta persona debe convencer a las personas que trabajan en Microbiología de que van a poder resolverlo, que lo están haciendo muy bien, y solucionar todos los problemas que surjan por el camino. Para ello es importante tener contacto de forma fluida con las casas comerciales más importantes a cualquier hora del día o de la noche para que nos suministren reactivos e instalen equipos, para no quedarnos nunca desabastecidos.

Es muy necesario mantener una relación fluida con los gerentes y las autoridades sanitarias implicadas para informarles en todo momento de los resultados que obtenemos y las necesidades que tenemos... Su apoyo es fundamental para la buena marcha del servicio de Microbiología Clínica durante la época de la pandemia.

Es también necesario estar en permanente contacto con los microbiólogos, en este caso virólogos, de toda España, para saber todos como se

está trabajando en los Servicios de Microbiología en las distintas regiones, reactivos que utilizan, incidencia y variantes que tienen, etc. Hace falta una relación fluida que nos permita contactar con ellos de lunes a domingo a cualquier hora del día.

También es necesario un buen sistema de información que recoja nuestros datos y se los reporte con la máxima brevedad posible a las autoridades sanitarias. Es fundamental que los resultados de Microbiología se vuelquen automáticamente a Salud Pública y a los médicos responsables de los pacientes. Esto evitará las infinitas llamadas telefónicas que se producen al Servicio de Microbiología Clínica, que dificultan e interrumpen el trabajo de las personas que las reciben. También es necesario tener una relación telefónica fluida con Salud Pública y con otros hospitales de nuestra comunidad autónoma.

Todas estas son los puntos que hemos resuelto adecuadamente durante la pandemia. Como temas pendientes de resolver nos quedan algunas cuestiones muy importantes que señalamos a continuación.

La técnica de secuenciación masiva ha cobrado vital importancia durante esta pandemia. La buena relación con la empresa pública Nasertic ha permitido la secuenciación de miles de genomas virales en Navarra, cuando hasta hace poco los microbiólogos de toda España no teníamos ni dispositivos ni conocimientos para llevarla a cabo. El impulso que ha sufrido la secuenciación durante la pandemia nos ha llevado en la actualidad a dotar al Servicio de Microbiología Clínica del HUN con tres equipos de secuenciación. Se trata de una técnica fundamental que debemos dominar los microbiólogos y residentes no sólo para la próxima pandemia, sino para beneficiarnos de sus múltiples aplicaciones en la práctica clínica diaria.

Entre los aspectos negativos hay que señalar el cambio de personal técnico en el Servicio de Microbiología Clínica durante la pandemia. En algunos casos se producía porque las personas estaban agotadas y ya no podían más, pero en otras ocasiones se debió a que la concesión de contratos tiene que seguir las listas de contratación sin tener en cuenta la experiencia de los técnicos en la realización de la técnica PCR. Esto supuso la formación continua de técnicos. Se debería repensar el criterio de contratación ya que no se puede estar formando personal en plena pandemia cuando ya hay profesionales conocedores de las técnicas.

Por último, hemos echado en falta, y es algo a mejorar, disponer de industria propia en España que nos permita ser autosuficientes como país para todo tipo de material sanitario crítico: fungible, PCR, vacunas, fármacos. No es admisible que en un campo tan sensible como la salud dependamos tanto de terceros países.

En resumen, disponer de un Servicio de Microbiología Clínica dotado, equipado, autosuficiente y con personal técnico especialista en laboratorio bien formado en laboratorio permite ofrecer un diagnóstico diario de calidad y afrontar con mejor solvencia las alertas infecciosas que puedan generarse.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Alocución de apertura del Director General de la OMS en la rueda de prensa sobre la COVID-19 celebrada el 11 de marzo de 2020. <https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>
2. LIU DX, LIANG JQ, FUNG TS. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of Virology 2021*: 428-440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>
3. Organización Mundial de la Salud. Noticias sobre brotes de enfermedades. Cepa variante del SARS-CoV-2 asociada a visones – Dinamarca – China. <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/2020-DON229>
4. Ministerio de Ciencia e innovación. Instituto de salud Carlos III. Informe del grupo de análisis científico de coronavirus del ISCIII (GACC-ISCIII) origen del sars-cov-2. https://www.conprueba.es/sites/default/files/noticias/2020-04/ORIGEN%20DEL%20SARS-COV-2_3.pdf
5. DHAMA K, KHAN S, TIWARI R, SIRCAR S, BHATD S, MALIK YS et al. Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clin Microbiol Rev* 2020; 33 (4): e00028-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>
6. KOOPMANS M. Initial assessment of the ability of published coronavirus primers sets to detect the Wuhan coronavirus SARS-CoV-2. <https://virological.org/t/initial-assessment-of-the-ability-of-published-coronavirus-primers-sets-to-detect-the-wuhan-coronavirus/321>
7. CILLA EGUILUZ G, NAVARRO MARI JM, GALÁN MONTEMAYOR JC, FOLGUEIRA LÓPEZ MD, PUMAROLA SUÑÉ T. Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2021: 73. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento73.pdf>
8. TROBAJO-SANMARTÍN C, ADELANTADO M, NAVASCUÉS A, GUEMBE MJ, RODRIGO-RINCÓN I, CASTILLA J et al. Self-collection of saliva specimens as a suitable alternative to nasopharyngeal swabs for the diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *J Clin Med* 2021; 10(2): 299. <https://doi.org/10.3390/jcm10020299>
9. TROBAJO-SANMARTÍN C, NAVASCUÉS A, MIQUELEIZ A, EZPELETA C. Evaluation of the rapid antigen test CerTest SARS-CoV-2 as an alternative COVID-19 diagnosis technique. *Infect Dis (Lond)* 2021 Sep; 53(9): 730-732. <https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1902563>
10. WÖLFEL R, CORMAN VM, GUGGEMOS W, SEILMAIER M, ZANGE S, MÜLLER MA et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; 581: 465-469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>

11. FOLGUEIRA MD, LUCZKOWIAK J, LASALA F, PÉREZ-RIVILLA A, DELGADO R. Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27: 886-891. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.014>
12. BORREMANS B, GAMBLE A, PRAGER KC, HELMAN SK, MCCLAIN AM, COX C et al. Quantifying antibody kinetics and RNA detection during early-phase SARS-CoV-2 infection by time since symptom onset. *Elife* 2020; 9: e60122. <https://doi.org/10.7554/eLife.60122>
13. MUECKSCH F, WISE H, BATCHELOR B, SQUIRES M, SEMPLE E, RICHARDSON C et al. Longitudinal serological analysis and neutralizing antibody levels in coronavirus disease 2019 convalescent patients. *J Infect Dis* 2021; 223(3): 389-398. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa659>
14. PÉREZ-GÓMEZ B, PASTOR-BARRIUSO R, PÉREZ-OLMEDA M, HERNÁN MA, OTEO-IGLESIAS J, FERNÁNDEZ DE LARREA N et al. ENE-COVID nationwide serosurvey served to characterize asymptomatic infections and to develop a symptom-based risk score to predict COVID-19. *J Clin Epidemiol* 2021; 139: 240-254. <http://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2021.06.005>
15. CASTILLA J, LECEA O, MARTÍN SALAS C, QUÍLEZ D, MIQUELEIZ A, TROBAJO-SANMARTÍN C et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 and risk of COVID-19 in Navarre, Spain, May to July 2022. *Euro Surveill* 2022; 27. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.33.2200619>
16. LÓPEZ MG, CHINER-OMS Á, GARCÍA DE VIEDMA D, RUIZ-RODRIGUEZ P, BRACHO MA, CANCINO-MUÑOZ I et al. The first wave of the COVID-19 epidemic in Spain was associated with early introductions and fast spread of a dominating genetic variant. *Nat Genet* 2021; 53: 1405-1414. <http://doi.org/10.1038/s41588-021-00936-6>
17. TROBAJO-SANMARTÍN C, MIQUELEIZ A, PORTILLO ME, FERNÁNDEZ-HUERTA M, NAVASCUÉS A, SOLA SARA P et al. Emergence of SARS-CoV-2 variant B.1.575.2, containing the E484K mutation in the spike protein, in Pamplona, Spain, May to June 2021. *J Clin Microbiol* 2021; 59: e0173621. <http://doi.org/10.1128/JCM.01736-21>
18. TROBAJO-SANMARTÍN C, MIQUELEIZ A, PORTILLO ME, FERNÁNDEZ-HUERTA M, NAVASCUÉS A, CASTILLA J et al. Utility of a commercial RT-qPCR assay to detect SARS-CoV-2 gene variations as an indicator of lineages. *J Virol Methods* 2022; 300: 114428. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114428>
19. European Centre for Disease Prevention and Control. Methods for the detection and characterisation of SARS-CoV-2 variants – second update. Actualizado el 2 de agosto 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/methods-detection-and-characterisation-sars-cov-2-variants-second-update>
20. MARTÍNEZ-BAZ I, MIQUELEIZ A, CASADO I, NAVASCUÉS A, TROBAJO-SANMARTÍN C, BURGUI C et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection and hospitalisation, Navarre, Spain, January to April 2021. *Euro Surveill* 2021; 26. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.21.2100438>