

**La importancia de la realización de cultivos virales de
SARS CoV 2 y de su aislamiento completo, para la
confirmación de la causalidad entre el virus y la
enfermedad COVID 19.**



BIÓLOGOS
por la verdad

www.biologosporlaverdad.es

Víctor Guirado Viedma. Ingeniero químico.

Jon Ander Etxebarria Gárate. Licenciado en biología.

Dra. Biología Nayra Txasko Carpio.

Almudena Zaragoza Velilla. Licenciada en biología.

Noviembre de 2021.

CONTENIDO.

0	RESUMEN	3
1	INTRODUCCIÓN	4
2	LIMITACIONES de la METODOLOGÍA OFICIAL.....	5
2.1	Método de Secuenciación	5
2.1.1	Limitaciones de la secuenciación.....	6
2.2	Prueba de detección de antígenos (Rapid Antigen Diagnostic Test, RADT).	8
2.2.1	Limitaciones de las pruebas de detección de antígenos.	8
2.3	Detección de ARN viral mediante una RT-PCR o una técnica molecular equivalente....	10
2.3.1	Limitaciones de la técnica RT-PCR para el virus SARS CoV 2	11
2.4	Limitaciones en el estudio estadístico epidemiológico y sus repercusiones sociales..	15
2.4.1	Detalle del número de test realizados en cada una de las “olas epidemiológicas” en España.....	25
2.5	RESUMEN DE LAS LIMITACIONES DE LA METODOLOGÍA.....	25
3	CULTIVOS VIRALES y AISLAMIENTO del SARS CoV 2.....	25
3.1	Cultivos virales de sars CoV 2. Modelos teóricos	26
3.2	Un modelo realista de cultivo viral.....	27
3.3	Experimentos de control	29
3.4	Aislamiento del SARS CoV 2.....	30
4	CONCLUSIONES.....	33
5	REFERENCIAS	36

ANEXOS.

Documentación complementaria.....	39
-----------------------------------	----

0 **RESUMEN**

Recientemente, el Ministerio de Sanidad, a través del portal de transparencia, que atiende a la Ley 19/2013, de 9 de diciembre, de Transparencia, Acceso a la información pública y Buen gobierno, ha reconocido a un ciudadano mediante un documento con registro de entrada 001-059144 (**ANEXO I**), no disponer de cultivo del virus SARS CoV 2 para ensayos y no tener registro de los laboratorios con capacidad de cultivo y aislamiento para ensayos. Este hecho, podría suponer un grave delito contra la salud pública, puesto que sin el aislamiento del virus y sin cultivos virales, no se puede establecer la causalidad entre el llamado SARS CoV 2 y la enfermedad denominada COVID 19.

El hecho, no solamente de no disponer de cultivos virales en general, sino de no haberlos realizado a cada paciente con resultado positivo en cualquiera de los test diagnósticos utilizados en la pandemia, significa que no se ha confirmado la presencia del virus SARS CoV 2 como causante de ese resultado positivo en personas, que han sido igualmente confinadas o que han recibido tratamientos para la enfermedad COVID 19, sin que ésta haya tenido una confirmación empírica. Esto supondría graves consecuencias para la integridad individual de la persona y para la inclusión de datos sobre Incidencia Acumulada en las estadísticas epidemiológicas, que han servido para la toma de decisiones por parte de las administraciones públicas.

Este trabajo se centra en la importancia de disponer del aislamiento de partículas virales viables, así como también de sus ensayos en cultivos celulares humanos, para poder comprobar que esas partículas sean la causa de la enfermedad, y también para poder confirmar los casos positivos en las pruebas diagnósticas diseñadas para la detección del virus SARS CoV 2, llamadas RT-PCR. En este sentido, se ha revisado la metodología utilizada tanto para la secuenciación del virus - mal interpretado como aislamiento- como la metodología utilizada para su detección en personas, y se han encontrado importantes limitaciones metodológicas, que se detallan en este estudio. Más allá de toda duda razonable, el aislamiento de las partículas virales propiamente dicho y la realización de cultivos virales en pacientes positivos es la forma más segura e inequívoca para establecer la relación causal entre virus SARS CoV 2 y la enfermedad COVID 19. Pero esto, tal y como se detalla en este estudio, no se ha realizado.

Tenemos la responsabilidad de velar por la integridad de las personas, la correcta recolección de datos para obtener resultados adecuados en estadística epidemiológica, que permitan

gestionar adecuadamente la situación sanitaria y a su vez, respetar los derechos y libertades de la población, recogidos en la Constitución Española.

1 INTRODUCCIÓN

El virus SARS CoV 2 se ha postulado como el causante de la enfermedad COVID 19, que se estima, según fuentes oficiales, ha causado millones de muertes en el mundo el último año (1). La primera secuencia completa del genoma del virus se publicó en enero de 2020 (2), tras la descripción de los primeros casos en diciembre de 2019 (3). Esta rapidez en las investigaciones relacionadas con el virus se han debido a la alarma mundial y han puesto en funcionamiento toda una serie de metodologías de detección del virus en personas, tanto sanas o asintomáticas, como enfermas o sintomáticas. Sin embargo, debido a la misma celeridad en patentar y comercializar productos farmacéuticos relacionados con la pandemia, su metodología ha dejado muchas incógnitas sin contestar, que podrían afectar gravemente a la salud pública y la integridad de las personas, por no disponer de suficiente consistencia científica en cuanto a la verificación y control de sus resultados.

En el presente estudio se ha revisado en profundidad la metodología utilizada para la secuenciación del supuesto virus y las pruebas de laboratorio para la detección de casos de infección activa (test de antígenos y PCR's). Las bases conceptuales de estos métodos se detallan en orden y seguidamente sus limitaciones como métodos rigurosos, que no se han tenido en cuenta. Así mismo, se reporta estadísticamente cómo la utilización masiva de los test PCR's y de antígenos, debido a sus limitaciones y su uso masivo, han dado una errónea valoración del riesgo para la población, y, por tanto, no pueden justificar los protocolos de protección (confinamientos, mascarillas, distanciamiento social, vacunación masiva, etc.), impuestos por las autoridades. En realidad, la valoración del riesgo se basa a su vez en los estudios científicos oficiales que asocian y relacionan la enfermedad COVID-19 con un nuevo virus, de origen desconocido, al que han llamado SARS CoV 2. Sin embargo, tras una profunda revisión, no consta ningún estudio científico con cultivos celulares humanos donde demuestren rigurosamente la infectividad de este supuesto nuevo virus, y ni si quiera existen estudios donde se haya aislado y purificado las partículas virales para su caracterización química y su secuenciación. En su lugar, y tal y como ha confirmado el Ministerio de Sanidad Español, se utilizan ensayos en cultivos de células VERO (y otras), en ausencia de pruebas de control que descarten las condiciones del experimento como causantes de la muerte celular, como se detalla en el apartado 3.3. Además, en estos estudios científicos oficiales han secuenciado fragmentos de ARN procedente de cultivos con células no humanas, y no han

aislado las partículas virales para confirmar que esa secuencia obtenida teóricamente, y llamada SARS CoV 2, existe físicamente y se encuentra como componente de dichas partículas.

2 LIMITACIONES DE LA METODOLOGÍA OFICIAL.

La celeridad con la que han acaecido los hechos durante la pandemia, el desconocimiento y los intereses económicos de las empresas farmacéuticas, han favorecido una laxa metodología y una falta de rigurosidad que ha afectado en la toma de decisiones sobre los criterios epidemiológicos. Debido a ello se ha hecho una mala utilización de test, cuando no estaban preparados para ser herramientas diagnósticas concluyentes. De sus resultados positivos, se ha derivado una toma de decisiones por parte de las administraciones sanitarias públicas que han vulnerado los derechos fundamentales de los individuos, que no estaban justificadas, ni tenían sustento científico y en este apartado se fundamentan estos hechos.

A continuación, se detallan las pruebas de laboratorio utilizadas para la detección de casos de una infección activa por SARS CoV 2, según el Ministerio de Sanidad Español (**ANEXO II**).

2.1 Método de secuenciación.

La secuenciación vírica consiste en la lectura del código genético de un virus que revela la secuencia de nucleótidos de sus genes, que son como las frases de un libro de instrucciones de cómo funciona esa biomolécula. Básicamente permite ordenar las letras o nucleótidos que describen sus funciones biológicas y almacenar esta información en bases de datos genómicas (4).

La metodología comienza tras una recogida de material nasofaríngeo mediante hisopado del paciente en cuestión, después se procede a separar el ARN de la muestra y mediante diferentes tecnologías, como la secuenciación de Sanger, Illumina o Ion Sanger, con la que se obtiene la secuencia de nucleótidos que posteriormente se procesa informáticamente comparándola y rellenando sus huecos con una secuencia consenso preexistente, que en este caso fue la Wuhan de enero de 2020 (2).

La importancia de la realización de cultivos virales de SARS CoV 2 y de su aislamiento completo, para la confirmación de la causalidad entre el virus y la enfermedad COVID 19.

SECUENCIACIÓN DE GENOMAS COMPLETOS SARS-COV-2

¿Qué es?

El genoma o la secuencia genética completa del SARS-CoV-2 es una molécula de ARN, una especie de código de 30.000 letras que necesita para poder formar muchas copias de sí mismo y lograr multiplicarse una vez que infecta a una célula diana.

¿Cómo se hace?

Una vez conseguido el ARN de la muestra, el objetivo es purificar el ARN del virus y separarlo del ARN del paciente siguiendo diferentes estrategias. A continuación se determina la secuencia de la molécula mediante procesos químicos y análisis bioinformáticos.

¿Para qué sirve?

Una vez conseguida la secuencia del genoma del virus, se puede utilizar esta información para diferentes aplicaciones:

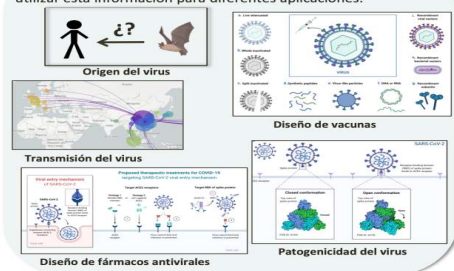


Figura 1. Iconografía que muestra el proceso de secuenciación (4).

Comentario [MM1]: Del carlos III.
Revisada y ok.

2.1.1 Limitaciones de la secuenciación.

Lo primero que tenemos que entender es que la secuenciación no es equivalente al aislamiento de una partícula viral y tampoco sirve para identificar al virus SARS CoV 2 como agente causal de la enfermedad (5).

Los virus no se consideran seres vivos según la biología clásica, ya que sólo son biomoléculas, que fuera del entorno celular no pueden realizar sus funciones biológicas, sólo son instrucciones dentro de los genomas de los seres vivos, parte de su información. Por lo tanto, el hecho de secuenciar un virus puede corresponderse únicamente con la lectura de parte de nuestro código genético y no tener relación alguna con la patogenicidad y las patologías observadas en un paciente.

Hoy en día se sabe que gran parte del genoma de los seres humanos contiene secuencias de origen viral (6). De hecho todos los mamíferos y las aves tenemos coronavirus endógenos codificados en nuestro genoma, el caso más relevante es el del coronavirus humano relacionado con el catarro común llamado NL63, que incluso tiene el mismo receptor que el virus SARS CoV (7).

Sin cultivo viral de confirmación, la secuenciación no es una metodología probatoria de patogenicidad y por tanto no puede suponer una evidencia empírica de la presencia del virus SARS CoV 2 en el paciente del que se recoge la muestra, puesto que esta secuencia puede corresponderse con parte del transcriptoma humano¹(8).

www.biologosporlaverdad.es

(Prohibida su copia, reproducción y utilización sin permiso explícito de sus autores).

(¹El transcriptoma humano es el conjunto de moléculas señalizadoras de ARN que circulan por nuestro cuerpo. Su función es llevar información para que las funciones del organismo se lleven a cabo con normalidad).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que a día de hoy, todas las secuencias que se dice pertenecen al virus SARS CoV 2 se basan en un modelo o plantilla inicial que se secuenció en Wuhan (2). Por lo tanto, si esa secuencia no hubiese sido obtenida de forma correcta, sería sencillo que el resto de genomas secuenciados en todo el mundo tampoco se correspondiesen con ese virus y estaríamos ante un error metodológico a nivel global, por haber secuenciado un virus partiendo de una plantilla inicial cuya metodología no fue rigurosa. De ahí que sea tan importante una confirmación mediante cultivos virales de esas personas positivas, antes de secuenciar. España por ejemplo ha subido más de 70.000 genomas completos a la base de datos genómica GISAID, usando la plantilla de Wuhan (9).

Es vital no olvidarse de detallar que hasta el día de hoy no se ha aislado una secuencia genética completa del virus SARS CoV 2 de ningún paciente con neumonía, ya que con la técnica RT PCR que se explica en el siguiente apartado, sólo se detectan fragmentos de apenas 200 nucleótidos, por lo que no es posible. En su defecto, estos fragmentos detectados, se comparan gracias a programas informáticos, con la secuencia original almacenada en una base de datos génica, para rellenar los huecos que faltan. O bien, se utilizan cebadores de diferentes regiones del virus para después unirlos de forma virtual, utilizando la bioinformática. Esto implica que en realidad, no sabemos si esas secuencias están juntas en su estado natural o bien pueden pertenecer a diferentes partes del propio transcriptoma humano y no a un virus patógeno de procedencia externa.

Finalmente cabe destacar, que ninguna de las secuencias completas del presunto SARS CoV 2 cargadas a las bases de datos génicas mundiales son exactamente iguales, lo que implica que a día de hoy, no se sabe con certeza cuál es su composición de nucleótidos exacta y real (10). De ahí que el seguimiento de variantes no tenga ningún fundamento científico, hasta que no se confirmen que estas secuencias recogidas de pacientes positivos pertenecen inequívocamente al virus SARS CoV 2, sin embargo el Ministerio de Sanidad, guiado por la Comisión Europea, se ha embarcado en un esfuerzo injustificado por secuenciar material genético de los pacientes positivos (**ANEXO III**).

2.2 Prueba de detección de antígenos (Rapid Antigen Diagnostic Test, RADT).

Un antígeno es cualquier sustancia que genere una respuesta del sistema inmune, en este caso, estas pruebas están diseñadas para detectar proteínas del virus SARS CoV 2, lo que se interpreta como una infección activa. Por lo general, las pruebas de antígenos están indicadas para la **detección cualitativa de antígenos** del SARS-CoV-2 en tipos de muestras autorizados recolectados de individuos sospechosos de COVID-19 por su proveedor de atención médica, dentro de un cierto número de días desde la aparición de los síntomas (12).

2.2.1 Limitaciones de las pruebas de detección de antígenos.

Lo primero que se debe destacar de estos test es que sus mismas fichas técnicas indican que no sirven para diagnóstico y sólo serían para investigación, ya que una de las limitaciones más grandes de estos test es la **sensibilidad**, que es la capacidad de dar como positivos aquellos casos que realmente lo son y ésta es muy variable dependiendo de las fuentes consultadas y el tipo de test comercial utilizado (13). Por otro lado, tenemos la **especificidad** que es la probabilidad de que un sujeto sano tenga un resultado negativo en una prueba y ésta vuelve a no ser del 100%, con unos valores que oscilan entre el 80 y el 95 % dependiendo del proveedor (13).

Estudiar la **prevalencia** de la enfermedad, es de vital importancia para evaluar la inmunización de la población y el valor predictivo de éstos test. La prevalencia en epidemiología, es la proporción de individuos que sufren una enfermedad, con respecto al total de la población. Y este valor sólo puede obtenerse mediante estudios de **seroprevalencia y seroepidemiológicos** (14).

La prevalencia influye directamente en **valor predictivo positivo (VPP)** que es el porcentaje de resultados positivos de las pruebas, que son verdaderos positivos. Una especificidad del 98 %, tendría un VPP de poco más del 80 % en una población con una prevalencia del 10 %, lo que significa que 20 de cada 100 resultados positivos serían falsos positivos. La misma prueba sólo tendría un VPP del 30 % en una población con una prevalencia del 1%, siendo el número de falsos positivos de 70 de cada 100 (12). En España sólo se han realizado tres estudios de seroprevalencia cuyos resultados se publicaron el 13 de mayo (**ANEXO IV**), el 3 de junio de 2020 (**ANEXO V**) y el 15 de diciembre de 2020 (**ANEXO VI**), sus resultados indicaban una

prevalencia inicial del 5% que aumentó hasta el 9,9%, lo cuál indica que la inmunidad natural aumentaba con el tiempo a medida que el virus iba pasando de persona a persona, ya que las pruebas serológicas miden el nivel de anticuerpos de la población. Como dato curioso contar que por ejemplo el personal sanitario ya en diciembre de 2020, contaba con una inmunidad natural del 16, 8% (**ANEXO VI**). Pese a los valiosísimos datos sobre la inmunidad natural de la población, estos estudios serológicos no se han realizado en el año 2021, lo cual achacamos a la presión de la vacunación y su elección como método de inmunización único, sin tener en cuenta de forma muy negligente nuestros anticuerpos naturales.

Incluso con estudios serológicos bien fundamentados, que deben estar disponibles para establecer el porcentaje de positivos reales en los test, la prueba de antígenos sigue teniendo sus limitaciones y por tanto, siempre existe un porcentaje de falsos positivos, que hemos de recordar que son personas a las que se les libraré de su derecho fundamental a la libre circulación por el territorio español recogido en la Constitución Española, ya que se les confinará en sus domicilios a ellos y a sus contactos estrechos, por lo que para poder legitimar y justificar esos positivos, se deben realizar cultivos virales de cada paciente positivo. Y jamás usar estos positivos sin confirmar, como indicadores de contagio o casos, ya que en la actualidad, forman parte de las estadísticas nacionales con las que se toman las medidas restrictivas, sin ser un dato fiable.

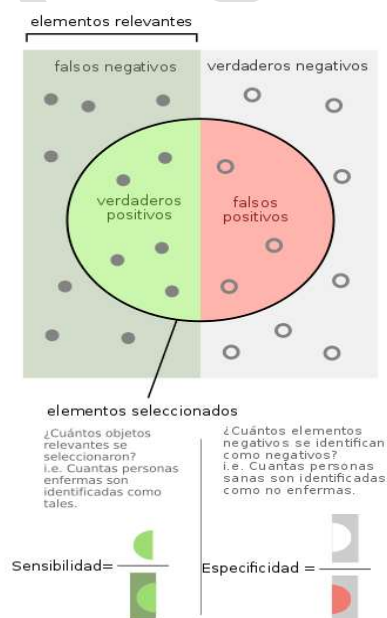


Figura 2. Se muestra de forma gráfica el concepto de especificidad y sensibilidad de cualquier test de análisis clínico. Todas estas metodologías, tienen de por sí un número de falsos positivos que se detallan en sus prospectos. (15).

2.3 Detección de ARN viral mediante una RT-PCR o una técnica molecular equivalente.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha erguido como prueba inequívoca cuyo resultado positivo es signo de caso o contagio, incluyéndose estos resultados en las estadísticas epidemiológicas nacionales. Su fundamento se basa en obtener copias de pequeños fragmentos de ADN, a lo cual se denomina amplificación del ADN (16). El método utiliza secuencias cortas de unos pocos nucleótidos llamadas cebadores (primers) para seleccionar la parte del genoma a amplificar². (²Amplificar significa repetir un número determinado de veces la copia del fragmento de material genético deseado). Esto se consigue, mediante ciclos de amplificación, que constan de separación de las hebras de ADN, unión de los cebadores a la secuencias deseada y síntesis de nuevas cadenas por adición de nucleótidos, con bajadas y subidas de la temperatura para favorecer las reacciones bioquímicas. Con unos 30 ciclos de amplificación, se pueden obtener más de dos billones de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas (17).

Comentario [MM2]: No me convence que haya puesto el buen título

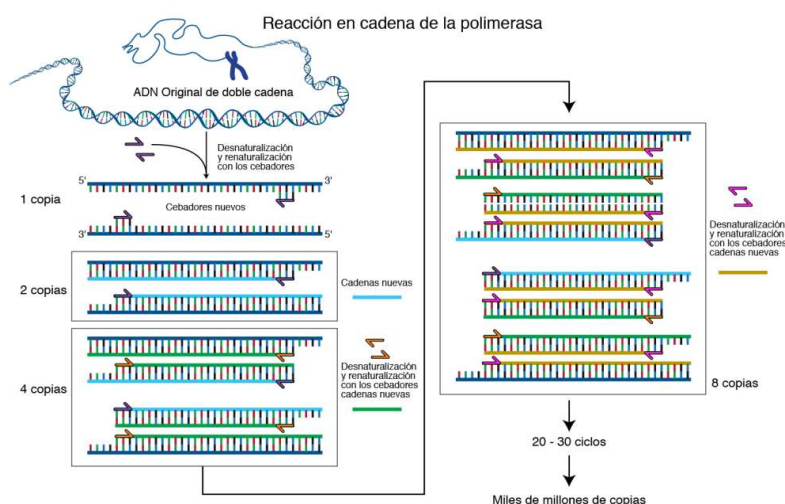


Figura 3. Esquema del proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR.

(Fuente: (18)).

Comentario [MM3]: Referencia falta

En la práctica se trata de una reacción que tiene como única función la copia múltiple de fragmentos de ADN de unos 200 nucleótidos, para aumentar su concentración hasta niveles lo suficientemente altos como para poder ser estudiado con diferentes objetivos:

- Estudios bioquímicos y de biología molecular
- Pruebas de medicina, biología legal y forense, antropología y arqueología.
- Estudios taxonómicos y filogenéticos.

En el caso que nos ocupa, la llamada prueba PCR para detectar enfermos por coronavirus se enmarca en el apartado de estudios taxonómicos y se denomina RT PCR (o Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real), es decir detecta la presencia de fragmentos de ARN, no de ADN, que en este caso, se atribuyen al virus SARS CoV 2 gracias a un protocolo aprobado por la Organización Mundial de la Salud (19; 20).

Como la técnica PCR sólo puede copiar cadenas de ADN, pero no de ARN, que es el material genético que porta el virus SARS CoV 2, el ARN debe pasar a ADN mediante una transcriptasa inversa, que es una enzima procedente de bacterias con capacidad de reacción a altas temperaturas que sintetiza ADN a partir de una ARN. Con lo cual tendríamos los siguientes pasos:

1. Retrotranscripción a partir del ARN.
2. Amplificación a partir de la primera hebra de ADNc.
3. PCR estándar.

2.3.1 Limitaciones de la técnica RT-PCR para el virus SARS CoV 2.

El mismo Ministerio de Sanidad, a través del portal de transparencia en el **anexo I** que se adjunta a este trabajo, confirma que; y se cita textualmente:

“[...] Los test por sí solos no suelen ser suficientes para determinar una enfermedad, requiriéndose una evaluación experta de la persona a la que se le ha realizado el test. [...]”

La primera limitación que encontramos en esta prueba es la ausencia de **calibración** para el virus SARS CoV 2. La calibración es la utilización de un estándar de medición, para determinar la relación entre un valor mostrado por el instrumento de medición y el valor verdadero. La calibración de la RT PCR se necesita para establecer el **umbral de ciclo**, es decir el número de ciclos a partir del cual un positivo sería falso. Para calibrar la prueba hacen falta cultivos virales que confirmen que el virus está presente en el paciente y que éste tiene un efecto

citopatogénico (que destruye las células del cultivo) cuando es detectado a un número de ciclos determinado. Según la evidencia científica de la que se dispone, se ha estimado que a los 27 ciclos, la prueba tiene un 50 % de falsos positivos y a los 35 ciclos de amplificación los falsos positivos son del 100 % (20).

Es importante destacar que los mismos autores de este estudio señalan que una limitación de su trabajo es que no puede extrapolarse a otros centros hospitalarios, ya que utilizan diferentes sistemas de transporte de muestras, de extracción de ARN y de PCR con diferentes cebadores y sondas. Por lo tanto proponen **que cada centro realice su propia correlación entre los resultados del cultivo y la carga de ARN viral de las muestras de los pacientes**. Es decir, cada laboratorio de realización de pruebas PCR, debería tener su propio umbral de ciclo con su calibración particular usando cultivos virales, en base al método de extracción de las muestras y los cebadores utilizados en la prueba.

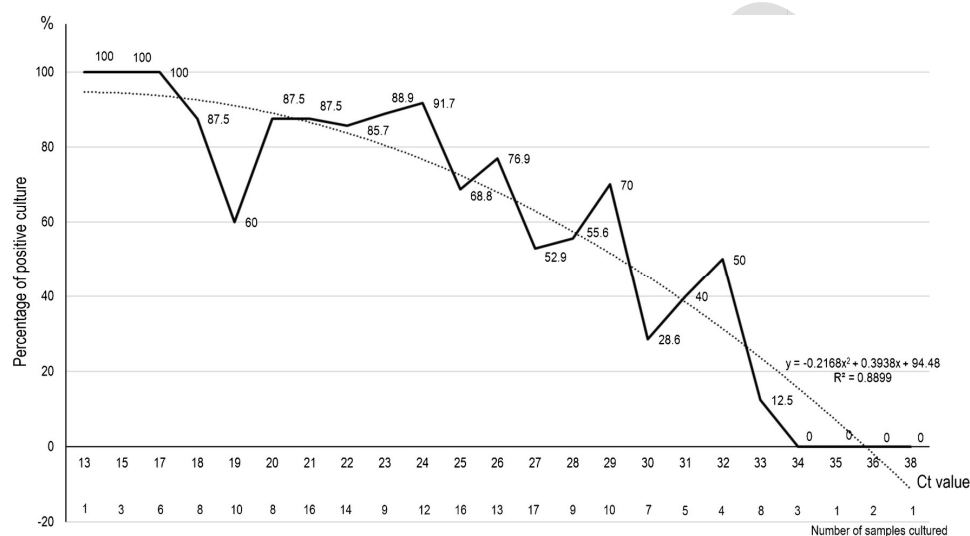
La obtención de muestras del ADN (o de ARN según el caso), es complicada y muy frecuentemente se ve contaminada dando resultados erróneos (21). Tanto la toma de muestras, como su conservación es compleja y debe ser realizada por personal especializado y en un tiempo concreto para evitar contaminación de dicha muestra (detección de otros organismos que no son objeto del estudio; por ejemplo, en el estudio de un virus concreto, una contaminación podría ser detectar restos de virus ya inactivos (21; 22).

Al respecto de los cebadores que se están utilizando en España para la detección del virus SARS CoV 2 (**ANEXO VII**), se ha preguntado a la Agencia Española del Medicamento y su respuesta ha sido más que inquietante y se cita textualmente:

“[...] la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) no dispone de la información sobre las secuencias de los primers utilizados en todos los test RT-PCR para la detección de SARS-COV-2 [...]”.

Si no existe una metodología consensuada y pruebas RT PCR calibradas estándar para todo el territorio español, los datos obtenidos son completamente aleatorios, al albur de los fabricantes de estos test y por lo tanto, no deberían ser utilizados dentro de la batería de datos de estadística epidemiológica que rigen las decisiones sanitarias, tampoco se debería librar de derechos y libertades a los ciudadanos con un positivo en estas pruebas, sin haberlo confirmado con cultivo viral.

En general, el Ministerio de Sanidad Español ha dictaminado en su documento como estrategia de detección precoz, vigilancia y control de covid-19 (**ANEXO II**) que **se asume que un umbral de ciclo superior a 30 o 35 ciclos, equivaldría a una carga viral sin capacidad infectiva**, lo cuál es una grave negligencia ya que a efectos prácticos sabemos que a 27 ciclos de amplificación, dependiendo de los cebadores utilizados en la prueba PCR, podrían darse hasta un 50% de falsos positivos y hasta el 100% de falsos positivos a 35 ciclos de amplificación (ver **Gráfica 1**) (23).



Gráfica 1. Porcentaje de cultivo viral positivo de muestras nasofaríngeas positivas por PCR para SARS-CoV-2 de pacientes con Covid-19, según el valor de ciclo (línea simple). La curva punteada indica la curva de regresión polinomial. (Fuente: (23)).

Un punto también importante a destacar es que en los propios prospectos de los kits comerciales de cebadores de la prueba RT PCR de SARS CoV 2 se indica claramente y entre exclamaciones que dichos test son únicamente para investigación y no para diagnóstico (**ANEXO VIII**) y que el propio documento sobre la estrategia.

Se ha solicitado información a los portales de transparencia de diferentes comunidades autónomas, sobre el umbral de ciclo utilizado para considerar un positivo como verdadero y se han obtenido diferentes respuestas que se reflejan en la (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de respuestas obtenidas a través de los portales de transparencia de las diferentes comunidades autónomas a la pregunta sobre el número de ciclos utilizados en las pruebas RT PCR de detección del virus SARS CoV 2 en la población española.

Cataluña (Anexo IX)	No existe ninguna norma que determine el umbral de ciclos (Ct) que determina el diagnóstico positivo de infección por el virus SARS-CoV-2. En general el umbral de ciclos se establece entre 30 y 35.
Andalucía (Anexo X)	Todas las técnicas comerciales que detectan el virus SARS CoV 2 utilizan su propio algoritmo de interpretación basado en sus propios estudios de validación. A todas las personas que se les realiza esta técnica, se le aplican los mismos ciclos, es decir, 40.
Asturias (Anexo XI)	Hay un cierto consenso en considerar, que la muestra es negativa si no se consigue la amplificación al llegar al ciclo 40. Como cualquier otra prueba no hay normativa que especifique o regule el funcionamiento de la técnica.
Extremadura (Anexo XII)	Se establece el umbral de ciclo en valores inferiores a 30 – 35.
Cantabria (Anexo XIII)	No existe una norma donde se establezca el número de ciclos al que se somete la prueba PCR para detectar el virus SARS CoV 2, el rango de ciclos definido en los diferentes programas está en el rango de 40 – 45 ciclos.
Baleares (Anexo XIV)	Esta PCR se realiza a 40 ciclos, cuando el positivo es superior a 34 se considera de baja carga viral y se solicita envío de nueva muestra para confirmación.
Castilla y León (XV)	Se sigue el documento sobre la estrategia de detección precoz, vigilancia y control del COVID 19 (ANEXO II). Entre 30 y 35 ciclos.

Este es un punto crítico, ya que se debe adoptar un criterio consensuado y unificado en todas las Comunidades Autónomas, en base a la validación de la PCR contra el cultivo viral en líneas celulares, con el objetivo de estandarizar el número de ciclos que se considere adecuado como punto de corte para considerar una muestra como positiva o negativa y permita inferir de manera más precisa infección e inefectividad. **En el ámbito clínico, la mera detección de pequeñas secuencias genéticas atribuidas a un virus no tiene ninguna utilidad para el diagnóstico, si el resultado no se contrasta con clínica, epidemiología y otros estudios complementarios como los cultivos virales de confirmación.** Además, se debe consignar el valor de ciclos en el informe que remita al profesional de salud solicitante e incluir el número de amplificaciones al dar el resultado de la PCR. Un alto número de amplificaciones (30 o más) sugiere que la carga viral es escasa, el diagnóstico incierto y la capacidad de contagio nula (ANEXO I).

Por lo tanto, la prueba RT PCR por sí misma, **no sirve como discriminación** del virus SARS CoV2, **ni como diagnóstico clínico** de la COVID 19, y sin embargo, su utilización masiva puede llevarnos a errores en la gestión epidemiológica, ya que a mayor número de test realizados, se generan mayor cantidad de datos, pero la calidad de los mismos disminuye por la inclusión de los falsos positivos (24). Es muy relevante el caso de Wuhan, donde se realizaron del orden de casi 10 millones de pruebas RT PCR y no se consiguió ni un solo positivo en cultivos virales de confirmación, por lo que se procedió a retirar todas las medidas restrictivas de la ciudad (25). Por estos motivos, la FDA ya ha advertido a todos los laboratorios del mundo que a partir de 2022 habrá que cambiar el protocolo y realizar test PCR múltiple (multiplexadas) (20).

2.4 Limitaciones en el estudio estadístico epidemiológico y sus repercusiones sociales.

Los resultados de estos métodos descritos anteriormente han sido utilizados para realizar la valoración del peligro y, en base a esta valoración, se han impuesto medidas de protección (confinamientos, distancia social, obligatoriedad de la mascarilla, vacunación masiva, toques de queda etc.), bajo la situación de alarma, que han tenido una repercusión en la forma de vida la población. Sin embargo, tal y como se ha detallado, estos métodos presentan unas limitaciones que dan lugar a una errónea caracterización de las partículas virales, y a una errónea interpretación de los positivos en las pruebas de anticuerpos y RT-PCR en estadística epidemiológica y, por tanto, la valoración del peligro y las medidas de protección no han sido las correctas.

Hemos de recordar que la falta de sensibilidad, especificidad y calibración con cultivos en las pruebas de antígenos y PCR's no solamente suponen una revisión puramente científica, si no también legal, ya que los falsos positivos en estas pruebas son ciudadanos españoles que han visto sus vidas gravemente afectadas. Por un lado, se les ha privado de su derecho a la libre circulación, habiendo sido confinados en sus casas, lo cual ha podido repercutir negativamente en muchos aspectos personales e incluso laborales y por otro, el estigma y el miedo producido por un diagnóstico erróneo de contagio por SARS CoV 2, que incluso ha podido derivar en un tratamiento médico no adecuado, con las repercusiones que esto puede tener en la salud del paciente.

En base a la acumulación de positivos sin confirmar con cultivos, se ha generado el estadístico denominado **Incidencia Acumulada (IA)**, que es la suma en valor absoluto del número de positivos en estas pruebas a 14 días. Así pues, en base a este parámetro, se han tomado todas las decisiones en pandemia, lo que ha supuesto una merma de derechos en la población basados en positivos inespecíficos, sin confirmar, ya que recordemos que **la única forma inequívoca de confirmar que un positivo en estas pruebas, se corresponde realmente con una persona contagiada de SARS CoV 2, es mediante la realización de cultivos virales con resultado positivo.**

La utilización de este índice (IA) como elemento para la toma de decisiones ha sido el mayor error de esta pandemia. Es una limitación que da lugar a una errónea interpretación de los datos obtenidos que no corresponde con la realidad. En efecto, desde un punto de vista estadístico, es esencial para el seguimiento de la evolución de los datos, y con ello saber si realmente hay un rebrote o no, tener un parámetro referenciado. En su lugar, la metodología utilizada pasa por la realización de un número de test de forma indiscriminada, sin criterios de epidemiología estadística para seguir la evolución de los contagios. Esto no es lo apropiado ya que el hecho de no tener esos criterios mínimos, resultará **más casos positivos cuanto más test se realicen.** En este sentido, hubiera sido más apropiado haber tenido en cuenta un criterio base con un valor referencia (número de tests por ejemplo) a realizar diariamente, de forma que nos diese, bajo un valor normalizado, la evolución de los porcentajes de positivos; y, en todo caso, aún sin ser normalizado, y con el fin de no obtener el número de positivos en función de si se quiere o no crear una alarma social, que no es real. El estadístico a utilizar más adecuado sería la evolución del porcentaje de positivos y no su valor absoluto.

También hay que tener en cuenta en la interpretación de los datos que, en base al número de test realizados, se considera que los test positivos en valor absoluto se corresponden con

individuos diferentes, sumándolos para el cálculo de la IA, dándose la circunstancia de que en España en este momento se habría controlado a toda la población incluso habiendo realizado más test que el total de habitantes (**66.213.858 test frente a 47.329.981 habitantes (26)**). **Eso significaría que estaríamos chequeados casi 1'4 veces el total de la población, y, por lo tanto, no tendría ningún sentido seguir realizando los test de PCR que se vienen realizando a diario.**

Así pues, la administración sanitaria a la hora de utilizar los positivos en valor absoluto está considerando que cada test realizado corresponde a una persona diferente, cuando se sabe que a una misma persona le han podido realizar más de un test, por lo que la utilización de muchos de los positivos en el cálculo de la IA acumulada a 14 días no es real, ya que están contabilizando personas a las que ya se había tenido en cuenta anteriormente al haber dado el primer positivo, es decir, al menos las IA deberían ser 1'4 veces menores que las que nos han ido contabilizando desde un inicio de la pandemia, que curiosamente es continuación desde el año 2020, cuando las epidemias siempre son contabilizadas estacionalmente y, si son enfermedades, anualmente.

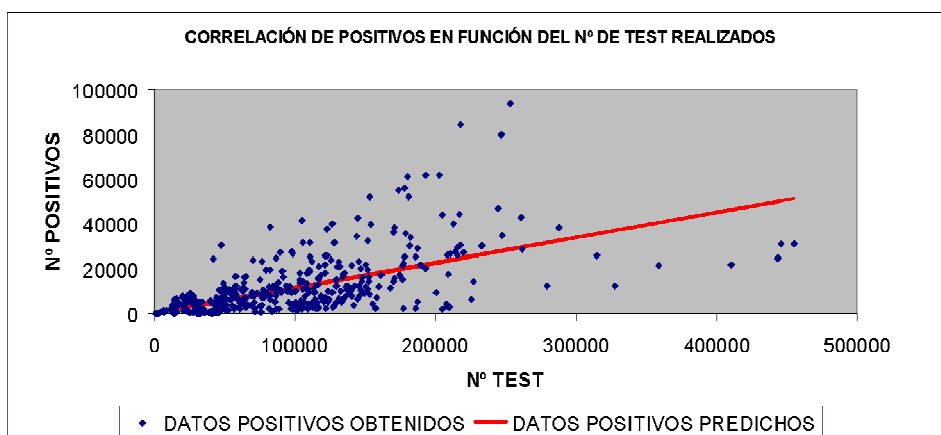
Durante esta pandemia se ha utilizado al libre albedrío el nº de test que se han realizado, de manera que se han generado las correspondientes olas, cuando la realidad de los datos que a continuación se presentan, dice que las mismas no han existido, más bien se han mal interpretado los datos.

La **Gráfica 2** representa el número de positivos frente al número de tests de PCR realizados, en la que se puede observar una correlación significativa ($r = 0'61$) (recta roja: positivos predichos por la recta de regresión). De esta manera se puede predecir con poco error este número de positivos (positivos predichos) en base a los test realizados.

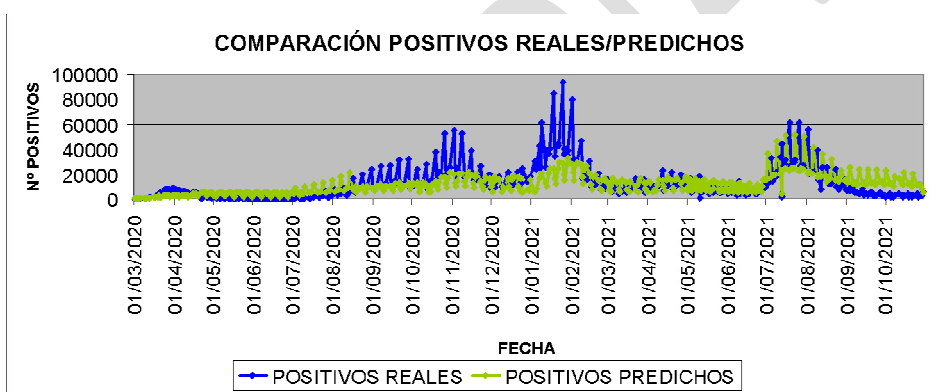
En este sentido, si se representa **Gráfica 2** el número de positivos obtenidos en los test y los positivos predichos en base a la recta de regresión obtenida en **Gráfica 2**, des de marzo de 2020 a octubre de 2021 se obtiene la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, de la cual se observan claramente dos cosas:

- A más test realizados más positivos obtenidos.
- Los positivos predichos se ajustan bastante bien a los positivos obtenidos, siendo las pequeñas diferencias debidas probablemente al número de ciclos de amplificación realizados.

La importancia de la realización de cultivos virales de SARS CoV 2 y de su aislamiento completo, para la confirmación de la causalidad entre el virus y la enfermedad COVID 19.



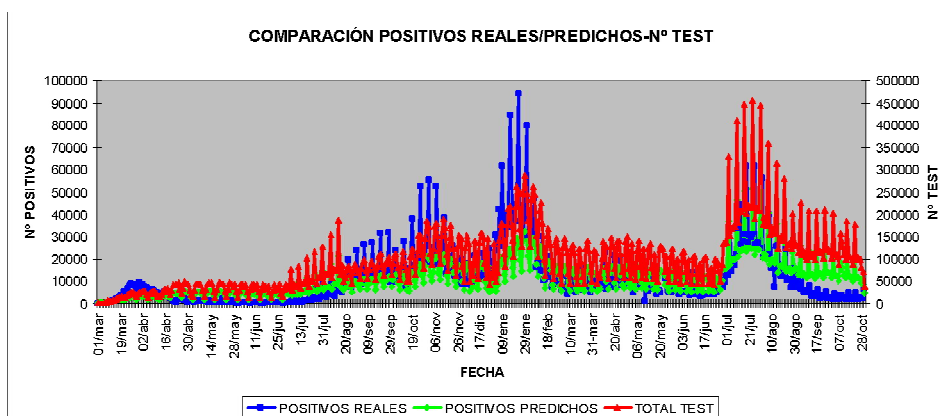
Gráfica 2. Correlación de positivos en función del nº de test realizados



Gráfica 3. Comparación positivos reales/predichos/nº test

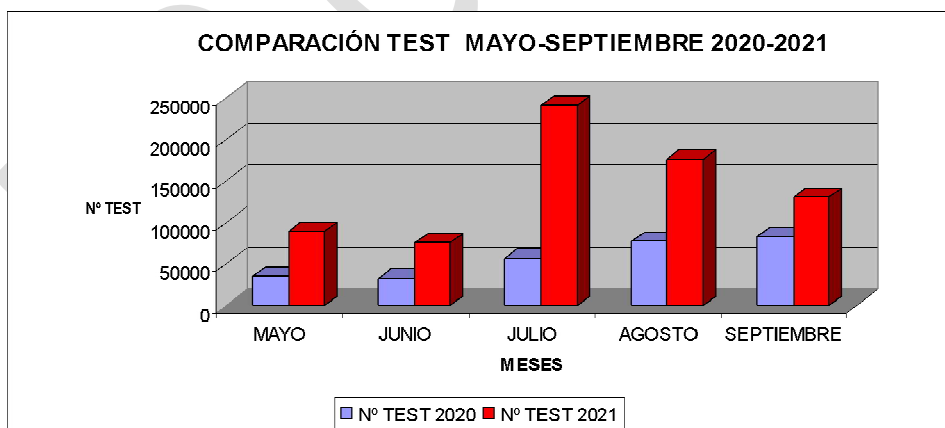
Si añadimos a la gráfica anterior, el número de tests realizados, obtenemos la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, de la que se desprende que el promedio de número de test desde mayo a septiembre durante el año 2020 fue de 285.498 frente a los 712.319 de promedio durante estos meses en 2021. **Es decir, este año 2021 se han realizado un 149,50% más de tests en promedio.**

La importancia de la realización de cultivos virales de SARS CoV 2 y de su aislamiento completo, para la confirmación de la causalidad entre el virus y la enfermedad COVID 19.



Gráfica 4. Comparación positivos reales y positivos predichos (Positivos reales: son los positivos obtenidos en las pruebas PCR. Positivos predichos: son los positivos calculados a partir de la ecuación obtenida en base a la correlación entre número total de test y número de positivos obtenidos)

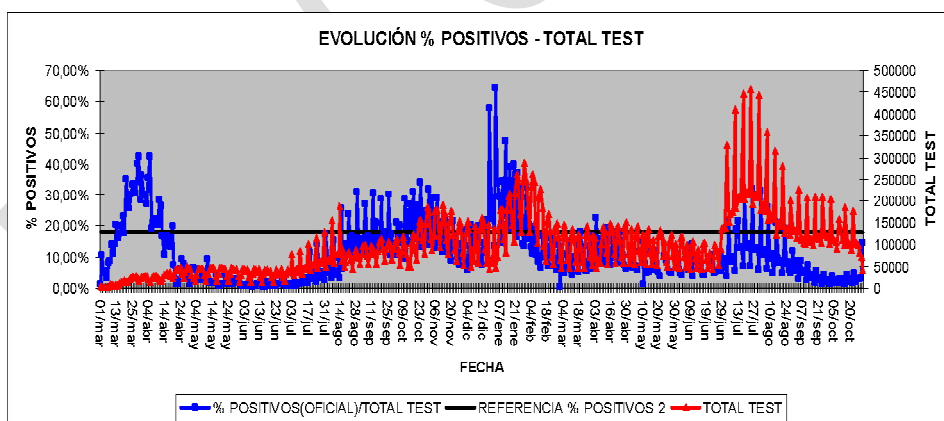
La distribución comparativa de los meses de mayo a septiembre entre el año 2020 y el 2021 queda representada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Nótese un aumento del número de test en julio, época libre de epidemias, del 323,75% coincidiendo con la denominada “quinta ola” en España, con la que se instó a los jóvenes a vacunarse.



Gráfica 5. Comparación del nº de test realizados durante los meses mayo-septiembre en los años 2020 y 2021

De las gráficas anteriores, se observa que los positivos contabilizados de forma oficial se correlacionan claramente con el nº de test realizados y, por lo tanto, en el período marzo-abril de 2020 al realizarse pocos test se obtuvieron pocos positivos. Pero sin embargo, sabemos que esos meses marzo-abril de 2020 fue el periodo en el que enfermaron y fallecieron más personas, sobre todo personas mayores. Por tanto, el número de positivos en valor absoluto, no nos informa de la situación real, aunque se están usando como toma de decisiones. En su lugar, esos datos deberían estar en base a un valor normalizado en función de un valor fijo de test realizados diariamente de manera que se pudiese utilizar el porcentaje resultante como herramienta normalizada con una mayor lógica para controlar la evolución de la pandemia. Además, dicho porcentaje podría compararse con un valor umbral, por ejemplo superar el 20% durante al menos 3 días consecutivos, de manera que ese valor sirviera para la valoración del peligro y la toma de decisiones (o al menos utilizar el porcentaje de positivos, aunque no estuviera normalizado, pero nunca el valor absoluto del número de positivos sin ninguna base).

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, muestra la evolución del porcentaje de positivos (que está en base al número de test realizados) que como se puede comprobar, informa con más rigurosidad la realidad que ocurrió en el período marzo-abril de 2020, período donde hubieron más enfermos y fallecidos.



Gráfica 6. Evolución del porcentaje positivos y del nº de test realizados

La razón para considerar el valor del porcentaje y que el umbral para la toma de decisiones sea del 20% (en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se basa en que si tomamos el valor oficial de 500 casos/100,000 habitantes de la IA a 14 días, nos indica que la media diaria de casos positivos sería de 36, lo cual representa 16.904 casos de COVID19 al día (de acuerdo con los datos oficiales). Siendo el promedio diario de tests realizados, desde el inicio de la

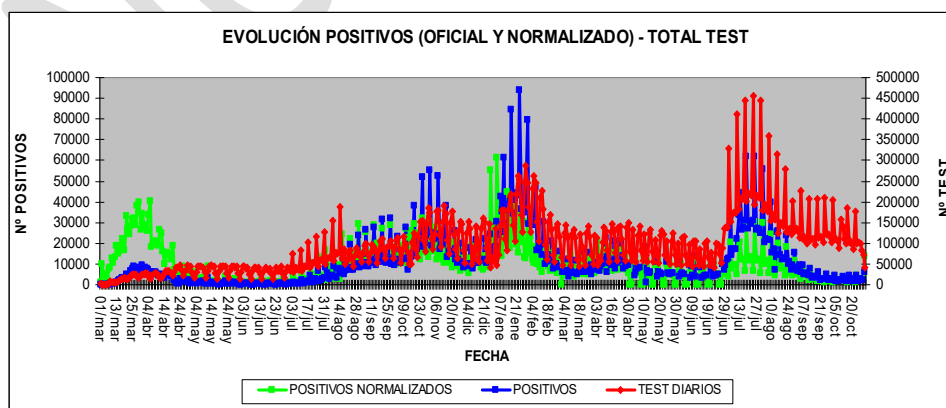
pandemia hasta finales de octubre de 2021, de 94.932, y considerando los 16.904 contagiados, representaría un 17,81% (línea negra en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). De esta manera se justifica que si se utilizase este 20% de positivos comentado anteriormente como índice de referencia, sería mucho más coherente para que se pudiesen tomar medidas. Siguiendo con la interpretación de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, los porcentajes durante el resto de la pandemia coinciden con las épocas estacionales de la epidemia de la gripe y curiosamente fuera de estas épocas se aprecia una subida durante el periodo estival coincidiendo con la progresión en la administración de las dosis de la vacuna. El valor promedio obtenido a lo largo de la pandemia es de un 11,37%.

Para normalizar el número de positivos y que entonces no dependiera del nº de test realizados, se debería realizar el siguiente cálculo:

$$\text{nº positivos normalizado} = \frac{\text{media aritmética del nº de test realizados}}{\text{nº de test realizados diarios}} \cdot \text{nº de positivos}$$

De esta manera se obtiene el nº de positivos normalizados, en función del nº de positivos obtenidos en test de PCR.

La **Gráfica 7** muestra en valor absoluto, el número de positivos obtenidos en las pruebas PCR y su valor normalizado. Como se puede apreciar, si nos fijamos en el número de positivos sin normalizar (línea azul), y como ya se ha comentado anteriormente, en el período marzo-abril de 2020 al realizarse pocos tests se obtuvieron pocos positivos. Sin embargo, si nos fijamos en el valor normalizado (línea verde), expresa bastante mejor la realidad de lo que ocurrió en aquellas fechas, no siendo de gran significación respecto a la enfermedad lo ocurrido durante el resto del año hasta la fecha actual.



Gráfica 7. Evolución del número de positivos, del valor normalizado y del número total de tests

En el anexo se adjunta el estudio de los datos oficiales, sobre los resultados de las PCR'sy la utilización de la IA a 14 días en España para el período comprendido entre marzo del 2020 y octubre del 2021. De este estudio

Si lo comparamos con el porcentaje de positivos calculado de forma oficial y con un valor normalizado lo obtenido es todavía más significativo, ya que en el período inicial de la pandemia el porcentaje calculado con el valor normalizado se correlaciona mejor que el cálculo oficial con lo realmente ocurrido, mientras que el resto del año hasta la fecha actual se presentan con ambos cálculos porcentajes que en ningún momento han seguido la tendencia de las supuestas olas generadas por medio de las IA a 14 días y, en definitiva, de los positivos obtenidos con valores absolutos acordes con la variación del número de test realizados diariamente, pero no con los porcentajes de positivos calculados tanto teniendo en cuenta el valor oficial como el normalizado.

	% de +/- test de PCR	% de camas UCIs	% de +/- UCIs	% positivos oficial	% positivos normalizado
2ª ola	-1,02%	23,55%	5,76%	14,72%	15,30%
3ª ola	-0,09%	23,82%	10,07%	19,73%	21,11%
4ª ola	-13,53%	-7,69%	-9,68%	10,31%	11,81%
5ª ola	-33,07%	52,58%	7,45%	9,41%	6,14%
	-11,93%	23,06%	3,40%	13,54%	13,59%

En base al siguiente cuadro en todas estas olas creadas hay dos denominadores comunes:

- Comparando las curvas de las olas en la fase de descenso respecto a la de ascenso, se observa que el número de test realizado ha sido bastante menor, del orden de cerca de un 12% menor.
- En relación a las UCIs la ocupación en las fases de descenso respecto a las de ascenso ha sido del orden de casi un 23% mayor y el porcentaje de ocupación de camas sobre el total disponible ha sido del orden de un 3,40%. Por lo que las medidas de restricciones llevadas a cabo prácticamente no han tenido significado alguno en la planificación sanitaria, siendo el incremento más importante en la última ola coincidente con el período estival, donde ya no existe la epidemia estacional de gripe pero si ha coincidido con el mayor incremento del porcentaje de dosis de vacunación administradas.
- En ninguna de las olas la evolución del porcentaje de positivos tanto calculado oficialmente, como si se realiza de forma normalizada, del orden del 13%, hubiese justificado la toma de las medidas restrictivas que se han llevado a cabo durante esta pandemia al no haberse superado el valor del 20%.

A modo de conclusiones finales sobre la prueba RT PCR, destinada a la detección del virus SARS CoV 2, se puede aseverar lo siguiente:

- 1) Una prueba RT PCR positiva no se puede considerar válida para considerar un contagio, ya que la PCR es una técnica que en ningún momento sirve para diagnosticar una enfermedad.
- 2) La variación en el número de ciclos utilizado para las pruebas RT PCR en distintos laboratorios es igualmente inaceptable debido a la fácil manipulación de este parámetro que se puede realizar a conveniencia de las autoridades, más ciclos de amplificación más positivos. No se deben aceptar pruebas RT PCR con más de 25 ciclos, confirmado también por la propia OMS.
- 3) Para considerar que una PCR es positiva se debe demostrar su crecimiento directo en células del aparato respiratorio humano.
- 4) En base a lo afirmado por el Ministerio de Sanidad no se ha realizado ningún cultivo viral a lo largo de la pandemia y no existe un registro de laboratorios que pudieran hacerlo.
- 5) Se establece una correlación muy significativa entre nº de test realizados y positivos obtenidos ($r=0,61$), por lo que se establece de forma directa que a más test realizados mayor número de positivos, lo que da la posibilidad de jugar con el nº de test realizados en base a las decisiones que ha llevado a cabo la administración sanitaria.
- 6) Para la toma de medidas se utiliza el criterio de la IA a 14 días que no deja de ser la suma de los positivos durante los últimos 14 días, y como existe una correlación clara entre número de test realizados y número de positivos ese índice se presta al libre albedrío de test realizados diariamente.
- 7) Este libre albedrío se ha dado con las supuestas cinco olas en donde se han realizado en la fase de ascenso de la IA respecto a la fase de bajada un promedio de un 12% de test de menos, es decir una vez aplicadas las medidas restrictivas se baja el nº de test realizados.
- 8) Los porcentajes de positivos han oscilado con dientes de sierra continuos por debajo del 20% y con un valor promedio de 11,37% desde el inicio de la pandemia.
- 9) Teniendo en cuenta el cálculo con un valor normalizado como podría ser el valor promedio de test. realizado desde el inicio de la pandemia, y calculando la IA a 14 días en base a esa normalización se observa que durante toda la pandemia exceptuando en marzo-abril 2020 en solo una ocasión y de forma ligera se hubiese superado el valor límite de 500 por lo que no se hubiesen podido tomar las medidas que se han tomado.

- 10) La utilización del porcentaje estableciendo como límite un valor del 20% superándose durante 3 días consecutivos sería un índice bastante más justo que nos definiría mejor la situación epidemiológica y, a su vez, solucionaría los dientes de sierra de este valor porcentual.
- 11) La razón para considerar el valor del porcentaje y que el umbral para la toma de decisiones sea del 20%, superándose durante 3 días consecutivos se basa en que si tomamos el valor de 500 casos/100.000 habitantes de la IA a 14 días, eso nos indica que la media diaria de casos positivos sería de 36 lo que representan 16,904 contagios al día. Si lo calculamos con el valor normalizado con el promedio de test realizado desde el inicio de la pandemia, en este momento 94.932 test, tendríamos que los 16.904 contagiados representarían un 17,81% de positividad.
- 12) Los porcentajes de positivos tanto con el cálculo oficial como normalizado en ningún momento hubiesen definido nuevas olas ya que prácticamente no se hubiese superado ese valor del 20% exceptuando algún momento puntual pero en ningún caso se habría dado la premisa de la superación de los 3 casos consecutivos.
- 13) Teniendo en cuenta la IA a 14 días calculada oficialmente en ningún momento hubiese explicado el pico de marzo-abril 2020, y, en cambio si se dan las siguientes olas generadas por el número de test realizados diariamente, al alza o a la baja, durante las fases de ascenso y descenso de la ola. Por otra parte si se calcula la IA a 14 días normalizada se explicaría el pico ocurrido al inicio de la pandemia (marzo-abril 2020) no generándose prácticamente ola alguna durante el resto de la pandemia.
- 14) Con todo lo expuesto se concluye que el estadístico más adecuado a utilizar para realizar el seguimiento epidemiológico de los contagios sería el % de positivos en base a un valor normalizado y estableciendo como umbral para la toma de medidas un valor del 20% con el criterio de que se superen al menos 3 veces consecutivas ese porcentaje.
- 15) La utilización de la IA a 14 días entendida como se realiza por parte de la administración sanitaria no es una herramienta válida para hacer el seguimiento epidemiológico de los contagios, además de estar sujeta al albur del número de test de PCRs que se realicen con la consiguiente posibilidad de manipulación que ello ofrece, como se ha podido apreciar con la generación de las diferentes olas, habiendo sido más coherente la utilización del índice de porcentaje de positivos.

- 16) Se observa que la IA de los sintomáticos (30% de los positivos) en ningún momento superaba el valor referencia de 500 utilizado para la toma de medidas restrictivas alcanzando de forma puntual el valor de 200 y con un valor promedio de 72 frente a 243 calculado oficialmente.
- 17) Según se han ido administrando dosis de vacunas en diferentes países de Europa se aprecia en todos ellos que el número de casos positivos en este verano de 2021 han sido superiores a los encontrados en el verano de 2020. Igualmente se aprecia que aquellos países que presentan un mayor porcentaje de vacunación son los que tienen un mayor número de casos positivos.
- 18) Comparando las dosis de vacunas administradas con diferentes indicadores en la época estival 2020-2021 en España, se observa que tanto la IA, fallecidos, Ucis, así como en número de casos positivos han presentado valores más elevados durante la época estival del 2021 que en la del 2020.
- 19) De la comparativa de datos entre Suecia y España la conclusión es que la estrategia de Suecia ha sido bastante más acertada que la de España ya que todos los índices son bastante mejores en Suecia, al igual que éstos se dan con porcentajes de dosis de vacunación completa menores en Suecia que en España, y, por supuesto sin las medidas restrictivas que se han adoptado a lo largo de toda la pandemia en Euskadi.
- 20) De la comparativa de datos de fallecidos en España en los años 2020 y 2021 se aprecia que efectivamente en marzo-abril del 2020 hubo fuerte elevación con un pico de fallecidos que no se ha dado en el 2021, mientras que durante el verano del 2021 se ha dado un ligero repunte en el número de fallecidos respecto al verano de 2020, siendo probable que en este pico haya tenido bastante que ver la administración de las dosis de la vacuna.

2.4.1 Detalle del número de test realizados en cada una de las “olas epidemiológicas” en España.

Se adjunta como **(ANEXO VXI)** el documento que acredita la creación de las olas epidemiológicas en España, mediante la inclusión de resultados positivos en los test de forma indiscriminada y mediante la generación de alarma mediática.

2.5 RESUMEN DE LAS LIMITACIONES DE LA METODOLOGÍA

Así pues y resumiendo las limitaciones de la metodología, en primer lugar, las pruebas PCR no pueden ser específicas para un virus cuya secuenciación no ha sido realizada de un aislamiento de la propia secuencia. En segundo lugar, si el número de ciclos usados en estas pruebas es superior a 10, el resultado pueden dar lugar a un número de entre el 20 – 100% de falsos positivos. En este sentido, estos datos no son rigurosos y no deberían ser usados para la toma de ninguna decisión. Pero además, en tercer lugar, el propio uso e inclusión de los datos en estadística epidemiológica no es adecuado, ya que sólo se está utilizando el número de positivos en valor absoluto y queda demostrado que cuantos más test de PCR se realicen mayor número de positivos, aún sabiendo que muchos de ellos son resultados falsos por no estar confirmados mediante cultivos virales. El hecho de que se contabilizan como individuos diferentes las repetidas pruebas hechas a la misma persona, también engorda este listado de positivos cuyo valor también aumenta artificialmente al no estar normalizado estadísticamente.

3 CULTIVOS VIRALES y AISLAMIENTO del SARS CoV 2.

Los cultivos virales se basan en la capacidad que tienen los virus de replicarse en células. En realidad, aunque se utilice la palabra crecimiento de virus en cultivos virales, los virus no crecen, sólo se copia su material genético en el interior de la célula de cultivo. Esto es debido a que éstos no son seres vivos, sino biomoléculas, fragmentos de información genética, por lo que se requiere de la maquinaria celular y sus orgánulos para que esta secuencia génica o virus se replique y en ocasiones se envuelva en una cápside y salga de la propia célula al exterior. A esta fase se la denomina **fase infectiva** del virus y según la virología clásica, estas partículas virales terminarían destruyendo la célula de origen, lo que se denomina **citopatología o efecto citopatogénico**. Si se realiza un cultivo viral y se observa que las células sufren un cambio estructural o se destruyen, se interpreta como un **cultivo viral positivo** e indicaría una confirmación de que la enfermedad de ese paciente positivo, está producida por el virus del que se sospecha, siempre y cuando se hayan realizado los experimentos de control, que se explican más adelante, para descartar las condiciones del experimento como la causa de la muerte celular.

Numerosos virus humanos pueden identificarse mediante cultivos virales, ejemplos de ello son el adenovirus, citomegalovirus, virus de la influenza, virus sincitial respiratorio y el virus de la varicela zóster, por ejemplo (27).

3.1 Cultivos virales de SARS CoV 2. Modelos teóricos

En cuanto al virus SARS CoV 2, son muchos los modelos teóricos que se han publicado en la literatura científica que son capaces de replicar este virus. Sin embargo, estos modelos son puramente experimentales, sólo sirven para estudiar el virus en condiciones controladas de laboratorio y no como indicador de la enfermedad en pacientes positivos a las pruebas diagnósticas.

De hecho el propio CDC (Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas de EEUU), pone a disposición de todos los laboratorios del mundo cultivos de SARS CoV 2 para unos fines muy específicos, que ellos mismos definen en su web como investigación de fármacos antivirales, desarrollo de vacunas, estudios sobre la patogénesis o sobre la estabilidad estructural del virus (28).

Es muy relevante destacar el gran número de trabajos en los que se cultiva el virus SARS CoV 2 en líneas celulares VERO (29). Las líneas celulares VERO fueron aisladas del epitelio de un riñón de un mono verde africano (*Chlorocebus* sp.). Estas células tienen unas características biológicas muy específicas, son aneuplóides, es decir, tienen un número anormal de cromosomas y permiten una replicación continua, por lo que pueden dividirse indefinidamente sin envejecer. Esto permite que puedan realizarse en ellas un número infinito de **pases** (ver **Figura 4**).

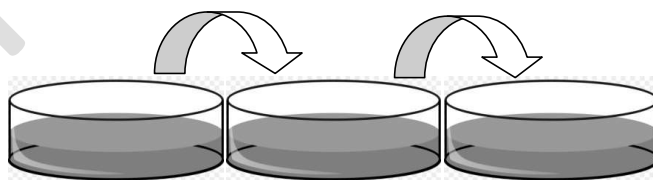


Figura 4. Los pases suponen transferir un pequeño número de células mezcladas con el virus de interés a un nuevo continente, hasta que se detecta la presencia del mismo. Con esta técnica se evita que las células mueran, antes de expresar el virus que se desea estudiar.

El mayor problema de utilizar células VERO en estos modelos teóricos es que, debido a la capacidad que tienen los virus de recombinación con el material genético celular, se ha comprobado experimentalmente que la propagación en serie del virus SARS CoV 2 en estas líneas celulares, conduce a un rápido aumento de las variantes genéticas, lo cuál conlleva una enorme peligrosidad y además, esos aislados de SARS CoV 2 que se propagan y estudian en todo el mundo, no representan con precisión la secuencia génica del virus que “presuntamente” circularía en la población (29).

Además de replicación en células VERO, hay estudios de propagación del virus en células Calu-3 o cancerígenas de pulmón que se usan en la industria farmacéutica para el desarrollo de fármacos por sus propiedades biológicas específicas de expresión de ciertos tipos de genes (30). También tenemos estudios en células Caco-2 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano (31), hay modelos con células madre pluripotentes y organoides (32), células Huh-7 derivadas de carcinoma de hepatocitos (33) e incluso hay estudios donde se diseñan variantes artificiales del virus SARS CoV 2 para estudiar su posible infectividad (34).

Al final, estos experimentos **no dejan de ser modelos teóricos de laboratorio donde poder estudiar ciertos aspectos de la biología de los virus y sirven única y exclusivamente para el desarrollo de vacunas o fármacos, no son una confirmación de la enfermedad en pacientes positivos.**

3.2 [Un modelo realista de cultivo viral.](#)

En este sentido, una correcta confirmación de la presencia del virus SARS CoV 2 en pacientes positivos a las pruebas diagnósticas que descartaría los falsos positivos, que es lo que realmente tiene importancia para poder prescribir tratamientos correctos y para poder tomar datos de importancia en estadística epidemiológica, que afecten a la toma de decisiones por parte de nuestras autoridades sanitarias, se describe en este apartado.

Un modelo realista de cultivo viral, que confirme la presencia del virus SARS CoV 2, debe ser aquél procedente de las células de muestras de pacientes con pruebas diagnósticas con resultado positivo, en el que no intervengan células animales.

Los cultivos del epitelio de las vías respiratorias humanas (HAE), que imitan eficazmente el entorno bronquial humano, permiten el cultivo de una amplia variedad de partículas virales respiratorias humanas como el virus de la influenza, virus respiratorio sincitial, adenovirus y coronavirus (35). La propagación inicial de secreciones respiratorias humanas en cultivos

utilizando células pluripotentes inducidas específicas del paciente (iPSC) (37), seguida de microscopía electrónica de transmisión y amplificación, secuenciación comprobación de la presencia de moléculas del transcriptoma humano del sobrenadante del cultivo, para descartarlo como falso positivo, puede ser un enfoque útil para la visualización y detección de nuevos virus respiratorios humanos, que han eludido la identificación mediante enfoques tradicionales.

Los cultivos en células animales, no reflejan a la perfección los síntomas de enfermedades humanas y no representan con precisión el tejido nativo, por ello pueden dar falsos positivos (37).

Los datos demuestran que los cultivos en células HAE, que se asemejan morfológicamente y funcionalmente a las vías respiratorias humanas *in vivo*, representan un sistema de cultivo universal robusto para aislar y comparar todas las cepas de coronavirus humanos contemporáneas (36).

La mejor opción para confirmar la presencia en pacientes positivos del virus SARS CoV 2, sean los cultivos en células humanas del aparato respiratorio, del mismo paciente. Se recoge líquido nasofaríngeo del paciente, se cultiva y si el resultado es positivo se aislaría la partícula viral viable, de la cual se procedería a realizar un test RT PCR calibrado. Con un positivo a menos de 10 ciclos de amplificación dirigido a genes diana consensuados y específicos de SARS CoV 2, tendríamos un positivo correctamente confirmado válido para ser contabilizado en la batería de datos de estadística epidemiológica y ese paciente podría tener un correcto diagnóstico y por tanto un adecuado tratamiento de los síntomas.

3.3 Experimentos de control.

Los experimentos de control son pruebas científicas realizadas bajo condiciones controladas, es decir, que sólo uno (o algunos) factores cambian en un momento dado, mientras el resto se mantiene constante.

En el contexto de los ensayos con cultivos celulares para comprobar la infectividad de un virus, estas pruebas de control se deben realizar para descartar las condiciones del experimento, como causantes y/o adyuvantes de la muerte celular y/o determinar la afección de estos factores. Las condiciones de los cultivos suelen ser escasez de nutrientes y toxicidad por

antibióticos o cualquier otro tóxico presente en el suero utilizado, y esas condiciones debilitan e intervienen en la función biológica normal de las células.

Los cultivos celulares utilizados para ensayos con el SARS CoV 2 trabajan en entornos de laboratorio que difieren del ambiente de nuestro organismo y se deberían realizar las pruebas de control para descartar las condiciones del experimento como la causante de la muerte celular. Sin embargo, en la metodología de todos los estudios sobre la infectividad del SARS CoV 2 no se han realizado estas pruebas. Sin estos experimentos de control, los resultados obtenidos no se pueden interpretar rigurosamente como **citopatogenia o efecto citopático** por infección vírica hacia las células del cultivo.

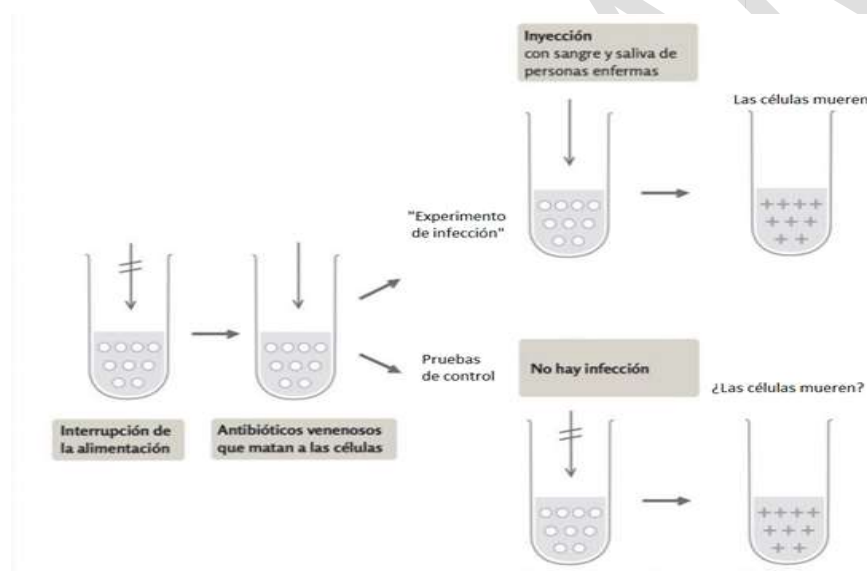


Figura 5. Esquema ilustrativo sobre la muerte celular de los cultivos, que ilustra la dificultad de discernir entre si la causaron virus o las condiciones del experimento (Fuente: (38)).

3.4 Aislamiento del virus SARS CoV 2.

El aislamiento de células de tejidos supuestamente infectados para el desarrollo de un cultivo celular, no debe confundirse como un aislamiento propiamente dicho del virus. El concepto de aislamiento de la partícula viral tampoco es aislar y secuenciar un fragmento de ARN, tal y como se realiza en la metodología oficial. Así pues, y como ya se ha dicho anteriormente, la secuenciación de un genoma no implica aislamiento de la secuencia, por lo tanto, no son sinónimos.

Para el aislamiento propiamente dicho de un virus o de cualquier bacteria u otra partícula con material genético, se debería seguir la siguiente metodología:

- Primero se toman muestras (sangre, esputo, secreciones) de muchas personas (por ejemplo, 500) con síntomas que son lo suficientemente únicos y específicos como para caracterizar una enfermedad.
- Sin mezclar estas muestras con ningún tejido o producto que también contenga material genético, se debe macerar, filtrar y centrifugar, es decir, **purificar la muestra**. Esta técnica de virología se realiza durante décadas para aislar bacteriófagos (39; 40; 41) y los llamados virus gigantes en todos los laboratorios de virología, y permite al virólogo mostrar con microscopía electrónica miles de partículas de tamaño y formas idénticas. Estas partículas son el virus aislado y purificado.
- A continuación, se comprueba la uniformidad de estas partículas idénticas mediante técnicas físicas y/o microscópicas.
- Una vez que se determina la pureza, las partículas pueden caracterizarse más. Esto incluiría examinar la estructura, morfología y composición química de todas ellas. A continuación, su composición genética se caracteriza por extraer el material genético directamente de las partículas purificadas y utilizar técnicas de secuenciación genética.
- Luego, se realiza un análisis para confirmar que estas partículas uniformes son de origen exógeno, es decir que son acelulares, como se conceptualiza oficialmente un virus, y descartar así que sean virus endógenos en fase extracelular, elementos del transcriptoma humano o productos de descomposición normales de los tejidos muertos y moribundos.

Es importante indicar aquí, que tanto los **retrovirus endógenos en fase extracelular**, como ciertos elementos del **transcriptoma humano**, así como **exosomas** y **cuerpos apoptóticos** (42; 43; 44), tienen la misma morfología y bioquímica que lo que la virología clásica define como virus patógenos de origen exógeno, es decir, que provienen del exterior del cuerpo. Por lo tanto, es muy importante diferenciar que el material genético que recogemos de los pacientes proviene del virus SARS CoV 2 y no de alguno de los elementos del propio cuerpo humano.

En este sentido, es muy relevante puntualizar que en ninguno de los trabajos revisados que indican haber aislado el virus SARS CoV 2, se han seguido estos pasos citados más arriba, que permitan diferenciar si el ARN recogido es de un virus exógeno o del propio cuerpo. Y en lugar de aislar la partícula viral desde el inicio, (tómese como ejemplo los primeros trabajos (2)

realizados en febrero del 2020), después de haber desarrollado el cultivo celular en condiciones de laboratorio (desnutrición y toxicidad), aíslan, como ya se ha comentado, todo el ARN presente y lo separan sólo del ARN ribosómico para su secuenciación. El resultado de la secuenciación de este ácido ribonucleico aislado, lo interpretan como la secuencia presente en las partículas virales. Pero no se puede descartar que esta secuencia pertenezca al transcriptoma humano, al no haber realizado el aislamiento propiamente dicho de la partícula viral.

Todos los estudios posteriores a (2) se basan en la misma metodología, ya que es el trabajo que se ha tomado como modelo de la pandemia. Toman muestras no purificadas de relativamente pocas personas (del orden de 10 individuos), con una sintomatología similar. A continuación, procesan e inoculan esta muestra sin purificar en un cultivo de tejidos de diferentes animales (células VERO, por ejemplo). El cultivo de tejidos se desnutre y se añaden antibióticos (esto se realiza para asegurar que no hay presencia de bacterias) con lo que evidentemente las células del cultivo pueden desintegrarse en muchos tipos de partículas, algunas de las cuales contienen material genético recombinado.

Este caldo, que contiene fragmentos de material genético humano e incluso del **microbioma**³ (³*el microbioma son el conjunto de bacterias y virus que acompañan al ser humano. Se sabe que son millones y que recubren todas las superficies de nuestro cuerpo*), se somete luego a un análisis genético, utilizando los métodos de secuenciación de última generación, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Es decir mediante reacciones en cadena de la enzima polimerasa (PCR's) y marcadores radioactivos o fluorescentes (dependiendo de la técnica) y un proceso de simulación e iteración por computadora (que busca posibles secuencias con los fragmentos amplificados y los compara con una secuencia modelo), obtienen la supuesta secuencia del presunto virus.

Por otro lado, en ningún momento se puede confirmar la presencia de un virus real mediante microscopía electrónica, ya que no pueden asegurar que el material genético obtenido (de esta forma teórica), pertenezca a dicha imagen, si la partícula, o la secuencia, no ha sido aislada y purificada. Únicamente aíslan ARN de todo el caldo de cultivo, que lo separan del ribosómico, y que después debe pasar un proceso de transcripción a ADN para poder ser amplificado mediante técnicas de PCR. En ningún momento se extrae y se secuencia un genoma de un virus aislado. Por tanto, la secuencia del SARS CoV 2 obtenida por la

metodología que se está utilizando, no puede confirmarse como físicamente real, si no ha sido aislada previamente.

4 CONCLUSIONES.

En el presente documento se evalúa la importancia de realizar cultivos virales de confirmación a las personas con resultado positivo en los test comerciales de detección del virus SARS CoV 2 que está utilizando el Ministerio de Sanidad Español, en base a una enorme batería de pruebas que ratifican el hecho de que los test comerciales utilizados tienen sus limitaciones, dando como resultado un número determinado de falsos positivos.

Estas personas con un falso positivo han sufrido una estigmatización al creerse contagiadas, se les ha privado de su derecho fundamental a la libre circulación, han sido mal diagnosticadas y algunas han recibido tratamientos erróneos, que podrían haber sido causa de muerte en algunos casos. Estos hechos, tienen si cabe una mayor gravedad si los extrapolamos a una sociedad entera, ya que las autoridades sanitarias han usado los resultados en estos test sin confirmar, para limitar las libertades de los ciudadanos, promover un miedo injustificado y una necesidad de vacunación, que sin duda no se ajustaba a la realidad inmunológica de la población, puesto que no se ha evaluado el nivel de anticuerpos de los españoles en 2021.

Para evitar estos graves atentados contra la integridad de las personas se deben tener en cuenta las siguientes conclusiones:

- La secuenciación del virus SARS CoV 2 se ha utilizado como sinónimo de aislamiento, cuando en realidad, sin cultivo viral de confirmación y/o sin aislamiento propiamente dicho de la partícula viral, esas secuencias no se puede asegurar que no pertenezcan a la expresión génica de nuestro propio genoma.
- Sin confirmación de que la secuencia del SARS CoV 2 existe físicamente como tal, no se pueden diseñar los cebadores que se utilizarían para las pruebas de PCR. Por tanto, los cebadores utilizados pueden ser fragmentos del propio transcriptoma humano.
- Tanto los test de antígenos, como los test PCR, sin cultivos de confirmación no pueden asegurar que el resultado positivo sea real y no se corresponda con otros virus o bacterias, incluso con el propio genoma y sus productos de expresión.
- La técnica PCR necesita ser calibrada mediante cultivos virales para establecer el umbral de ciclo y validar a partir de cuántos ciclos los positivos en esta prueba son

falsos y por tanto, han de ser descartados, exonerando así a las personas sin síntomas o asintomáticas, de ser potenciales contagiadores.

- Se deben realizar más estudios de seroprevalencia para comprobar que nivel de inmunización natural tiene actualmente la población española, antes de seguir realizando más test o seguir instando a la vacunación. Tres estudios de seroprevalencia con 60.000 personas del año 2020 no es reflejo de la situación actual, sin embargo se siguen haciendo cada vez más test sin comprobar los anticuerpos.
- La Agencia Española del Medicamento debería tener la obligación de tener un registro de los cebadores utilizados en la prueba PCR y si éstas están calibradas mediante cultivos virales, para asegurar que los positivos se dan a un umbral adecuado de ciclo.
- Con la evidencia científica de la que disponemos en la actualidad podemos decir que el número de ciclos de entre 30 y 45, utilizados de por las comunidades autónomas que han enviado esta información a través de la Ley de Transparencia, es inadecuado ya que sabemos que a este número de ciclos, una prueba PCR calibrada podría dar hasta un 100% de falsos positivos. Por lo tanto, se debe instar a las comunidades autónomas a calibrar las pruebas PCR y establecer un umbral de ciclo adecuado.
- En cuanto al uso de los positivos sin confirmar en estas pruebas, se aportan evidencias estadísticas suficientes para afirmar que se ha hecho una utilización totalmente negligente del número de positivos, para respaldar las medidas restrictivas adoptadas durante la pandemia. Es vital exigir que sólo se tengan en cuenta como indicadores epidemiológicos los positivos confirmados mediante cultivos virales, así como un valor normalizado de los mismos, que funcione como indicador más veraz de los contagios y la evolución de la epidemia y evitar la creación artificial de “olas” que sirvan a los intereses políticos.
- Sobre los cultivos virales, se aporta base científica para concluir que se deben realizar experimentos de control de los mismos para evitar resultados erróneos que se deban a las condiciones del experimento y no utilizar células animales, ni cancerígenas o totipotentes para realizar dichos cultivos en personas positivas, por su poco parecido con el modelo de enfermedad humano. Si bien pueden ser válidos para modelos teóricos de estudio del virus, en la práctica no se ajustan a la situación real de un cuerpo humano. Para ello, se debe usar el cultivo en células del aparato respiratorio (HAE), del que se adjuntan en este informe modelos reales en los que éstas células reproducen a la perfección el tejido respiratorio del paciente y por tanto, son la mejor

La importancia de la realización de cultivos virales de SARS CoV 2 y de su aislamiento completo, para la confirmación de la causalidad entre el virus y la enfermedad COVID 19.

forma de evaluar la patogenia del enfermo, lo que ayudará a concluir con diagnósticos realistas y una gestión epidemiológica adecuada.

NO COPIAR

5 **REFERENCIAS**

1. Statista. (2020). "Número de personas fallecidas a consecuencia del coronavirus a nivel mundial a fecha de 31 de octubre de 2021, por continente". <https://es.statista.com/estadisticas/1107719/covid19-numero-de-muertes-a-nivel-mundial-por-region/>
2. Wu, F., Zhao, S., Yu, B. *et al.* (2020). "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China". *Nature* **579**, 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
3. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., *et al.* (2019). "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China". *The New England Journal of Medicine*. **382**, 727 - 733
DOI: [10.1056/NEJMoa2001017](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017)
4. Instituto de Salud Carlos III-ISCIII. (2020). "¿Qué es la secuenciación genética? Una herramienta más para combatir el nuevo coronavirus". <https://www.isciii.es/InformacionCiudadanos/DivulgacionCulturaCientifica/DivulgacionISCIII/Paginas/Divulgacion/InformeCoronavirusSecuenciacion.aspx>
5. Organización Mundial de la Salud-WHO. (2021). "Secuenciación del genoma del SARS-CoV-2 confines de salud pública: Orientaciones provisionales, 8 de enero de 2021". https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-genomic_sequencing-2021.1
6. Blinov, V.M., Zverev, V.V., Krasnov, G.S. *et al.* (2017) "Viral component of the human genome". *Molecular Biology*. **51**, 205–215, <https://doi.org/10.1134/S0026893317020066>
7. Hofmann H., *et al.* (2021). "Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**:(22), 7988-7993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409465102>
8. Melé, M. *et al.* (2015). "The human transcriptome across tissues and individuals" *Science*. **348**, 660-665. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aaa0355>
9. GISAID. Global Initiative on Sharing All Influenza Data. <https://www.gisaid.org/>
10. National Library of Medicine. National Centre for Biotechnology Information NCBI Virus. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?VirusLineage_ss=Severe%20acute%20respiratory%20syndrome%20coronavirus%20%20\(SARS-CoV-2\),%20taxid:2697049&SeqType_s=Nucleotide](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?VirusLineage_ss=Severe%20acute%20respiratory%20syndrome%20coronavirus%20%20(SARS-CoV-2),%20taxid:2697049&SeqType_s=Nucleotide)
11. U.S. Food and Drug Administration. (2021). "Potential for False Positive Results with Antigen Tests for Rapid Detection of SARS-CoV-2 - Letter to Clinical Laboratory Staff and Health Care

- Providers". <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/potential-false-positive-results-antigen-tests-rapid-detection-sars-cov-2-letter-clinical-laboratory>
12. Instituto Carlos III. (2020). "Informe Sobre Estrategia De Diagnóstico Microbiológico Del Covid-19 (Actualización)".
<https://www.semergen.es/files/docs/COVID-19/Documentos/informe-lestrategia-microbiologico.pdf>
13. Cardeñosa N. (2009) "Estudios seroepidemiológicos". Rev. Esp. Salud Pública **83**:(5) Madrid.
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272009000500002
14. Ministerio de Sanidad de España. (2021). "Estudio Nacional de sero-Epidemiología de la Infección por SARS-CoV-2 en España (ENE-Covid)".
<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/ene-covid/home.htm>
15. De FeanDoe - Modified version from Walber's Precision and Recall
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Precisionrecall.svg>, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=65827036>
16. Mullis KB. (1990). "Reacción en cadena de la polimerasa". *Investigación y ciencia*.
<https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/deforestacin-en-los-trpicos-272/reaccin-en-cadena-de-la-polimerasa-5190>
17. Serrato A., Flores LI., Aportela J., Sierra E. (2014). "PCR: reacción en cadena de la polimerasa". *Herramientas moleculares aplicadas en ecología aspectos teóricos y prácticos*. **3**, 53 – 73
https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa
18. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov>
19. Corman VM., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D., Bleicker T. et al. (2020). "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR". *Euro Surveill*. **25**(3):2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
20. Organización Mundial de la Salud (WHO). (2020). "Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en las que se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el SARS-CoV-2". <https://www.who.int/es/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020-05>
21. Scherzinger, C. A., (1999). "A systematic analysis of PCR contamination". *J Forensic Sci* **44**(5): 1042 – 5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10486955/>
22. Crespo MP. (2000). "El diagnóstico viral por el laboratorio". *Colombia Médica* **31**(3): 135 – 150. <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/166>

23. La Scola B., Le Bideau M., Andreani J. *et al.* (2020). "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* **39**, 1059–1061. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>
24. Cohen A., Dessel B. (2020). "False positives in reverse transcription PCR testing for SARS-CoV-2". *MedRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080911>
25. Cao, S., Gan, Y., Wang, C. *et al.* Post-lockdown SARS-CoV-2 nucleic acid screening in nearly ten million residents of Wuhan, China. *NatCommun* **11**, 5917 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19802-w>
26. Presidencia del Gobierno de España, (2021). "España ha realizado más de 60 millones de pruebas diagnósticas desde el inicio de la epidemia por COVID – 19. https://www.lamondcloa.gob.es/serviciosdeprensa/notasprensa/sanidad14/Paginas/2021/111021-pruebas_diagnosticas.aspx
27. Leland, D. S. & Ginocchio, C. C. (2020). "The role of cell culture for virus detection in the age technology". *Clinical Microbiology Reviews ASM Journals*. **20**: 1. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>
28. Centre for Disease Control and Prevention. (2020). "SARS-CoV-2 Viral Culturing at CDC". <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/grows-virus-cell-culture.html>
29. Funnell, S.G.P., Afrough, B., Baczenas, J.J. *et al.* (2021). "A cautionary perspective regarding the isolation and serial propagation of SARS-CoV-2 in Vero cells". *Vaccines* **6**, 83 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00346-z>
30. Hui Xin Ong, Traini D., Young P. (2013). "Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line". *Expert Opinion on Drug Delivery*, **10**:(9), 1287-1302, DOI: [10.1517/17425247.2013.805743](https://doi.org/10.1517/17425247.2013.805743)
31. Shuai, H., Chu, H., Hou, Y., Yang, D., Wang, Y., Hu, B., Huang, X., Zhang, X., Chai, Y., Cai, J. P., Chan, J. F., & Yuen, K. Y. (2020). "Differential immune activation profile of SARS-CoV-2 and SARS-CoV infection in human lung and intestinal cells: Implications for treatment with IFN-β and IFN inducer". *The Journal of infection*, **81**:(4), e1–e10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.07.016>
32. Han, Y., Duan, X., Yang, L. *et al.* (2021). "Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids". *Nature* **589**, 270–275. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2901-9>
33. Schmidt, N., Lareau, C.A., Keshishian, H. *et al.* (2021). "The SARS-CoV-2 RNA–protein interactome in infected human cells". *Nat Microbiol* **6**, 339–353. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00846-z>

34. Yixuan J. Hou, Chiba S., Hlafmann P., Ehre C., Kurodakeneth M., Dinnon H., Leist S., Schäfer A., Nakajima N. (2020). "SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo". *Science* **370**:(6523), 1464-1468. DOI: [10.1126/science.abe8499](https://doi.org/10.1126/science.abe8499)
35. Banach B., Orenstein J., Fox L., et al. (2009). "Human airway epithelial cell culture to identify new respiratory viruses: Coronavirus NL63 as a model". *Journal Virol Methods*, **156** (1) : 19 - 26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671689/>
36. Dijkman, et al. (2013). "Isolation and characterization of current human coronavirus strains in primary human epithelial cell cultures reveal differences in target cell tropism" *Journal of Virology*. **87**: 11. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.03368-12>
37. Calvert, B. A & Ryan A. L. (2019). "Application of iPSC to modelling of respiratory diseases". *Cell biology and translational medicine* **7**: 1 – 16. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F5584_2019_430
38. WISSENSCHAFTPLUS magazin 01/2020 · Auszug. <https://wissenschaffplus.de/uploads/article/wissenschaffplus-un-error-de-interpretacion-parte-1.pdf>
39. J. K. Akhwale, M. Rohde, C. Rohde, B. Bunk, C. Spröer, H. Iddi Boga, Hans-Peter Klenk, J. Wittmann. (2019). "Isolation, characterization and analysis of bacteriophages from the haloalkaline lake Elmenteita, Kenya". *PLOS* **14**(4): e0215734 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0215734>
40. Gabriel Gaviria A, María González de S, Jhon Castaño O. (2010) "Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5α a partir de aguas residuales". *Revista MVZ Córdoba* **17**(1): 2852-2860 https://www.researchgate.net/publication/262505804_Bacteriophages_specific_for_DH5a_strain_of_E_Coli_from_wastewater_isolation_techniques
41. C. Carvalho, M. Susano, E. Fernandes, S. Santos, B. Gannon, A. Nicolau, P. Gibbs, P. Teixeira, J. Azeredo. (2010). "Method for bacteriophage isolation against target Campylobacter strains". *Journal of Applied Microbiology*. **50**: 192 – 197. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2009.02774.x>
42. Nisole, S. & Saib, A. (2004). "Early steps of retrovirus cycle". *Springer* **1**:(9) <https://link.springer.com/article/10.1186/1742-4690-1-9>
43. Grandi, N.; Tramontano, E. (2017) "Type W Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) Integrations and Their Mobilization by L1 Machinery: Contribution to the Human Transcriptome and Impact on the Host Physiopathology". *Viruses* **9**: 162. <https://doi.org/10.3390/v9070162>

44. Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R. *et al.* (2013) "Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies". *J Neurooncol* **113**: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>

NO COPIAR