



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, UNAN-MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

“LUIS FELIPE MONCADA”

DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO

SEMINARIO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA

Tema: *El diagnóstico microbiológico en la infección por SARS-CoV-2.*

Sub Tema: *Métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2 utilizados en América, enero 2020-septiembre 2021.*

Autores:

- Br. María Fernanda Sánchez Espinoza
- Br. Gema Esperanza Díaz

Tutora: MSc. Kenia Lizeth García Rosales

Enero. Managua, Nicaragua.

Dedicatoria

Primeramente, a nuestro Dios por ser el dador de la vida, sabiduría, nuestra guía, proveedor y fortaleza durante todo el proceso.

A nuestros padres que durante toda nuestra vida han velado por el bienestar y educación, siendo las personas más importantes que con dedicación, amor y comprensión nos brindaron ese apoyo incondicional y de esta manera esta meta alcanzada da honor a tanto esfuerzo, que a pesar de tantas dificultades y obstáculos nos impulsan a seguir adelante.

Agradecimientos

En primer lugar, le damos gracias a Dios por protegernos durante todo el proceso y darnos las fuerzas para superar obstáculos y dificultades, por brindarnos la sabiduría y el tiempo para realizar dicho trabajo y por haber conocido en el transcurso de este camino a muchas personas que colaboraron con sus conocimientos para hacer este sueño realidad.

A nuestros padres, por el apoyo incondicional, amor y comprensión. A nuestra tutora MSc. Kenia García Rosales quien nos ayudó con sus valiosos conocimientos.

A cada docente que nos motivó y enseñó a luchar por ser excelentes profesionales y al Instituto Politécnico de la Salud, POLISAL/UNAN-Managua por permitirnos culminar nuestros estudios.

Resumen

El coronavirus SARS-CoV-2 es un nuevo tipo de coronavirus, detectado por primera vez en 2019 en China, el 80% de los casos se recuperan de la enfermedad, alrededor del 15% desarrollan una enfermedad grave y el 5% llegan a un estado crítico. El diagnóstico correcto y rápido de la infección por SARS-CoV-2 es crucial esto permite identificar pacientes positivos asintomáticos y brindar atención temprana. En general, la técnica RT-qPCR es el Gold estándar para el diagnóstico de SARS-CoV-2, sin embargo, existen diversas metodologías adaptadas a las necesidades según la disposición de cada región. Con el fin de complementar la detección del virus han surgido inmunoensayos y pruebas rápidas que contribuyen el seguimiento y control de la enfermedad.

En esta investigación se describen los métodos de detección disponibles para SARS-CoV-2 en América, las metodologías de RT-qPCR, las técnicas diagnósticas basadas en inmunoensayos de tipo ELISA y pruebas rápidas, de igual forma realizó una comparación de los parámetros analíticos de desempeño y se indica la utilidad estas metodologías.

La información fue obtenida de informes, artículos científicos y páginas web que desarrollaran la temática en estudio. A partir del análisis de la información se concluyó que las metodologías utilizadas en América de la técnica de RT-qPCR están basadas en la detección del gen N, S y ORF1ab con parámetros analíticos superiores respecto a las otras técnicas, en cambio los inmunoensayos de tipo ELISA reportados son principalmente automatizados dirigidos al dominio RBD cualitativos y cuantitativos para IgM, IgG e IgA. En tanto el desarrollo de pruebas rápidas se basa en Inmunocromatografía de flujo lateral a partir del uso de oro coloidal para detección de antígenos y anticuerpos, estas técnicas representan una herramienta útil en etapas tardías de la infección para el control y seguimiento de la enfermedad como también estudios de inmunidad y contribución a la contención de la enfermedad en zonas de difícil acceso.

Managua, 11 de enero del 2021

Valoración del tutor

El presente seminario de graduación con el subtema “***Métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2 utilizados en América, enero 2020-septiembre 2021***”, contiene información científica actualizada, siendo un valioso aporte bibliográfico sobre esta temática de gran importancia para la salud pública.

Por lo antes expuesto, a través de la presente y en calidad de tutora, hago constar que el documento presentado por los bachilleres ***María Fernanda Sánchez Espinoza*** y ***Gema Esperanza Díaz***, reúne los requerimientos establecidos para ser presentado ante el comité de evaluación del Departamento de Bioanálisis Clínico del Instituto Politécnico de la Salud, POLISAL, UNAN-Managua.

MSc. Kenia Lizeth García Rosales
Departamento de Bioanálisis Clínico
Tutora

Índice

1. Introducción	1
2. Justificación	2
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos específicos	4
4. Desarrollo del subtema	5
4.1. Generalidades del virus SARS-CoV-2	5
<i>4.1.1. Filogenia</i>	5
<i>4.1.2. Estructura del SARS-CoV-2</i>	6
<i>4.1.3. Estructura del genoma viral</i>	7
<i>4.1.4. Ciclo de Replicación</i>	8
<i>4.1.5. Patogénesis de la infección por SARS-CoV-2 en humanos.</i>	9
<i>4.1.6. Respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2</i>	9
4.2. Diagnóstico de SARS-CoV-2	11
4.3. Metodologías de RT-qPCR utilizadas para la detección de SARS en América. 17	
<i>4.3.1. RT-qPCR en tiempo real para SARS-CoV-2</i>	17
<i>4.3.2. Muestras utilizadas para la detección de SARS-coV-2 mediante RT-qPCR</i> ..	18
<i>4.3.3. Método de Extracción de ARN para detectar SARS-CoV-2</i>	19
<i>4.3.4. Criterios de interpretación</i>	22
4.4. Técnicas diagnósticas basadas en inmunoensayos de tipo ELISA y pruebas rápidas para de SARS-CoV-2	31
<i>4.4.1. Inmunoensayos de tipo ELISA para la detección de SARS- CoV-2.</i>	31

4.4.2.	<i>Pruebas rápidas (inmunocromatograficas)</i>	38
4.4.3.	<i>Pruebas Rápidas basadas en la detección de antígenos</i>	39
4.4.4.	<i>Pruebas rápidas basadas en la detección de anticuerpos</i>	40
5.	Características de desempeño analítico de los métodos de detección de la infección por SARS-Cov-2.	45
7.	Diseño Metodológico	54
8.	Conclusiones	56
9.	Bibliografía	58

1. Introducción

El Coronavirus tipo 2, identificado por primera vez a finales del 2019 en Wuhan, China en personas con neumonía severa, se propagó alrededor del mundo, ocasionando la pandemia de Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), produciendo en todo el mundo, hasta ahora al menos 4.919.395 muertos, desde que la oficina de la OMS en China dio cuenta de la aparición de la enfermedad en diciembre de 2019. (Universidad Médica, 2021)

Un diagnóstico correcto y rápido de la infección por SARS-CoV-2 es crítico, desde el punto de vista epidemiológico dado que muchas personas infectadas están asintomáticas, como desde el punto de vista clínico, para identificar y tratar a los pacientes con prontitud. (Med Clin (Barc). 2021. Respecto a los métodos de detección y diagnóstico aprobados por la FDA tan pronto como se conoció la secuencia viral de SARS-CoV-2, la PCR acoplada a transcripción reversa, fue el primer método empleado para diagnosticar COVID-19, debido a que las sondas de hidrólisis y cebadores necesarios se lograron producir rápidamente. Han surgido y circulado linajes genéticos del SARS-CoV-2 en todo el mundo desde el comienzo de la pandemia de COVID-19 estos linajes genéticos del SARS-CoV-2 en los Estados Unidos se monitorean de manera rutinaria a través de investigaciones epidemiológicas, vigilancia de la secuencia genética de los virus y estudios de laboratorio.

Ahora bien, existen una gran variedad de pruebas, sin embargo, el diagnóstico de certeza requiere la detección del SARS-CoV-2. Se ha verificado que las pruebas serológicas no se usan rutinariamente para diagnosticar infecciones por CoV, su importancia radica en la comprensión de la epidemiología de las infecciones emergentes por CoV Humanos (CoVH) y en el papel de las infecciones asintomáticas. Dado el avance de la ciencias, gracias a la disponibilidad de nuevas tecnologías existen en el mercado una gran variedad de pruebas disponibles pero cada una con características y utilidad diagnóstica distinta, es por esto que se ha realizado una investigación descriptiva, realizando una revisión bibliográfica de literatura científica en bases de datos como google académico, Pubmed , Biomed, Clinical trials con el objetivo de describir los métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2 utilizados en América de enero 2020 a septiembre 2021.

2. Justificación

La detección temprana de la infección por SARS-CoV-2 es una intervención crucial tanto desde el punto de vista epidemiológico como también clínico, para el control de pacientes infectados asintomáticos en tiempo oportuno que contribuye a reducir la transmisión del virus y el aumento progresivo de casos, evitando la saturación de sistemas de salud por hospitalizaciones, por lo que en el transcurso de esta problemática se han realizado innumerables ensayos de laboratorio que en la actualidad se siguen ejecutando con el fin de proporcionar herramientas que mejoren la eficiencia en el diagnóstico y detección de la enfermedad.

El diagnóstico estándar de oro de COVID-19 se logra mediante la identificación molecular del SARS-CoV-2 mediante pruebas de amplificación de ácido nucleico como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR). Sin embargo, muchos entornos de bajos recursos no están capacitados con equipos de laboratorio y recursos humanos para realizar una identificación molecular masiva. La falta de recursos y una alta demanda conduce a la diversificación de métodos de detección. En algunos países, también se implementan pruebas serológicas rápidas para complementar el diagnóstico molecular.

La gran expansión de la enfermedad representa un desafío importante para los países en desarrollo, en general, en América se han realizado inmunoensayos basados en pruebas serológicas cuyo uso ha sido con fines epidemiológicos, de vigilancia y continuamente ensayos moleculares con fines diagnósticos e investigativos. Es relevante como personal de laboratorio, conocer las diferentes metodologías diagnósticas disponibles para SARS-CoV-2 de tal forma que se haga buen uso de las mismas, optimizar las existentes a este nuevo contexto y contribuir al diagnóstico oportuno. Abordar esta temática es muy importante, ya que es una emergencia de salud pública internacional, dada la severidad de la infección y a su rápida distribución se siguen realizando diversos estudios para encontrar una solución a ello, con un óptimo protocolo diagnóstico de laboratorio.

Esta investigación permitirá al lector obtener una descripción de los métodos de detección disponibles para SARS-coV-2, además de realizar una comparación de los parámetros de desempeño valorando la eficacia de los mismos con el fin de aportar información actualizada de técnicas utilizadas en América, motivando así el desarrollo de futuras investigaciones basadas en la temática.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Describir los métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2 utilizados en América, enero 2020-septiembre 2021.

3.2. Objetivos específicos

1. Explicar las metodologías de RT-qPCR utilizados para la detección de SARS- CoV-2 en América.
2. Exponer las técnicas diagnósticas basadas en Inmunoensayos de tipo ELISA y pruebas rápidas para de SARS-CoV-2.
3. Comparar las principales características de desempeño analítico de los métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2.
4. Indicar la utilidad de las metodologías RT-qPCR, ELISA y Pruebas rápidas en el diagnóstico de SARS-CoV-2.

4. Desarrollo del subtema

4.1. Generalidades del virus SARS-CoV-2

4.1.1. Filogenia

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la subfamilia *Orthocoronavirinae* en la familia Coronaviridae del orden *Nidovirales*. fueron descritos por primera vez en 1966 a partir de las secreciones nasales de un paciente con rinitis (Acter et al., 2020). Son una subfamilia de virus ARN monocatenario de longitud variable (26-32 kb), de pequeño tamaño (65-125 nm de diámetro). Esta subfamilia se subdivide en cuatro géneros: *Alfa-coronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamma-coronavirus* y *Deltacoronavirus*. Normalmente, los dos primeros infectan mamíferos y los otros dos, aves y peces, aunque también es posible que infecten mamíferos. Aunque sus huéspedes naturales son animales como aves y diversos mamíferos, son capaces de transmitirse e infectar al ser humano, tratándose así de una zoonosis.

El análisis del árbol filogenético del nuevo coronavirus ha revelado que el SARS-CoV-2 pertenece, junto con SARS-CoV y Bat-SARS, a un lado diferente del MERS-CoV, y está filogenéticamente más relacionado con los coronavirus Bat-SARS aislados en China de los murciélagos de herradura (*Rhinolophus sp.*) entre 2015 y 2018, que al SARS-CoV. Este hallazgo sugiere que SARS-CoV y MERS-CoV han sufrido una evolución viral diferente, involucrando a los murciélagos como reservorio primario. (Petrosillo, 2020)

El SARS-CoV-2 apareció en Wuhan (provincia de Hubei, China) a finales de diciembre de 2019. Este nuevo virus es el causante de la enfermedad infecciosa del síndrome respiratorio agudo severo altamente transmisible conocida hoy en día como COVID-19. (puentes, 2020) El estudio de la secuencia del genoma de SARSCoV-2 ha demostrado que pertenece al género *Betacoronavirus*. (Chen, 2020)

4.1.2. Estructura del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 se caracteriza por poseer cuatro glucoproteínas estructurales principales la glucoproteína espiga o proteína S, la glucoproteína de envoltura (proteína E), la glucoproteína de membrana (proteína M) y la proteína nucleocápside (proteína N), además de diferentes proteínas accesorias (ORFs). La espiga o proteína S es una proteína transmembrana que forma parte de la porción externa del virus y que tiene aproximadamente un peso molecular de 150 kDa. Se caracteriza por formar homotrímeros que sobresalen en la superficie viral, otorgándole el aspecto de corona característico de esta familia de virus.

Su función es facilitar la unión de la envoltura del virus a las células huésped al interactuar con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) expresada en las células del tracto respiratorio inferior. (Astuti, 2020)

La proteína S es escondida por la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) con la cooperación de la furina de la célula hospedadora en dos subunidades funcionales S1 y S2 La subunidad S1 es la responsable de la unión al receptor de la célula huésped y la subunidad S2 se encarga de la fusión de las membranas viral y celular. (Astuti, 2020)

Por su parte, la nucleocápside también conocida como proteína N está estructuralmente unida al material de ácido nucleico del virus (Astuti, 2020). Su función es mediar el ensamblaje viral interactuando con la proteína M y con el genoma (Naqvi, 2020). Otro componente importante que forma parte de este virus es la glucoproteína de membrana o proteína M ya que determina la morfología de la envoltura del virus y tiene la capacidad de unirse al resto de proteínas estructurales. El último componente por destacar es la envoltura o proteína E, que constituye la proteína más pequeña de la estructura del SARS-CoV-2. Su papel es fundamental en cuanto a la producción y maduración del virus (Astuti, 2020)

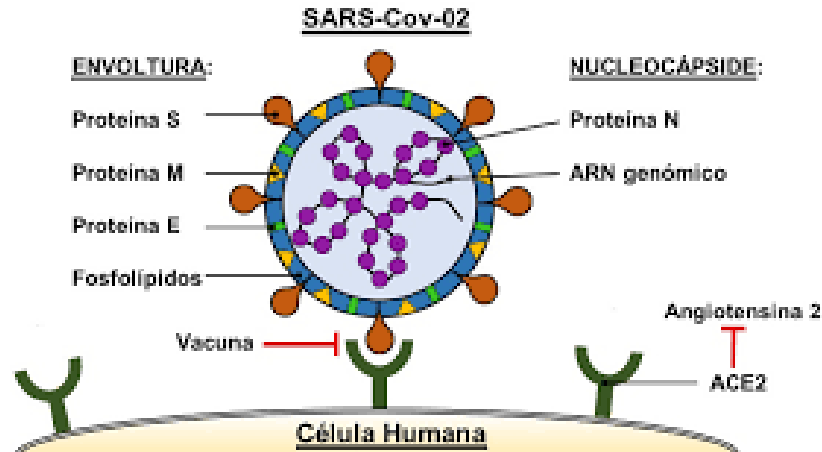


Figura 1. Organización estructural de SARS-CoV-2. Fuente. Universidad y salud col.2020

4.1.3. Estructura del genoma viral

El genoma del SARS-CoV-2 es un ARN monocatenario de sentido positivo (perteneciente a la clase IV según la clasificación de Baltimore) con una caperuza 5' y una cola poli-A 3' (Naqvi et al., 2020). Su composición genética la conforman entre trece y quince marcos de lectura (ORF) que contienen aproximadamente 30.000 nucleótidos y es muy similar a los genomas de SARS-CoV y Bat-SARS. (Naqvi, 2020)

La proteína estructural de mayor importancia como objetivo terapéutico es la glucoproteína espiga (S) ya que es la que se une a la célula hospedadora.

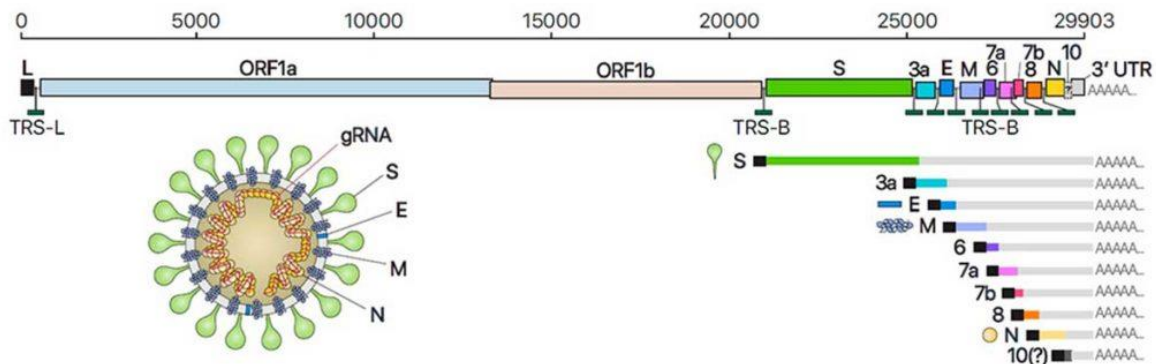


Figura 2. Composición de ARN genómicos y subgenómicos de SARS-CoV-2. Fuente. Biotech, 2020.

4.1.4. Ciclo de Replicación

Acoplamiento y entrada: La unión de la porción soluble de la proteína espiga (S), es decir, de su parte más externa, a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) es el primer paso de la infección de los neumocitos tipo II presentes en los alveolos, en los cuales se encuentra dicho receptor celular. Para entrar a la célula, el virus lo hace a través de las dos subunidades de la glucoproteína espiga (S), el complejo resultante es procesado proteolíticamente por la serin-proteasa transmembrana tipo II (TMPRSS2). En la membrana de la célula hospedadora se abre un poro por donde el virus penetra en la misma.

Replicación y transcripción: Una vez en su interior, el ARN viral es liberado en el citoplasma y este se une al ribosoma de la célula huésped, y posteriormente comienza la traducción del gen de la replicasa del ARN genómico.

Ensamblaje y liberación: Posteriormente, las glucoproteínas estructurales S, M y E recién formadas, se insertan en el retículo endoplásmico y se combinan con la proteína N. Los genomas virales son encapsulados por la proteína N, que migrarán en las vesículas hacia la membrana plasmática como viriones. En última instancia serán liberados por exocitosis como virus maduros.

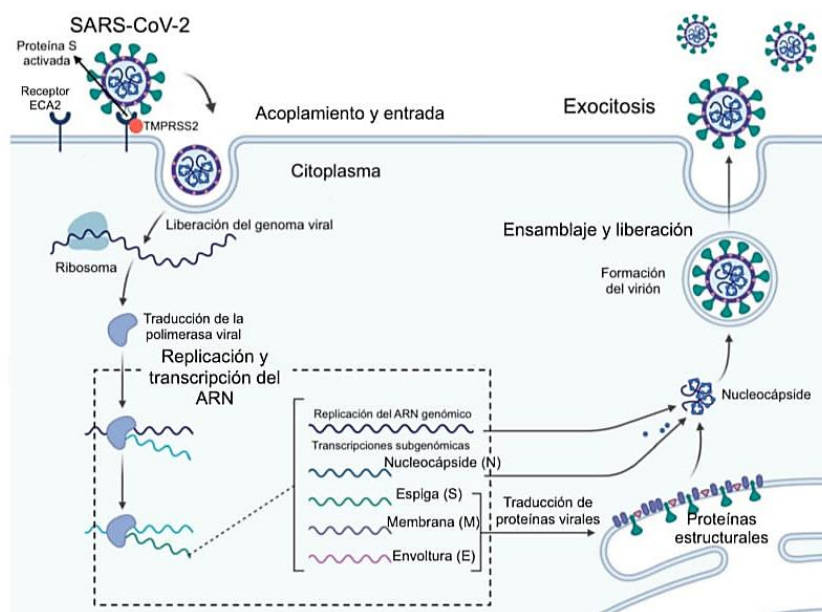


Figura 3. Ciclo de Replicación del SARS-CoV-2. Fuente: González Puente A. Técnicas de detección del SARS-CoV-2. Universidad de Coruña, 2020.

4.1.5. Patogénesis de la infección por SARS-CoV-2 en humanos.

La infección por SARS-CoV-2 se inicia por la unión de la proteína S a receptores presentes en la superficie de la célula huésped. El SARS-CoV-2 utiliza el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE 2) para ingresar a las células, se ha observado la expresión de ACE2 en el epitelio intestinal, en células cardíacas y endotelio vascular, y en niveles más bajos en monocitos, macrófagos y linfocitos. este receptor es una ectoenzima transmembrana que está altamente conservada entre los mamíferos, facilitando así la transferencia entre especies. El receptor de SARS-CoV-2, ACE2, se expresa principalmente en un pequeño subconjunto de células del pulmón llamadas células alveolares tipo 2. La proteína S es determinante para el tropismo y patogenicidad del hospedador y es de gran interés en términos de respuesta inmunológica y diseño de vacunas, ya que induce la formación de anticuerpos neutralizantes como un importante mecanismo de defensa inmune. El dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S es, por lo tanto, el principal objetivo de terapia y detección del SARS-CoV-2.

4.1.6. Respuesta inmune a la infección por SARS-CoV-2

El ingreso del SARS-CoV-2 en el organismo desencadena la activación de respuesta inmune innata y adquirida del individuo, que se expresará clínicamente de diversas formas. La respuesta inmune efectiva puede provocar la eliminación del virus y la generación de memoria inmunitaria contra la infección. En los casos de pacientes con infección grave por SARS-CoV-2, el desbalance de la respuesta inmunitaria que induce la secreción de citoquinas de manera descontrolada favorece el reclutamiento de células inflamatorias a múltiples órganos, principalmente los pulmones, desencadenando el cuadro clínico severo de COVID-19.

La seroconversión frente a la infección por el SARS-CoV-2, se inicia con la respuesta de anticuerpos de isotipo IgM, la cual se genera dentro de la primera semana después de los síntomas. Posteriormente, entre los 7-14 días después de la infección primaria, aparecen los anticuerpos de isotipo IgA e IgG los cuales permanecen por tiempo prolongado indicando exposición previa al virus (ver figura 4). (García, 2020)

El periodo de transmisibilidad puede comenzar 1 o 2 días antes de que aparezcan los síntomas, pero es probable que las personas sean más infecciosas durante el periodo sintomático, incluso si los síntomas son leves y muy inespecíficos. Ahora se estima que el periodo infeccioso dura entre 7 y 12 días en los casos moderados y hasta dos semanas en promedio en los casos graves. (García, 2020)

El marcador serológico más sensible y más temprano son los anticuerpos totales, cuyos niveles comienzan a aumentar a partir de la segunda semana de inicio de los síntomas. Aunque se ha encontrado que IgM e IgG por ELISA son positivos incluso el cuarto día después del inicio de los síntomas, los niveles más altos se producen en la segunda y tercera semana de enfermedad.

Típicamente, la mayoría de los anticuerpos se producen contra la proteína más abundante del virus, que es la N. Por lo tanto, las pruebas que detectan anticuerpos contra N serían las más sensibles. Sin embargo, el dominio de unión a receptores de la proteína S (RBD-S) es la proteína de unión del huésped, y los anticuerpos contra la RBD-S serían más específicos y se espera que sean neutralizantes. Por lo tanto, el uso de uno o ambos antígenos para detectar IgG e IgM resultaría en alta sensibilidad. Sin embargo, los anticuerpos pueden tener reactividad cruzada con SARS-CoV y posiblemente otros coronavirus.

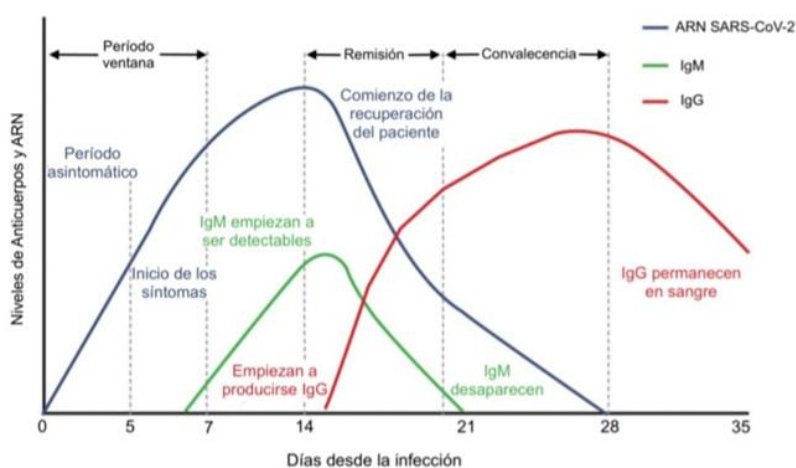


Figura 4. Evolución de la producción de anticuerpos y ARN durante la infección por SARS-coV-2. Fuente: González Puente A. Técnicas de detección del SARS-CoV-2 Universidad de Coruña, 2020.

4.2. Diagnóstico de SARS-CoV-2

A partir del inicio de la pandemia se han establecido métodos diagnósticos para confirmar la infección por SARS-CoV-2 a como también métodos complementarios de detección que agilizan la toma de decisiones, la confirmación habitual de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR inmediata, la detección molecular del virus utilizando protocolos bien diseñados suele ser muy específica; por lo tanto, un resultado positivo confirma la detección del virus.

Entre las otras alternativas de detección es importante incluir que durante los primeros días tras el inicio de los síntomas (de 1 a 5 días aproximadamente), se generan proteínas virales (antígenos) que pueden ser detectadas mediante diferentes ensayos (ELISA, inmunofluorescencia, o incluso pruebas rápidas). En general, la detección de antígenos presenta una especificidad aceptable (dependiendo del ensayo), por lo cual su detección puede ser usada como criterio de confirmación (en conjunto con la definición de caso, la historia clínica y los antecedentes epidemiológicos) y para tomar decisiones en el ámbito de la salud pública (p. ej., aislamiento). (OPS, 2020)

Dentro de las herramientas de detección también se encuentra los ensayos serológicos, estos son aquellos que permiten detectar los anticuerpos (IgM, IgG o IgA) generados como parte de la respuesta inmunitaria del individuo contra el virus de la COVID-19. En general, la mayor proporción de anticuerpos son producidos contra la proteína más abundante del virus, que es la de la nucleocápside (N). Por ello, los ensayos que detectan anticuerpos contra esta proteína podrían ser más sensibles. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos contra la proteína de unión a los receptores celulares (proteína S) suelen ser más específicos. (OPS, 2020)

Con todo esto, los ensayos serológicos (tanto pruebas de ELISA como pruebas rápidas) no son considerados pruebas diagnósticas y los resultados deben ser evaluados cuidadosamente a la luz de la información clínica, el resultado de otros ensayos y el contexto epidemiológico.

A continuación, se presenta una tabla que indica los métodos diagnósticos y recopila los datos principales sobre estudios que se han realizado en América a partir de la búsqueda en bases de datos científicas.

Tabla 1. Métodos de detección por SARS-CoV-2 utilizados en América

Región/ país	Título de estudio	Metodología	Universo	Edad de pacientes	Tipo de muestra	Sexo	Diana de detección
Colombia ¹	SARS-CoV y RT-PCR en pacientes asintomáticos: resultados de una cohorte de trabajadores del Aeropuerto internacional El dorado de Bogotá	RT-PCR en tiempo real	205 individuos	Media de 36 años	Nasofaríngeas	155 Hombres 10 mujeres	ORF1ab y N
México ²	Distribución de los valores del ct en RT PCR para SARS-CoV al momento del diagnóstico en pacientes pediátricos	RT- PCR en tiempo real	1325 pacientes	0 a 18 años	Nasofaríngeo y orofaríngeos	Femenino y masculino	ORF1ab Y N
Chile ³	Precisión de un ensayo de detección RT-qPCR SARS CoV-2 sin extracción previa de ARN	RT-PCR en tiempo real	80 pacientes	No reflejado	Nasofaríngeo	No reflejado	ORF1ab S Y N
EEUU ⁴	Técnicas alternativas sin extracción de ARN para la detección por RT-PCR en tiempo real del SARS-	RT-PCR en tiempo real	192 muestras	No reflejado	Nasofaríngeo y esputo	No reflejado	ORF1ab y N

	CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo y de esputo						
Colombia ⁵	Evaluación del rendimiento diagnóstico de nueve kits comerciales RT PCR para la detección de SARS-coV-2 en Colombia	RT-PCR en tiempo real	94 muestras	No reflejado	Nasofaríngeo	No reflejado	Gen E
Chile ⁶	Rendimiento de RT- PCR en comparación con la prueba rápida de antígeno.	RT- PCR	854 individuos	34-48 años	Nasofaríngeo	No reflejado	Gen N y S
Perú ⁷	Estudio Comparativo de 2 Técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2	Inmuno ensayo de Flujo lateral de tipo ELISA-IgM	141 individuos	No reflejada	Suero	No reflejado	Anticuerpos IgM

EEUU⁸	Desarrollo de ELISA específico para SARS-CoV-2.	ELISA IgM-IgG-IgA contra dominio (RBD)	68 muestras positivas para SARS-cov-2 232 muestras negativas contra SARS-CoV-2-RBD	No reflejada	Suero/plasma	No reflejado	Dominio de unión-Receptor RBD de proteína de pico Anticuerpos IgM, IgG, IgA
EEUU⁹	El nuevo protocolo ELISA Vincula los anticuerpos reactivos del SARS-CoV-2 preexistentes con la inmunidad y la edad del coronavirus endémico y revela una identificación serológica mejorada del COVID-19 agudo a través de detección de múltiples parámetros	ELISA RBD-IgM-IgG	71 muestras	No reflejada	Suero/plasma	Hombres	Anticuerpos IgM, IgG, IgA

México ¹⁰	Análisis de anticuerpos IgG, IgA, e IgM contra la proteína pico S1 del SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes y vacunados con las vacunas pfizer BioNtech Cansinobio	ELISA indirecto IgM-IgG-IgA	142 muestras	No reflejada	Suero/plasma	Hombres y mujeres	Proteína S1 Recombinante
Panamá ¹¹	Evaluación de 9 pruebas rápidas serológicas para la detección de SARS-CoV-2	Inmunocromatografía Pruebas rápidas	293 muestras	Edad media de 38 años	Sangre total	No reflejado	Anticuerpos IgM-IgG
Perú ¹²	Evaluación en condiciones de campo de una prueba serológica rápida para detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2	Inmunocromatografía Pruebas Rápidas	144 muestras	No reflejada	Suero	No reflejado	Anticuerpos IgM-IgG

Chile ¹³	Rendimiento de la prueba rápida de antígeno del SARS-CoV-2 en comparación con la RT-PCR en tiempo real en personas asintomáticas.	Inmuno ensayo de flujo lateral	854	36-48	Hisopado nasofaríngeo	Hombres y mujeres	Antígeno específico de SARS-CoV-2
----------------------------	---	--------------------------------	-----	-------	-----------------------	-------------------	-----------------------------------

Fuente: (Rojas, 2020)¹ (Beltran , 2021)² (Cruz, 2021)³ (Villota, 2021)⁴ (Hernandez, 2021)⁵ (Peña, 2021)⁶ (Cruz, 2021)⁷ (Fischinger, 2020)⁸ (Yuen, 2021)⁹ (Melgoza, 2021)¹⁰ (Mercado M, 2020)¹¹ (Vidal M, 2020)¹² (Peña, 2021)¹³

4.3. Metodologías de RT-qPCR utilizadas para la detección de SARS en América.

4.3.1. RT-qPCR en tiempo real para SARS-CoV-2

La prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para SARS-CoV-2 está establecida como la prueba de elección en pacientes con sospecha de infección por COVID-19, la cual consiste en el aislamiento y purificación del material genético del virus, la síntesis de ADN complementario a partir de ARN viral por medio de la transcriptasa inversa y, posteriormente, la amplificación del material genético.

La transcripción inversa convencional (RT-PCR) y la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) son las estrategias más comúnmente usadas y, a diferencia de la convencional, la qRT-PCR monitoriza la amplificación del material genético durante cada ciclo y no al final. La OMS recomienda la confirmación rutinaria de SARS-CoV-2 en individuos sospechosos por medio del RT-qPCR, siendo esta prueba el estándar de oro actual (Cabrera K, 2020)

El término en tiempo real se refiere que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final.

A partir de los estudios recopilados realizados en América se pudo constatar que, en diversos países como Brasil, Chile, Perú, EEUU, entre otros, los ensayos de RT-PCR para SARS-CoV-2 están siendo desarrollados no solo con fines diagnósticos, sino también de forma investigativa con el propósito de estandarizar protocolos que se ajusten a las necesidades, limitaciones y disponibilidad de cada país, así como también mejorar la eficiencia de cada uno de los métodos, utilizando en dichos estudios protocolos previamente aprobados como el propuesto por Berlin Alemania, basados en el uso de iniciadores y sondas de Hidrólisis

TaqMan y caracterización del virus a partir de muestras clínicas obtenidas en vías Respiratorias altas y bajas.

4.3.2. Muestras utilizadas para la detección de SARS-coV-2 mediante RT-qPCR

1. hisopados nasofaríngeos/ orofaríngeos

Según la revisión sistemática de los estudios en America los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos son las muestras biológicas más utilizadas para el diagnóstico de COVID-19. Estas deben ser obtenido por personal capacitado, siguiendo una metodología protocolizada que incluye desde disponer del material necesario, un correcto etiquetado de los tubos y el uso adecuado de los Equipos de Protección Individual (EPI), hasta las instrucciones al paciente, el propio procedimiento de obtención de la muestra y su correcta manipulación y traslado al laboratorio Una obtención deficiente de la muestra dar lugar a un resultado falsamente negativo. Por otra parte, aunque la especificidad de esta técnica es próxima al 100%, su Sensibilidad es más variable y depende del momento evolutivo del proceso infeccioso (la carga viral es mayor en etapas iniciales) (Muntadas, 2021). En los estudios desarrollados en Chile y México se utilizaron mayormente este tipo de muestras obteniendo resultados satisfactorios.

2. Esputo

Según (Villota, 2021) Las muestras de esputo son difíciles de obtener porque pocos pacientes con COVID-19 producen esputo espontáneo y no está indicado el esputo inducido por el riesgo de diseminación viral. Sin embargo, se ha observado en el desarrollo de los protocolos ejecutados en América que la carga viral suele ser superior en muestras de esputo que en las obtenidas con hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos y que las técnicas están siendo adaptadas y estandarizadas para el uso de este tipo de muestra. Dentro de ensayos desarrollados en EEUU se han estandarizado protocolos con el fin de evaluar la utilización de este tipo de muestras en el diagnóstico de SARS-CoV-2 en los cuales se ha comprobado que se obtiene una detección alta y adecuada de carga viral.

3. Aspirado traqueobronquial y lavado bronco- Alveolar

Este tipo de muestras solo son posibles en pacientes ventilados mecánicamente o portadores de traqueostomía. Aunque la carga viral detectada es alta, este procedimiento puede suponer un riesgo importante para el profesional sanitario que lo realiza.

En pacientes críticos con neumonía COVID-19 es posible detectar SARS-COV-2 en muestras de lavado bronco-alveolar (BAL), incluso en ausencia de positividad en muestras del tracto respiratorio superior. Igual que en el caso del aspirado traqueobronquial, este procedimiento puede suponer un riesgo importante para el profesional sanitario que lo realiza, por lo que tampoco está indicados de forma rutinaria para el diagnóstico de COVID-19, por lo que dentro de los ensayos en America no están utilizando este tipo de muestra. (Muntadas, 2021)

4.3.3. Método de Extracción de ARN para detectar SARS-CoV-2

La extracción cuantitativa de ácidos nucleicos con alta pureza a partir de muestras complejas es el requisito previo para ensayos de RT-PCR eficientes y es un paso crucial en el uso de técnicas moleculares para la detección eficiente de virus en muestras clínicas. Actualmente se utilizan dos métodos principales de extracción de ARN previo a la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2: la cromatografía de columna y la aplicación de partículas magnéticas. (Noriega, 2021)

Tabla 2. de kits comerciales validados (13 de julio de 2020) por el EEUU-CDC para la extracción de ARN de SARS-CoV-2.

Nombre comercial	Tipo de muestra	Método de extracción
mini kit QIAamp® Viral RNA	Fluidos corporales libres de células	Columna con membrana de sílice
QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit	Fluidos corporales libres de células, plasma (tratado con anticoagulantes que no sean heparina) o suero	Columna con membrana de sílice
EZ1® DSP Virus Kit and Buffer AVL	Suero humano, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, sangre completa, heces, medios de transporte, muestras respiratorias y torundas secas	Partículas magnéticas
Roche MagNA Pure™ Total Nucleic Acid Kit*	Suero, plasma y sangre completa	Partículas magnéticas

Roche MagNA Pure™ 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Sangre entera de mamífero, suero, plasma, orina, esputo, hisopos, heces, lavado broncoalveolar (BAL), líquido cefalorraquídeo (LCR) y cultivos bacterianos (con o sin opción de lisis externa)	Partículas magnéticas
---	--	-----------------------

Los métodos de extracción de ARN utilizados en el diagnóstico son un factor importante en el resultado de la técnica, esto favorece a la obtención de muestras puras que facilitan la detección de partículas virales en muestras clínicas, en América se han realizados estudios comparativos de RT-PCR en donde se han utilizado diversos Kits de extracción a como también evaluación de la técnica omitiendo el paso de la extracción de ARN, en particular los ensayos desarrollados en EEUU, México, Colombia utilizaron el mini kit QIAamp® Viral RNA que se basa en un método de unión selectiva de extracción por columnas de sílice con la velocidad del centrifugado que corresponde a la técnica más utilizada en América con resultados eficientes.

Factores que afectan en los resultados de RT PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2.

- a) **Tipo de muestra utilizada:** Los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos son las muestras típicamente usadas para confirmar la presencia de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Sin embargo, el virus también se ha detectado en especímenes de otros sitios, a través de los cuales se han alcanzado diferentes eficiencias de detección. Por la facilidad de su recolección en pacientes y bajo riesgo infeccioso para proveedores de salud, la saliva es una muestra potencial en la detección de SARS-CoV-2 y virus similares por lo que la muestra y la correcta toma de la misma influyen en los resultados que se obtienen.

- b) **Extracción de ARN:** La extracción cuantitativa de ácidos nucleicos con alta pureza a partir de muestras complejas es el requisito previo para ensayos de RT-PCR eficientes y es un paso crucial en el uso de técnicas moleculares para la detección eficiente de virus en muestras clínicas. Actualmente se utilizan dos métodos principales de extracción de

ARN previo a la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2: la cromatografía de columna y la aplicación de partículas magnéticas.

- c) **Transporte y correcto etiquetado de las muestras:** Las muestras respiratorias, como por ejemplo hisopados o aspirados nasofaríngeos, deben almacenadas en refrigeración a una temperatura entre 2 y 8°C hasta un máximo de 72 horas. Si transcurren más de 72 horas hasta el procesamiento de las muestras respiratorias refrigeradas, se recomienda su congelación a -20°C esto para evitar una degradación del ARN del virus que afecten los resultados. Asimismo, el correcto etiquetado evita resultados erróneos, falsos positivos y falsos negativos.

4.3.4. Criterios de interpretación

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia está por debajo del nivel de detección, una segunda en donde se da un incremento de la fluorescencia el cual es en forma exponencial y una tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción.

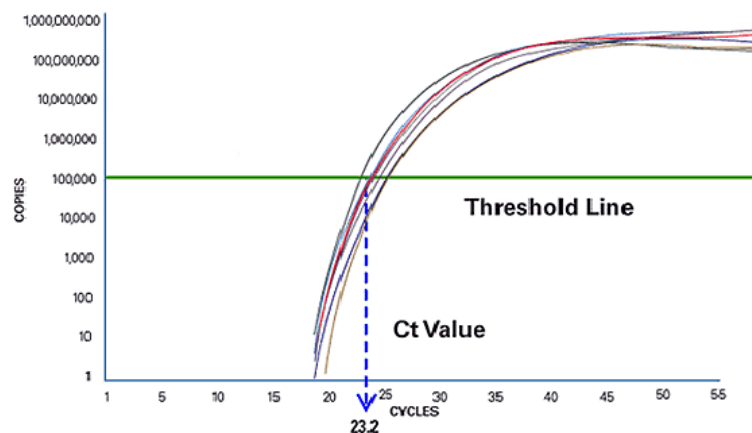


Figura 5. Visualización de la curva de interpretación y el valor del ct. Fuente: Serrano Cumplido A. Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. Medicina de familia, 2021.

La lectura de los resultados de una corrida de RT- PCR en tiempo real llega por por la interpretación (por el sistema) de la intensidad de la señal fluorescente en el momento que se identifica la presencia de la secuencia genética correspondiente al virus. Para ello, es preciso determinar una lectura básica utilizada como referencia, que se establece con los primeros ciclos (habitualmente entre el 3 y el 15), en los que los cambios de la señal fluorescente suelen ser mínimos. (Serrano, 2020)

El umbral de Ciclos o *ciclo umbral* (Ct) Es El Número de Ciclos En El Que La Señal fluorescente cruza Este umbral. Para valorar la presencia del virus en la muestra, se determina el número de ciclos Ct de RT-qPCR necesarios para que la prueba resulte positiva, es decir, indica el momento preciso de la amplificación en el que la prueba es capaz de identificar la presencia de la diana molecular investigada, sin indicar la cantidad presente. Así, el Ct es un valor semicuantitativo inversamente relacionado con la cantidad de ARN de la muestra, de manera que un número bajo de Ct está relacionado con mayor carga viral y viceversa.

La RT-qPCR permite detectar cargas virales muy bajas (20-100 copias de ARN / mL) siempre que la muestra se tome de forma adecuada y con la suficiente concentración viral como también existen algunas limitaciones al interpretar el valor Ct, como no expresarse con unos valores lineales, la dependencia del resultado con el tipo y calidad de la toma, así como con el manejo de la muestra, o variaciones significativas intraprueba.

Según la revisión previa de estudios y ensayos se han establecido opciones de valorar Ct en los pacientes con RT-qPCR positiva, aceptando el criterio de que un Ct entre 31 y 35 equivaldría a una carga viral sin capacidad infectiva aunque, dada la heterogeneidad de la muestra tomada (técnica de adquisición y localización de la toma) y de los diferentes sistemas comercializados, será cada laboratorio el que tenga que validar la prueba y marcar el umbral de ciclos que consideren definitorio de la alta o baja carga viral. (Serrano, 2020)

Se ha estratificado en 4 grupos a los pacientes con RT-PCR positiva en función del valor del Ct y de su relación con la carga viral y la persistencia de virus viable: altamente contagioso; moderadamente contagioso; zona de indecisión; no infeccioso. Existe una zona de indecisión, con valores Ct = 34-37, en los que sería preciso repetir la prueba en unos días y vigilar la aparición de síntomas. Tampoco hay que descartar la posibilidad de que valores

Ct > 37 pudiesen manifestar una infección temprana con carga viral baja. Un Ct > 35 podría ser considerado como valor permisivo para la reincorporación social, aunque es preciso analizarlos en su contexto clínico y epidemiológico. (Serrano, 2020)

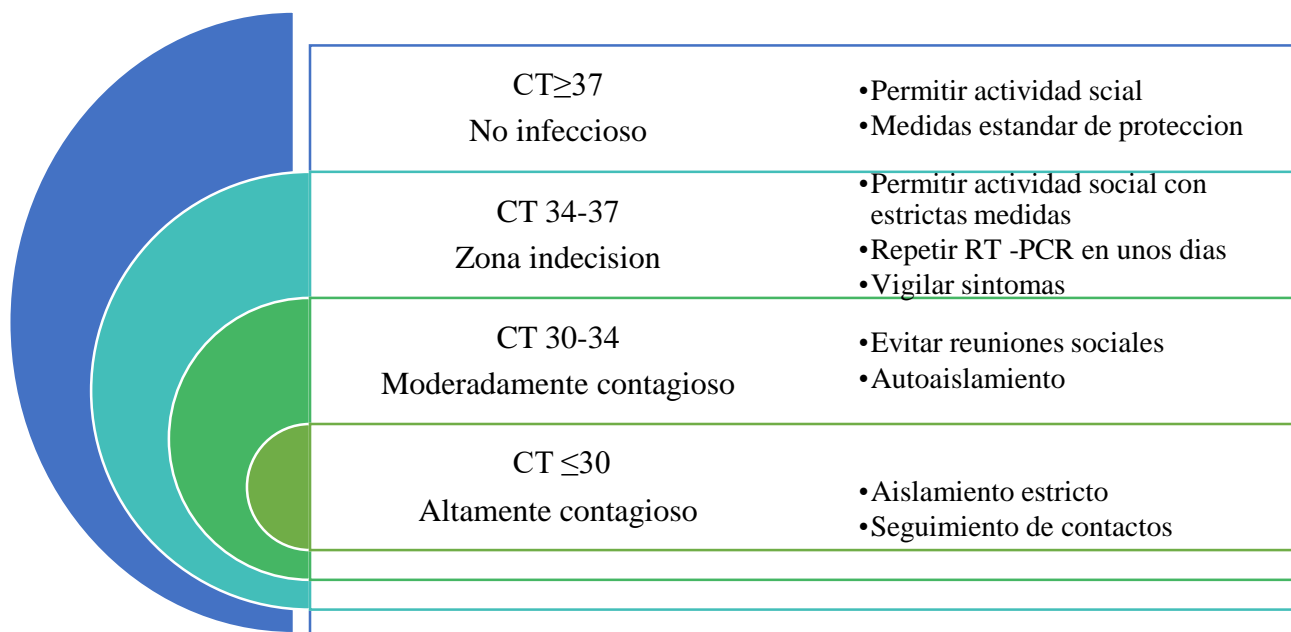


Figura 6. Estratificación del riesgo de contagio según el valor de ct. Fuente: A. Serrano-Cumplido, Medicina de Familia.

Los genes diana que prevalecieron en los estudios estaban dirigidos a ORF1ab, gen N (nucleocápside), S (espícula).

Se llevó a cabo un estudio en **Bogotá** bajo el título **SARS-CoV y RT-PCR en pacientes asintomáticos: resultados de una cohorte de trabajadores del Aeropuerto internacional El dorado de Bogotá en 2020** con el fin de identificar y caracterizar infección asintomática a partir de la técnica de RT-PCR en donde la muestra utilizada fue el hisopado nasofaríngeo con un seguimiento de 21 días, dichas muestras fueron procesadas según lo señalado en el protocolo de Berlín para RT-PCR, se amplificaron los genes ORF1, Y N para obtener los valores del umbral, estableciendo positividad por debajo de los 40 ciclos.

A partir de los resultados de 212 trabajadores según el seguimiento se obtuvo una incidencia de la infección por SARS-coV-2 del 16.51% en los pacientes asintomáticos, se observó que

el 50% de los positivos tuvieron valores de ct superior a 33 ciclos y la proporción de contactos infectados cercanos fue baja (11,86) lo que respalda que la transmisión de la infección por asintomáticos no es tan eficiente como con los pacientes sintomáticos. (Rojas, 2020)

Otro estudio realizado en **México** cuyo título es **Distribución de los valores del ct en RT-PCR para SARS-CoV al momento del diagnóstico en pacientes pediátricos desarrollado en 2020** con el fin de describir la información recopilada en el desempeño analítico de la técnica de RT-PCR para la identificación de SARS-coV-2 en población infantil, se incluyeron las muestras de todos los pacientes pediátricos con síntomas de la infección, se utilizaron hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos recolectados en la primera semana del inicio de los síntomas. El ARN total fue extraído y purificado empleando el QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN), la detección de genes diana estuvo dirigida a ORF1ab, nucleocapside (N) y (S) mediante RT-PCR en tiempo real con los kits de detección (kit for 2019 Novel coronavirus y TaqMan 2019-nCoV).

Se logró como resultado identificar que, en todos los pacientes pediátricos positivos, presentaron una carga viral baja según la distribución del ct (63 %) esto aporta a los apartados que afirman que, por razones genéticas o biológicas, los pacientes pediátricos podrían presentar diferencias en la expresión del receptor asociado con los mecanismos de infección viral. (Parra, 2020)

Un estudio realizado en **Chile** con la temática **Precisión de un ensayo de detección RT-qPCR SARS-CoV-2 sin extracción previa de ARN** se llevó a cabo con el fin de evaluar diferentes kits y protocolos de RT-qPCR para el mejor enfoque a utilizar omitiendo un paso de extracción de ARN. La muestra utilizada fue hisopado nasofaríngeo, se confirmó la presencia de ARN viral utilizando este kit siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante en un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio3 de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) que muestra la presencia de los genes del SARS-CoV-2 ORFab, S y N.

El ARN extraído se probó con tres kits de detección diferentes aprobados por la FDA y disponibles comercialmente: a saber, SARS-CoV-2 RdRp más control de EAV (cat. 40-0777-10, Roche), kit de RT-PCR fluorescente en tiempo real para detectar 2019-nCoV (cat. MFG030011, BGI) y kit de detección para ARN de 2019-nCoV (Sonda de fluorescencia

por PCR) (Universidad Sun Yat-sen, cat. DA0930, Da An Gene Co., Ltd). Los resultados mostraron que se detectó un número significativamente menor de muestras positivas cuando se omitió el paso de extracción de ARN, los tres kits de detección de SARS-CoV-2 evaluados en este trabajo presentaron menor eficiencia que el protocolo, incluida la extracción de ARN. Estos datos sugieren fuertemente que esta técnica depende en gran medida de la cantidad de ARN viral presente en la muestra. (Beltrán, A. 2021)

En **EEUU** se llevó a cabo un ensayo titulado **Técnicas alternativas sin extracción de ARN para la detección por RT-PCR en tiempo real del SARS-coV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo y de esputo** cuyo fin era obtener un protocolo que pudiera utilizarse independientemente del tipo de muestra (hisopos nasofaríngeos o muestras de esputo) y que demostrara ser reproducible. En este estudio se utilizaron un total de 192 muestras clínicas, se recolectaron y procesaron 153 muestras clínicas en Ecuador y se recolectaron y procesaron 39 muestras en Estados Unidos.

Se utilizaron dos métodos para la extracción de ARN: un kit comercial para la extracción de ARN viral (Qiagen Viral RNA Mini Kit) y el Trizol LS Reagent (Invitrogen) para la extracción total de ARN. De igual forma se ejecutaron dos protocolos diferentes de tratamiento de muestras para reemplazar el paso de extracción de ARN: choque térmico y uso directo de la muestra (técnica directa). Para la corrida de RT-PCR se utilizó un kit de detección comercial con objetivos en los genes ORF1ab y nucleocápside (N) (DA0930; Da An Gene Co. Ltd. de la Universidad Sun Yat-sen. El segundo protocolo de rRT-PCR utilizó un ensayo interno con una diana en el gen N. Se desarrolló a partir del kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step RT-qPCR (Invitrogen).

Los resultados mostraron que la amplificación directa sin inhibidores de ARNasa aumentó significativamente los valores de Ct en una media de 3,59 ciclos. Por lo tanto, el uso de inhibidores de ARNasa ayuda a proteger el genoma viral y preserva la detección del virus en muestras con bajas cargas virales. Además, nuestro estudio presenta una técnica de detección directa que puede preservar la sensibilidad (100%) y la especificidad (100%) de las reacciones de RT-PCR cuando se realizan sin extracción dedicada. (Villota D, 2021)

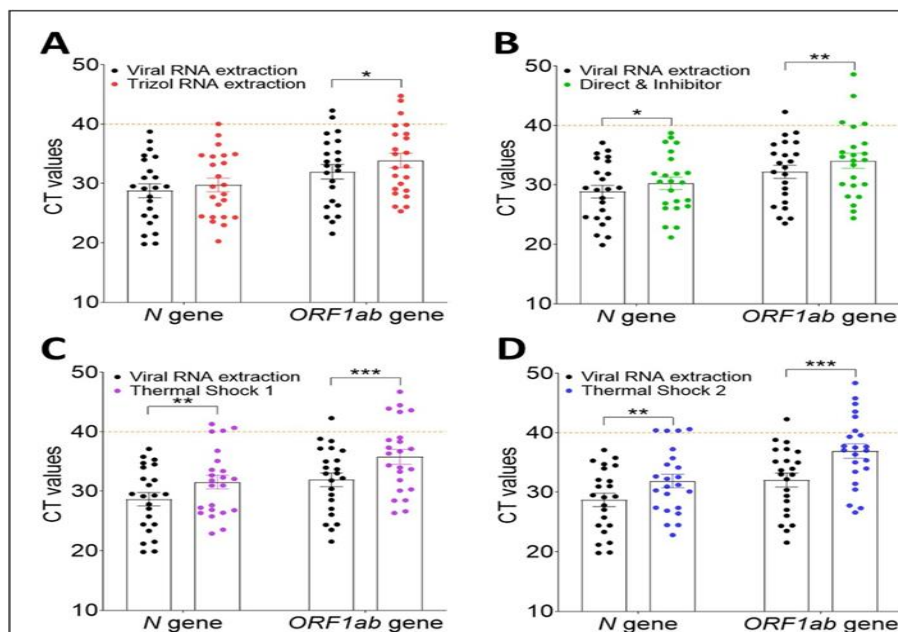


Figura 7. Distribución comparativa de los valores de umbral de ciclo (Ct). Resultados obtenidos por rRT-PCR de los genes N y ORF1ab utilizando métodos de extracción de ARN convencionales y técnicas sin extracción.

Fuente: Villota D. Stephany. *Técnicas alternativas sin extracción de ARN para la detección por RT-PCR en tiempo real del SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo y de esputo, 2021.*

En el gráfico se observan los resultados de las muestras nasofaríngeas analizadas mediante cuatro métodos diferentes antes del ensayo de RT-PCR en donde se utiliza como método de referencia la extracción de ARN a partir de un kit comercial (círculo negro) los cuales se compararon con extracción de ARN con Trizol **A** (círculo rojo) muestra directa con inhibidores de ARNasas **B** (círculo verde) choque térmico 1 **C** (círculo purpura) choque térmico 2 **D** (círculo azul). En una comparación con los valores de ct, la extracción con trizol mostro un aumento para el objetico ORF1ab, pero sin diferencias para el objetivo N, ambas técnicas de choque térmico mostraron aumento para los dos objetivos, la técnica directa arrojó los mejores resultados en comparación con el kit de referencia, seguida de extracción con trizol.

En **Colombia** se desarrolló un estudio con el propósito de **Evaluar del rendimiento diagnóstico de nueve kits comerciales RT PCR para la detección de SARS-coV-2 en**

Colombia y proporcionar una comparación confiable del rendimiento diagnóstico de nueve kits de RT-PCR de diferentes fabricantes (utilizados con mayor frecuencia en Colombia) para evaluar el impacto de su uso potencial para el cribado masivo al considerar el panorama de variación genómica del SARS-CoV- 2 en el país.

Las muestras incluidas para las pruebas se procesaron evitando la congelación / descongelación y se procesaron en paralelo con el método de referencia. La prueba de referencia estándar se basó en la detección del gen E utilizando los cebadores y la sonda descritos en el protocolo Berlin Charité.

La variabilidad genómica del SARS-CoV-2 podría afectar la precisión diagnóstica de las pruebas de diagnóstico actualmente disponibles, particularmente en el contexto de variantes emergentes. A pesar de la variabilidad inherente en el rendimiento diagnóstico, todos los kits de RT-PCR evaluados en este estudio resultaron adecuados para la detección genómica del SARS-CoV-2 en Colombia. Sin embargo, en aquellos escenarios donde se requiere una detección altamente sensible de SARS-CoV-2, cualquiera de los kits que incluyen el gen E (GeneFinder, Seegene, Inbios y PCL) ha demostrado ofrecer una ventaja potencial para mejorar la sensibilidad de la prueba. (Hernandez, 2021)

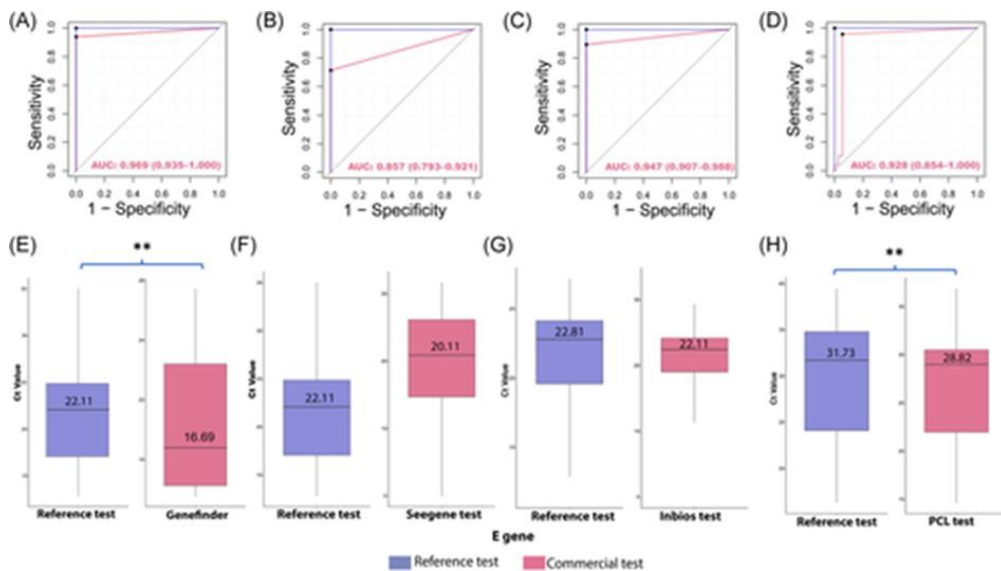


Figura 8. Comparación del rendimiento del diagnóstico del gen E y de los valores de Ct entre el ensayo de referencia y los kits comerciales de RT-PCR. (A – D) Fuente: Hernández C. Evaluación del rendimiento diagnóstico de nueve kits comerciales de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2 en Colombia, 2021.

Diferentes estudios que comparan el rendimiento analítico de diversas dianas virales incluidas en la detección de SARS-CoV-2 basados en la amplificación del gen E mediante el protocolo de Berlin han demostrado una mayor sensibilidad en comparación con las otras dianas virales. En el gráfico se puede observar que los kits Genefinder y PLC mostraron medianas más bajas de ct lo que sugiere una mayor sensibilidad.

Rendimiento de RT- PCR en comparación con la prueba rápida de antígeno fue un estudio que se desarrolló en Chile con el fin de realizar una comparación masiva de prueba RAT y RT-PCR en tiempo real en individuos asintomáticos de una región chilena.

Para el ensayo el ARN viral se extrajo utilizando el kit Mag-Bind Viral DNA / RNA 96 (Omega Bio-Tek,) en el procesador de partículas magnéticas Kingfisher Flex (Thermo Fisher Scientific). Se realizó RT-PCR en tiempo real en Laboratorio Médico Bioclinic y Hospital Regional de Iquique utilizando el GenomeCov19 Detection Kit ABM (Applied Biological Materials Inc, Canadá, con valores de umbral de ciclo (Ct) ≤ 40 considerados positivos para las regiones de genes virales N y S.

De acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2021) recomendación sobre el uso de pruebas de antígenos, la sensibilidad del 69,86% indica que la RAT no debe reemplazar la RT-PCR en tiempo real en el diagnóstico y la vigilancia de la infección por SARS-CoV-2 (CDC, 2021). Sin embargo, el VPP de las pruebas de antígenos fue del 94,44%, lo que indica que las personas asintomáticas con resultados positivos de antígenos están infectadas con SARS-CoV-2 y no requerirían RT-PCR confirmatoria en tiempo real. Asimismo, el VPN de las pruebas de antígenos fue del 97,21%, lo que indica que es poco probable que los individuos asintomáticos con resultados de antígenos negativos se infecten con SARS-CoV-2.

Dados los altos valores predictivos en personas asintomáticas y el resultado rápido de la prueba que implica un rastreo más rápido de las personas infectadas, estos resultados respaldan y brindan a los legisladores evidencia de que la RAT podría tener un papel importante en las estrategias de detección, prueba y rastreo de contactos de COVID-19 para el control de la misma. (Peña, 2021)

Ventajas y desventajas

Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de la técnica RT-PCR.

Ventajas	<ul style="list-style-type: none">○ Método de diagnóstico estándar para Covid-19 según OMS y CDC.○ Permite estudiar un gran número de pacientes por la posible automatización de los procedimientos.○ Detecta y amplifica secuencias de ADN o la presencia del virus en muestras nasofaríngeas desde los primeros momentos de la infección.○ Más sensible y específica que los otros métodos hasta ahora disponibles.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none">○ Funcionamiento es complicado, con personal experto en biología molecular○ Requieren laboratorios certificados e infraestructura adecuada.○ Equipo costoso y técnicos capacitados para realizarlos

4.4. Técnicas diagnósticas basadas en inmunoensayos de tipo ELISA y pruebas rápidas para de SARS-CoV-2

4.4.1. Inmunoensayos de tipo ELISA para la detección de SARS- CoV-2.

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un método de prueba basado en anticuerpos que permite dar un resultado relativo de la concentración de anticuerpos mediante dilución de la muestra (titulación de anticuerpos). Existen tres diferentes tipos de ELISA directo, indirecto y tipo sándwich, para la detección de anticuerpos los utilizados son los dos últimos. Esta técnica se realiza en placas de microtitulación. Esta tecnología de uso extendido es sensible, rápida y fiable.

La realización de un ensayo ELISA requiere como mínimo un anticuerpo específico para un antígeno concreto. De acuerdo con el método básico, uno de los componentes inmunológicos se inmoviliza en una fase sólida, en las cavidades de la placa de microtitulación. El analito de la muestra interactúa con el sistema anticuerpo-antígeno. Esta interacción se puede visualizar mediante enzimas, enlazadas a antígenos o anticuerpos secundarios, e indica si se ha producido un enlace antígeno-anticuerpo. La enzima enlazada convierte un sustrato agregado, lo que da lugar a un cambio de color, que se puede medir mediante un espectrofotómetro.

Los ELISAs se clasifican en 4 tipos: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich y ELISA competitivo.

- ELISA directo: Se basa en donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación del mismo.
- ELISA indirecto: Es un ensayo parecido al ELISA directo, pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima.

- ELISA de tipo sándwich: En el ELISA tipo sándwich el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección también conocidos como pares de anticuerpos, que se unirán a dos epítopos distintos de un mismo antígeno.
- ELISA competitivo: El ELISA competitivo es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario. Se utiliza generalmente para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en muy bajas cantidades.

En los estudios, se reportan variaciones basadas en técnicas más automatizadas, a continuación, se describe cada una de ellas:

Ensayos de aglutinación inmunomagnéticos (IMA): son métodos recientemente desarrollados que utilizan partículas magnéticas recubiertas con moléculas de captura (por ejemplo, anticuerpos, ligandos, nucleótidos) que se unen específicamente al biomarcador diana, formando grupos que permiten la detección. Se han desarrollado diferentes ensayos para la detección de patógenos, moléculas pequeñas y proteínas. Estos métodos son fáciles de usar y pueden mejorar la sensibilidad y el tiempo a los resultados de los métodos clásicos como ELISA.

Se ha desarrollado un ensayo para detectar los anticuerpos contra SARS CoV-2 basado en tecnología IMA y en nanopartículas. Los ensayos inmunomagnéticos, en particular, se refieren a la identificación del analito diana (por ejemplo, antígeno o anticuerpo) a través de restos de captura (es decir, anticuerpos, antígenos, ligandos, nucleótidos) conjugados sobre la superficie de partículas magnéticas. Específicamente, los restos de captura detectan el objetivo deseado (biomarcador de proteína, ADN, ARN) para la posterior separación de la solución restante mediante un simple imán y, en consecuencia, para varios métodos de análisis.

Se realizó un estudio en Lima, Perú con el título **Estudio Comparativo de 2 Técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos anti-SARS-coV-2** con el fin de identificar Acs contra SARS-CoV-2 en suero proveniente de individuos, con o sin diagnóstico previo

de COVID-19 y detectar Acs específicos contra SARS-CoV-2 con el uso del inmunoensayo de flujo lateral y el ensayo inmuno-magnético (IMA). En el estudio se analizaron 141 muestras. IMA como técnica para la detección de anticuerpos anti- SARS CoV-2 presenta un perfil de sensibilidad y especificidad superior a la prueba rápida por el método de Inmuncromatografía de flujo lateral. IMA, para COVID-19, es una prueba rápida y fácil de usar en el punto de atención sin necesidad de contar con mayor maquinaria de laboratorio.

En los países EEUU, y México son los que han publicado estudios donde utilizan ELISA de tipo directa, cuantitativo calificado y estándar con un procedimiento de lavado de placas distinto.

ELISA cuantitativo: Es una prueba de ELISA robusta que permite detectar y cuantificar IgA, IgM e IgG, en este tipo de ensayo los pocillos de las placas utilizadas contienen soluciones donde ya se conoce la concentración del antígeno. Estas muestras se crean comúnmente al diluir el antígeno para crear una curva estándar que contiene un amplio rango de concentraciones de antígeno. La intensidad del sustrato en las muestras desconocidas se puede comparar con la curva estándar para determinar una concentración de antígeno aproximada. Esta técnica permite la optimización a partir de la utilización de diversas concentraciones tanto de antígenos y anticuerpos con el fin de obtener una mayor sensibilidad y especificidad en la cuantificación.

Se realizó un estudio en EEUU con el título **Desarrollo de ELISA específico para SARS-CoV-2** en el año 2020 con el fin de detectar y cuantificar IgA, IgM e IgG contra el dominio de unión al receptor del SARS-coV-2 (RBD) con el uso de un ELISA cuantitativo calificado. El tipo de muestra analizada fue suero/plasma de 118 personas convalecientes, estas se inactivaron por calor a 60°C durante 1h. De igual manera se evaluó la capacidad de los modelos de regresión logística para discriminar entre muestras positivas y negativas de SARS-coV-2 basadas en IgG, IgA, IgM. Las curvas características operativas al receptor, revelaron la capacidad diagnóstica de cada isotipo para clasificar a los individuos en convalecientes y controles comunitarios.

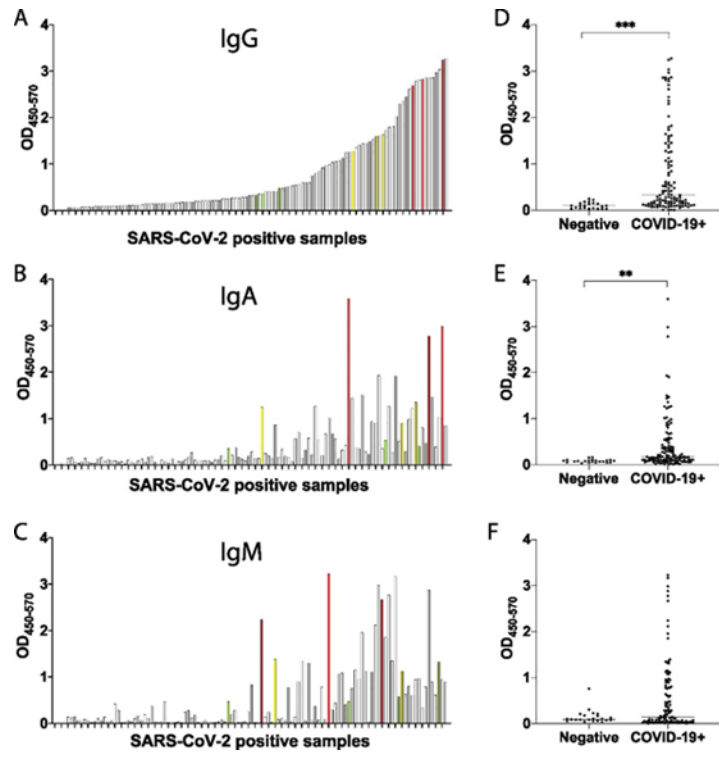


Figura 9. Niveles de anticuerpos específicos de CoV2-RBD en la infección temprana por CoV2. Fuente: Vicky Roy, Desarrollo de ELISA específico para SARS-CoV-2,2020.

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es un método comúnmente utilizado para la medición de analitos en una muestra de suspensión. Si bien es de bajo costo y fácil de adaptar en la mayoría de los entornos de laboratorio, una limitación de esta plataforma es el alto nivel de fondo de algunas muestras biológicas en diluciones de muestra bajas. Específicamente, las densidades ópticas (DO) de diluciones de muestras inferiores a 1: 100 suelen ser considerables y pueden enmascarar el analito de interés. Este problema es particularmente relevante para las pruebas serológicas para el SARS-CoV-2, ya que los anticuerpos que presentan reactividad cruzada en personas no expuestas, que se generan recientemente en infecciones asintomáticas y / o recientes, que se inducen a partir de un encuentro con dosis bajas de virus o que disminuyen después de la convalecencia se puede perder porque los niveles están por debajo del límite de detección de los ensayos actuales.

Para abordar esta problemática, en el estudio que se describe a continuación desarrollaron un protocolo de ELISA con pasos únicos para reducir la señal no específica en diluciones de

muestra bajas. Un cambio es el procedimiento de lavado de placas, que lo realiza manualmente un operador con una pipeta multicanal e incluye pasos de agitación y remojo con la eliminación completa repetida del fluido residual.

Se llevó a cabo un estudio en EEUU con el título **El nuevo protocolo ELISA Vincula los anticuerpos reactivos del SARS-coV-2 preexistentes con la inmunidad y la edad del coronavirus endémico y revela una identificación serológica mejorada del Covid 19 agudo a través de detección de múltiples parámetros**, en el año 2021 con el fin de desarrollar un nuevo protocolo ELISA estándar con un procedimiento de lavado de placas distinto y desarrollo de placas cronometrado a través del uso de una curva estándar. Utilizando el método de "ELISA BU". Este protocolo se ejecutó en muestras de suero o plasma de un total de 71 sujetos pre pandémicos y 29 infectados con SARS-CoV-2. Además, se probó la especificidad de los anticuerpos de detección para confirmar la precisión de las lecturas específicas de isotipo y la capacidad del reactivo de detección de IgG para medir las cuatro subclases de IgG.

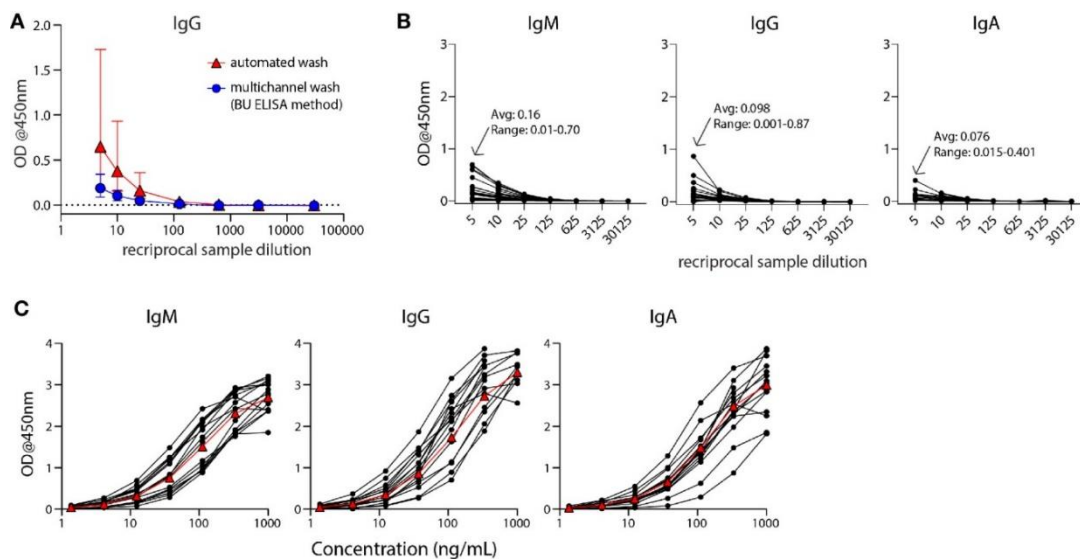


Figura 10. BU ELISA. Exhibe una señal de fondo baja a una alta concentración de muestra y el uso de curvas estándar de anticuerpos recombinantes de SARS-Cov-2 RBD permite una cuantificación precisa de la muestra. Fuente: Rachel R Yuen, 2021.

ELISA indirecto: se utiliza para detectar anticuerpos en una muestra con el fin de cuantificar las respuestas inmunitarias. La placa se recubre primero con un antígeno de captura específico, que inmoviliza el anticuerpo objetivo, y este complejo antígeno-anticuerpo se detecta utilizando un segundo anticuerpo. Este estudio se estandarizó un ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG, IgA e IgM contra el SARS-CoV-2 utilizando la proteína S1 recombinante como objetivo. Primero, se evaluó la concentración óptima de antígeno para el recubrimiento y se estableció en una concentración de 2 µg / mL. Y se evaluó la persistencia de anticuerpos y la respuesta de un grupo de pacientes.

Se realizó un estudio en México con el título **Análisis de anticuerpos IgG, IgA, e IgM contra la proteína pico S1 del SARS-CoV-2 en pacientes convalecientes y vacunados con las vacunas pfizer BioNtech Cansino1bio** en el año 2021 con el fin de evaluar los anticuerpos S1 en 142 individuos convalecientes y vacunados, mediante la prueba de ELISA indirecta, se detectaron anticuerpos IgG contra la proteína S1 del SARS-coV-2 hasta 42 semanas después del inicio de los síntomas en contraste con la IgA e IgM que disminuyeron en 14 semanas después del inicio de los síntomas. Estos resultados confirman que después de la infección natural con SARS-CoV-2, es posible detectar anticuerpos hasta por 10 meses. Además, nuestros resultados mostraron que una dosis de la vacuna CanSinoBio induce una menor respuesta de anticuerpos IgG que la inducida por el esquema completo de la vacuna Pfizer-BioNTech.

Ventajas y desventajas

Tabla 4. Ventajas y desventajas del uso de Inmunoensayos ligado a enzimas (ELISA)

Tipos de ELISA	Ventajas	Desventajas
ELISA-directo	<ul style="list-style-type: none"> • El protocolo es simple y rápido. • No hay posibilidad de reacción cruzada con el anticuerpo secundario. • Menor probabilidad de error debido al uso de un menor uso de reactivos y pasos en el procedimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede dar mayor ruido de fondo, ya que otras proteínas presentes en la muestra pueden adherirse a la placa. • No hay amplificación de la señal ya que no se emplean anticuerpos secundarios, lo que

		<p>reduce la sensibilidad del ensayo.</p> <ul style="list-style-type: none"> El anticuerpo primario debe de ir marcado lo que resta flexibilidad al ensayo.
ELISA-indirecto	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad, ya que el uso de anticuerpos secundarios posibilita la amplificación de la señal. Alta flexibilidad por el hecho de que un mismo cuerpo secundario puede emplearse con diferentes anticuerpos primarios, lo que también se traduce en un beneficio económico. El anticuerpo primario mantiene intacta su inmunoreactividad al no ir conjugado. 	<ul style="list-style-type: none"> Protocolo más complejo que el ELISA directo, que incluye pasos de incubación adicionales con el anticuerpo secundario. El uso de anticuerpos secundarios puede dar lugar a una reacción cruzada.
ELISA-sándwich	<ul style="list-style-type: none"> Alta flexibilidad, ya que la detección se puede hacer tanto por procedimiento directo como indirecto. Alta sensibilidad y especificidad, debido al uso de dos anticuerpos frente al mismo antígeno. 	<ul style="list-style-type: none"> El antígeno debe tener un tamaño lo suficientemente grande como para permitir la unión al mismo de dos anticuerpos de manera simultánea. No siempre es fácil o posible contar con pares de anticuerpos que funcionen bien en este tipo de ensayo.
ELISA-competitivo	<ul style="list-style-type: none"> Alta flexibilidad, puede basarse en procedimiento directo, indirecto o sándwich. Alta sensibilidad, robustez y consistencia. Permite la detección de antígenos de pequeño tamaño y en bajas 	<ul style="list-style-type: none"> El protocolo es relativamente complejo. Requiere el uso de antígeno de inhibición.

concentraciones.

- No requiere el procesamiento previo de las muestras.

4.4.2. Pruebas rápidas (inmunocromatograficas)

La detección, las pruebas y el rastreo de contactos desempeñan un papel fundamental en el control de la pandemia de COVID-19. Por lo que en función de disminuir el tiempo de respuesta del método habitual para SARS-coV-2 se han diseñado pruebas rápidas que detectan antígenos y anticuerpos referentes a la infección. En América según los datos recopilados se están desarrollando estudios para identificar las funciones principales de estas pruebas y los escenarios adecuados para su utilización asimismo la precisión diagnóstica de cada test utilizado.

Existen diversos kits de detección por métodos inmunocromatográficos, dentro de los más habituales analizados en los estudios están: Biosensor, Cromatest COVID 19, HIGHTOP one step rapid test, estos con el fin de identificar anticuerpos de tipo IgG e IgM con muestras de sangre venosa o sangre capilar, plasma o suero según lo indicado por cada kit.

En Chile se llevó a cabo un estudio con el título **evaluación en condiciones de campo de una prueba serológica rápida para detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2** con el fin de Determinar el rendimiento diagnóstico adicional de una prueba serológica rápida que detecta anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2 en donde se incluyeron 144 personas, el dato significativo obtenido a partir de este ensayo fue que La prueba serológica rápida logró detectar un mayor número de casos respecto a la molecular, sobre todo a partir de la segunda semana de inicio de síntomas. Además, presentó una alta especificidad. Los resultados mostrarían su utilidad como prueba complementaria a la prueba molecular, especialmente durante la segunda y tercera semana de enfermedad. (Vidal M, 2020)

Otro estudio realizado en Panamá **Evaluación de 9 pruebas serológicas rápidas para la detección de SARS-cov-2** tenía como fin evaluar la capacidad operativa de nueve pruebas serológicas para detectar IgM/IgG en suero de pacientes con SARS-coV-2 en diferentes estadios clínicos.

Se estimó como tamaño de la muestra a 293, se utilizó como estándar de oro RT-PCR en tiempo real y se usó ensayos inmunocromatográfico para la detección cualitativa de anticuerpos IgG/IgM obteniendo como resultado que el mejor desempeño de las pruebas ocurrió para IgG en grupo de pacientes sintomáticos con más de 11 días después del inicio de los síntomas. El estudio mostro que la utilidad de las pruebas serológicas inmunocromatograficas para SARS-coV-2 es limitada y pueden utilizarse en el estudio de seroprevalencia adecuada para el cribado de población infecciosa. (Mercado M, 2020)

En Chile se realizó otro ensayo comparativo con el título de **Rendimiento de la prueba rápida de antígeno del SARS-CoV-2 en comparación con la RT-PCR en tiempo real en personas asintomáticas** con el fin de evaluar el rendimiento de la prueba de antígeno SD Biosensor en comparación con RT-PCR.

El método utilizado fue la prueba de antígeno SD Biosensor, Inc. (República de Corea,) un inmunoensayo de flujo lateral rápido para la detección cualitativa de antígenos específicos del SARS-CoV-2 presentes en la nasofaringe humana Según el fabricante, los resultados están disponibles en 30 minutos y se proporcionan todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo. Los kits de ensayo son estables cuando se almacenan entre 2 y 30 ° C. Se obtuvo que dicha prueba resulto con una sensibilidad del 69,86% y una especificidad del 99,61%. El método de antígeno SD Biosensor permitió la identificación rápida de individuos asintomáticos.

4.4.3. Pruebas Rápidas basadas en la detección de antígenos

La prueba de antígeno COVID-19 (oro coloidal) es una tira de membrana cualitativa basada en un inmunoensayo para la detección del antígeno de la proteína de la nucleocapside del SARS-CoV-2 en muestras de hisopados nasofaríngeos. En este procedimiento de prueba, el espécimen reacciona con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en la almohadilla etiquetada, y luego la mezcla migra hacia arriba en la membrana cromatográficamente por acción capilar y reacciona con el anticuerpo antiSARS-CoV-2 en la zona de detección.

Si la muestra contiene SARS-CoV-2, aparecerá una línea de color en la región de la línea de prueba que indica un resultado positivo. Si la muestra no contiene SARS-CoV-2, no aparecerá una línea de color en esta región, lo que indica un resultado negativo. Para servir como control del procedimiento, siempre aparecerá una línea de color en la región de la línea de control que indica que se ha añadido el volumen adecuado de muestra y que se ha producido la mecha de la membrana.

Las llamadas pruebas rápidas de detección de antígeno (PRD-Ag), se fundamentan en detección directa de las proteínas virales por método inmunocromatográfico de flujo lateral. En el caso de las PDR-Ag del SARS-CoV-2, con frecuencia el antígeno blanco que se desea detectar es la proteína de la nucleocápside (N) del virus, preferencia que se explica por su relativa y abundante producción durante la fase aguda de la infección. (Carlos D'Suze García, 2021)

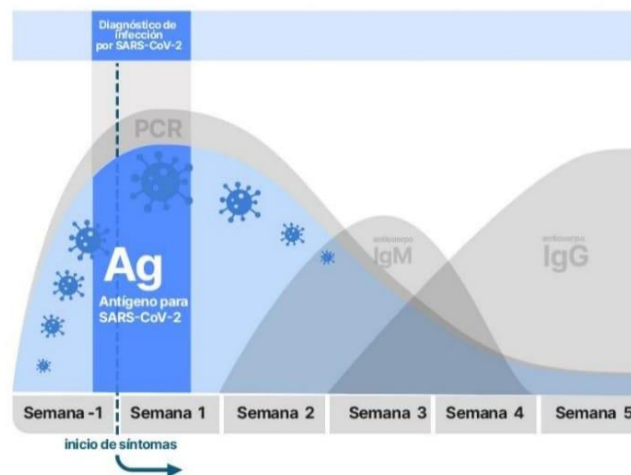


Figura 11. Tiempo de detección de antígenos en la evolución de la enfermedad por SARS-CoV-2. Fuente: González Puente A. *Técnicas de detección del SARS-coV-2 Universidad de Coruña*

4.4.4. Pruebas rápidas basadas en la detección de anticuerpos

Los inmunoensayos serológicos se consideran pruebas de tamizaje, más que en pruebas confirmatorias. Debido a que identifican anticuerpos en sangre, plasma o suero de personas, su sensibilidad puede variar según los estadios de la enfermedad. Se conoce que la producción de anticuerpos puede tomar varios días, por ejemplo, la IgM contra SARS-CoV-2 puede detectarse, en promedio de 5 a 10 días después del inicio de los síntomas, y la IgG alrededor de 10 días después del inicio de los síntomas. Esto hace que la sensibilidad de las pruebas serológicas sea menor en las etapas iniciales de la enfermedad, y que algunas

personas infectadas con el virus pueden tener un resultado negativo (falsos negativos). Sin embargo, la sensibilidad de la prueba aumenta a medida que el cuerpo produce anticuerpos contra el virus, lo que lleva a una reducción de los falsos negativos.

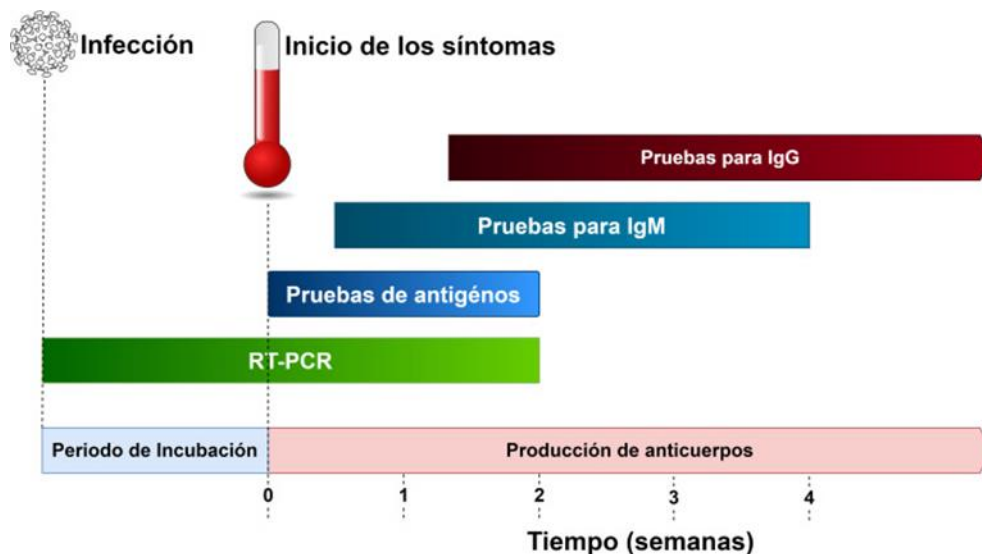


Figura 12. Tiempos de detección de anticuerpos y ARN viral de SARS-CoV-2. Fuente: Julián Santaella Tenorio Colomb Med (Cali), 2020.

El casete de prueba rápida para COVID-19 IgG/IgM (sangre total/suero/plasma) es un ensayo inmunocromatográfico cualitativo basado en membrana para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra SARS-CoV-2 en muestras de sangre, suero o plasma. Esta prueba consta de dos componentes, un componente IgG y un componente IgM. En el componente IgG, la IgG antihumana está recubierta en la región de la línea de prueba de IgG. Durante la prueba, la muestra reacciona con partículas recubiertas de antígeno 2019-nCoV en el casete de prueba.

Fundamento

Son pruebas rápidas de flujo lateral que mencionamos anteriormente. Estas pruebas se fundamentan en la detección de anticuerpos IgM o IgG utilizando dispositivos que contienen tiras de nitrocelulosa donde se fijan las proteínas del virus. La interpretación de los resultados depende del isotipo de anticuerpo detectado. La aparición de líneas para IgG o IgM, o ambas, indica una muestra positiva y, por lo tanto, que el paciente ha sido infectado con el coronavirus COVID-19. (Juárez, 2020)

Interpretación

Un resultado positivo indica infección por SARS-coV-2 ya que implica la formación de inmunidad contra ello, sin olvidar que existe la posibilidad de falsos positivos por reacción cruzada con otros coronavirus humanos y otros virus. (Onoda, M 2020)

Tabla 5. Estado de inmunidad y momento de la infección según los resultados de IgG y/o IgM.

IGM	IGG	INTERPRETACION
-	-	No infección o infección en fase precoz
+	-	Infección aguda
+	+	Infección evolucionada
-	+	Infección Pasada

Fuente: Martínez Chamorro M. Asociación Chilena de atención primaria. Abril 2020

En Chile se llevó a cabo un estudio con el título evaluación en condiciones de campo de una prueba serológica rápida para detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2 con el fin de Determinar el rendimiento diagnóstico adicional de una prueba serológica rápida que detecta anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2 en donde se incluyeron 144 personas, el dato significativo obtenido a partir de este ensayo fue que La prueba serológica rápida logró detectar un mayor número de casos respecto a la molecular, sobre todo a partir de la segunda semana de inicio de síntomas. Además, presentó una alta especificidad. Los resultados mostrarían su utilidad como prueba complementaria a la prueba molecular, especialmente durante la segunda y tercera semana de enfermedad. (Vidal M, 2020)

Otro estudio realizado en Panamá Evaluación de 9 pruebas serológicas rápidas para la detección de SARS-cov-2 tenía como fin evaluar la capacidad operativa de nueve pruebas

serológicas para detectar IgM/IgG en suero de pacientes con SARS-coV-2 en diferentes estadios clínicos.

Se estimó como tamaño de la muestra a 293, se utilizó como estándar de oro RT-PCR en tiempo real y se usó ensayos inmunocromatográfico para la detección cualitativa de anticuerpos IgG/IgM obteniendo como resultado que el mejor desempeño de las pruebas ocurrió para IgG en grupo de pacientes sintomáticos con más de 11 días después del inicio de los síntomas. El estudio indicó que la utilidad de las pruebas serológicas inmunocromatograficas para SARS-CoV-2 es limitada y pueden utilizarse en el estudio de seroprevalencia adecuada para el cribado de población infecciosa. (Mercado M, 2020)

En Chile se realizó otro ensayo comparativo con el título de Rendimiento de la prueba rápida de antígeno del SARS-CoV-2 en comparación con la RT-PCR en tiempo real en personas asintomáticas con el fin de evaluar el rendimiento de la prueba de antígeno SD Biosensor en comparación con RT-PCR.

El método utilizado fue la prueba de antígeno SD Biosensor, Inc. (República de Corea,) un inmunoensayo de flujo lateral rápido para la detección cualitativa de antígenos específicos del SARS-CoV-2 presentes en la nasofaringe humana Según el fabricante, los resultados están disponibles en 30 minutos y se proporcionan todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo. Los kits de ensayo son estables cuando se almacenan entre 2 y 30 ° C. Se obtuvo que dicha prueba resulto con una sensibilidad del 69,86% y una especificidad del 99,61%. El método de antígeno SD Biosensor permitió la identificación rápida de individuos asintomáticos.

Ventajas y desventajas

Tabla 6. Ventajas y desventajas del uso de pruebas rápidas de detección de antígenos

Ventajas y desventajas del uso de (PRD-Ag)	
Ventajas	Desventajas
<p>a. En muestras respiratorias tomadas dentro de los primeros 5-7 días después del inicio de los síntomas, generalmente se requieren menos de 30 minutos para dar un resultado.</p> <p>b. Pueden ser utilizadas directamente en puntos de atención (primer nivel de atención; se pueden realizar con poco o sin ningún equipamiento adicional.</p> <p>c. Se pueden ofrecer para hacer estudios de prevalencia de la infección en poblaciones que viven en lugares de difícil acceso a centros de diagnóstico con uso de técnicas moleculares, contribuyendo a la interrupción comunitaria mediante el aislamiento de casos diagnosticados.</p>	<p>Un resultado no reactivo (negativo) no permite descartar la infección por virus SARS-CoV-2, por lo tanto, los resultados deben ser verificados por pruebas moleculares como la RT-q PCR.</p>

Tabla 7. Ventajas y desventajas del uso de pruebas de anticuerpos

Ventajas y desventajas del uso de pruebas de Ac para la detección de SARS-coV-2 (Johanna Mercedes Meza Calvache, 2020)	
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sensibilidad del 88,66%, especificidad del 90, 63%. ○ Resultado rápido en 15 minutos. ○ No requiere un equipo específico ni complejo Simple de realizar y solo requiere un entrenamiento mínimo. ○ Complementan a los estudios de RTPCR ○ Económica
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tiempos de respuesta después la primera semana. IgG e IgM contra el SARS-CoV-2 será una indicación de infección (que no discrimina si es activa o pasada). ○ Reactividad cruzada con otros coronavirus y con el virus de la gripe. ○ Errores diagnósticos por insuficiente sensibilidad y especificidad. ○ El resultado negativo de IgM y de IgG no excluye que el paciente esté infectado por SARS-CoV-2. ○ Deben ser validados, podrían tener un muy importante porcentaje de falsos negativos y positivos, y no garantizan inmunidad.

5. Características de desempeño analítico de los métodos de detección de la infección por SARS-Cov-2.

Las pruebas diagnósticas son utilizadas para diferentes fines: tamizaje de una población, búsqueda de casos, descarte de un diagnóstico, confirmación de un diagnóstico o seguimiento de una patología. Para una correcta evaluación de una prueba diagnóstica se deben conocer

los siguientes elementos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo, positivo, valor predictivo negativo entre otros criterios. (Donis, 2020)

- Sensibilidad: Es definida como la capacidad de una prueba para identificar correctamente aquellos que tienen la enfermedad.
- Especificidad: es definida como la capacidad de una prueba para identificar aquellos que no tienen la enfermedad.
- Valor Predictivo Positivo (VPP): Es la probabilidad que tiene un individuo de estar enfermo cuando el resultado de la prueba es positivo.
- Valor Predictivo Negativo (VPN): contrariamente el valor predictivo negativo es la probabilidad de que un individuo que obtenga un resultado negativo a la prueba, no presente la enfermedad o esté sano.

En los estudios previamente descritos referentes a los métodos de detección y diagnóstico de SARS-coV-2 se evaluaron criterios analíticos que les permiten valorar la validez de cada una de las técnicas realizadas.

La actual pandemia de SARS-CoV-2 plantea numerosos retos sanitarios, entre los que destaca el uso adecuado e interpretación correcta de las pruebas diagnósticas disponibles en diferentes contextos clínicos. Como cualquier prueba diagnóstica, las de SARS-CoV-2 tienen limitaciones metodológicas de sensibilidad (S) y especificidad (E) que determinan su valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN). Además, su rendimiento diagnóstico depende del contexto clínico en el que se evalúen. (Muntadas, 2021)

Tabla 8. Características de desempeño analítico de los métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2.

Región/país	Título del estudio	Metodología	Tipo de muestra	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
EEUU	Técnica Alternativa sin extracción de ARN para la detección por RT-PCR en muestras de hisopado y esputo.	RT-PCR Sin extracción de ARN	Hisopado Nasofaríngeo	100 %	100%	No reflejado	No reflejado
		RT-PCR Con trizol		95, 7%	100%	No reflejado	No reflejado
		RT- PCR Sin extracción de ARN	Esputo	100%	100%	No reflejado	No reflejado
		RT-PCR Con Trizol		90%	100%	No reflejado	No reflejado
Colombia	Evaluación del rendimiento diagnóstico de 9 kits comerciales de RT-PCR para	RT-PCR Quatumpx	Hisopado nasofaríngeo	100%	95.56%	96.8%	100%
		RT-PCR GeneFinder		93.88%	100%	100%	97.75%

	la detección de SARS-CoV-2 en Colombia	Ensayo ALLPLEX		87.76%	100%	100%	88.24%
		RT-PCR Plus RealAmp		97.9%	92.13%	92.29%	83.16%
		MIRXES		87.76%	100%	100%	93.62%
		RT-PCR GENESIG		87.76%	97.78%	97.73%	88.00%
		RT-PCR SANSURE		83.48%	88.43%	88.89%	82.84%
EEUU	Desarrollo de ELISA específico para SARS-CoV-2	ELISA IgG 8-14 días	Suero/plasma	76.67%	99.56%	NR	NR
		ELISA IgG 15-21 días		86.21%	97.41%	NR	NR
		ELISA IgG Mayor a 21 días		100%	100%	NR	NR
		ELISA IgA 8-14 días	Suero/Plasma	76.67%	96.55%	NR	NR
		ELISA IgA		86.21%	94.83%	NR	NR

		15-21 días					
		ELISA IgA Mayor a 21 días		100%	100%	NR	NR
		ELISA IgM 8-14 días	Suero/Plasma	93.33%	96.98%	NR	NR
		ELISA IgM 15-21 días		96.55%	96.68%	NR	NR
		ELISA IgM Mayor de 21 días		100%	80.36%	NR	NR
Chile	Rendimiento de la prueba rápida de antígeno para SARS-coV-2 en comparación con la RT PCR en personas asintomáticas	Prueba de Antígeno	Suero/plasma	69.86%	99.6%	94.44%	97.22%
		RT-PCR	Hisopado nasofaríngeo	98.23%	99.61%	94.44%	97.21%
Perú	Evolución en condiciones de campo de una prueba rápida serológica para detección de SARS-CoV-2	Prueba rápida IgM-IgG	Sangre	43.8 %	98.9%	NR	NR

Perú	Evaluación en condiciones de campo de una prueba serológica rápida para detección de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2	Prueba rápida IgM e IgG	Suero/plasma	43, 8	98,9	-	-
Panamá	Evaluación de 9 pruebas serológicas IgM- IgG rápidas para la detección de SARS-CoV-2	Biosensor	Suero/plasma	75%	94%		
		AMS International	Suero/plasma	60.41%	98.5%		
		Leccurate	Suero/plasma	93.75%	86.5%		
		HIGHTOP one step	Suero/plasma	45.83%	99%		
		Cromatest-covid 19	Suero/plasma	75%	95.50%		
		AMP Rapid test	Suero/plasma	70.83%	95.50%		
		Egens	Suero/plasma	37.5%	98%		
		Cellex	Suero/plasma	70.83%	96%		
		Onesite Rapid test	Suero/plasma	66.66%	97%		

A partir de los resultados obtenidos referentes a las características de desempeño analítico de cada una de las técnicas en estudio, se pueden observar variaciones en los datos, eso se debe a diversos criterios que deben ser tomados en cuenta para el uso de los métodos.

En el estudio realizado en Colombia sobre la evaluación de diversos kits comerciales de la técnica de RT-PCR se pueden observar variaciones a partir del gen diana al cual se dirigió cada uno de los métodos, por lo que la variabilidad genómica puede afectar la precisión diagnóstica, así como también el tipo de muestra utilizada. Con respecto a los métodos de extracción de ARN analizados en EEUU, teniendo como método de referencia un kit comercial sugiere que se obtienen resultados satisfactorios con métodos directos de extracción y que el Trizol es una opción aceptada para la obtención del material genético.

Las pruebas rápidas serológicas fueron evaluadas tomando en cuenta principalmente el tiempo de evolución de la enfermedad y el tiempo posterior a haber contraído la infección, obteniendo que a medida que transcurre este periodo, (mayor a 11 días) la sensibilidad de detección de anticuerpos aumenta, resultado no aptas para etapas iniciales de la infección.

En los inmunoensayos ligado a enzimas se valoró la capacidad tanto para detectar anticuerpos como antígenos optimizando las técnicas, refiriendo que entre los días 7-15 los resultados son más eficientes.

6. Utilidad de las metodologías RT-qPCR, ELISA y Pruebas rápidas en el diagnóstico de SARS-CoV-2

Tabla 9. Utilidad de RT-PCR, ELISA y pruebas rápidas

Metodologías en el diagnóstico de SARS-coV-2	Utilidad
RT-qPCR	<ul style="list-style-type: none"> • Esta técnica debe de ser aplicada en casos sospechosos de menos de 7 días del inicio de los síntomas.

	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta el ARN del virus SARS-CoV-2 mediante la amplificación exponencial del ADN complementario detectado en tiempo real. • Es el eslabón fundamental del diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. • Detecta hasta 100 copias por reacción (316 equivalentes genómicos por reacción) • Indicada para fase precoz de la infección
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Posee una elevada sensibilidad para detectar a los posibles pacientes positivos para SARS-CoV-2. • Determina con precisión si la persona es portadora del anticuerpo SARS-coV-2. • Esta técnica indica en qué fase de la infección se encuentra la persona en estudio. • Detecta los anticuerpos IgM/IgG o a los anticuerpos IgG RBD. • Indicada tras 7 días del inicio de los síntomas o etapa postsintomática. • Estudio del estado inmunitario
Pruebas rápidas	<p>Pruebas de antígenos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Responder a presuntos brotes de COVID-19 en lugares remotos, instituciones y comunidades donde las pruebas moleculares son de difícil acceso. <ol style="list-style-type: none"> 1. Para apoyar investigaciones de brotes en grupos cerrados o semi-cerrados como, por ejemplo: escuelas, residencias geriátricas, prisiones, lugares de trabajo, cruceros. 2. Monitorear la incidencia de la enfermedad en las comunidades, particularmente en lugares de trabajadores esenciales y de la salud durante los brotes o en regiones de transmisión generalizada donde el valor predictivo positivo

y negativo de una PDR-Ag es suficiente para permitir un control efectivo de la infección y seguimiento de contactos

3. Despistaje de la infección por SARS-CoV-2 en los contactos asintomáticos, aun cuando las PDR -Ag no están específicamente autorizadas para tal fin, ya que se ha demostrado que los casos asintomáticos tienen cargas virales similares a los casos sintomáticos. En estos casos un resultado negativo de la PDR-Ag no debe excluir un contacto de los requisitos de la cuarentena

- **Pruebas de anticuerpos**

1. Estudios de vigilancia poblacional
2. Identificación de donantes de plasma de convalecientes
3. Diagnóstico tardío o retrospectivo en situaciones definidas
4. Identificación de población susceptible en estrategias de inmunización

7. Diseño Metodológico

7.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo el cual esta soportado a partir de una búsqueda de estudios científicos técnicos como fuente de información que favorecen el desarrollo del subtema en estudio.

7.2. Área de estudio

El área de estudio fue en Virología, concretamente en el diagnóstico por biología molecular y serológico mediante el análisis de estudios realizados en América.

7.3. Universo

El universo estuvo compuesto por 29 documentos que abordan la temática en América.

7.4. Muestra

La muestra estuvo conformada por 12 estudios desarrollados en EEUU, Chile, Perú, Panamá, Colombia y México que corresponden al 40% del universo.

7.5. Recolección de la información

La información y los datos utilizados se recolectaron a partir de fuentes primarias como revistas científicas, informes, que desarrollan los diferentes hallazgos acerca de los métodos de detección de la infección por SARS-CoV-2 en América.

7.6. Instrumento de recolección

Para la recolección de datos se utilizó herramientas como bosquejos para la estructuración del desarrollo del subtema, fichas textuales y paráfrasis que junto con el análisis de diversas fuentes se obtuvieron ideas principales e hicieron posible la recopilación de información.

7.7. Presentación de la información

La presente información fue digitada haciendo uso del procesador de texto Microsoft office Word 2016 y para la presentación se utilizó Microsoft power point.

7.8.Ética y confiabilidad de datos

En el proceso de elaboración de la presente investigación no hubo modificaciones de los datos publicados en los estudios.

8. Conclusiones

1. La RT-qPCR representa el método establecido para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, las metodologías de esta técnica utilizadas en América se basan en la detección los genes N, S y en menor medida E a como también marcos de lectura abiertos ORF1ab utilizando muestras de hisopado nasofaríngeos, orofaríngeos y esputo, siendo la primera la muestra ideal. Referente a los métodos de extracción de ARN, los kits empleados se fundamentan en el uso de columnas de sílice en donde (6/12 estudios reportaron el uso de este método) y en 4/12 usaron partículas magnéticas, en otros estudios desarrollaron técnicas sin extracción previa. Para la detección del producto de la RT-qPCR predominó el uso de sondas fluorogénicas TaqMan y los protocolos fueron optimizados a partir de los propuestos por Alemania.
2. Los Inmunoensayos tipo ELISA reportados en los estudios fueron tanto cualitativos como cuantitativos, para IgM, IgG e IgA dirigidos al dominio RBD, estos métodos desarrollados fueron principalmente automatizados basados en nanopartículas, ensayos inmunomagnéticos y ELISA BU con modificaciones de lavado. Dentro de las pruebas rápidas se utilizaron técnicas basadas en oro coloidal de tiras para detección de anticuerpos IgM-IgG y detección de antígenos por Inmunocromatografía de flujo lateral teniendo como blanco la proteína N.
3. Respecto a las características de desempeño, los estudios determinaron para la RT-qPCR una especificidad entre 88% y 100%, la baja sensibilidad se atribuye a metodologías que utilizaron para detección de gen E a diferencia de las dirigidas al gen N, S, u ORF1ab donde la sensibilidad fue mayor (100%). Dentro de las pruebas de ELISA se observó un aumento en sensibilidad y especificidad en periodos mayor a 21 días y un bajo rendimiento en resultados de pruebas rápidas.

4. El uso de cada uno de los métodos está delimitado a las etapas de infección y desempeño analítico, siendo RT-qPCR capaz de detectar la partículas virales durante la infección en etapas tempranas con resultados eficaces y el elegido para diagnóstico del virus, en tanto ELISA y pruebas rápidas útiles en la detección de antígenos y anticuerpos en etapas tardías posterior a 7 días del inicio de los síntomas, y monitoreo inmunitario de pacientes después de 21 días de la infección y útiles en escenarios de brotes cerrados y semi-cerrados, comunidades de difícil acceso, monitoreo de incidencia, control y seguimiento de contactos.

9. Bibliografía

- Aires, M. (2020). *Consenso sobre el uso de pruebas diagnosticas para SARS-coV-2*. Buenos aires, Argentina. Recuperado de: <http://bancos.salud.gob.ar/recurso/consenso-sobre-el-uso-de-pruebas-diagnosticas-para-sars-cov-2>
- Astuti, I. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 407-409. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32335367/>
- Cabrera K, (2020). Revisión rápida sobre la utilidad del Umbral de ciclos de Rt PCR en pacientes con sospecha de SARS-coV 2. *Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud*, 22. Recuperado de: [https://www.iets.org.co/Archivos/18.RSrapida_Utilidad_Ct_en_RT-PCRpara_COVID-19\(VA\).pdf](https://www.iets.org.co/Archivos/18.RSrapida_Utilidad_Ct_en_RT-PCRpara_COVID-19(VA).pdf)
- Carranza J. (2020). Pruebas antigenicas en la vigilancia de Covid . *Acta Científica de la Sociedad Venezolana*, 196. Recuperado de: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/21201
- Casco A. (2021). Precisión de un ensayo de detección RT-qPCR SARS-CoV-2 sin extracción previa de ARN. *Revista de metodos virologicos* . Recuperado de: <https://alerta.salud.gob.sv/factores-relevantes-sobre-el-ensayo-rt-pcr-para-la-deteccion-de-sars-cov-2-virus-causante-del-covid-19/>
- Chen, Y. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 418-423. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967327/>
- Cruz, A. (2021). Estudio Comparativo de 2 Tecnicas inmunologicas para la deteccion de anticuerpos anti-SARS-coV-2 . *Repositorio Academico USMP*. Recuperado de: https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7582/pareja_ac.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Donis, J. (2020). Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avances de la biomedicina*, 73-81 .Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3313/331328015005.pdf>
- Edster H. (2021). Analisis de anticuerpos IgG, IgA, e IgM contra la proteina pico S1 del SARS-coV-2 en pacientes convaecientes y vacunados con las vacunas pfizer BioNtech Cansinobio. *Wiley online Library* .Recuperado de: <https://neurosciences.com/2021/03/14/respuesta-negativa-de-anticuerpos-anti-sars-cov-2-s-despues-de-la-vacunacion-con-pfizer-sars-cov-2-en-un-paciente-que-tomaba-ocrelizumab/>
- Fernandez S, (2021). Covid 19 among healthcare workers in a Souther Brazilian Hospital and evaluation of a diagnostic strategy based on the RT-PCR test and retest SARS-coV-2 . *European Review for Medical and Pharmacological Science* , 3365-3374. Recuperado de: <https://www.europeanreview.org/article/25748>
- Garcia, C. (2020). SARS-coV-2, Apectos biologicos epidemiologico, de un coronavirus emergente . *Acta cientifica de la sociedad venezolana de Bioanalistas especialistas* , 10. Recuperado de: <https://www.svbe.org/descargas/Acta%20Cient%20ADfca%202020-1.pdf>
- Hernandez, C. (2021). Evaluacion del rendimiento diagnostico de nueve kits comerciales de RT PCR para la deteccion de SARS- coV-2 en colombia . *J Med Virol*. Recuperado de: <https://search.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/es/covidwho-1206843>
- Mamiko Onoda, M. J. (2020). Pruebas diagnosticas de laboratorio de Covid-19. *AEPAP*, 10-11. Recuperado de: <https://www.aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/biblioteca/pruebas-diagnosticas-de-laboratorio-de-covid-19>
- Mercado J. (2020). Evaluation of nine serological rapid tests for the detection of SARS-CoV-2. *Rev Panam Salud Publica*, 44-49. Recuperado de: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53057>

- Muntadas, M. (2021). Pruebas diagnósticas COVID-19: importancia del contexto clínico. *Medicina clinica* , 185-190. Recuperado de: <https://medes.com/publication/162828>
- Naqvi, A. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome structure, evolution, pathogenesis and therapies. *Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 189. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544429/>
- Noriega, F. (2021). Desarrollo de Tecnicas de Amplificacion por RT-PCR . *Salud y vida* . Recuperado de: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/01/1146454/factores_relevantes_sobre_el_en_sayo_rt-pcr_para_la_deteccion_d_AucnkXH.pdf
- OPS. (2020). Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. *OPS*. Recuperado de: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52471>
- Parra Ortega Israel, C. F. (2020). Distribucion de los valores del Ct en la RT PCR para SARS-coV- 2 al momento del diagnostico en pacientes pediatricos mexicanos . *Patologia clinica* , 176-182.
- Peña, M. (2021). Rendimiento de la prueba rapida de antígeno del SARS-coV-2 en comparacion con la RT-PCR en tiempo real en personas asintomaticas . *Institute Journals infected disease* . Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8101797/>
- Petrosillo, N. (2020). COVID-19, SARS and MERS: are they closely related. *Clinical Microbiology and Infection*, 729. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7176926/>
- R Yuen, D. (2021). El nuevo protocolo ELISA Vincula los anticuerpos reactivos del SARS-coV-2 preexistentes con la inmunidad y la edad del coronavirus endémico y revela una identificación serológica mejorada del Covid 19 agudo a través de detección de múltiples parámetros . *Frontiers en inmunologia*. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332418/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.2-spa.pdf>
- Rojas, J. (2020). SARS-coV y RT PCR en pacientes asintomaticos: resultados de una cohorte de trabajadores en el Aeropuerto internacional El Dorado bogota,2020.

Biomedica. Recuperado

de:

<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5802>

Solis E. (2021). Tecnicas alternativas sin extraccion de ARN para la deteccion por RT PCR en tiempo real del SARS-coV-2 en muestras de hisopado nasofaringeo y de esputo. *Revista de metodos virologicos* . Recuperado de: <https://alerta.salud.gob.sv/autotoma-de-muestra-de-saliva-para-diagnostico-de-sars-cov-2-por-rt-qpcr-en-poblacion-ambulatoria/>

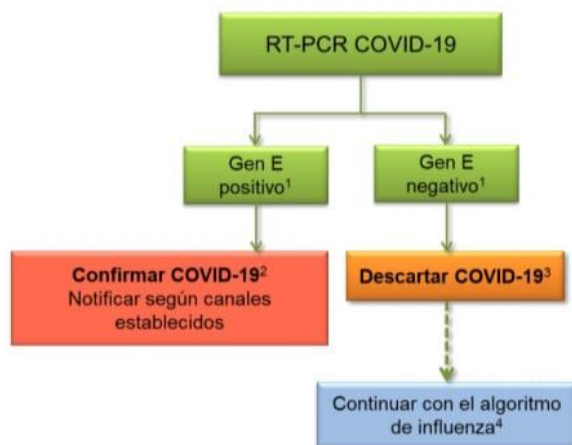
Vásquez,P. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta 2021*, 32-33. Recuperado de: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/01/1146454/factores_relevantes_sobre_el_ensayo_rt-pcr_para_la_deteccion_d_AucnkXH.pdf

Vasquez S(2020). Desarrollo de Elisa especifico para SARS-coV-2 . *Journal of immunological Methods*, 102-103. Recuperado de: <https://search.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/es/covidwho-696588>

Vidal, M . (2020). Evaluacion en condiciones de campo de una prueba serologica rapida para deteccion de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-coV-2. *Revista de Peru Med Exp Salud*, 50-62. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342020000200203

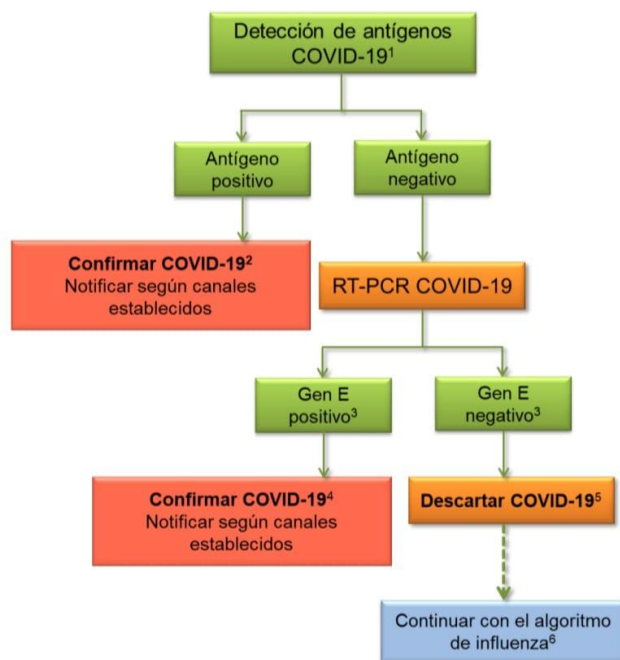
Anexos

Anexo 1. Algoritmo de detección Molecular



Fuente: OPS (2020)

Anexo 2. Algoritmo basado en detección de antígenos



Fuente: OPS (2020)