



Autores: Federico García¹, Santiago Melón² David Navarro³,
José Ramón Paño⁴ y Juan Carlos Galán⁵

Editores: Juan Carlos Galán⁵ y José Ramón Paño³

1. Servicio de Microbiología. Hospital San Cecilio. Granada
2. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo
3. Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. Valencia
4. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínico Universitario. Zaragoza
5. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

ÍNDICE

1. Introducción.....	2
2. Técnicas de diagnóstico microbiológico de COVID-19 disponibles en la actualidad	3
3. Priorización de las técnicas de detección de SARS-CoV-2 en función del escenario epidemiológico.....	4
3.1. Necesidad de adaptar la estrategia diagnóstica al escenario epidemiológico y de planificar la escalada de la capacidad diagnóstica del sistema a los escenarios menos favorables.....	4
3.2. Estrategia de diagnóstico microbiológico y herramientas para su implementación en diferentes escenarios epidemiológicos	4
3.3. Categorización de las muestras en origen según el contexto clínico-epidemiológico para facilitar la priorización del diagnóstico y la selección de técnicas diagnósticas.	6
4. Estrategias de optimización de las técnicas de diagnóstico microbiológico	7
4.1. Implementar el trabajo por “pooles” de muestras.....	7
4.2. Utilización de muestras alternativas.....	8
4.3. Laboratorios de diagnóstico integral con otros virus respiratorios	8
4.4. Diferenciar áreas Covid de áreas no Covid	9
4.5. Cómo prevenir el impacto de las roturas de stock	9
5. Seguimiento microbiológico de los pacientes COVID-19.....	11
5.1. Detección de RNA viral mediante RT-PCR e infectividad.....	11
5.2. Anticuerpos e infectividad.....	12
5.3 Seguimiento microbiológico para determinar el pronóstico del paciente COVID-19 ..	13
Referencias	14

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico microbiológico de la infección SARS-CoV-2 tiene dos objetivos. En primer lugar, tiene un objetivo clínico ya que permite llegar al diagnóstico etiológico en pacientes con infección respiratoria aguda. En pacientes con infección moderada o grave por SARS-CoV-2 el diagnóstico microbiológico es esencial para identificar a aquellas personas que se benefician de un tratamiento específico. Por otro lado, el diagnóstico microbiológico tiene un objetivo epidemiológico que es el de identificar pacientes contagiosos para poder aislarlos, analizar los contactos y cortar así las cadenas de transmisión. Es por tanto uno de los elementos fundamentales en la estrategia de control de la pandemia COVID-19, aunque su valor para este fin depende enormemente de la implementación de estrategias de aislamiento de los individuos que pueden transmitir el virus.

En el actual contexto epidemiológico de la pandemia COVID-19, de cara al inicio de la temporada de infecciones respiratorias causadas por virus respiratorios estacionales, cuyas manifestaciones son frecuentemente indistinguibles de COVID-19, es necesario integrar la detección de SARS-CoV-2 en el algoritmo diagnóstico junto con esos virus estacionales (ver Documento de estrategia diagnóstica de infecciones respiratorias). Por este motivo se prevé una fuerte demanda de diagnóstico microbiológico de COVID-19 de forma sostenida en los próximos meses que pueden amenazar la capacidad del sistema. En este contexto se elabora este documento que pretende:

- **Describir las principales características de las técnicas de laboratorio** disponibles para el diagnóstico microbiológico de COVID-19.
- **Propuesta para priorizar la utilización de las técnicas de laboratorio** para la detección de SARS-CoV-2 en función del contexto clínico y/o epidemiológico.
- Diseño de **estrategias de optimización de uso de las técnicas de diagnóstico microbiológico de COVID-19** con la intención de contribuir a evitar la saturación del sistema y de minimizar el impacto de limitaciones o incidencias derivadas de la sobrecarga de la cadena de suministros.

2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE COVID-19 DISPONIBLES EN LA ACTUALIDAD

	RT-PCR (exudado nasofaríngeo /orofaríngeo)	RT-PCR (saliva)	RT-PCR en exudado nasofaríngeo (Multiplex)	Test antigénicos rápidos de última generación (exudado nasofaríngeo)	Test de determinación de anticuerpos
Sensibilidad	85-90% (<i>Gold standard</i>)	Muy variable (5-91%)"	Similar al <i>gold standard</i>	<ul style="list-style-type: none"> Sintomáticos: >95% Asintomáticos: (escasa evidencia) 	Dependiente del tiempo desde inicio de síntomas <ul style="list-style-type: none"> 1-5 d: <50% 6-10 d: 50-75% 10-20 d: >75% >20 d: >90%
Especificidad	99,5% (<i>Gold Standard</i>)	Similar al <i>gold standard</i>		95-99%	90- 99%
Hisopo	Sí	No	Sí	Sí	No
Toma de muestra por personal especializado	Sí	No	Sí	Sí	Sí* / No** * Venopunción ** Sangre capilar
POC†	No	No	No	Sí	Sí / No
Pooling‡	Sí	Sí	No	No	Teóricamente posible
Tiempo de respuesta	1-6h¶	2-6h¶	2-6h¶	15 min	15 min-3 h
Comentarios	<ul style="list-style-type: none"> La sensibilidad depende de diferentes factores, entre ellos la calidad de la toma de la muestra y el tiempo desde el contacto. En pacientes asintomáticos, si la toma se realiza antes de a 4 días desde le contacto la sensibilidad es <80%. La especificidad de la RT-PCR. Es la técnica diagnóstica con mayor especificidad. Sin embargo, no permite discriminar con precisión entre una infección aguda y una infección resuelta. Tipo de muestra: En algunos lugares se recomienda doble toma naso- y orofaríngea. Recomendamos la muestra nasofaríngea por haber demostrado mayor sensibilidad. La orofaríngea es una buena alternativa en caso de rotura de stocks de torundas para muestras nasofaríngeas. 	<ul style="list-style-type: none"> Técnica ideal de recogida: saliva escupida. Sensibilidad. En un estudio de validación con muestras de aproximadamente 2000 pacientes, la sensibilidad fue del 5% en pacientes con carga viral baja (<20.000 copias/mL) y del 97% en individuos con cargas virales intermedias o altas. (Agencia Federal Belga del Medicamento y Productos Sanitarios). En otro estudio, la RT-PCR en saliva fue positiva en el 81% de los pacientes con infección confirmada frente al 71% mediante RT-PCR en frotis nasofaríngeo (Willye et al. NEJM 2020)1 El tratamiento con proteinasa K y choque térmico parece aumentar la sensibilidad de la técnica hasta hacerla comparable a la de la RT-PCR en exudado nasofaríngeo en pacientes sintomáticos. Las discrepancias observadas en la sensibilidad snslítica dificultan un posicionamiento definitivo más claro en ausencia de más evidencia. 	<ul style="list-style-type: none"> Se prevé disponibilidad más limitada. No útiles para entornos en los que exista una alta demanda de detección de SARS-CoV-2 Encarece significativamente el coste La combinación más extendida será: SARS-CoV-2+ gripe (idealmente diferenciando gripe A y B en pacientes que requieran ingreso) +/-VRS en población pediátrica y geriátrica 	<ul style="list-style-type: none"> Existen varios kits comerciales de detección de antígeno de nueva generación entre los que existe variabilidad en la sensibilidad y especificidad. Sensibilidad en sintomáticos: >93%: Panbio Covid-19 (Abbott) bajo condiciones óptimas de uso (ensayo realizado durante los primeros 5-7 días tras el inicio de la clínica) según estudio de validación por CNM. Sensibilidad en asintomáticos: Existe poca experiencia aún. Los resultados aportados por el CNM alcanzan hasta el 90% con Panbio Covid-19 (Abbott). Sería importante disponer de información con un mayor número de pacientes y en distintos contextos El contexto idóneo de utilización de esta técnica depende de sus VPP y VPN que están condicionados por su sensibilidad y especificidad (dependientes del modelo) así como por la probabilidad pre-prueba. Requiere un hisopado independiente al necesario para RT-PCR. No tiene riesgos asociados de bioseguridad, una vez realizada la toma de la muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> Principal utilidad: estudio de seroprevalencia Criterio diagnóstico de infección pasada. Aporta información sobre la cronología de infecciones asintomáticas Como criterio de apoyo para la reincorporación de trabajadores sanitarios con PCR positiva y Ct elevados No es el método idóneo de diagnóstico de pacientes con infección sintomática.

Tabla 1. Resumen de las diferentes técnicas de detección de SARS-CoV-2. † POC (Point-of-care): posibilidad de realización en el lugar de la toma. ‡ ¶ En las pruebas que no son POC (deben realizarse en laboratorios localizados a distancia del lugar de la toma de la muestra) hay que añadir el tiempo necesario para el envío y el procesamiento preanalítico de las muestras

3. PRIORIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE SARS-COV-2 EN FUNCIÓN DEL ESCENARIO

3.1. Necesidad de adaptar la estrategia diagnóstica al escenario epidemiológico y de planificar una escalada progresiva de la capacidad diagnóstica del sistema a los escenarios menos favorables.

Durante primera ola pandémica, se comprobó que las medidas previstas de escalamiento de la capacidad diagnóstica de los centros hospitalarios eran insuficientes para dar respuesta a la enorme demanda asistencial generada, por lo que un mayor grado de descentralización podría ser una buena estrategia para agilizar el diagnóstico.

Para ello, es necesario que todos los laboratorios o servicios de Microbiología dispongan de soporte técnico adecuado para realizar los ensayos de diagnóstico de COVID-19 basados en la detección del virus (antígeno y/o genoma) y en aquellos que no dispongan de esta capacidad deben de convertirse en una prioridad para los centros hospitalarios de los que dependen. Una vez garantizado este punto será conveniente conocer la capacidad diagnóstica real del conjunto de los laboratorios de Microbiología en España.

Estas acciones previas permitirán proponer un sistema de escalonamiento coordinado y en red, entre los diferentes laboratorios de una misma área geográfica acorde a la población atendida, para evitar la dispersión del virus.

3.2. Estrategia de diagnóstico microbiológico y herramientas para su implementación en diferentes escenarios epidemiológicos

En Mayo de 2020, el CDC propuso una planificación frente a la pandemia en 4 escenarios, basado en características clínicas-microbiológicas y epidemiológicas, recientemente actualizada (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planning-scenarios.html#table-1>)³. Nuestras capacidades diagnósticas se han adaptado a esa propuesta de 4 escenarios posibles (**Tabla 2**). En los escenarios 1 y 2 es clave la coordinación y la transferencia de información con Salud Pública y Atención Primaria, definiendo canales de comunicación directos. En los escenarios 3 y 4 es más importante la estrecha cooperación entre los laboratorios de Microbiología con sus diferentes capacidades, para disponer de densas redes de cooperación.

Tabla 2. Propuesta de las estrategias diagnósticas adaptadas a la circulación del virus.

	Escenario 1 Baja o nula circulación viral	Escenario 2 Circulación viral con brotes localizados	Escenario 3 Transmisión comunitaria	Escenario 4 Saturación del sistema hospitalario
Objetivos del diagnóstico de SARS-CoV-2	<ul style="list-style-type: none"> • Cribado de individuos procedentes de zonas con transmisión comunitaria de SARS-CoV-2. • Vigilancia de población residente, incluyendo lugares donde se concentren personas vulnerables (residencias de ancianos) o por confinamiento obligatorio (centros penitenciarios, centros de internamiento psiquiátrico...) 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de SARS-CoV-2 en pacientes sintomáticos • Investigación y control de los brotes. • Despistaje de SARS-CoV-2 en los contactos de los casos estrechos. • Cribados poblacionales periódicos en entornos epidemiológicos estratégicos (como trabajadores sanitarios y centros sociosanitarios). Tiempo de respuesta ideal < 24h. Si las autoridades sanitarias lo consideren oportuno⁴ 		<ul style="list-style-type: none"> • Los objetivos del diagnóstico son similares a los de los escenarios 2 y 3, garantizando los estudios de muestras de los pacientes más graves.
Herramientas para la implementación	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades descentralizadas capacitadas para la realización de ensayos POC • Programas de vigilancia epidemiológica de la población residente 	<ul style="list-style-type: none"> • Las pruebas de detección de antígeno viral tienen las propiedades diagnósticas y las características necesarias para su implementación como POC en Atención Primaria o en grupos cerrados en investigación de brotes para estudio de pacientes sintomáticos, pero requiere de una gran coordinación con los servicios de Microbiología (modelo de diagnóstico descentralizado e integrado). • RT-PCR (servicios de Microbiología): trabajo por "pooles" de muestras para los estudios poblacionales de cribado o incluso en los estudios de contactos². El tamaño de los pooles estará condicionado por la prevalencia estimada. Así, por ejemplo, se acepta pooles de 5 muestras con 5% de pruebas positivas esperadas⁵. 	<ul style="list-style-type: none"> • Categorización en origen de las muestras según su contexto clínico o epidemiológico. • Urgencias: • Pruebas de detección de antígeno viral o PCR para pacientes sintomáticos que no requieran ingreso • Técnicas rápidas moleculares de SARS-CoV-2 (y potencialmente gripe cuando co-circulen ambos virus) en pacientes con factores de riesgo y requieran ingreso. • Microbiología (hospitales de tercer nivel): • Disponibilidad de >1 plataforma de diagnóstico molecular altamente automatizada (considerar una plataforma diagnóstica por cada 600-750 muestras/día recibidas) • Continuidad asistencial 24/7 en hospitales de tercer nivel. • Trabajo por "pooles" en función de la tasa de circulación comunitaria³. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los hospitales deberán disponer de sistemas de detección rápidos en pacientes que accedan a Urgencias. • La determinación de ARNemia puede ser de ayuda como factor pronóstico de síndrome severo⁶ • El trabajo por "pooles" no será recomendado. • Implementar en casos graves diagnóstico diferencial con otros virus y/o bacterias relacionadas con neumonía
Técnicas de diagnóstico microbiológico	<ul style="list-style-type: none"> • Se podrían considerar casi indistintamente: • RT-PCR • Antígeno viral* • *En pacientes sintomáticos con alta probabilidad pre-prueba y un primer resultado negativo habría que realizar una segunda prueba a las 48h. Poca o nula experiencia en el diagnóstico precoz de pacientes asintomáticos o para el cribado poblacional. 			
Comentarios	<ul style="list-style-type: none"> • El diagnóstico mediante POC debe estar bien coordinado con los laboratorios o servicios de Microbiología 	<ul style="list-style-type: none"> • La implementación de estas medidas supone un incremento alto del número de muestras y por tanto una alta sobrecarga a los laboratorios de Microbiología que debe evaluarse previamente. • En todos los centros sanitarios que dispongan de un microbiólogo, éste deberá estar capacitado y disponer de los recursos técnicos adecuados. • En aquellos que no dispongan de esta posibilidad, se establecerá una cooperación dinámica con los servicios de Microbiología de tercer nivel más próximos para encontrar las soluciones más viables. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los laboratorios de Microbiología deben cuantificar sus capacidades máximas manteniendo un tiempo de respuesta <24h. • Si se sobrepasa la capacidad de respuesta se activarán circuitos de canalización de muestras hacia hospitales de referencia próximos (canalizar preferentemente muestras que no impliquen a los pacientes más graves ni a las poblaciones más vulnerables). • Los centros receptores deberán disponer un plan director de escalonamiento progresivo de recursos técnicos y humanos para absorber esta demanda. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es recomendable establecer grupos multidisciplinares con otros laboratorios de servicios centrales (Inmunología, Rayos, Bioquímica...) para disponer de la mayor información sobre las alternativas de diagnóstico y seguimiento de los pacientes. • Buscar alternativas para reforzar las capacidades diagnósticas en los hospitales de primer y segundo nivel.

3.3. Categorización de las muestras en origen según el contexto clínico-epidemiológico para facilitar la priorización del diagnóstico y la selección de técnicas diagnósticas.

En situaciones con aumento importante de la demanda de realización de pruebas, los laboratorios y servicios de Microbiología deben ser capaces de priorizar de la manera más fácilmente posible las muestras de los pacientes que más se benefician del diagnóstico microbiológico o que tienen un mayor impacto en el manejo de la epidemia.

La prioridad del diagnóstico microbiológico es mayor en pacientes sintomáticos graves o vulnerables seguido de pacientes que necesiten ingreso hospitalario por otras patologías, y finalmente de otros pacientes sintomáticos. El estudio de brotes en ámbitos estratégicos y determinados entornos como centros sanitarios, sociosanitarios o educativos debería tener también una prioridad alta (**Tabla 3**).

Se debe implementar un sistema de solicitud de pruebas de diagnóstico de SARS-CoV-2 que incluya la categorización de la prueba en relación con su contexto clínico o epidemiológico para facilitar la priorización de los estudios microbiológicos por parte de los laboratorios y servicios de Microbiología.

Orden de prioridad	Contexto	Número de muestras	Rapidez de respuesta	Comentario	ExNF-PCR	ExNF-Antígeno ¹	Saliva-PCR ^{2,3}	Pooling-ExNF-PCR ^{3,4}	Pooling-Saliva-PCR ^{3,4}
1a	Paciente sintomático grave	+	< 1-6 h	• Pacientes sintomáticos que requieren hospitalización	***	**	*	0	0
1b	Paciente sintomático vulnerable ⁴		< 24 h	• Pacientes vulnerables sin datos de gravedad, que no requieren hospitalización	**	***	**	0	0
2	Estudio de brotes activos	+/+++ (volumen muy variable según la fase de la epidemia)	< 24 h	• Pacientes sintomáticos	**	***	**	*3	*
				• Pacientes asintomáticos	***	**	**	*	*
3	Prevención de brotes en ámbitos estratégicos (Pacientes asintomáticos)	++ (volumen relativamente estable de muestras)	24-48 h	• Cribado preingreso hospitalario, centros sociosanitarios o en residencias de ancianos • Cribado a profesionales sanitarios y de residencias asintomáticos	***	**	*	*	*
4	Persona sintomática no grave/no vulnerable fuera del contexto de un brote	+/+++	24 - 48 h		**	***	**	*	*
5	Contactos estrechos de pacientes SARS-CoV-2	+/+****	24 - 48h	• Volumen muy variable según la fase de la epidemia	**	**6	*	***	***
6	Cribados aleatorios o no aleatorios a poblaciones de alto riesgo	+++++	24 - 72 h		*	*6	**	***	***

Tabla 3. Categorización y priorización de las muestras según el contexto clínico y epidemiológico. Priorización de las técnicas microbiológicas en cada uno de los contextos anteriores (el número de + se relaciona con la preferencia de cada estrategia en cada población descrita). **ENF:** exudado nasofaríngeo. ******* De elección. ****** Alternativa (1ª). ***** Alternativa (2ª). **0.** No apropiado. **1.** Si S> 80% en el contexto de uso (en pacientes sintomáticos habitualmente con evolución de síntomas ≤5-7 días). **2.** Uso preferente si problema de disponibilidad de hisopos o para autotoma. **3.** Requiere validación local previa **4.** Sólo si probabilidad preprueba ≤15% **5. Población vulnerable:** Enfermedad pulmonar crónica (incluido asma), cardiovascular, renal, hepática, hematológica, trastornos metabólicos, o neurológicos, mujer embarazada, pacientes institucionalizados. **6.** Según su rendimiento, podrían plantearse las pruebas combinadas de Ag y Ac que algunas casas comerciales están desarrollando

4. ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

4.1. Implementar el trabajo por “pooles” de muestras

Concepto

El análisis de muestras por “pooles” consiste en el análisis conjunto de un número variable de muestras para que, en caso de obtenerse un resultado positivo, realizar el análisis unitario de todas y cada una de las muestras del conjunto.

Se trata de una estrategia de optimización de recursos utilizada hace décadas en campañas de diagnóstico serológico masivo, que se sigue empleando actualmente en el ámbito de la sanidad animal.

Circunstancias necesarias para plantear el análisis de muestras por “pooles”

El análisis de muestras por “pooles” debe plantearse exclusivamente cuando la prevalencia de casos positivos no sea superior al 15%. Las situaciones que pueden inducir al trabajar por “pooles” son cuando

- Se supere la capacidad de realización de PCRs individuales del laboratorio y/o
- Ante la posibilidad de escasez de recursos materiales o la cuando las limitaciones de los recursos económicos lo demanden.

Aspectos técnicos relacionados con el análisis de muestras por “pooles”

- **Número de muestras por “pool”.** Dependerá de la prevalencia poblacional como medida de la probabilidad pre-prueba (a mayor tasa de positivos, menor número de muestras por “pool”). Un reciente artículo sugiere que el número idóneo son 5 muestras por pool⁵; sin embargo, esta estimación debería estar referida a la prevalencia esperada en la población analizada. Así la modelización matemática de este mismo trabajo sugiere que, si la prevalencia esperada es 15%, 5% o 1%, el número de muestras incluidas por pool sea 3, 5 u 11, con una reducción en el número de pruebas de 28%, 57% y 80% respectivamente. Otros autores han estimado que para prevalencia entre 1-2%, y aceptando una sensibilidad y especificidad del 95 y 100% respectivamente, el tamaño muestral de los pooles podría ser 25.16 muestras (<https://www.chrisbilder.com/shiny>).
- **Momento de creación de los “pooles” o grupos de muestras.** La extracción del material genético esta siendo uno de los cuellos de botella en los estudios moleculares para la detección de SARS-CoV-2. Por lo tanto, el momento ideal para optimizar recursos de material es en la etapa previa a la extracción, de manera que la extracción no corresponda a una única muestra sino a un grupo de muestras.
- **El trabajo por “pooles” no tiene por qué implementarse en todas las muestras que se reciben en el laboratorio.** Si se dispone de grupos de muestras con menor prevalencia (como por ejemplo, estudios de contactos o cribado en población asintomática) que se puedan localizar fácilmente, estos grupos serán prioritarios y siempre que esa estrategia no suponga un retraso significativo en la emisión de resultados.
- Para la implementación del trabajo por “pooles” recomendamos seguir las indicaciones de los CDCs y de las siguientes herramientas/aplicaciones <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html>

- **Validación interna.** Previo al trabajo por “pooles” consideramos recomendable realizar una validación interna del procedimiento elegido en el laboratorio en el que se vaya a implementar.
- Recientemente se ha propuesto también el uso de pooles en muestras de saliva (<https://doi.org/10.1101/2020.09.02.20183830>)⁷.

Barreras y limitaciones

1. **Pérdida de sensibilidad:** En varios ejemplos publicados, las muestras que se analizan en pooles se diluyen entre 1/5- 1/10. Hay que tener en cuenta que esta dilución de la muestra se traduce en un retraso de 3 ciclos en la RT-PCR
2. **Pérdida de trazabilidad de las muestras.** Un factor que ningún trabajo ha tenido en cuenta es la trazabilidad de las muestras. Actualmente ni las aplicaciones de los sistemas comerciales de RT-PCR ni los sistemas informáticos de los laboratorios de Microbiología poseen una herramienta para garantizar la trazabilidad de las muestras cuando se emplea el *pooling*, en especial para la emisión de resultados.
3. Falta de automatización De igual manera, debe considerarse una limitación la automatización de la realización de “pooles”, que no estará disponible en todos los laboratorios.

Para la implementación del trabajo por “pooles” recomendamos seguir las indicaciones de los CDC donde se pueden encontrar las siguientes herramientas/aplicaciones <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html>⁸

4.2. Utilización de muestras alternativas

Si bien el exudado nasofaríngeo ha sido la muestra recomendada para la detección del virus, la escasez de torundas adecuadas para la toma nasofaríngea durante la primera ola pandémica (ver epígrafe de roturas de stocks) ha planteado la búsqueda de alternativas a la muestra nasofaríngea como la saliva. La muestra de saliva, recogida incluso por el mismo individuo, ha presentado resultados prometedores, e incluso mejores que el exudado nasofaríngeo en paciente con menos de 10 días de evolución¹. Esta muestra tiene una serie de ventajas como fácil recogida o almacenaje a distintas temperaturas sin disminuir la capacidad diagnóstica⁹. También se ha ensayado la muestra de saliva en pooling con un rendimiento aceptable⁷. Un problema de la recogida de saliva, puede ser la seguridad de la muestra y su capacidad infectiva. Existen recipientes que pueden inactivar el virus una vez en contacto con la muestra.

En resumen, la muestra de saliva parece una buena alternativa al exudado nasofaríngeo en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2: su rendimiento es bueno y la autonomía para su obtención facilitaría todo el proceso.

4.3. Laboratorios de diagnóstico integral con otros virus respiratorios

Existe una alta probabilidad de una coincidencia temporal de infecciones por SARS-CoV-2 con otros virus respiratorios estacionales como virus respiratorio sincitial (VRS) y con los virus de la gripe en el próximo otoño-invierno y que su diagnóstico no debe separarse de un diagnóstico viral sindrómico respiratorio. Este hecho exigirá plantear un diagnóstico diferencial de, al menos, SARS-CoV-2, gripe en un gran número de pacientes (y VRS en población infantil y geriátrica).

Sin embargo, este posible escenario que requiera un diagnóstico diferencial de al menos 3 virus coincidirá con casos de diagnóstico exclusivo de SARS-CoV-2 (estudios de contactos, protocolos prequirúrgicos, o seguimiento de pacientes diagnosticados), lo que complicará los circuitos internos de muestras en un laboratorio dedicado exclusivamente a SARS-CoV-2. Se propone un algoritmo general basado en técnicas de diagnóstico rápido para cribado de SARS-CoV-2 en población general sintomática, de SARS-CoV-2 y gripe en población sintomática con factores de riesgo de complicaciones que se beneficiaría de un tratamiento precoz con oseltamivir y de SARS-CoV-2, gripe (A y B) y VRS en población que requiera ingreso (donde la necesidad de establecer precauciones de contacto y gotas de forma selectiva según el patógeno obliga al diagnóstico etiológico específico- **Ver módulo III de organización asistencial del documento SEIMC**),

Al menos en centros hospitalarios de tercer nivel, será conveniente implementar paneles multidianas de otros virus respiratorios (como picornavirus, coronavirus endémicos, parainfluenzavirus, metapneumovirus y adenovirus) y algunas bacterias (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*) para complementar el diagnóstico en situaciones especiales como pacientes hospitalizados con inmunosupresión más o menos significativa. Por otra parte, debido a los casos de sobreinfecciones bacterianas en pacientes de UCI detectadas durante la pandemia en primer semestre de 2020, debería en estos casos evaluarse la posibilidad de detectar en vías respiratorias inferiores, bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* por técnicas moleculares rápidas, además de los cultivos bacterianos (**Ver módulo I de estrategia diagnóstica del Documento SEIMC**).

4.4. Diferenciar áreas Covid de áreas no-Covid

En las situaciones de alta circulación viral en la población y alta de afluencia de personas a los centros hospitalarios (escenarios epidemiológicos 3 y 4), el número de muestras para detección de SARS-CoV-2 en los laboratorios de Microbiología se incrementará significativamente.

Para optimizar el trabajo, en la medida de lo posible se establecerán circuitos independientes para muestras de diagnóstico COVID y no-COVID, desde la recepción hasta el manejo interno en el laboratorio. Para ello, es importante que cada centro evalúe las posibilidades y diseñe un plan de flujo de muestras en un espacio exclusivamente destinado a diagnóstico de este virus (*laboratorio COVID*), así como una agrupación de los pacientes por cohortes (COVID+, gripe+ y COVID/gripe+).

Con el fin de garantizar los tiempos de respuesta antes descritos, los laboratorios deberán contar con suficiente personal bien preparado para el manejo de muestras acorde a la carga asistencial y recursos humanos de cada centro, pero organizados en 3 turnos diarios para alcanzar el objetivo de *laboratorios COVID 24/7*, en todos los laboratorios de Microbiología. El personal técnico adscrito al *laboratorio COVID* deberá organizarse en puestos rotatorios acorde a un flujo interno de muestras previamente establecido en cada laboratorio (**Ver módulo III de organización asistencial del documento SEIMC**)

4.5. Cómo prevenir el impacto de las roturas de stock

Esta situación puede darse en cualquier momento y es difícil hacer recomendaciones generales ante posibles escenarios de faltas de reactivos o de cualquier otro material necesario en el laboratorio para el diagnóstico de COVID-19. Sin embargo, nos gustaría sugerir algunas recomendaciones generales:

- 1) Se debe **evitar**, por insolidario y poco eficiente, el **plantear acopio de material en cada centro, más allá de lo necesario para 2 semanas**.
- 2) Ante la **falta de medios de transporte de virus** el ECDC recomienda torunda para toma orofaríngea en medio salino estéril.
- 3) **Si faltan los hisopos para la toma de exudado nasofaríngeo**, considerar la **saliva como muestra principal** para el diagnóstico. El 14 de agosto, la FDA aprobó un sistema basado en toma de saliva sin necesidad de preservantes ni extracción de ARN con resultados similares a las técnicas de referencia (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.03.20167791v1>). Otra alternativa a la torunda flexible para muestra nasofaríngea es la torunda rígida para muestra orofaríngea.
- 4) Ante **falta de reactivos de extracción**:
 - Trabajo por “pools” si la prevalencia estimada lo permite.
 - Trabajar con plataformas que integren extracción y amplificación.
 - Según el ECDC, se puede realizar un pretratamiento con proteinasa K y posterior calentamiento de la muestra (95°C/5 min), en lugar de la extracción de ARN, esto debe ir seguido del uso de un control interno para garantizar que se haya incluido suficiente ARN en la reacción de RT-PCR. Es importante, señalar que en este caso se observa un retraso de 2 Ct en la amplificación. (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.08.03.20167791v2>)
 - La muestra de saliva podría ser una solución adecuada como se comentó anteriormente.
- 5) Ante **falta de reactivos de amplificación**. Si la circulación del virus es alta, se puede plantear usar una única diana (siempre que los tests diagnósticos permitan usar independientemente cualquier diana de su ensayo). En otros casos se ha recurrido a reducir a la mitad el volumen de la reacción, con resultados similares.

5. SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO DE LOS PACIENTES COVID-19

5.1 Detección de ARN viral mediante RT-PCR e infectividad

El valor de *cycle threshold* (Ct)

En ausencia de estándares de cuantificación (ej. virus inactivado o plásmido/s que contienen la/s secuencia/s diana), las técnicas de RT-PCR proporcionan una estimación semicuantitativa de la carga viral. En este sentido, el ciclo umbral de positividad -*cycle threshold* (Ct)- se correlaciona inversamente con la carga viral.

Para una misma muestra que contiene ARN viral, los Ct que proporcionan distintas RT-PCR pueden ser diferentes, incluso cuando la secuencia diana de éstas es la misma. En lo que respecta a las muestras del tracto respiratorio superior positivas por RT-PCR, si son de baja calidad (poca celularidad) el Ct puede no reflejar fielmente la carga viral presente en ese compartimento; el “delta Ct”, esto es la diferencia entre el Ct de la secuencia diana y el Ct de una secuencia de un gen celular (control “*housekeeping*”), como RNAsa P o beta-glucuronidasa, provee una información más precisa sobre la carga viral real.¹⁰

La detección de ARN viral no supone necesariamente la presencia de virus infectivo en las muestras clínicas, sean éstas de la naturaleza que sean. No obstante, existe una relación inversa entre la magnitud del Ct y la probabilidad de recuperar virus infectivo a partir de muestras del tracto respiratorio (si bien esta correlación varía según la diana y las características analíticas de la RT-PCR considerada)¹¹. A continuación se resume la evidencia disponible:

1. Un trabajo¹² observó que la probabilidad de cultivar el virus decrece un 32% por cada unidad de Ct a partir de un Ct de 24.
2. Otros autores reportaron que las muestras con un Ct >33-34 no contenían virus infectivo¹³.
3. Sin embargo, en un estudio reciente se observó que hasta un 25% de las muestras con Ct >30 se correspondían con virus potencialmente infectivo. En dicho trabajo Ct<25 se asociaron con una probabilidad del 85% de los casos y del 66% para Ct<30¹⁴
4. Recientemente se ha consensuado que un valor de Ct>30 podría corresponder a un proceso infeccioso en fase de resolución, siendo el individuo no contagioso. La variabilidad observada en el valor de Ct que discrimina entre virus infectivo y no infectivo no permite seleccionar un valor único, ya que este valor depende de múltiples factores técnicos (p. ej. el número y tipo de dianas). Una aproximación más precisa a la transmisibilidad consistiría evaluar conjuntamente el valor de Ct y el tiempo de evolución (o del tiempo desde el contacto en personas asintomáticas), curso clínico, gravedad de la enfermedad e inmunosupresión

Positividad de la RT-PCR durante infección y post-infección por SARS-CoV-2

El tiempo de positividad de la RT-PCR en muestras del tracto respiratorio es más prolongado que el del cultivo viral. En pacientes adultos con formas leves de COVID-19 la duración media de la detección de ARN de SARS-CoV-2 después de la aparición de los síntomas en el tracto respiratorio superior (TRS) es de alrededor de 10-12 días, de 24 días en el tracto respiratorio

inferior (TRI) y de 15 días en las heces.¹⁵⁻¹⁷ En pacientes adultos con forma moderadas o graves, la duración media de la detección SARS-CoV-2 RNA en TRS es de 16 días, 23 días en TRI y 21 días en heces.¹⁵⁻¹⁷ Con independencia de la gravedad de la enfermedad, la probabilidad de detectar ARN viral en el TRS decrece a partir de la segunda semana tras la aparición de los síntomas, mientras que a partir de ese momento las probabilidades de detección viral son mayores en TRI y heces.

En contraste con lo anterior, el cultivo del virus es improbable en la mayoría de pacientes después de 10 días desde la aparición de los síntomas, ya sea a partir de muestras de TRS o de TRI.¹⁸ Sin embargo, varios trabajos aseguran que la excreción de virus infeccioso en TRS en pacientes con COVID-19 grave puede perdurar más allá de los 10 días, hasta un mes en un tercio de los pacientes.¹⁹ Conviene subrayar que: (i) los estudios que apoyan lo anterior son difícilmente comparables entre sí por diferir notablemente en el estatus clínico de los pacientes y en parámetros pre-analíticos del cultivo (uso de muestras congeladas o “frescas”); (ii) los pacientes inmunodeprimidos, en quienes podría cultivarse SARS-CoV-2 durante periodos más prolongados, están infrarrepresentados en las series publicadas. Por otro lado, SARS-CoV-2 no ha podido ser cultivado a partir de la sangre y solo anecdóticamente a partir de las orina y heces.²⁰

La reaparición de ARN viral en el tracto respiratorio (“re-positivos”) es relativamente frecuente (hasta un 10%) en el mes siguiente al momento de la primera RT-PCR negativa, generalmente en ausencia de síntomas o asociados con síntomas leves. El virus no ha sido aislado a partir de TRS o TRI en “re-positivos”.²¹ Aunque aún infrecuente, conviene resaltar el hecho de que un re-positivo después de un periodo largo de tiempo desde el primer episodio de infección (actualmente se ha fijado en 3 meses, pero en continua revisión) puede ser el resultado de una reinfección por una cepa heterotípica.²²

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, siguiendo recomendaciones de instituciones como CDC y OMS, el des-aislamiento basado en el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas y en criterios clínicos, parece más razonable (10 días desde el inicio de los síntomas y al menos 3 días desde la resolución de la fiebre); si bien alrededor del 6% de los casos, se recuperan virus infecciosos más allá del día 10 por lo que seguramente deba prolongarse al menos 20 días en aquellos casos de aclaramiento viral más lento como en paciente hospitalizados graves e inmunodeprimidos (**Ver módulo III de organización asistencial del documento SEIMC**).

5.2. Anticuerpos e infectividad

En la mayoría de los pacientes COVID-19 se detectan anticuerpos específicos de uno o varios isotipos, neutralizantes o no, en los primeros 15 días después de la aparición de los síntomas, con independencia de la naturaleza de la prueba serológica empleada.^{23,24}

La presencia de IgG específicas en asintomáticos, paucisintomáticos o con formas leves de COVID-19 de casos que había sido confirmados previamente por PCR, se asocia a una baja o nula infectividad (criterio recomendado para la reincorporación del personal sanitario). No obstante, el virus puede cultivarse con cierta frecuencia en pacientes con COVID-19 moderado-grave que ya han seroconvertido (IgG positivos).¹⁸

De acuerdo con la experiencia acumulada en los brotes de SARS-CoV-1 y MERS parece razonable asumir que los anticuerpos frente a SARS-CoV-2 con actividad neutralizante (AcNt) protegen frente a las reinfecciones durante un tiempo no determinado.^{25,26} Sin embargo, se desconoce cuál es el nivel de AcNt que confiere protección. La correlación entre los niveles séricos de AcNt y

los de IgG, IgM o IgA específicas medidas mediante ELISA o CLIA comerciales (semicuantitativas) varían notablemente. Con carácter general la correlación es mejor cuando el antígeno del inmunoensayo es RBD (receptor binding domain), S1, S1/S2 y N, por este orden.²⁷⁻³⁰

5.3. Seguimiento microbiológico para determinar el pronóstico del paciente COVID-19

Existen datos que avalan la existencia de una relación directa la magnitud de la carga viral basal en el momento del diagnóstico (no del Ct) en TRS y la gravedad (pronóstico) de COVID-19^{31,32}. Sin embargo no hay evidencia en cuanto al impacto de la monitorización periódica de la carga viral en el manejo de COVID-19. Es posible detectar ARN viral en la sangre (RNAemia) en alrededor de un 10% de los pacientes. La presencia de ARNemia ha sido vinculada con COVID-19 grave.³³

De acuerdo con anterior, no existen razones de peso para recomendar la monitorización sistemática de la carga viral de SARS-CoV-2, bien inferida a partir del Ct, o bien determinada mediante técnicas cuantitativas (RT-PCR en tiempo real o PCR digital), en el tracto respiratorio o cualquier otro compartimento.

REFERENCIAS

1. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Aug 28 [cited 2020 Sep 30]; Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2016359>
2. CDC Centers for Diseases Control and Report. Interim Guidance for Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2 | CDC [Internet]. [cited 2020 Sep 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
3. CDC Centers for Diseases Control and Report. COVID-19 Pandemic Planning Scenarios | CDC [Internet]. [cited 2020 Sep 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planning-scenarios.html#table-1>
4. Larremore DB, Wilder B, Lester E, Shehata S, Burke JM, Hay JA, et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 surveillance. *medRxiv* [Internet]. 2020 Sep 8 [cited 2020 Sep 30];2020.06.22.20136309. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.22.20136309v2>
5. Abdalhamid B, Bilder CR, McCutchen EL, Hinrichs SH, Koepsell SA, Iwen PC. Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2020 May 5 [cited 2020 Sep 30];153(6):715–8. Available from: www.chrisbilder.com/shiny.
6. Hogan CA, Stevens BA, Sahoo MK, Huang C, Garamani N, Gombar S, Yamamoto F, Murugesan K, Kurzer J, Zehnder J, Pinsky BA. High Frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and Association With Severe Disease. *Clin Infect Dis*. 2020 Sep 23:ciaa1054. doi: 10.1093/cid/ciaa1054. Epub ahead of print. PMID: 32965474.
7. Watkins AE, Fenichel EP, Weinberger DM, Vogels CBF, Brackney DE, Casanovas-Massana A, et al. Pooling saliva to increase SARS-CoV-2 testing capacity. *medRxiv* [Internet]. 2020 Sep 3 [cited 2020 Sep 30];2020.09.02.20183830. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.09.02.20183830>
8. CDC Centers for Diseases Control and Report. Interim Guidance for Use of Pooling Procedures in SARS-CoV-2 Diagnostic, Screening, and Surveillance Testing | CDC [Internet]. [cited 2020 Sep 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html>
9. Ott IM, Strine MS, Watkins AE, Boot M, Kalinich CC, Harden CA, et al. Simply saliva: stability of SARS-CoV-2 detection negates the need for expensive collection devices. *medRxiv* [Internet]. 2020 Aug 4 [cited 2020 Sep 30];2020.08.03.20165233. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.20165233>.
10. Albert E, Ferrer B, Torres I, Serrano A, Alcaraz MJ, Buesa J, Solano C, Colomina J, Bueno F, Huntley D, Olea B, Valdivia A, Navarro D. Amplification of human β -glucuronidase gene for appraising the accuracy of negative SARS-CoV-2 RT-PCR results in upper respiratory tract specimens. *J Med Virol* 2020 Jun 2:10.1002/jmv.26112. doi: 10.1002/jmv.26112

11. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19 [Internet]. Vol. 20, *The Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2020 [cited 2020 Sep 30]. p. 656–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/S2213->
12. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, 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
13. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. 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 Jun;39(6):1059-1061. doi: 10.1007/s10096-020-03913-9.
14. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Bernal JL, Saliba V, Ellis J, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 30];25(32):1. Available from: </pmc/articles/PMC7427302/?report=abstract>
15. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 2020; published online Feb 24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4).
16. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 2020; published online Jan 30. DOI:10.1056/NEJMc2001737.
17. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):656-657. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30232-2.
18. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May;581(7809):465-469.
19. Folgosa MD, et al. Persistent SARS-CoV-2 replication in severe COVID-19 medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.10.20127837>.
20. Mahendiratta S, Batra G, Sarma P, Kumar H, Bansal S, Kumar S, Prakash A, Sehgal R. Molecular diagnosis of COVID-19 in different biologic matrix, their diagnostic validity and clinical relevance: A systematic review. *Medhi B. Life Sci*. 2020 Aug 7;258:118207. doi: 10.1016/j.lfs.2020.11820.
21. Simon V, van Bakel H, Sordillo EM. Positive, again! What to make of “re-positive” SARS-CoV-2 molecular test results. *EBioMedicine*. 2020 Sep 21;60:103011.
22. To KK, Hung IF, Ip JD, Chu AW, Chan WM, Tam AR, Fong CH, et al. COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 25;ciaa1275. doi: 10.1093/cid/ciaa1275

23. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020 Jul 1;370:m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516.
24. Özçürümez MK, Ambrosch A, Frey O, Haselmann V, Holdenrieder S, Kiehntopf M, et al. SARS-CoV-2 antibody testing-questions to be asked. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jul;146(1):35-43.
25. Zohar T, Alter G. Dissecting antibody-mediated protection against SARS-CoV-2. *Nat Rev Immunol* 2020; 20:392-394.
26. Moore JP, Klasse PJ. SARS-CoV-2 vaccines: 'Warp Speed' needs mind melds not warped minds. *J Virol* 2020 Jun 26: JVI.01083-20. doi: 10.1128/JVI.01083-20.
27. Gozalbo-Rovira R, Gimenez E, Latorre V, Frances-Gomez C, Albert E, Buesa J, et al. SARS-CoV-2 antibodies, serum inflammatory biomarkers and clinical severity of hospitalized COVID-19 Patients. *J Clin Virol*. 2020 Oct;131:104611
28. Weidner L, Gänsdorfer S, Unterweger S, Weseslindtner L, Drexler C, Farcet M, et al. Quantification of SARS-CoV-2 antibodies with eight commercially available immunoassays. *J Clin Virol* 2020 Jul 6;129:104540. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104540.
29. GeurtsvanKessel CH, Okba NMA, Igloi Z, Bogers S, Embregts CWE, Laksono BM, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat Commun* 2020;11:3436.
30. Bonelli F, Sarasini A, Zierold C, Calleri M, Bonetti A, Vismara C, et al. Clinical And Analytical Performance Of An Automated Serological Test That Identifies S1/S2 Neutralizing IgG In COVID-19 Patients Semiquantitatively. *J Clin Microbiol*. 2020 Jun 24:JCM.01224-20. doi: 10.1128/JCM.01224-20.
31. Alteri C, Cento V, Vecchi M, Colagrossi L, Fanti D, Vismara C, Puoti M, Perno CF. Nasopharyngeal SARS-CoV-2 load at hospital admission as predictor of mortality. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 16:ciaa956. doi: 10.1093/cid/ciaa956.
32. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, Richter F, Zhao S, Wajnberg A, Nadkarni G, Glicksberg BS, Houldsworth J, Cordon-Cardo C. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med*. 2020 Sep;8(9):e70.
33. Veyer D, Kernéis S, Poulet G, Wack M, Robillard N, Taly V, et al. Highly sensitive quantification of plasma SARS-CoV-2 RNA sheds light on its potential clinical value. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 17:ciaa1196. doi: 10.1093/cid/ciaa1196.