



**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Farmacia**

**ENSAYOS Y METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN
DE SARS-CoV-2: DESAFÍOS E IMPLICACIONES
PARA EL DIAGNÓSTICO DE COVID-19**

Alumna: María Paula Silva

Directora: Dra. Silvia A. González

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, CONICET–Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano (UB)

Buenos Aires, 2022

RESUMEN

El brote de la neumonía viral COVID-19 causada por un nuevo coronavirus, el virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), fue declarado pandemia por la Organización Mundial de la Salud en enero de 2020. En efecto, SARS-CoV-2 y su patología asociada, COVID-19, generaron mucha preocupación tanto en el ámbito médico como científico debido a su impacto epidemiológico a nivel mundial. Luego de más de dos años desde el inicio de la pandemia, las estrategias efectivas para COVID-19 se basan principalmente en el diagnóstico generalizado y la vacunación masiva. En particular, las pruebas diagnósticas constituyen un componente esencial de la respuesta a la pandemia de COVID-19, ya que permitieron implementar medidas rápidas y efectivas que ayudaron a contener la pandemia mediante la identificación de los individuos infectados y de los que son aún asintomáticos durante el período de incubación de la enfermedad, así como el rastreo de los contactos de un individuo enfermo. En este sentido, las empresas farmacéuticas y de base biotecnológica respondieron inmediatamente a esta pandemia, desarrollando una amplia variedad de pruebas de diagnóstico para detectar SARS-CoV-2 así como los anticuerpos generados por infección natural o por vacunación.

En base a una selección de estudios publicados, en este Trabajo de Tesina se analizó el desempeño de los diferentes tipos de estrategias y ensayos diagnósticos para COVID-19 disponibles en el mercado, evaluando además las características y propiedades de cada uno de ellos.

PALABRAS CLAVE: SARS-CoV-2; COVID-19; pruebas de diagnóstico; vigilancia epidemiológica

AGRADECIMIENTOS

A todos los docentes que contribuyeron a mi crecimiento tanto académico como personal y en especial a la Dra. Silvia A. González por su gran labor como tutora, que su compromiso, profesionalismo y dedicación, colaboraron a que esta última etapa sea más fácil.

Además, agradecer a toda mi familia por acompañarme en este proceso y en particular a mis padres y hermanas por darme ánimo, creer en mí, ser mi guía y sostén en los momentos más difíciles. Gracias por inculcarme el amor por la química y por la farmacia. Este logro es también de ustedes.

A mis abuelos, y Gladys, que son la luz de mis ojos, y que siempre se alegraron, no solo por cada logro en los exámenes, sino también en momentos difíciles acompañarme aún más.

A Federico, mi compañero de vida, por acompañarme en esta etapa y en uno de los momentos más difíciles de mi vida y a toda su familia, por ser parte.

A mis amigas de toda la vida que me acompañan desde siempre.

A mis amigas y amigos que me dejó la facultad y futuros colegas, por el apoyo diario y darme animo durante este proceso.

Quiero agradecer por último, a todas las personas que me acompañaron y participaron de manera directa o indirecta, en especial a Juan, que sin su ayuda, la estaba lejos de mi casa para poder estudiar la carrera que amo, no hubiera sido lo mismo.

ÍNDICE

Abreviaturas	v
Introducción	
1. COVID-19: características generales y patogenia de la enfermedad infecciosa ..	1
2. El virus del síndrome respiratorio severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2).....	2
2.1. Organización genómica de SARS-CoV-2 y estructura del virión	2
2.2. Ciclo de vida de SARS-CoV-2	6
3. Pruebas diagnósticas para la detección de SARS-CoV-2	7
3.1. Metodologías moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos...7	
3.1.1. Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	7
3.1.2. Retrotranscripción acoplada a amplificación isotérmica mediada por bucle.....	8
3.1.3. Secuenciación de genomas virales de SARS-CoV-2	9
3.2. Pruebas diagnósticas inmunológicas rápidas basadas en la detección de antígenos virales.....	10
3.3. Pruebas inmunológicas basadas en la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2	10
3.3.1. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas.....	13
3.3.2. Inmunoensayos quimioluminiscentes	13
3.3.3. Inmunoensayos de flujo lateral para la detección de anticuerpos dirigidos a proteínas de SARS-CoV-2.....	13
Objetivos	15
Métodos	16
1. Diseño	16
2. Búsquedas bibliográficas y fuentes de consulta para la investigación.....	16
3. Selección de los trabajos científicos	16
4. Criterios aplicados para la recolección de datos	17
4.1. Diseño de los ensayos.....	17
4.2. Valoración de sesgos en los estudios.....	17
5. Parámetros y variables evaluados en los estudios seleccionados	17
Resultados	18
1. Análisis de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 basadas en RT-qPCR	18
1.1. Evaluación de la sensibilidad analítica y el desempeño clínico de los kits de detección molecular de SARS-CoV-2 utilizados en Argentina.....	18
1.2. Análisis del impacto de la diversidad genética de las variantes de SARS-CoV-2 circulantes en América del Sur sobre el desempeño de los ensayos moleculares	21
1.3. Falsos negativos y su incidencia en los ensayos iniciales de RT-PCR para	

COVID-19.....	22
2. Análisis de pruebas inmunológicas desarrolladas para el diagnóstico de COVID-19.....	24
2.1. <i>Precisión diagnóstica de las pruebas serológicas para la determinación de la infección por SARS-CoV-2</i>	24
3. Comparación de las pruebas serológicas para la detección de la infección por SARS-CoV-2 con el ensayo molecular de RT-qPCR	32
Discusión y conclusiones	39
Referencias	42

ABREVIATURAS

- ACE2: enzima convertidora de la angiotensina 2
- Ag-RDTs: tests diagnósticos rápidos de antígeno
- ARNm sg: ARNm subgenómicos
- + ARNsc: ARN monocatenario de sentido positivo
- CLIA: inmunoensayos de quimioluminiscencia
- COVID-19: enfermedad del coronavirus 2019
- E: proteína de la envoltura del coronavirus
- ECLIA: inmunoensayos de electroquimioluminiscencia
- ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
- ER: retículo endoplásmico
- ERGIC: compartimento intermedio ER-Golgi
- IC 95%: intervalo de confianza del 95%
- LFIA: inmunoensayo de flujo lateral
- LoD: límite de detección
- M: proteína de membrana del coronavirus
- MAb: anticuerpo monoclonal
- MAb-AuNP anti-N: MAb anti-N conjugado a nanopartículas de oro coloidal
- MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
- N: proteína nucleocápside del coronavirus
- NRP1: proteína neuropilina-1
- nsp5: proteasa similar a quimotripsina
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ORF: marco abierto de lectura
- POCT: pruebas de laboratorio en el lugar de atención al paciente
- RBD: dominio de unión al receptor
- RdRP: ARN polimerasa dependiente de ARN
- RTC: complejo de replicación y transcripción viral

- RT-LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle
- RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- S: glicoproteína de la espícula del coronavirus
- SARS: síndrome respiratorio agudo severo
- SARS-CoV-2: virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2
- SNP: polimorfismo de nucleótido único
- TMPRSS2: serina proteasa de superficie celular 2

INTRODUCCIÓN

1. COVID-19: características generales y patogenia de la enfermedad infecciosa

El 31 de diciembre de 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó el primer caso de un nuevo virus del género coronavirus en la ciudad de Wuhan (Provincia de Hubei, China), el cual estaba relacionado con el agente causal de un brote de neumonía atípica ocurrido en 2003 que se denominó síndrome respiratorio agudo severo (SARS; *severe acute respiratory syndrome*) (<https://www.who.int/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019>). Un mes más tarde, la OMS declaró el estado de pandemia causada por este nuevo virus que fue nombrado virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). A diciembre de 2021, la enfermedad causada por SARS-CoV-2, denominada COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), había provocado 235 millones de casos confirmados y causado más de 5,2 millones de muertes a nivel mundial (<https://www.who.int/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019>).

Al igual que SARS-CoV, el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 utiliza como receptor a la proteína celular ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*), lo cual hace que el principal tropismo viral sea el pulmón (Harrison *et al.*, 2020). En efecto, los primeros blancos de la entrada viral son las células epiteliales del tracto respiratorio y alveolares, las células del endotelio vascular y los macrófagos alveolares (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2020; Harrison *et al.*, 2020). Uno de los aspectos distintivos entre SARS-CoV y SARS-CoV-2 es la alta capacidad de este último de infectar el tracto respiratorio superior, tales como los tejidos nasofaríngeo y orofaríngeo (Harrison *et al.*, 2020; Lebeau *et al.*, 2020). Posiblemente, esta característica de SARS-CoV-2 se deba a su mayor afinidad por el receptor ACE2, el cual se expresa también en tejidos de las cavidades oral y nasal (ver referencias en Harrison *et al.*, 2020). En este sentido, el hecho de detectar SARS-CoV-2 en muestras de tracto respiratorio superior de pacientes con COVID-19 durante el período prodrómico explicaría la transmisibilidad más rápida y efectiva de SARS-CoV-2 con respecto a SARS-CoV-1.

Siendo SARS-CoV-2 un virus respiratorio, su principal mecanismo de transmisión es a través de pequeñas gotas de saliva de la persona infectada que se emiten al hablar, estornudar, toser o respirar, aunque recientemente se ha señalado la importancia de la transmisión por aerosoles (<https://www.who.int/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019>). Los síntomas de COVID-19 más prevalentes son fiebre, dificultad para respirar, disnea, tos seca y fatiga y se asocian comúnmente con diarrea, dolor de cabeza, anosmia, linfopenia y/o daño hepático (Lebeau *et al.*, 2020). Sin embargo, dado que éstos son síntomas variables que pueden asociarse a otras enfermedades, la presentación clínica no puede ser utilizada para el diagnóstico certero de infección por SARS-CoV-2. Las características clínicas de COVID-19 varían desde una enfermedad leve o aparentemente asintomática hasta condiciones de pacientes en estado crítico. Cabe destacar que la infección por SARS-CoV-2 puede desencadenar la desregulación de la respuesta inmune en pacientes graves provocando el síndrome de disfunción multiorgánica (Yang *et al.*, 2020). Las comorbilidades más comunes en pacientes críticos son la edad, la hipertensión, la diabetes, la obesidad, las

enfermedades cardiovasculares y las enfermedades del sistema respiratorio (Yang *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 y su patología asociada han generado mucha preocupación tanto en el ámbito médico y científico como a nivel mundial debido a su impacto epidemiológico. En este sentido, resulta imprescindible contar con métodos diagnósticos precisos y sensibles que permitan detectar los focos de infección de manera temprana y así poder reducir la transmisión comunitaria y evitar la saturación del sistema de salud.

En Argentina, según las cifras difundidas al día 11 de febrero de 2021, los casos confirmados llegaron a 2.008.345 de los cuales 49.874 fueron víctimas fatales (<https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19>). Debido a la gran cantidad de casos confirmados hasta esa fecha y a la necesidad de contener la propagación del virus, el Gobierno Nacional decidió tomar una serie de medidas preventivas con el objetivo de aplanar la curva de contagios. Algunas de estas medidas de prevención fueron: (i) implementar el aislamiento social preventivo para reducir el desplazamiento de los individuos; (ii) mantener aproximadamente una distancia de dos metros con otras personas; (iii) utilizar barbijo o tapabocas que cubra nariz, boca y mentón; (iv) realizar una adecuada higiene de manos, siendo lo más adecuado lavarse las manos frecuentemente con agua y jabón, o, alternativamente, higienizar las manos con soluciones a base de alcohol, (alcohol en gel o alcohol 70%); (v) toser o estornudar sobre el pliegue interno del codo; (vi) no compartir utensilios, vajilla, u otros elementos de uso personal que se utilizan con frecuencia, y si es así, desinfectarlos antes de su uso; y (vii) realizar con regularidad una adecuada ventilación de los ambientes cerrados; sobre todo en período invernal o de bajas temperaturas para así permitir el intercambio de aire. Es importante asegurar el recambio de aire mediante la apertura de puertas y ventanas que produzcan circulación cruzada del aire.

2. El virus del síndrome respiratorio severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

2.1. Organización genómica de SARS-CoV-2 y estructura del virión

SARS-CoV-2 es un virus con genoma de ARN monocatenario sentido positivo y con envoltura lipídica que pertenece al género betacoronavirus de la familia *Coronaviridae* (Chen *et al.*, 2020; Masters & Perlman, 2013). El genoma de aproximadamente 30.000 nucleótidos de SARS-CoV-2 codifica para 27 proteínas: los dos primeros tercios del ARN viral comprenden el mayor marco abierto de lectura (ORF; *open reading frame*), el ORF 1a y el ORF1b, los cuales codifican para las 15 proteínas no estructurales (nsp) que forman parte del complejo de replicasa/transcriptasa viral (**Figura 1**). El tercio 3' del genoma contiene los genes para varias proteínas accesorias y para las cuatro proteínas estructurales involucradas en la interacción del virus con el receptor celular, el ensamblado y la morfogénesis de los viriones, así como en la liberación de las partículas virales al medio extracelular: la glicoproteína de la espícula (S; *spike*), la proteína de la envoltura (E; *envelope*), la proteína de membrana (M; *membrane*) y la proteína nucleocápside (N; *nucleocapsid*) (Fehr & Perlman, 2015) (**Figura 1**).

Estudios de criomicroscopía y de criotomografía electrónicas mostraron que los viriones esféricos, cuyo diámetro es de aproximadamente 125 nm, exhiben la característica particular de presentar espículas que se proyectan desde la superficie de la envoltura viral, confiriéndoles una apariencia de corona solar (**Figura 2a**) (Fehr & Perlman, 2015; Masters & Perlman, 2013). Las proteínas S, M y E se hallan insertas en la envoltura lipídica del virión, mientras que la proteína N se asocia al ARN genómico formando el *core* ribonucleoproteico (**Figura 2a**) (Fehr & Perlman, 2015; Masters & Perlman, 2013).

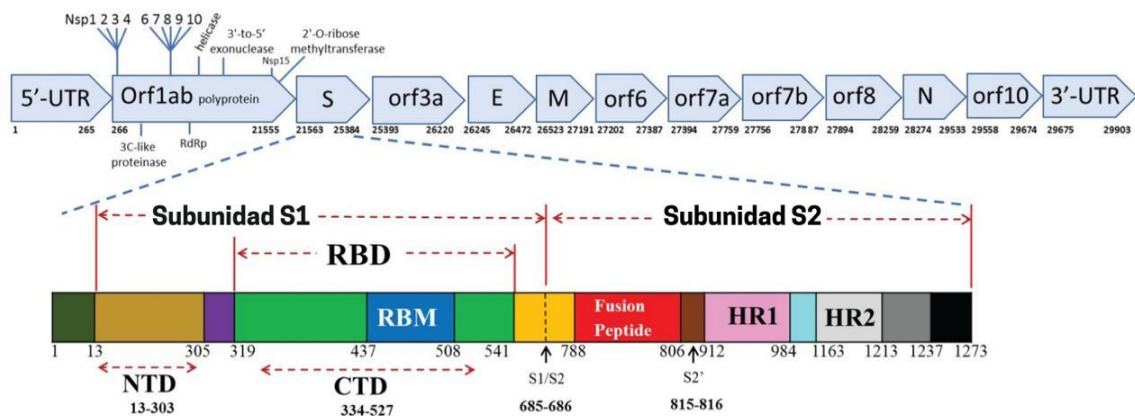


Figura 1 | Organización genómica de SARS-CoV-2 y dominios de la proteína S. El genoma de SARS-CoV-2 está flanqueado por una región no traducida en los extremos 5' y 3' (5'-UTR y 3'-UTR, respectivamente) y contiene el Orf1ab que codifica para las proteínas del complejo replicasa/transcriptasa seguido de los ORFs para las proteínas que forman el virión (la glicoproteína S, y las proteínas E, M y N) y para las proteínas accesorias.

La proteína viral S es una glicoproteína de transmembrana formada por la subunidad S1, que contiene el dominio de unión al receptor (RBD; *receptor binding domain*); y la subunidad S2 que exhibe el péptido de fusión responsable de la fusión de la membrana viral con la celular.

NTD: dominio N-terminal; CTD: dominio C-terminal; RBM: motivo aminoacídico de unión al receptor; HR1/2: repeticiones en héptada 1 y 2 de la subunidad S2. Los números se refieren a las posiciones aminoacídicas en la proteína S de SARS-CoV-2 (<https://covid-19.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC2>).

Adaptado de Mittal *et al.* (2020).

La **glicoproteína S** (~150 kDa) es una proteína de fusión clase I que se encuentra en el virión bajo la forma de homotrímeros, lo cual resulta en la estructura de espículas distintiva de los coronavirus (Beniac *et al.*, 2006). Esta glicoproteína viral es procesada por una proteasa celular del tipo furina en las subunidades S1 y S2, las cuales son clave para el tropismo y la entrada de SARS-CoV-2 a sus células blanco (**Figuras 1 y 2**). S1 media la unión del virus al receptor ACE2, mientras que la subunidad transmembrana S2 es responsable de la fusión de la membrana viral con membranas celulares (Mittal *et al.*, 2020).

La **proteína M** (~25-30 kDa) es la proteína estructural más abundante del virión y juega un papel importante, junto con las proteínas E y N, durante el ensamblado viral (Siu *et al.*, 2008) (**Figura 2**). Al unirse a la nucleocápside, M promueve la finalización del ensamblado de las partículas virales (Neuman *et al.*, 2011).

La **proteína E** de SARS-CoV-2 (~8 kDa), que se halla en bajos niveles en la membrana viral, facilita el ensamblado y liberación de los viriones (Yoshimoto, 2020) (**Figura 2**). Además, la proteína E exhibe actividad de canal iónico, la cual es necesaria para la patogénesis viral (Fehr & Perlman, 2015; Yoshimoto, 2020).

La **proteína N** se une al ARN genómico viral constituyendo la única proteína viral presente en la nucleocápside (Fehr & Perlman, 2015; Yoshimoto, 2020) (**Figura 2**).

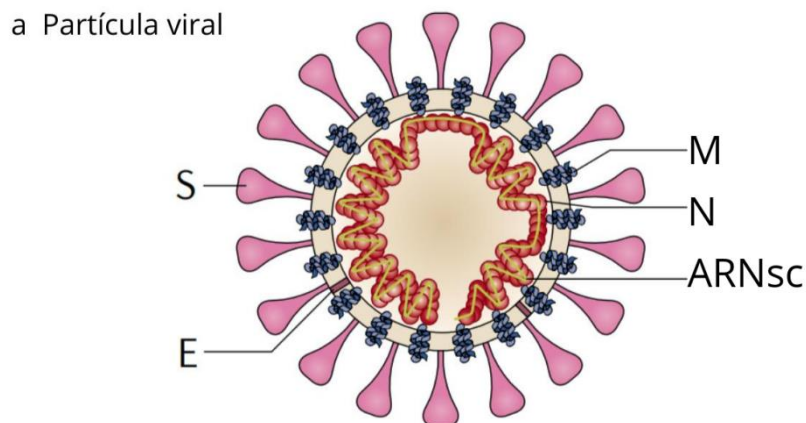


Figura 2 | Organización y estructura del virión de SARS-CoV-2. a) En el esquema se indican las proteínas que forman la partícula viral: S, E, M, y N. El genoma de ARN monocatenario de sentido positivo (+ ARNsc) es empaquetado por N, mientras que las proteínas M y E aseguran su incorporación en la partícula viral durante el proceso de ensamblado. Los trímeros de S sobresalen de la envoltura lipídica viral derivada de la célula infectada y proporcionan especificidad para los receptores celulares que son utilizados para la entrada del virus a la célula.

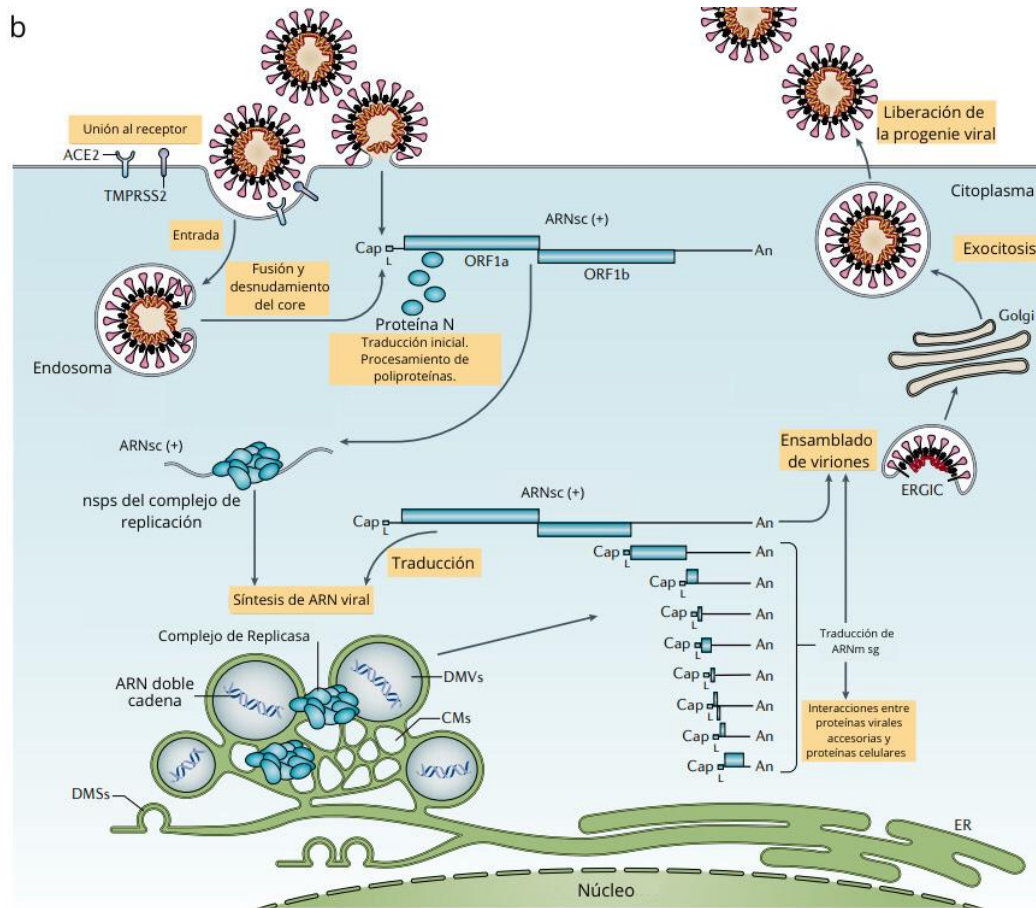


Figura 2 | Ciclo de replicación de SARS-CoV-2 (Continuación). b) Las partículas virales se unen a su receptor en las células blanco y las interacciones de la glicoproteína S con ACE2 y con factores del hospedador (como la serina proteasa de superficie celular TMPRSS2), promueven la fusión de la membrana viral con la membrana celular o endosomal. El desnudamiento (*uncoating*) del *core* viral y la liberación del ARN genómico en el citoplasma de la célula infectada permiten la traducción inmediata de los ORF1a y ORF1b. Las poliproteínas pp1a y pp1ab codificadas por Orf1a/b son procesadas cotraduccional/postraduccionalmente en las proteínas no estructurales maduras (nsps) que forman el complejo de replicación/transcripción. Concomitantemente con la expresión de las nsps, la biogénesis de los orgánulos de replicación viral, que consisten en vesículas de doble membrana perinucleares (DMVs), membranas contorneadas (CMs) y pequeñas esférulas abiertas de doble membrana (DMSs), crean un microambiente protector para la replicación del ARN genómico y la transcripción de los ARNm subgenómicos (ARNm sg). Las proteínas estructurales sintetizadas son trasladadas al retículo endoplásmico (ER) y transitan a través del compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC), donde interactúan con el ARN genómico recién sintetizado que se halla asociado a la proteína N. Esto resulta en el ensamblado de las partículas virales que brotan hacia el lumen de los compartimentos de la vía secretoria. Finalmente, los viriones son secretados de la célula infectada por exocitosis.

Cap: modificación por 7-metilguanósina del extremo 5' de los ARNm; L: secuencia líder; An: extremo 3' poliadenilado del ARN genómico viral y de los ARNm virales.

Adaptado de V'kovski *et al.* (2020).

2.2. Ciclo de vida de SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 entra a sus células blanco mediante la interacción de la región RBD (*receptor binding domain*) de la glicoproteína S del virión con el receptor ACE2 (Lan *et al.*, 2020; Shang *et al.*, 2020) (**Figuras 1 y 2b**). Mutaciones en la región RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 confieren al virus mayor afinidad por ACE2 y posiblemente mayor capacidad infectiva (Harrison *et al.*, 2020; Wrapp *et al.*, 2020). Además de la unión al receptor celular, la proteína S es procesada por la serina proteasa TMPRSS2 (*transmembrane serine protease 2*) presente en la superficie celular (V'kovski *et al.*, 2020). Este procesamiento proteolítico es esencial para exponer el péptido de fusión de la subunidad S2, lo cual resulta en la fusión de la envoltura lipídica del virión con membranas celulares (**Figuras 1 y 2b**). Es interesante destacar que TMPRSS2 se expresa en el tracto respiratorio humano y, por lo tanto, contribuye en gran medida tanto a la propagación como a la patogénesis de SARS-CoV-2 (Shang *et al.*, 2020). De hecho, la inhibición de TMPRSS2 es suficiente para bloquear la entrada de SARS-CoV-2 a células de pulmón *in vitro* (Hoffmann *et al.*, 2020). Por otra parte, dos estudios recientes demostraron que la neuropilina-1 (NRP1), que se une a sustratos procesados por la furina, potencia la capacidad infectiva de SARS-CoV-2 (Cantuti-Castelvetri *et al.* 2020; Daly *et al.*, 2020). La proteína NRP1 se halla en niveles abundantes en los epitelios respiratorio y olfatorio, alcanzando su máxima expresión en las células epiteliales y endoteliales (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2020). Luego del desnudamiento del virión, el ARN genómico viral es traducido para generar en una primera etapa las dos poliproteínas pp1a y pp1ab, codificadas por los ORF1a y ORF1b, respectivamente (**Figuras 1 y 2b**). Estos dos precursores poliproteicos son procesados proteolíticamente en las proteínas no estructurales que forman el complejo de replicación y transcripción viral (RTC; *replication and transcription complex*). Así, dieciséis proteínas no estructurales se generan a partir de los precursores pp1a (nsp1-11) y pp1ab (nsp1-10, nsp12-16) tras el procesamiento proteolítico por las dos cisteína proteasas que se encuentran asociadas a nsp3 (proteasa similar a la papaína; PL^{pro}) y nsp5 (proteasa similar a quimotripsina). La proteasa nsp5 es llamada también proteasa similar a 3C (3CL^{pro}), debido a sus similitudes con la proteasa 3C de los picornavirus, o proteasa principal (M^{pro}), porque es la responsable del procesamiento proteolítico de la mayoría de los sitios en los precursores poliproteicos pp1a y pp1ab (**Figura 2b**). La liberación proteolítica temprana de nsp1 posibilita que esta proteína viral se una a la subunidad ribosomal 40S, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas involucradas en la respuesta inmune innata de la célula hospedadora (Schubert *et al.*, 2020). Las proteínas nsp2-16 componen el RTC viral: nsp2-11 proporcionan las funciones necesarias para la formación del RTC viral, tales como la modulación de las membranas intracelulares, la evasión de la respuesta inmune del hospedador y los cofactores para la replicación del genoma viral, mientras que las proteínas nsp12-16 contienen las funciones enzimáticas responsables de la síntesis y modificación del ARN genómico junto con la actividad 3'→5' exonucleolítica de corrección de la síntesis del ARN (actividad de *proofreading*) provista por nsp14 (V'kovski *et al.*, 2020).

La síntesis de los ARN virales es llevada a cabo por nsp12, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP; *RNA-dependent RNA polymerase*), y sus dos cofactores nsp7 y nsp8, teniendo esta

última proteína actividad de primasa o de adenilil transferasa 3'-terminal (ver referencias en V'kovski *et al.*, 2020). La modificación del extremo 5' del ARN genómico y de los ARNm de los coronavirus es llevada a cabo por un complejo enzimático formado por nsp10, que funciona como cofactor, nsp13, que proporciona la actividad de ARN 5'-trifosfatasa, y por nsp14 y nsp16, que realizan las funciones de N7-metiltransferasa y 2'-O-metiltransferasa, respectivamente (V'kovski *et al.*, 2020). La interacción de las proteínas no estructurales con diferentes proteínas celulares en la etapa temprana de la infección viral da origen a la biogénesis de los orgánulos de replicación viral donde se replica el ARN genómico viral y se transcribe el conjunto anidado de ARNm subgenómicos (ARNm sg) característicos de los coronavirus (Fehr & Perlman, 2015) (**Figura 2b**). Los orgánulos de replicación viral son estructuras perinucleares de doble membrana interconectadas que derivan del retículo endoplasmático y que consisten en vesículas de doble membrana, membranas contorneadas y pequeñas esférulas abiertas de doble membrana (**Figura 2b**).

La traducción de los ARNm sg da lugar a la expresión de las proteínas estructurales y accesorias (**Figura 2b**). Las proteínas estructurales S, E, y M son sintetizadas en el retículo endoplasmático como proteínas de membrana y son transportadas hacia el compartimiento intermedio R.E.-Golgi (ERGIC; *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*). La brotación del ARN genómico viral empaquetado por la proteína N hacia el interior de las membranas del ERGIC que contienen a las proteínas estructurales S, E, y M resulta en el ensamblado y la formación de los viriones maduros (**Figura 2b**). Finalmente, los viriones son secretados de la célula infectada mediante exocitosis (Fehr & Perlman, 2015; V'kovski *et al.*, 2020) (**Figura 2b**).

3. Pruebas diagnósticas para la detección de SARS-CoV-2

3.1. Metodologías moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

3.1.1. Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El método de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR; *real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) detecta el ARN genómico de SARS-CoV-2, lo cual permite determinar la presencia de este virus y/o cuantificar la carga viral en muestras biológicas de hisopado nasofaríngeo, orofaríngeo o saliva (Byrne *et al.*, 2020; D'Cruz *et al.*, 2020). Esta prueba es el *Gold Standard* para la detección de SARS-CoV-2 debido a su alta sensibilidad y especificidad, además de posibilitar el diagnóstico de infecciones activas por SARS-CoV-2 (Ravi *et al.*, 2020) (**Figura 3**).

Para ello los diferentes ensayos de RT-qPCR utilizan oligonucleótidos iniciadores (*primers*) cuyos blancos son regiones altamente conservadas de los genes virales N, S, E, orf1a/b, o la región genómica que codifica para la RdRP (ver referencias en Ravi *et al.*, 2020). En el caso de emplear el sistema de PCR *multiplex*, se utiliza más de un par de oligonucleótidos iniciadores de manera de amplificar simultáneamente diferentes regiones altamente conservadas del ARN genómico viral (D'Cruz *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020). Esto permite asegurar especificidad y reducir los falsos

negativos debido a la evolución genética de las variantes virales circulantes. Como control interno de las reacciones de RT-qPCR, se amplifica simultáneamente el ARNm de la proteína celular RNasa P, lo cual permite controlar que la extracción de ARN celular a partir de la muestra biológica ha sido exitosa y que la reacción de RT-qPCR ha sido realizada de manera correcta (D´Cruz *et al.*, 2020).

Sin embargo, la prueba de RT-qPCR tiene algunas desventajas, tales como el costo, la necesidad de contar con personal muy capacitado y experto en biología molecular y en medidas de bioseguridad, y el requisito de laboratorios centralizados con equipos y personal específico (D´Cruz *et al.*, 2020; Meza Calvache *et al.*, 2020).

La prueba de RT-qPCR puede dar resultados falsos negativos debido a varios factores, tales como una inadecuada toma de muestra, ya sea deficiente o fallida (por ejemplo, presencia en la muestra de ARN de inhibidores de la ADN polimerasa utilizada para PCR); una recolección tardía de la muestra o en etapas muy tempranas de la infección cuando los niveles de material genético viral se hallan por debajo del límite de detección del ensayo; la técnica de muestreo empleada; una inadecuada condición de transporte y/o almacenamiento de la muestra; y mutaciones en las secuencias del genoma viral que son blanco para la amplificación por PCR (Bachelet, 2020).

3.1.2. *Retrotranscripción acoplada a amplificación isotérmica mediada por bucle*

Otro ensayo que permite detectar el ARN genómico viral es el de retrotranscripción acoplada a amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP; *reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification*) (Kashir & Yaqinuddin, 2020). Para ello, la metodología LAMP utiliza cuatro o seis oligonucleótidos cebadores que se unen a seis regiones del ADN blanco, confiriéndole así una elevada especificidad a este ensayo molecular (Notomi *et al.*, 2015). Se emplea una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena para iniciar la síntesis, mientras que dos cebadores forman estructuras de bucle para facilitar y acelerar las rondas posteriores de amplificación (Notomi *et al.*, 2015). Por otra parte, los métodos de detección son sencillos (visualización de cambio colorimétrico, turbidez, o fluorescencia), lo cual simplifica la metodología al no requerir de un equipo de detección costoso (Safiabadi Tali *et al.*, 2021).

La prueba de RT-LAMP tiene la ventaja de ser significativamente rápida, lo que permite obtener resultados en menos de dos horas (con similar sensibilidad que las técnicas actuales de RT-qPCR) (Dao Thi *et al.*, 2020; Kashir & Yaqinuddin, 2020). Otra de las cualidades que presenta este método de diagnóstico es que es un método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos; por lo tanto, no requiere instrumentación sofisticada y costosa y ayuda a reducir los costos de detección de SARS-CoV-2 (Dao Thi *et al.*, 2020; Kashir & Yaqinuddin, 2020).

Para la detección del ARN viral de SARS-CoV-2 mediante RT-LAMP se emplean seis oligonucleótidos cebadores dirigidos a secuencias del orf1ab, gen S y del gen N (Dao Thi *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020). Esta técnica presenta un alto grado de especificidad y de sensibilidad lo cual permite, al igual que la técnica RT-qPCR, diagnosticar infecciones activas por SARS-CoV-2 (Dao Thi *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020) (**Figura 3**). Sin embargo, la sensibilidad del ensayo RT-LAMP es

insuficiente para detectar una infección por SARS-CoV-2 en los casos en que la carga viral sea baja (al inicio de la enfermedad o durante las etapas posteriores de la enfermedad), (Dao Thi *et al.*, 2020).

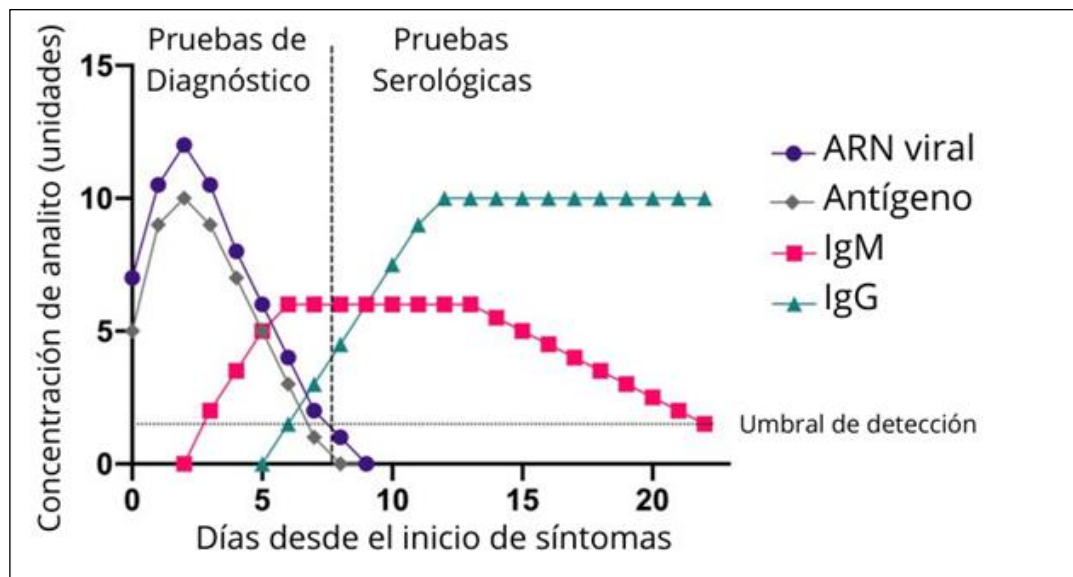


Figura 3 | Perfil del curso temporal de las concentraciones aproximadas de ARN viral, antígeno viral y anticuerpos IgM e IgG después de la aparición de los síntomas en un paciente hipotético infectado con SARS-CoV-2. Las pruebas de diagnóstico incluyen RT-qPCR y la detección de antígenos virales, lo cual permite diagnosticar una infección activa. Las pruebas serológicas son efectivas para la detección de los isotipos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2, después de aproximadamente 5 días del inicio de los síntomas.

Adaptado de Ravi *et al.* (2020).

3.1.3. Secuenciación de genomas virales de SARS-CoV-2

En la situación de la pandemia de COVID-19, los datos obtenidos a partir de la secuenciación de genomas virales circulantes de SARS-CoV-2 es aprovechada para investigar la evolución de la propagación espaciotemporal viral, determinar el surgimiento de nuevas variantes virales y medir el nivel de su persistencia temporal, así como también evaluar hipótesis sobre vías de transmisión (Chiara *et al.*, 2021; Oude Munnink *et al.*, 2021).

Por otra parte, la información sobre las secuencias genómicas puede ser utilizada para establecer cuáles son las pruebas de diagnóstico más apropiadas, y decidir cuáles son los compuestos y formulaciones vacunales con mayor potencial de ser efectivos como estrategias antivirales. En este sentido, el análisis de los genomas circulantes de SARS-CoV-2 puede complementar y servir de apoyo para las estrategias dirigidas a reducir la carga de la enfermedad COVID-19 (Safiabadi Tali *et al.*, 2021).

3.2. Pruebas diagnósticas inmunológicas rápidas basadas en la detección de antígenos virales

Los tests diagnósticos rápidos de antígeno (Ag-RDTs; *antigen-detecting rapid diagnostic tests*) permiten detectar directamente proteínas virales en especímenes de tracto respiratorio aplicando un inmunoensayo de flujo lateral (LFIA; *lateral flow immunoassay*). Para el caso de COVID-19, los Ag-RDTs se basan en la detección de la proteína N de SARS-CoV-2, ya que es la proteína viral más abundante (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/334253>).

Básicamente, la línea de prueba de la membrana de nitrocelulosa de los kits de Ag-RDTs para SARS-CoV-2 contiene el anticuerpo específico para capturar el complejo entre el antígeno viral N y el anticuerpo monoclonal (MAb) conjugado, mientras que en la línea control está fijo el anticuerpo para el MAb anti-N conjugado (Safiabadi Tali *et al.*, 2021) (**Figura 4**). A pesar de que la sensibilidad de los Ag-RDTs para SARS-CoV-2 es muy variable en comparación con la de RT-qPCR, su especificidad es elevada (>97%) (Safiabadi Tali *et al.*, 2021). En este sentido, la utilización de Ag-RDTs es adecuada para los casos en que los pacientes tienen carga viral elevada (>10⁶ copias de genoma viral/ml), lo cual corresponde generalmente a las fases presintomática (1-3 días previos al inicio de los síntomas) y sintomática temprana de la enfermedad (dentro de los primeros 5-7 días de la enfermedad) (Dinnes *et al.*, 2020) (**Figura 3**). La OMS recomienda el uso de Ag-RDTs para COVID-19 en las siguientes situaciones (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/334253>): (i) para responder a presuntos brotes de COVID-19 en lugares remotos, centros y comunidades semicerradas en los que no se tenga acceso inmediato a las pruebas moleculares de RT-qPCR; y (ii) para apoyar las investigaciones de los brotes (por ejemplo, en grupos cerrados o semicerrados, como escuelas, residencias de ancianos, cruceros, cárceles, lugares de trabajo, residencias universitarias, etc.).

Cabe mencionar que resultados positivos en los Ag-RDTs de muchos de los casos sospechosos son indicativos de un brote de COVID-19, lo cual permitiría aplicar precozmente medidas de control de la infección. Por otra parte, la OMS recomienda que, siempre que sea posible, las muestras que den positivo en los Ag-RDTs sean trasladadas a laboratorios con capacidad para realizar pruebas moleculares de RT-qPCR para confirmar los resultados.

3.3. Pruebas inmunológicas basadas en la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2

Estas pruebas son utilizadas para detectar las inmunoglobulinas totales específicas contra SARS-CoV-2 (IgG, IgM, y/o IgA) producidas como componentes de la respuesta inmune frente a la infección viral (D´Cruz *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020) (**Figura 3**). En lo que respecta a COVID-19, varios estudios han analizado la cinética de la respuesta inmune humoral por infección con SARS-CoV-2, durante la cual se generan IgA, IgM e IgG dirigidas a las proteínas N y S, así como al RBD de la subunidad S1 (Bläckberg *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2020; Wagner *et al.*, 2021). La IgA secretoria es un anticuerpo importante de las mucosas, siendo capaz de neutralizar a SARS-CoV-2 al inhibir la unión del virus a las células epiteliales del tracto respiratorio o aparato digestivo (Bläckberg *et al.*, 2021). Alrededor de los 17-19 días posteriores al inicio de los síntomas, el 100% de los individuos

infectados tiene IgG específicas de SARS-CoV-2, siendo la mediana de tiempo para seroconversión tanto para IgM como para IgG de 13 días posteriores al inicio de los síntomas (Long *et al.*, 2020) (Figura 5).

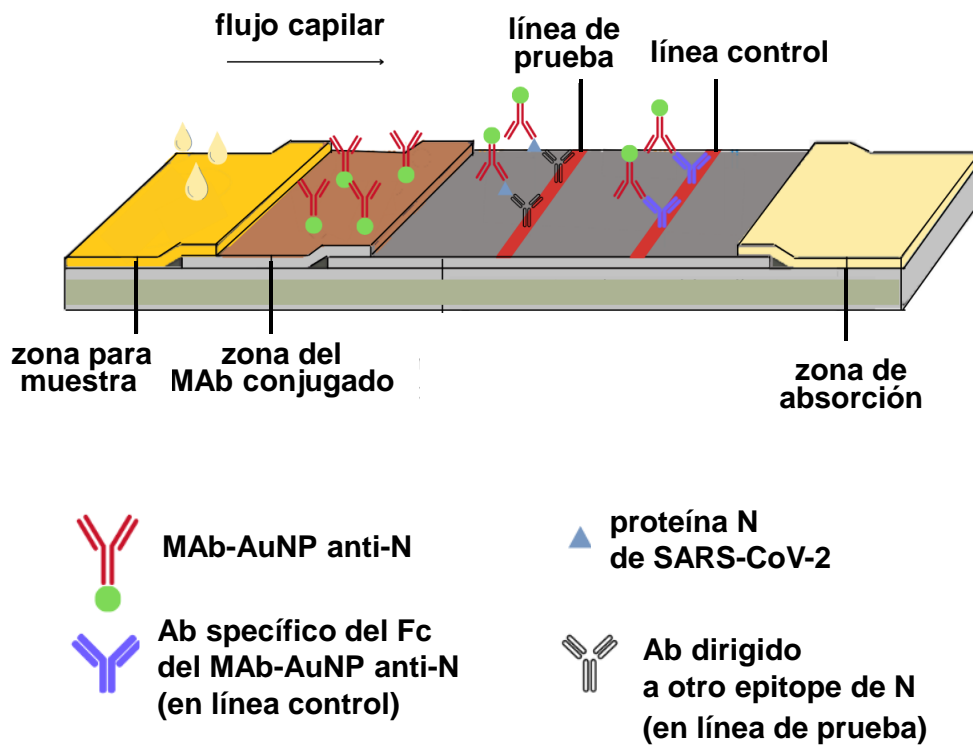


Figura 4 | Esquema de LFIA para el antígeno N de SARS-CoV-2. En este ensayo inmunológico cualitativo, si la muestra biológica contiene el antígeno N de SARS-CoV-2, éste forma un complejo con el MAb anti-N conjugado a nanopartículas de oro coloidal (MAb-AuNP anti-N), y todo el complejo migra por acción capilar hasta ser capturado por un MAb dirigido a otro epítipo de la proteína N de SARS-CoV-2 inmovilizado en la línea de prueba de la membrana de nitrocelulosa. Como los complejos antígeno-anticuerpo quedan atrapados en esta zona de la membrana, forman una línea que puede visualizarse a simple vista. Además, el exceso de los MAb-AuNP, ya sea conjugados con antígeno viral o no, continúan migrando hasta que son capturados en la línea control por un anticuerpo específico de isotipo dirigido a la región Fc del MAb-AuNP-anti-N. Esto asegura la validez de la prueba.

Es importante destacar que se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos al RBD de S1 correlacionan, al menos durante seis meses posinfección, con los anticuerpos neutralizantes (Wagner *et al.*, 2021). En este sentido, resulta esencial determinar los niveles y la duración de los anticuerpos neutralizantes ya que permite no sólo evaluar la inmunidad inducida por infección natural, sino

también documentar la respuesta inmune frente a las diferentes formulaciones vacunales autorizadas hasta el momento para COVID-19.

El perfil de la respuesta inmune frente a la infección por SARS-CoV-2 (**Figuras 3 y 5**) indica que la serología no es útil como ensayo diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad. Por otra parte, un resultado positivo en una prueba serológica no excluye la posibilidad de excreción viral (Safiabadi Tali *et al.*, 2021).

Hasta el presente, las aplicaciones de la serología para COVID-19 tienen un rol complementario a las pruebas moleculares para detectar SARS-CoV-2 en pacientes sospechados de estar enfermos de COVID-19, porque presentan síntomas persistentes o progresivos, pero que han tenido resultados negativos o indeterminados por RT-qPCR repetidamente.

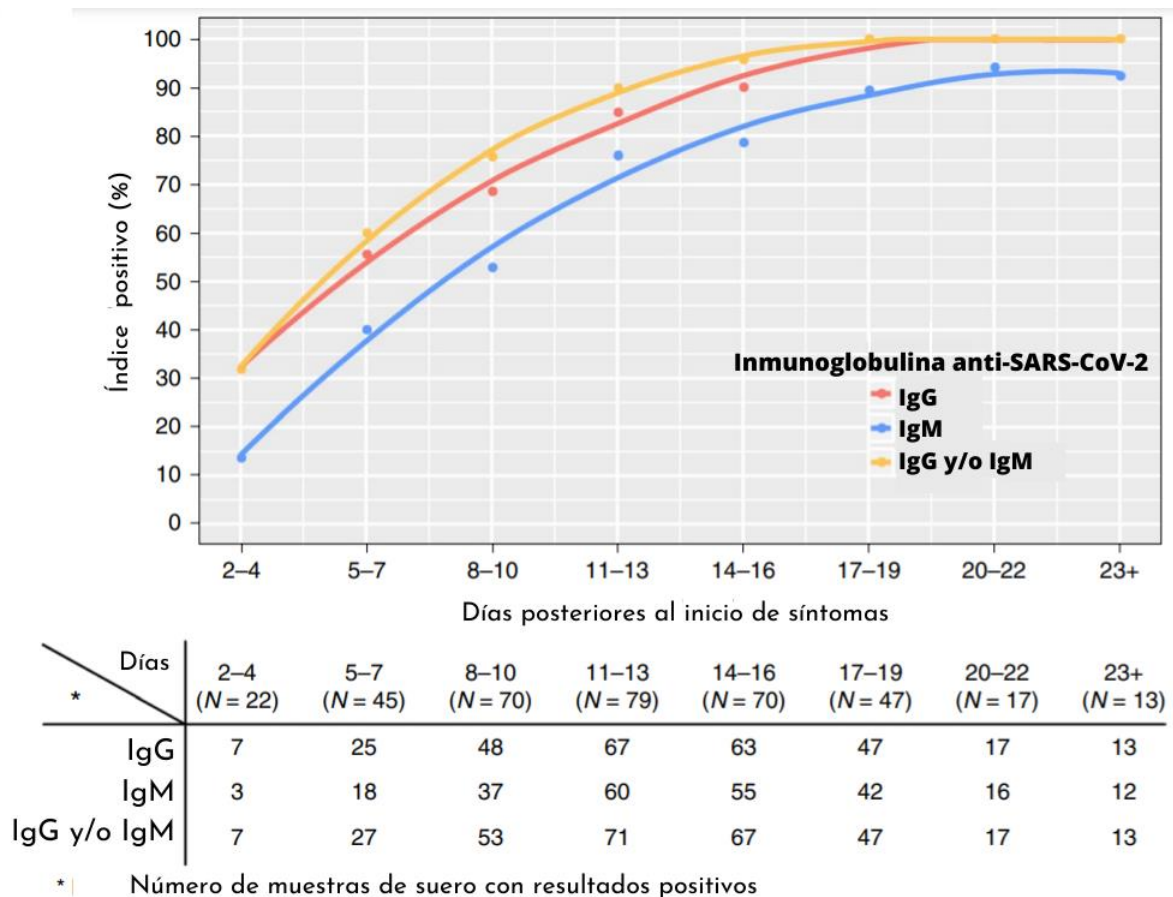


Figura 5 | Perfil de respuesta de anticuerpos contra SARS-CoV-2. Gráfico del índice positivo de anticuerpos IgG e IgM específicos de SARS-CoV-2 en función de los días transcurridos desde la aparición de los síntomas. Los datos corresponden al análisis mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia de 363 muestras de suero provenientes de 262 pacientes.

Adaptado de Long *et al.* (2020).

3.3.1. *Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas*

El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA; *enzyme-linked immunosorbent assay*) permite detectar, a partir de muestras de suero o plasma, anticuerpos dirigidos a las proteínas N, o S, o al RBD de la subunidad S1 de SARS-CoV-2. En el caso de que la muestra biológica contenga anticuerpos específicos de SARS-CoV-2, éstos se unirán a los antígenos inmovilizados en los pocillos de la placa ELISA. Luego de las etapas de lavado, se agrega la solución con el anticuerpo secundario que es específico del isotipo a detectar (esto es, anti-IgG, anti-IgM, o anti-IgA humana). Este anticuerpo secundario (o conjugado) está unido a un fluoróforo (detección de señal fluorescente), o está conjugado a una enzima que genera una señal colorimétrica o quimioluminiscente al agregar el sustrato correspondiente.

Esta prueba constituye una herramienta complementaria en el diagnóstico de la enfermedad, debido a su buena sensibilidad para la detección de IgA y su excelente sensibilidad para la detección de anticuerpos IgG de muestras recolectadas ≥ 4 días después del diagnóstico de COVID-19 por RT-qPCR (Beavis *et al.*, 2020) (**Figura 3**).

Un aspecto crítico en la puesta a punto de estos ensayos serológicos para COVID-19 es que no haya reactividad cruzada; en particular, esto requiere verificar que las proteínas recombinantes utilizadas como moléculas de captura en el ELISA no unan anticuerpos dirigidos a los otros coronavirus que comúnmente infectan a humanos (Beavis *et al.*, 2020).

3.3.2. *Inmunoensayos quimioluminiscentes*

Los inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA; *chemiluminescence immunoassay*) y de electroquimioluminiscencia (ECLIA; *electrochemiluminescence immunoassay*) se utilizan bajo plataformas automatizadas y se caracterizan por su elevada sensibilidad en comparación con la de otras pruebas serológicas (Dove, 2021; Ravi *et al.*, 2020; Safiabadi Tali *et al.*, 2021). En particular, el desarrollo reciente de inmunoensayos automatizados de alto rendimiento basados en electroquimioluminiscencia, como es el caso del sistema Elecsys-S de Roche Diagnostics, que determinan de manera cuantitativa anticuerpos dirigidos al RBD de la subunidad S1 de SARS-CoV-2, podrían ofrecer la alternativa de determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes sin tener que recurrir a los ensayos de neutralización viral para los cuales se requiere trabajar bajo condiciones de bioseguridad (Dove, 2021; Resman Rus *et al.*, 2021) (**Figura 6**).

3.3.3. *Inmunoensayos de flujo lateral para la detección de anticuerpos dirigidos a proteínas de SARS-CoV-2*

Como ya se explicó en el punto 3.2. de la Introducción, las pruebas de LFAs representan un elemento básico en el campo del diagnóstico rápido para los servicios de emergencia donde se requiere una respuesta inmediata (Ching, 2015; Safiabadi Tali *et al.*, 2021). En efecto, los LFAs pueden ser utilizados como RDTs o pruebas de laboratorio en el lugar de atención al paciente (POCT; *point-of-care testing*). Por otra parte, además de obtener los resultados a los pocos minutos

de la aplicación de la muestra, los ensayos rápidos LFIA ofrecen las ventajas de ser de bajo costo y de no requerir ni del entrenamiento del personal de salud ni de equipo especializado (Ching; 2015).

La especificidad y sensibilidad de los diferentes LFIA se basan en el empleo de MAb con elevada afinidad y especificidad por el analito de interés (Ching, 2015). Para COVID-19, los antígenos virales que sirven para captura de los anticuerpos a detectar en los kits de LFIA son las proteínas N, S (RBD de S1) o ambas (Lisboa Bastos *et al.*, 2020). La sensibilidad de esta prueba es mayor al menos tres semanas después de la aparición de los síntomas en comparación con la primera semana (Lisboa Bastos *et al.*; 2020). Cabe enfatizar que los LFIA sólo indican la presencia de IgG/IgM anti-SARS-CoV-2 en la muestra, pero que no deben usarse como el único criterio para el diagnóstico de COVID-19. Si los síntomas persisten a pesar de que el resultado de la prueba rápida es negativo, es necesario realizar ensayos adicionales como RT-PCR o ELISA (Lisboa Bastos *et al.*, 2020).

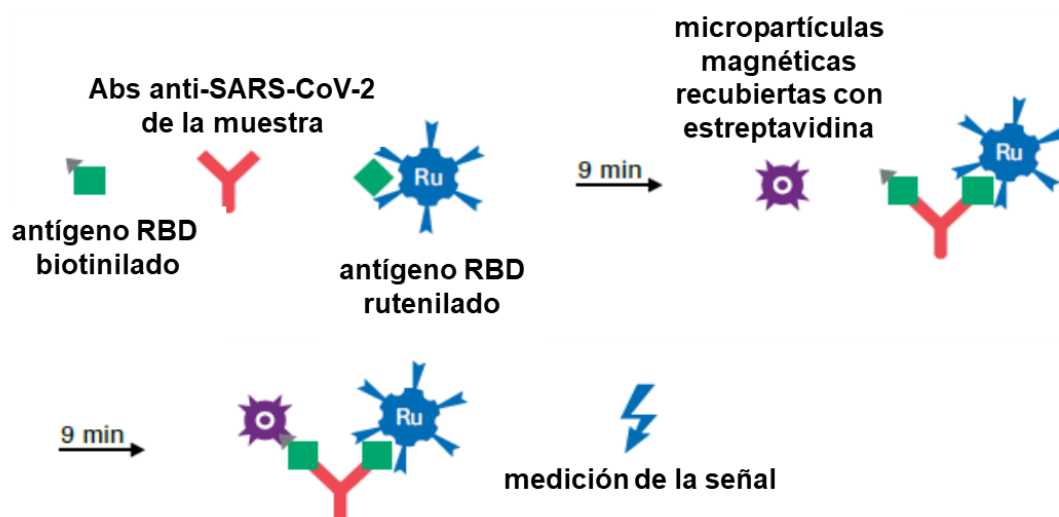


Figura 6 | Esquema de un ensayo para detección de anticuerpos anti-S de SARS-CoV-2 basado en electroquimioluminiscencia. La muestra biológica se incuba con una solución conteniendo una mezcla de antígenos RBD biotinilado y rutenilados. Los complejos inmunes tipo sándwich de doble antígeno se forman en presencia de los anticuerpos correspondientes. Después de la adición de micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, los complejos inmunes se unen a la fase sólida mediante la interacción de la biotina con la estreptavidina. La solución resultante se transfiere a la celda de medición, donde las micropartículas son capturadas magnéticamente sobre la superficie de un electrodo. Por último, se aplica voltaje para inducir la electroquimioluminiscencia, la cual se mide con un fotomultiplicador. La señal es proporcional al nivel de anticuerpos presentes en la muestra.

OBJETIVOS

El desarrollo de pruebas de diagnóstico para un nuevo patógeno como es el caso de SARS-CoV-2, se basó principalmente en los siguientes aspectos: ser capaces de poder medir cargas virales bajas para la detección temprana de la infección; utilizar metodologías que sean específicas para las cepas virales; y utilizar plataformas que permitan que los resultados del ensayo se obtengan de manera rápida.

Desde el comienzo de la pandemia de COVID-19, el desarrollo de las pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 fue evolucionando. Es por ello que es importante tener una comprensión clara de la naturaleza de estas pruebas y una interpretación de los hallazgos hasta el momento.

Teniendo en cuenta estos conceptos, nos propusimos realizar un trabajo en el cual se analizaran y discutieran las características y propiedades de los diferentes tipos de tests y estrategias diagnósticas para COVID-19 disponibles en el mercado.

Como objetivo general de la investigación, se planteó evaluar el rendimiento de las pruebas existentes para SARS-CoV-2 y calificar cuál es la mejor opción diagnóstica en personas sintomáticas y asintomáticas, en base al análisis de los estudios publicados entre julio de 2020 y diciembre de 2021.

Los objetivos específicos planteados fueron:

1. Evaluar y comparar los parámetros biológicos que se utilizan en cada test para diagnosticar la infección por SARS-CoV-2.
2. Analizar y comparar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas existentes para COVID-19 en personas sintomáticas y asintomáticas.
3. Evaluar si la realización de varias pruebas simultáneas puede superar la sensibilidad limitada de una prueba individual.
4. Analizar la variabilidad de los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas de acuerdo con el momento de la recolección de la muestra.
5. Evaluar el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de las pruebas.

MÉTODOS

1. Diseño

El enfoque metodológico de esta investigación surgió de observar que la pandemia de COVID-19 demandó el desarrollo de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 que pudieran ser implementadas inmediatamente. Por lo tanto, resulta importante tener una comprensión clara de la naturaleza de estas pruebas y cómo se evalúa e interpreta el desempeño de las mismas.

Teniendo en cuenta estos conceptos, se realizó una revisión sistemática de las publicaciones científicas sobre diagnóstico de COVID-19, analizando las características y propiedades de los diferentes tipos de tests y estrategias diagnósticas para detectar SARS-CoV-2 o los anticuerpos dirigidos a proteínas virales. Cabe destacar que, para obtener un mayor número de resultados, todas las búsquedas se hicieron en inglés.

2. Búsquedas bibliográficas y fuentes de consulta para la investigación

Para realizar una búsqueda bibliográfica óptima, los datos e información sobre las metodologías y fundamentos de los ensayos para el diagnóstico de COVID-19 se recolectaron en una primera etapa en las bases de datos MEDLINE PubMed y Cochrane Library utilizando los términos y palabras claves SARS-CoV-2; COVID-19; *antigen detection assay*; *SARS-CoV-2 detection*; *SARS-CoV-2 infection*; *RT-qPCR*; *ELISA*; *tests for SARS-CoV-2 detection*.

Por otra parte, PubMed organizó la sección especial *PubMed Clinical Queries* para COVID-19/SARS-CoV-2. A modo informativo, la búsqueda de “*COVID-19: Diagnosis*” realizada el 6 de mayo de 2022 en esta sección de PubMed dio 59.640 resultados.

En las etapas posteriores, se analizaron las referencias bibliográficas de los artículos seleccionados de las búsquedas en MEDLINE PubMed y Cochrane Library con el fin de obtener otros estudios que pudieran ser incluidos para este Trabajo de Tesina.

Para profundizar la revisión bibliográfica fue de gran utilidad la información actualizada diariamente provista por la OMS; el Ministerio de Salud de la Nación; la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (*U.S. Food and Drug Administration*; FDA).

3. Selección de los trabajos científicos

Se incluyeron estudios de cualquier diseño que evaluaran el desempeño de pruebas de diagnóstico para COVID-19, discriminando primero en base al resumen (*abstract*) de cada artículo, y evaluando luego si el enfoque experimental y los resultados presentados en cada estudio eran relevantes y apropiados para este Trabajo de Tesina.

4. Criterios aplicados para la recolección de datos

4.1. Diseño de los ensayos

Para esta investigación, se seleccionaron trabajos científicos que evaluaran las diferentes pruebas de diagnóstico para COVID-19 y que incluyeran estudios de cohortes, casos y controles, y transversales.

4.2. Valoración de sesgos en los estudios

No se tuvo en cuenta durante la búsqueda de los artículos científicos que los resultados publicados fueran positivos o negativos de manera de evitar “sesgos de publicación”.

5. Parámetros y variables evaluados en los estudios seleccionados

El desarrollo de pruebas diagnósticas para un nuevo patógeno, como es el caso de SARS-CoV-2, enfrentó varios desafíos: (i) tener la capacidad de poder medir cargas virales bajas para la detección temprana de la infección; (ii) garantizar la ausencia de reactividad cruzada con otras cepas virales o con otros virus respiratorios; (iii) utilizar plataformas de diagnóstico que sean sencillas, rápidas y rentables.

En base a lo expuesto, se analizaron los siguientes parámetros y variables en los estudios incluidos en este Trabajo de Tesina:

- parámetros biológicos, tipo de reacciones químicas y plataformas de detección utilizados en cada prueba para diagnosticar la infección por SARS-CoV-2;
- la variabilidad de los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas de acuerdo con el momento de la recolección de la muestra;
- el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de las pruebas;
- diferencias, ventajas y desventajas entre los diferentes tests de detección de SARS-CoV-2

RESULTADOS

1. Análisis de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2 basadas en RT-qPCR

1.1. Evaluación de la sensibilidad analítica y el desempeño clínico de los kits de detección molecular de SARS-CoV-2 utilizados en Argentina

Las pruebas de laboratorio para confirmación de COVID-19 recomendadas por la OMS consisten en la detección del ARN genómico de SARS-CoV-2 mediante estrategias moleculares de amplificación de secuencias nucleotídicas, tal como la reacción de RT-qPCR (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>). El diagnóstico óptimo requiere la detección de al menos dos genes independientes del genoma de SARS-CoV-2. Sin embargo, en áreas con transmisión generalizada es aceptable el diagnóstico molecular que tenga como blanco detectar un único gen viral (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>).

El Servicio de Virosis Respiratorias del Departamento de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán de la Argentina adoptó rápidamente la técnica de referencia desarrollada por el Instituto de Virología Charité (Alemania) y recomendada por la OMS, que detecta los genes *E* y *RdRp* de SARS-CoV-2 y es el que permitió diagnosticar los primeros casos de COVID-19 (Corman *et al.*, 2020). Sin embargo, frente a la situación generada por la pandemia de contar de manera urgente con ensayos de diagnóstico específicos y sensibles para SARS-CoV-2, se introdujeron en el mercado numerosos kits comerciales que eran hasta ese momento desconocidos en el mercado local. Por otra parte, cabe destacar que el gobierno argentino impulsó el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico para COVID-19 por parte del sistema científico público y privado.

Es por ello que seleccionamos el trabajo de Fellner *et al.* (2021) en el cual participaron investigadores de diferentes servicios del Instituto de Virología y de la Unidad de Evaluación de Métodos de Diagnóstico y Estadística Aplicada del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS-Malbrán. En efecto, en este estudio se evaluaron el desempeño analítico y clínico de doce ensayos moleculares (nueve pruebas de RT-qPCR y tres de RT-LAMP) para la detección SARS-CoV-2 utilizados en Argentina, comparándolos con la prueba de RT-qPCR recomendada por la OMS considerada como método estándar de referencia. Asimismo, los investigadores se propusieron, como objetivo secundario, evaluar la concordancia entre los diferentes ensayos moleculares analizados con la prueba recomendada por la OMS.

Como primer paso para este estudio se preparó, a partir de ARN genómico de SARS-CoV-2 extraído de células Vero infectadas con un aislamiento viral, un estándar secundario de ARN al que denominaron “SARS-CoV-2 Secondary Standard, RNA 002/20 batch, *E*, *RdRp* and *N* genes” (SARS-CoV-2 SStd), con el cual se generaron las curvas de calibración necesarias para estimar para cada kit comercial evaluado el límite de detección 95% (LoD_{95%}) de los genes virales *E*, *RdRp*, y *N*. Por otra parte, se prepararon 32 grupos de muestras artificiales que fueran positivas para SARS-CoV-2 agregando diferentes cantidades de SARS-CoV-2 SStd a mezclas de ARN extraídos de muestras

clínicas clasificadas como negativas para SARS-CoV-2 al ser analizadas mediante la prueba de RT-qPCR recomendada por la OMS. Estas muestras artificiales incluyeron concentraciones de 10^5 a 5 copias/ μ l de ARN genómico viral. Asimismo, se generaron 30 grupos de muestras artificiales que fueran negativas para SARS-CoV-2 agregando ARNs extraídos de muestras clínicas previamente clasificadas como negativas para SARS-CoV-2 utilizando el ensayo de RT-qPCR recomendado por la OMS.

Los kits cuyos desempeños fueron evaluados en el trabajo de Fellner *et al.* (2021) fueron:

Kits que aplican RT-qPCR para la detección del genoma de SARS-CoV-2:

- (a) RealStarSARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Hamburgo, Alemania): consiste en una reacción tipo PCR multiplex para detectar los genes *E* y *S*.
- (b) Detection kit for 2019 Novel coronavirus (2019-nCoV) RNA (Da An Gene Ltd, Guangzhou, China): detecta a través de una reacción PCR multiplex.
- (c) AccuPower SARS-CoV-2 Realtime RT PCR kit (Bioneer Corporation, Daejeon, Corea): consiste en dos reacciones tipo PCR multiplex para detectar de manera independiente los genes *E* y *RdRp* incluyendo sendos controles internos.
- (d) VIASURE SARS CoV-2 Real time PCR Detection kit (CerTest Biotec SL, Zaragoza, España): se basa en PCR multiplex para el gen *N* y el *ORF1ab*.
- (e) GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp kit (Osang Healthcare Co., Ltd., Gyeonggi-do, Corea): se basa en la detección simultánea de los genes virales *E*, *N* y *RdRp* mediante PCR multiplex.
- (f) Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) detection kit v2 (Anatolia Geneworks, Turquía): los genes virales *E* y *ORF1ab* son los blancos a ser detectados en el ensayo de PCR multiplex.
- (g) ARGENE SARS-COV-2 R-GENE (Biomérieux, Marcy Letoile, Francia): involucra dos ensayos de PCR multiplex en los que se detectan simultáneamente en una reacción los genes *N* y *RdRp*, y en otra reacción, el gen viral *E* junto con un control de un gen celular
- (h) CoronARDx SARS-CoV-2 RT-PCR (Argenomics ZevBiotech, Buenos Aires, Argentina): se basa en tres ensayos de PCR para detectar de manera separada los genes virales *E* y *RdRp*, y un ARN control.
- (i) WGene SARS-CoV-2 RT (Wiener lab, Rosario, Argentina): consiste en una única reacción PCR multiplex para detectar los genes *N* y *RdRp*.

Kits que aplican RT-LAMP para la detección del genoma de SARS-CoV-2:

- (a) iAMP COVID-19 Detection Kit (ATILA Biosystems, China): utiliza amplificación isotérmica en tiempo real para detectar por fluorescencia en una única reacción los genes *N* y *ORF1ab*.
- (b) Covid-19 NEOKIT Tecnoami (NEOKIT SAS, Argentina): se basa en la amplificación isotérmica con detección colorimétrica de las regiones genómicas *E*, *N*, *ORF1Aa*, y *ORF1ab* de SARS-CoV-2.
- (c) ELA CHEMSTRIP COVID-19 (Chemtest Argentina SA, Buenos Aires, Argentina): amplifica específicamente una región del gen viral *E*. Como control del procedimiento de purificación del ARN a partir de la muestra biológica, se incluye otra reacción de amplificación isotérmica del gen para la RNasaP de humanos. Este kit, a diferencia de los demás ensayos de RT-LAMP, presenta

una tecnología exclusiva basada en la detección inmunocromatográfica de los productos de la reacción (CHEMSTRIP®).

Los datos obtenidos mostraron que los kits comerciales de Altona y Da An Gene exhiben el LoD más bajo para los genes *E* (LoD 1,1-6,0 copias por reacción) y *RdRp* (LoD 2,0-12,0 copias por reacción), resultando, por lo tanto, similares al método recomendado por la OMS (LoD para gen *E*: 1,3-7,0 copias por reacción; LoD para gen *RdRp*: 1,1-3,0 copias por reacción). Los ensayos de Da An Gene (LoD 2,0-14,0 copias por reacción), VIASURE CerTest (LoD 4,0-22,0 copias por reacción) y GeneFinder (LoD 7,0-42,0 copias por reacción) mostraron el LoD más bajo para el gen *N*, equivalente al de la prueba diagnóstica de referencia (LoD para gen *N*: 10,0-22,0 copias por reacción). En el caso de los ensayos RT-LAMP, se observaron diferencias importantes en los LoD que son inherentes a la variabilidad de la metodología LAMP y son independientes de los genes virales que son blanco de la amplificación.

Por otra parte, el desempeño clínico de los ensayos moleculares de RT-qPCR mostró una especificidad del 100% para casi todos los ensayos y alta sensibilidad, si bien se observaron variaciones dependientes del gen viral detectado. En este sentido, la mayor sensibilidad clínica se alcanzó con los genes *E* y *N* utilizando los kits VIASURE CerTest (gen *N*: 100%), GeneFinder (gen *E*: 96,8%; gen *N*: 100%), ARGENE (gen *N*: 100%) y CoronAR (gen *E*: 93,6%, mientras que el gen *RdRp* en casi todos los kits o el gen *S*, en el caso particular del kit Altona, contribuyeron a aumentar la especificidad clínica. En cambio, los ensayos RT-LAMP evaluados exhibieron un desempeño diagnóstico variable: los kits iAMP COVID-19 y NEOKIT tuvieron una alta especificidad clínica (100 %), mientras que el kit CHEMSTRIP mostró una alta sensibilidad clínica (100 %).

Este trabajo también destaca la importancia de incluir un control interno en las pruebas moleculares, ya que permite detectar la presencia de inhibidores de reacción y analizar la calidad y cantidad de la muestra clínica. En efecto, todas las metodologías de RT-qPCR evaluadas incluyen un control interno (endógeno o exógeno), ya sea bajo el formato de reacción multiplex (Altona, Da An Gene, GeneFinder, VIASURE CerTest, Anatolia, ARGENE y Wiener lab) o como reacción individual (CoronAr). Si bien en los ensayos LAMP con detección colorimétrica no es posible realizar una reacción multiplex y se debe realizar otra reacción en paralelo, como es el caso del kit ELA-CHEMSTRIP, los datos de Fellner *et al.* (2021) mostraron que la reacción del control interno de este kit falló en el 30% de las muestras analizadas. En el caso del ensayo Covid-19 NEOKIT Tecnoami, éste carece de un control interno.

Finalmente, se debe tener en cuenta que la mayoría de los ensayos moleculares aplicados al diagnóstico de COVID-19 fueron desarrollados utilizando como referencia la secuencia genómica de la cepa Wuhan-1 (GenBank: NC_045512.2), la cual era la única cepa identificada cuando Fellner y colaboradores realizaron este estudio. Sin embargo, actualmente resulta imprescindible evaluar cómo las mutaciones presentes en las nuevas variantes circulantes de SARS-CoV-2 afectan el grado de unión de los oligonucleótidos cebadores y sondas utilizados para la detección del genoma viral, ya que esto tiene un impacto directo sobre el desempeño de los ensayos de diagnóstico molecular.

1.2. Análisis del impacto de la diversidad genética de las variantes de SARS-CoV-2 circulantes en América del Sur sobre el desempeño de los ensayos moleculares

Como se explicó anteriormente, la sensibilidad y especificidad de los ensayos de diagnóstico molecular dependen de las regiones del genoma viral seleccionadas como blanco para las reacciones, así como de las combinaciones de cebadores y sondas empleadas. En este sentido, la secuenciación de los genomas de los virus circulantes ha permitido optimizar las condiciones para las reacciones de RT-PCR.

En marzo de 2022, ya se hallaban disponibles en GenBank más de 4 millones de secuencias genómicas de SARS-CoV-2. De hecho, en los primeros seis meses de la pandemia de COVID-19 ya se contaba con más de 300 secuencias de genomas virales completos provenientes de Brasil, Chile, Ecuador, Colombia, Uruguay, Perú, y Argentina (Ramírez *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta esa fecha no había estudios que abordaran cómo la diversidad genómica de SARS-CoV-2 afecta el diagnóstico molecular para COVID-19. Es por ello que uno de los trabajos seleccionados para esta Tesina fue el estudio *in silico* de Ramírez *et al.* (2020) en el cual se analizó cómo la diversidad genómica de los aislamientos sudamericanos de SARS-CoV-2 afecta el rendimiento de las pruebas de RT-qPCR.

Como se mencionó anteriormente, la detección molecular de SARS-CoV-2 se basa principalmente en tres regiones del genoma viral que exhiben secuencias altamente conservadas: (1) el gen *RdRp* del ORF1ab, (2) el gen *E*, y (3) el gen *N*. Mientras los genes *RdRp* y *E* de SARS-CoV-2 muestran una sensibilidad analítica para detección elevada (límite de detección de 3,6 y 3,9 copias por reacción utilizando ARN transcrito *in vitro* como molde), el gen *N* muestra una sensibilidad analítica mucho menor (8,3 copias por reacción) (Corman *et al.*, 2020; Udugama *et al.*, 2020).

Los objetivos del estudio de Ramírez *et al.* (2020) fueron comparar la capacidad de todos los conjuntos de cebadores-sondas disponibles para detectar variantes de SARS-CoV-2 basándose en las secuencias disponibles de virus circulantes en Sudamérica, y evaluar si esos datos podrían ser utilizados para predecir el desempeño de los ensayos de RT-qPCR. Para ello, el grupo de investigadores realizó primeramente una revisión de los diferentes esquemas aplicados para detectar SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, focalizándose en los conjuntos de cebadores y de sondas cuyos blancos son los genes *E*, *N* y *RdRp*. Este análisis identificó 16 conjuntos de oligonucleótidos (cebadores+sondas). Asimismo, se obtuvieron las secuencias genómicas de las variantes de SARS-CoV-2 circulantes en países de América del Sur disponibles en la base de datos EpiCoV™ de GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*; <https://www.gisaid.org/>) hasta el 15 de junio de 2020. Cabe destacar que EpiCoV™ es el repositorio de datos genómicos más completo sobre los coronavirus que han causado la pandemia de COVID-19. Esta búsqueda en GISAID, luego de aplicar el algoritmo para eliminar secuencias redundantes, arrojó un total de 373 secuencias genómicas diferentes de los siguientes siete países de América del Sur: Argentina (n = 29), Brasil (n = 95), Colombia (n = 88), Ecuador (n = 4), Perú (n = 2), y Uruguay (n = 11).

El análisis de los datos obtenidos en este estudio mostró que los genes *RdRp* y *N* se agrupan en tres haplotipos principales, exhiben una diversidad significativa, la cual es una característica

compartida con otros miembros de la familia *Coronaviridae* (**Figura 7**), y presentan un número elevado de polimorfismos de nucleótido único (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*) en las regiones seleccionadas para la hibridación de los diferentes conjuntos de cebadores y sondas (**Figura 7**). En cambio, para la mayoría de los genomas de SARS-CoV-2 circulantes en Sudamérica, el gen *E* se agrupa dentro de un único haplotipo y no presenta SNPs en las regiones que son blanco para la hibridación de los diferentes conjuntos de cebadores y sondas (**Figura 7**).

En conclusión, los resultados del estudio realizado por Ramírez y colaboradores (Ramírez *et al.*, 2020) indican que el gen *E* es el blanco molecular más conservado y confiable para el diagnóstico molecular de COVID-19 en Sudamérica en el caso de implementar la detección del genoma de SARS-CoV-2 en muestras biológicas mediante la amplificación de un único gen viral.

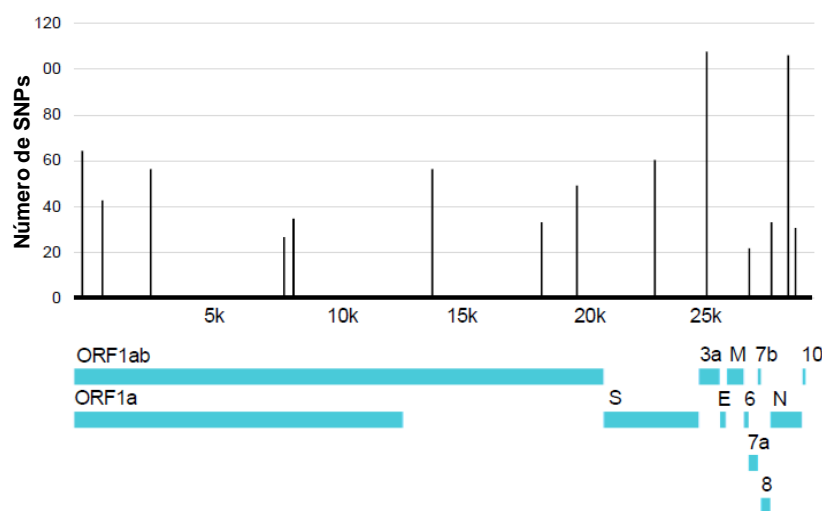


Figura 7 | Diversidad nucleotídica de los genomas de SARS-CoV-2 de países de América del Sur. Gráfico en el cual se halla representada la diversidad nucleotídica por posición genómica de SARS-CoV-2 determinada a partir del alineamiento de las secuencias de genomas completos disponibles en la base de datos GISAID hasta el 15 de junio de 2020. La secuencia del genoma completo de la cepa Wuhan-Hu-1 de SARS-CoV-2 (NCBI: NC_045512.2) se incluyó como secuencia de referencia para el análisis de la diversidad nucleotídica.

Adaptado de Ramírez *et al.* (2020).

1.3. Falsos negativos y su incidencia en los ensayos iniciales de RT-PCR para COVID-19

Un aspecto para tener en cuenta en las pruebas diagnósticas moleculares son los falsos negativos, los cuales se definen como los casos sospechosos de infección por SARS-CoV-2 que dan inicialmente un resultado negativo de RT-PCR pero son positivos en una prueba posterior.

Los casos falsos negativos tienen un impacto directo sobre las medidas sanitarias en lo que respecta al aislamiento de los individuos infectados y al riesgo de transmisión de COVID-19. Para

analizar este aspecto de los ensayos de diagnóstico molecular para COVID-19, seleccionamos el trabajo de Arévalo-Rodríguez *et al.* (2020), en el que se evaluó con un enfoque riguroso la proporción de resultados falsos negativos para SARS-CoV-2 en las pruebas iniciales de RT-PCR mediante una revisión sistemática y metaanálisis de la literatura hasta julio 2020 de acuerdo con la declaración PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) para los estudios de evaluación de la precisión diagnóstica (PRISMA-DTA). Cabe destacar que en este trabajo participaron dos médicos investigadores de instituciones de la Argentina, el Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS-CONICET) y la Fundación Huésped.

Para este trabajo de revisión sistemática las búsquedas se realizaron en MEDLINE; EMBASE; LILACS; la base de datos de la OMS de publicaciones sobre COVID-19 (disponible en: <https://www.who.int/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov>); el mapa sistemático vivo de la evidencia sobre COVID-19 del Centro EPPI (*Evidence for Policy and Practice Information and Co-ordinating Centre*); el Proyecto de Acceso Abierto de Evidencia Viva sobre COVID-19, desarrollado por el Instituto de Medicina Social y Preventiva (ISPM) de la Universidad de Berna (disponible en: <https://ispmbern.github.io/covid-19/>); y el repositorio centralizado LOVE (*Living Overview of Evidence*) desarrollado por Epistemonikos (disponible en: <https://app.iloveevidence.com/topics>).

Para seleccionar los estudios elegibles, dos de tres revisores examinaron de manera independiente los resultados de las búsquedas basándose en los títulos y los resúmenes de los trabajos. Seguidamente, obtuvieron una copia del texto completo de cada estudio y dos de tres revisores confirmaron la admisibilidad de los estudios de acuerdo con los criterios de selección. Para la extracción de datos, un revisor extrajo datos cualitativos y cuantitativos de los estudios elegibles. Un revisor adicional verificó toda la información extraída para verificar su exactitud (verificación no independiente de la extracción de datos). Se contactó incluso a los autores de aquellos estudios seleccionados para que proveyeran información faltante que resultaba crucial para la revisión sistemática y el metaanálisis.

Se incluyeron 34 estudios observacionales (que incluían 12.057 pacientes confirmados de COVID-19), realizados entre el 1 de enero y el 15 de abril de 2020, que usaron inicialmente RT-PCR para la detección del ARN genómico de SARS-CoV-2 en pacientes bajo sospecha de infección por criterios clínicos o epidemiológicos. La mayoría de estos estudios fueron llevados a cabo en China, pero diez fueron realizados en otros países (España; Italia; Países Bajos; Suiza; Turquía; tres en EE. UU.; y dos en Singapur). Se extrajeron los datos de todos los estudios incluidos para calcular la proporción de resultados falsos negativos, siendo el numerador (casos falsos negativos) el número de casos considerados inicialmente negativos en un ensayo de RT-PCR y el denominador, el número total de casos de infecciones por SARS-CoV-2 detectados en una reacción de RT-PCR adicional, ya sea usando el mismo u otro tipo de ensayo. El riesgo de sesgo se evaluó mediante la herramienta QUADAS-2 (*Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies*) y se calculó la proporción de falsos negativos con el IC 95% correspondiente utilizando un modelo de regresión logística multinivel de efectos mixtos utilizando el software estadístico para la ciencia de datos Stata 16. La calidad de la

evidencia sobre los casos de falsos negativos se calificó utilizando el sistema GRADE para pruebas y estrategias (Schünemann *et al.*, 2020a; 2020b). Se incluyeron todos los tipos de kits de RT-PCR, independientemente de la marca y fabricante, del método de extracción de ARN utilizado, del número de ensayos de genes virales diana evaluados y del valor umbral del ciclo para considerar positividad.

La proporción de resultados falsos negativos fue calculada con el IC del 95%, mediante un modelo de regresión logística multinivel de efectos mixtos. La certeza de la evidencia sobre casos falsos negativos se calificó siguiendo el enfoque GRADE para pruebas y estrategias. Utilizando una prevalencia del 50%, encontraron que de 1 a 27 casos serían mal diagnosticados y no recibirían, por lo tanto, un manejo clínico adecuado de la enfermedad COVID-19.

El trabajo de Arévalo-Rodríguez *et al.* (2020) demuestra que existe una heterogeneidad importante en los datos que no puede ser totalmente explicada mediante el análisis estadístico realizado. En efecto, los estudios incluidos comunicaron parcialmente u omitieron información que es fuente de heterogeneidad, tales como tipo de espécimen biológico, el tiempo desde el inicio de los síntomas (como criterio aproximado de carga viral), y el nombre del kit comercial de RT-PCR utilizado. Los autores pudieron reducir el nivel de variabilidad solamente al comparar los estudios llevados a cabo en China con los realizados en otros países (EE. UU.; Singapur; y Países Bajos). La información provista por los estudios seleccionados de RT-PCR realizados en China refleja la poca experiencia en el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 con la que se contaba en el año 2020 al comienzo de la pandemia de COVID-19 y los datos reportados provienen de los primeros kits desarrollados para la detección del genoma viral que no se hallaban aún estandarizados.

En resumen, este trabajo de revisión sistemática y de metaanálisis enfatiza la necesidad de realizar pruebas repetidas en pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2, ya sea debido a razones clínicas o epidemiológicas, dado que hasta el 54% de los pacientes con COVID-19 pueden tener un resultado inicial de RT-PCR negativo (certeza de la evidencia: muy baja).

2. Análisis de pruebas inmunológicas desarrolladas para el diagnóstico de COVID-19

2.1. Precisión diagnóstica de las pruebas serológicas para la determinación de la infección por SARS-CoV-2

Los ensayos serológicos tienen básicamente cuatro aplicaciones: (i) para el diagnóstico de casos sospechosos de COVID-19 en pacientes que presentan síntomas, pero en los que no se ha detectado genoma viral en las pruebas moleculares; (ii) para evaluar la respuesta inmune en pacientes con enfermedad severa; (iii) para determinar si un individuo ha generado una respuesta inmune como consecuencia de la infección con SARS-CoV-2 o de la vacunación; y (iv) para la vigilancia de seroprevalencia en la población en el marco de la gestión de la salud pública.

Las diferentes pruebas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos dirigidos a un patógeno varían en lo que respecta a su sensibilidad y especificidad de acuerdo con el isotipo de Ig a detectar, las características de la proteína utilizada como antígeno de captura, y la metodología aplicada para la detección del complejo antígeno-anticuerpo.

Es por ello por lo que seleccionamos, a partir de las publicaciones sobre COVID-19 de la Biblioteca Cochrane, el trabajo de Deeks *et al.* (2020), ya que se trata de un estudio de revisión amplio y abarcativo en el que se analiza la precisión diagnóstica de las pruebas de anticuerpos tanto para determinar si una persona está cursando o cursó previamente una infección por SARS-CoV-2 como para su aplicación en la vigilancia epidemiológica. La búsqueda y elegibilidad de los resultados de esta revisión sistemática y metaanálisis se realizaron de acuerdo con los criterios establecidos por la declaración PRISMA para la precisión de los ensayos diagnósticos (PRISMA *Diagnostic Test Accuracy*; PRISMA-DTA) (McInnes *et al.*, 2018; Moher *et al.*, 2009). En efecto, este trabajo se basó en la búsqueda electrónica de todos los estudios relacionados a COVID-19, estuvieran publicados o como *preprints* de las bases de datos de medRxiv y bioRxiv (artículos aún no evaluados por pares), realizados desde 2019 hasta el 27 de abril de 2020. Se incluyeron 54 estudios de cohortes con 15.976 muestras, de las cuales 8.526 eran de casos de infección por SARS-CoV-2. Estos estudios, que se realizaron en Asia (n = 38), Europa (n = 15), y en Estados Unidos y China (n = 1), comprendieron la utilización de 25 kits comerciales y numerosos ensayos serológicos desarrollados por el propio grupo, y fueron publicados en el Registro de Estudios de COVID-19 de Cochrane (<https://covid-19.cochrane.org>) y en la Base de Datos de COVID-19 del Instituto de Medicina Social y Preventiva de la Universidad de Berna (<https://www.ispm.unibe.ch>).

El posible riesgo de sesgo y la aplicabilidad de los estudios fueron evaluados mediante la herramienta de evaluación de la calidad de los estudios de precisión diagnóstica 2 (QUADAS-2; *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies*). Además, se presentó la sensibilidad y la especificidad para cada anticuerpo (o combinación de anticuerpos) utilizando diagramas de bosque emparejados. Los datos se agruparon mediante regresión logística de efectos aleatorios si era pertinente, estratificando por el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas de COVID-19. La incertidumbre en las estimaciones de sensibilidad y especificidad fue calculada utilizando intervalos de confianza (IC) del 95% (IC 95%). Por otra parte, se incluyeron todos los estándares de referencia para definir la presencia o ausencia de SARS-CoV-2 (RT-PCR y los criterios de diagnóstico clínico).

Cabe mencionar que la mayoría de estos estudios de precisión diagnóstica (n = 44) solo incluyeron personas hospitalizadas debido a infección presunta o confirmada por SARS-CoV-2, y que los autores señalan que en algunos casos no pudieron verificar si los datos reportados correspondían a una infección actual o pasada, ya que fueron pocos los estudios en los que se informó si los participantes se estaban recuperando.

Por otra parte, la búsqueda electrónica llevada a cabo por Deeks y sus colaboradores (2020) no dio ningún resultado sobre estudios serológicos que evaluaran exclusivamente a personas asintomáticas, mientras que en dos tercios de los estudios (n = 33) los casos de COVID-19 se

definieron basándose únicamente en los resultados de RT-PCR sin tener en cuenta la posibilidad de resultados de RT-PCR falsos negativos.

Como se resume en la **Tabla 1**, el metaanálisis de los datos recogidos en este estudio mostró que la sensibilidad para la detección de IgG, IgM, IgA, anticuerpos totales e IgG/IgM fue baja cuando las pruebas se realizaron en la primera semana desde la aparición de los síntomas, aumentando en la segunda semana y alcanzando sus valores más altos en la tercera semana. En efecto, la sensibilidad general de las pruebas serológicas para IgG anti-SARS-CoV-2 a lo largo de las tres semanas fue del 29,7% (IC 95%: 22,1 a 38,6), 66,5% (IC 95%: 57,9 a 74,2) y 88,2% (IC 95%: 83,5 a 91,8); para IgM fueron 23,2% (IC 95%: 14,9 a 34,2), 58,4% (IC 95%: 45,5 a 70,3) y 75,4% (IC 95%: 64,3 a 83,8); y para la combinación de IgG/IgM fueron 30,1% (IC 95%: 21,4 a 40,7), 72,2% (IC 95%: 63,5 a 79,5) y 91,4% (IC 95%: 87,0 a 94,4).

En cambio, las pruebas serológicas realizadas en las semanas 4 y 5 desde la aparición de los síntomas de COVID-19 evidenciaron una disminución en la sensibilidad con respecto a los valores para la tercera semana: 80,3% (IC 95% 72,4-86,4) y 68,1% (IC 95% 55,0-78,9) para IgG e IgM anti-SARS-CoV-2, respectivamente, mientras que las sensibilidades agrupadas para IgG/IgM fueron del 96,0% (IC 95% 90,6-98,3). Los datos posteriores a la semana 5 dieron estimaciones de sensibilidad del 86,7% (IC 95%: 79,6 a 91,7; IgG), 53,9% (IC 95%: 38,4 a 68,6; IgM) y 77,7% (IC 95%: 66,0 a 86,2; IgG/IgM) (**Tabla 1**). Cabe mencionar que las estimaciones de sensibilidad de los ensayos realizados posteriormente a la semana 3 se basaron en tamaños de muestras menores, siendo 12 estudios los que aportaron datos para las semanas 4 y 5, y solamente cuatro estudios proveyeron datos de seguimiento de los pacientes luego de la semana 5 (Deeks *et al.*, 2020). Por otra parte, los datos obtenidos se basan en la combinación de varios estudios transversales y en tamaños de muestra pequeños, sin hacer el seguimiento de los mismos grupos de participantes a lo largo del tiempo ni en la utilización de las mismas pruebas. El número de individuos que aportan datos dentro de cada estudio dentro de cada semana es muy pequeño; por lo tanto, al combinar estos datos entre los estudios, estos metaanálisis proveen claridad a la relación entre la sensibilidad y el tiempo desde la aparición de los síntomas de COVID-19. No obstante, deben tenerse en cuenta las limitaciones mencionadas de estos estudios al interpretar todos los resultados.

	Días 1-7	Días 8-14	Días 15-21	Días 22-35	Días > 35	Comparación
Grupos de prueba [estudios] (verdaderos positivos/casos de COVID-19) Sensibilidad (IC 95%)						
IgG	33 [23] (165/568) 29,7% (22,1 a 38,6)	34 [22] (766/1200) 66,5% (57,9 a 74,2)	34 [22] (974/1110) 88,2% (83,5 a 91,8)	20 [12] (417/502) 80,3% (72,4 a 86,4)	11 [4] (213/252) 86,7% (79,6 a 91,7)	P < 0,00005
IgM	34 [24] (207/608) 23,2% (14,9 a 34,2)	32 [21] (724/1171) 58,4% (45,5 a 70,3)	32 [21] (800/1074) 75,4% (64,3 a 83,8)	19 [11] (378/507) 68,1% (55,0 a 78,9)	11 [4] 118/215 53,9% (38,4 a 68,6)	P < 0,00005
IgA	4 [4] (54/100) 28,4% (0,9 a 94,3)	3 [3] (38/53) 78,1% (9,5 a 99,2)	3 [3] (66/68) 98,7% (39,0 a 100)	2 [2] (81/82) 98,7% (91,9 a 99,8)	1 [1] (23/23) 100% (85,2 a 100)	*
Anticuerpos totales	5 [4] (62/144) 24,5% (9,5 a 50,0)	6 [5] (220/247) 84,0% (64,1 to 93,9)	6 [5] (174/176) 98,1% (90,1 to 99,6)	4 [3] (19/11) 69,5% (34,8 to 90,7)	2 [1] (15/28) 79,0% (49,8 to 93,4)	P < 0,00005
IgG/IgM	17 [9] (81/259) 30,1% (21,4 a 40,7)	21 [9] (441/608) 72,2% (63,5 a 79,5)	21 [9] (636/692) 91,4% (87,0 a 94,4)	16 [5] (146/152) 96,0% (90,6 a 98,3)	9 [2] (122/153) 77,7% (66,0 a 86,2)	P < 0,00005
IgA/IgG	1 [1] (0/12) 0% (0 a 26,5)	1 [1] (5/10) 50,0% (18,7 a 81,3)	1 [1] (7/8) 87,5% (47,3 a 99,6)	1 [1] (1/1) 100% (2,5 a 100)	0 [0]	*
IgA/IgM	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	
* datos inadecuados para hacer una comparación estadística formal.						

Tabla 1 / Sensibilidad por tiempo desde el inicio de los síntomas. Resultados basados con un máximo de 12 estudios desglosados por semana de análisis desde el inicio de los síntomas para IgG (de 23 estudios), IgA (de 4 estudios), IgM (de 24 estudios), anticuerpos totales (de 5 estudios), combinación de IgG/IgM (de 21 estudios) e IgA / IgG (de 1 estudio; estos resultados se basan en un máximo de 12 participantes por período de tiempo).

Para evaluar la especificidad general de los ensayos serológicos se tuvieron en cuenta los casos falsos positivos/no-COVID-19. El estándar de referencia para verificar los casos no-COVID fue clasificado en tres grupos principales: controles prepandémicos (tanto individuos sanos como con otra enfermedad) que no se sometieron a la prueba de RT-PCR; controles actuales de personas sanas o con otra enfermedad (que tampoco se sometieron a la prueba de RT-PCR); e individuos sospechosos de COVID-19 pero considerados no-COVID (**Tabla 2**).

Los resultados agrupados de todos los estudios mostraron una especificidad superior al 98% para todos los isotipos de inmunoglobulinas, siendo las más elevadas para IgA/IgM e IgA/IgG (**Tabla 2**). Cabe destacar que en los controles actuales de individuos sanos o con una enfermedad que no fuera COVID-19, todos los ensayos para IgG, IgM e IgG/IgM alcanzaron una especificidad mayor (de aproximadamente 99%) que en los casos de pacientes sospechosos de COVID-19 considerados negativos (**Tabla 2**). Por otra parte, se observaron más falsos positivos para las pruebas IgG/IgM en los estudios que utilizaron un grupo sospechoso de COVID-19 que en los otros estudios (**Tabla 2**).

La mayoría de los estudios del trabajo de revisión de Deeks *et al.* (2020) sólo incluyeron participantes cuyo diagnóstico para COVID-19 se basó en el resultado positivo del ensayo de RT-PCR. Sin embargo, los autores buscaron estudios en los que se definiera la infección por SARS-CoV-2 para casos sospechosos de COVID-19 pero con un ensayo de RT-PCR negativo en base a los criterios establecidos por la OMS (WHO-2019-nCoV-Surveillance_Case_Definition-2020.2-eng.pdf) y el Centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades (<https://www.chinacdc.cn/en/COVID19/>). Es frecuente en la práctica clínica que haya pacientes que, a pesar de no contar con una prueba de RT-PCR positiva, muestran signos de COVID-19 a nivel de síntomas clínicos y de estudios por imágenes (Volpicelli *et al.*, 2022). Los autores encontraron 12 estudios en los que la infección de COVID-19 se definió en base a estos criterios, los cuales, por lo tanto, incluyeron en el grupo de COVID-19 tanto a pacientes con una prueba de RT-PCR negativa como positiva.

Se compararon las estimaciones de sensibilidad entre los estudios que utilizaron una prueba positiva de RT-PCR como estándar de referencia y aquellos estudios que definieron la infección por SARS-CoV-2 basándose en los criterios de diagnóstico clínico y de imágenes (incluyendo tanto los positivos como los negativos para la prueba de RT-PCR) (**Tabla 3**). Los autores también estratificaron el análisis por semanas desde el inicio de los síntomas (**Tabla 4**). Todas las diferencias observadas estuvieron dentro de las magnitudes esperadas al azar.

	Especificidad general	Sospechosos de COVID considerados negativos	Controles actuales sanos o con otra enfermedad	Controles pre-pandémicos	Comparación de grupos de control
	Grupos de prueba [estudios] (casos de falsos positivos/no-COVID)				
	Especificidad (IC 95%)				
IgG	62 [44] (159/6136) 99,1% (98,3% a 99,6%)	6 [6] (10/396) 98,0% (91,0% a 99,6%)	14 [10] (60/2614) 99,2% (97,6% a 99,8%)	19 [10] (88/2633) 99,2% (97,8% a 99,7%)	P = 0,56
IgM	59 [41] (183/6103) 98,7% (97,4% a 99,3%)	5 [5] (12/384) 98,1% (89,9% a 99,7%)	14 [10] (89/3069) 98,6% (96,0% a 99,5%)	17 [9] (38/2075) 99,3% (98,0% a 99,8%)	P = 0,50
IgG/IgM	34 [23] (78/5761) 98,7% (97,2% a 99,4%)	7 [7] (33/454) 92,8% (89,7% a 95,0%)	7 [5] (20/506) 99,9% (65,2% a 100%)	18 [6] (22/1104) 98,7% (96,6% a 99,5%)	No es posible una comparación formal
Anticuerpos totales	16 [10] (41/3585) 99,2% (98,3% a 99,6%)				
IgA	4 [4] (10/663) 98,5% (97,2% a 99,2%)				
IgA/IgG	2 [2] (1/528) 99,8% (98,9% a 100%)				
IgA/IgM	1 [1] (1/483) 99,8% (99,2% a 100%)				

Tabla 2 | Especificidad e impacto del estándar de referencia para los casos no-COVID-19. Adaptado de Deeks et al. (2020).

	Casos de COVID-19 positivos para RT-PCR	Casos de COVID-19 negativos para RT-PCR	Comparación
	Grupos de prueba [estudios] (casos de verdaderos positivos/ casos de COVID) Sensibilidad (IC 95%)		
IgG	26 [15] (1555/2280) 87,9% (82,7 a 91,7)	8 [8] (925/1300) 91,2% (83,9 a 95,4)	P = 0,36
IgM	23 [13] (1368/2166) 70,8% (56,3 a 82,0)	10 [9] (792/1292) 87,5% (73,7 a 94,6)	P = 0,06
IgG/IgM	17 [6] (966/1278) 90,6% (86,6 a 93,5)	4 [4] (400/499) 93,6% (88,9 a 96,4)	P = 0,22

Tabla 3 | Impacto del estándar de referencia sobre la sensibilidad de las pruebas serológicas.

Adaptado de Deeks *et al.* (2020).

Casos de COVID-19 positivos para RT-PCR			Casos de COVID-19 negativos para RT-PCR	
	Grupos de prueba [estudios] (verdaderos positivos/casos de COVID-19)	Sensibilidad (IC 95%)	Grupos de prueba [estudios] (verdaderos positivos/casos de COVID-19)	Sensibilidad (IC 95%)
IgG				
Días 1-7 ^b	2 [2] (1/28)		2 [2] (13/8)	
Días 8-14 ^b	2 [2] (21/33)		3 [3] (25/30)	
Días 15-21 ^b	2 [2] (39/40)		3 [3] (64/72)	
Agrupados (estratificados por tiempo) ^a		72,6% (46,2% a 89,1%)		84,0% (64,4% a 93,9%)
Prueba de la diferencia de sensibilidad entre los grupos RT-PCR-positivos y RT-PCR-negativos: P = 0,18				
IgM				
Días 1-7 ^b	2 [2] (3/28)		2 [2] (4/13)	
Días 8-14 ^b	2 [2] (25/33)		3 [3] (30/11)	
Días 15-21 ^b	2 [2] (16/8)		3 [3] (31/72)	
Agrupados (estratificados por tiempo) ^a		64,6% (49,7% a 77,1%)		49,0% (34,2% a 63,9%)
Prueba de la diferencia de sensibilidad entre el grupo RT-PCR-positivo y el grupo RT-PCR-negativo: P = 0,07				
IgG / IgM				
Días 1-7 ^b	2 [2] (8/36)		2 [2] (4/17)	
Días 8-14 ^b	2 [2] (37/53)		3 [3] (29/40)	
Días 15-21 ^b	2 [2] (141/150)		3 [3] (104/113)	
Agrupados (estratificados por tiempo) ^a		71,9% (58,7% a 82,2%)		71,1% (57,0% a 82,0%)
Prueba de la diferencia de sensibilidad entre el grupo RT-PCR-positivo y el grupo RT-PCR-negativo: P = 0,90				
^a Las estimaciones de sensibilidad se obtuvieron a partir de un modelo que combina todos los datos de ambos subgrupos y grupos de tiempo, estratificando por grupo de tiempo. La estimación corresponde a la sensibilidad en los días 15-21.				
^b Los datos de pruebas positivas de RT-PCR solo se incluyeron cuando el estudio analizó también un subgrupo de pacientes con ensayos de RT-PCR negativos.				

Tabla 4 | Estudios que informaron sensibilidad tanto en los subgrupos de pacientes RT-PCR positivos como RT-PCR negativos. Adaptado de Deeks *et al.* (2020).

En conclusión, el estudio de Deeks *et al.* (2020) demuestra que la sensibilidad de los ensayos de anticuerpos es demasiado baja en la primera semana desde el inicio de los síntomas de COVID-19 como para ser utilizada como criterio de diagnóstico. Sin embargo, puede ser útil el uso de pruebas de anticuerpos en pacientes con un resultado negativo del ensayo de RT-PCR pero que son altamente sospechosos de estar infectados por SARS-CoV-2; en particular, luego de las dos semanas desde el inicio de los síntomas. Los datos analizados en esta revisión sugieren también que las pruebas de anticuerpos tendrían una función útil para detectar una infección previa por SARS-CoV-2 si se utilizan a partir de los 15 días desde el inicio de los síntomas.

Por otra parte, no se cuenta con suficiente evidencia respecto de la utilidad de estas pruebas para las encuestas de seroprevalencia con fines de gestión de la salud pública, dado que: (i) no se ha establecido aún ni la duración ni los niveles de anticuerpos necesarios para no desarrollar enfermedad por infección con SARS-CoV-2, y (ii) Deeks *et al.* (2020) encontraron muy pocos datos más allá de los 35 días posteriores al inicio de los síntomas.

3. Comparación de las pruebas serológicas para la detección de la infección por SARS-CoV-2 con el ensayo molecular de RT-qPCR

Uno de los objetivos de este Trabajo de Tesina fue comparar el desempeño de los ensayos serológicos con el del ensayo molecular de RT-qPCR, considerado como patrón oro para el diagnóstico de COVID-19.

De todos los artículos analizados, se seleccionó el trabajo de Chierighin *et al.* (2021). En este estudio caso-control retrospectivo se evaluaron la sensibilidad y especificidad de cinco ensayos serológicos empleados para la detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos de SARS-CoV-2 en muestras de sangre, utilizando RT-qPCR, a partir de hisopados nasofaríngeos, como prueba estándar de referencia. Asimismo, los investigadores se propusieron, como objetivo secundario, evaluar la concordancia entre los diferentes ensayos serológicos analizados en base a la clase de inmunoglobulina detectada (IgG o IgM).

Para este estudio se utilizaron muestras remanentes de plasma congelado recolectadas, entre los meses de abril y junio del año 2020, de 337 individuos asintomáticos y sintomáticos con resultados de RT-PCR positivos ($n= 207$) y negativos ($n= 130$) para SARS-CoV-2. Estas muestras fueron tomadas en el marco de las investigaciones serológicas de rutina en la Unidad Operativa de Microbiología Clínica del IRCCS del Policlinico Sant'Orsola, de la Universidad de Bolonia en Italia. Los asintomáticos se sometieron a pruebas moleculares, ya que cumplían con al menos uno de los dos criterios epidemiológicos establecidos por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (*European Center for Disease Prevention and Control; ECDC*) (ecdc.europa.eu [a]). Se excluyeron los sujetos con RT-PCR negativo para SARS-CoV-2 que cumplían con algunos de los criterios para COVID-19, ya sea a nivel de diagnóstico clínico y epidemiológico o con respecto a diagnóstico por imágenes (ecdc.europa.eu [a]).

Los kits empleados en este estudio fueron:

- (1) un ensayo POCT basado en inmunocromatografía de flujo lateral: LFIA IgG/IgM (Technogenetics S.R.L., Italia);
- (2) dos inmunoensayos de quimioluminiscencia automatizados: CLIA-iFlash IgG/IgM (Shenzhen YHLO Biotech Biotech Co., Ltd., China) y LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG CLIA (DiaSorin S.p.A., Italia);
- (3) un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia automatizado: Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 ECLIA (Roche Diagnostics, Suiza);
- (4) un ELISA automatizado: Anti-SARS-CoV-2 IgA ELISA (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Alemania).

Los kits LFIA de Technogenetics, CLIA-iFlash IgG/IgM y Elecsys Anti-SARS-CoV-2 ECLIA de Roche Diagnostics se basan en la detección cualitativa de anticuerpos anti-SARS-CoV-2. El ensayo de Technogenetics utiliza como molécula de captura a la proteína N de SARS-CoV-2 y tiene un tiempo de respuesta de 15 minutos, mientras que el CLIA-iFlash IgG/IgM contiene perlas magnéticas recubiertas con las proteínas recombinantes N y S de SARS-CoV-2 y tiene un tiempo de respuesta aproximado de 40 minutos. El ensayo Elecsys Anti-SARS-CoV-2 ECLIA, que tiene un tiempo de respuesta de 20 minutos por muestra, utiliza la proteína N recombinante como antígeno de captura en un formato que favorece la detección de anticuerpos de alta afinidad. Este kit detecta predominantemente IgG a pesar de que captura anticuerpos de todos los isotipos (IgA, IgM, e IgG) (Egger *et al.*, 2020).

Para la detección cuantitativa de IgG de SARS-CoV-2 se utilizó el ensayo LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG CLIA de DiaSorin, el cual, al basarse en perlas magnéticas recubiertas con las proteínas recombinantes S1 y S2 de SARS-CoV-2, permitiría detectar anticuerpos neutralizantes. En este sentido, se ha reportado que este ensayo detecta anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 con un 94,4% de concordancia positiva y un 97,8% de concordancia negativa con los ensayos de neutralización viral en cultivos celulares (Bonelli *et al.*, 2020). Para la detección semicuantitativa de IgA anti-SARS-CoV-2 se empleó el ELISA Anti-SARS-CoV-2 IgA de Euroimmun que utiliza la proteína recombinante S1 de SARS-CoV-2 como molécula de captura.

En los ensayos semicuantitativo y cuantitativo automatizados, la cantidad de Ig anti-SARS-CoV-2 en el suero/plasma es proporcional a las unidades lumínicas relativas (RLU; *relative light units*) medidas en el analizador, lo cual permite calcular automáticamente la concentración de anticuerpos en unidades arbitrarias (UA/ml) teniendo en cuenta los datos de RLU y de la curva de calibración.

Como se resume en la **Tabla 5**, el análisis de los datos obtenidos en este estudio mostró que la sensibilidad general de todos los ensayos serológicos para IgG fue > 80%, oscilando entre el 81,6% (intervalo de confianza del 95% [IC 95%] 75,7-86,7) al emplear el ensayo LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG CLIA (CLIA-LIAISON® XL) y 89,9% (IC 95% 84,9-93,6) con el ensayo CLIA-iFlash, mientras que la especificidad fue > 95%, oscilando entre el 97,7% (IC 95% 93,4-99,5) con el kit CLIA-LIAISON® XL y 100% (IC 95% 97,2 a 100) con ECLIA-Elecsys®. En cambio, la sensibilidad general de las pruebas serológicas para IgM anti-SARS-CoV-2 fue muy baja: 47,6% (IC 95% 40,6-54,6) y

54,6% (IC 95% 47,5-61,5) con los ensayos cualitativos LFIA y CLIA-iFlash, respectivamente, mientras que la especificidad fue del 98,5% (IC 95% 94,6-99,8) y 96,2% (IC 95% 91,3-98,7). El kit ELISA de Euroimmun Medizinische Labordiagnostika para la determinación semicuantitativa de IgA anti-SARS-CoV-2 (**Tabla 5**, ELISA Euroimmune I) tuvo una sensibilidad del 84,3% (IC 95% 78,3-89,2) y una especificidad del 81,7% (IC 95% 73,1-88,4).

El análisis de los datos para evaluar el desempeño de los ensayos serológicos de acuerdo con la presencia de síntomas de COVID-19 mostró que la sensibilidad de todas las pruebas fue menor en los individuos asintomáticos que en los sintomáticos, mientras que la especificidad fue similar (**Tabla 6**). Sin embargo, cabe mencionar que en los individuos asintomáticos todos los ensayos para IgG alcanzaron una sensibilidad de aproximadamente 80%, a excepción del LFIA que mostró una sensibilidad de tan solo 68,4% (**Tabla 6**).

Los autores también estratificaron la sensibilidad de los diferentes ensayos serológicos en base al tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas característicos de COVID-19. Como se resume en la **Tabla 7**, la sensibilidad de todas las pruebas serológicas fue menor en sujetos cuya muestra de sangre fue tomada dentro de los 14 días de inicio de los síntomas que en aquellos en los que ya habían transcurrido más de 14 días. En particular, la sensibilidad del LFIA, de los CLIA y del ECLIA IgG fue de 73,8 frente a 91,8%; 80,0 frente a 95,9% (CLIA-iFlash); 70,8 frente a 87,8% (CLIA-LIAISON® XL) y 72,3 frente a 95,1%, en sujetos con inicio de síntomas dentro y después de 14 días desde la extracción de sangre, respectivamente (**Tabla 7**).

Ensayos serológicos		Nro de muestras	RT-PCR positivos	RT-PCR negativos	Positivos verdaderos	Falsos positivos	Negativos verdaderos	Falsos negativos	% Sensibilidad (IC 95%)	% Especificidad (IC 95%)
IgG	LFIA POCT	336	206	130	173	1	129	33	84,0 (78,2-88,7)	99,2 (95,8-100)
	CLIA iFlash	337	207	130	186	2	128	21	89,9 (84,9-93,6)	98,5 (94,6-99,8)
	LIAISON _{XL}	337	207	130	169	3	127	38	81,6 (75,7-86,7)	97,7 (93,4-99,5)
	ECLIA Elecsys	337	207	130	179	0	130	28	86,5 (81,0-90,8)	100 (97,2-100)
IgM	LFIA POCT	336	206	130	98	2	128	108	47,6 (40,6-54,6)	98,5 (94,6-99,8)
	CLIA iFlash	337	207	130	113	5	125	94	54,6 (47,5-61,5)	96,2 (91,3-98,7)
IgA	ELISA Euro-immune I	294	185	109	156	20	89	29	84,3 (78,3-89,2)	81,7 (73,1-88,4)

Tabla 5 | Sensibilidad y especificidad de los ensayos serológicos para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 con respecto a la prueba de RT-PCR considerada como estándar de referencia.

Adaptado de Chiereghin et al. (2021).

Ensayos serológicos		Nro de muestras	RT-PCR positivos	RT-PCR negativos	Positivos verdaderos	Falsos positivos	Negativos verdaderos	Falsos negativos	% Sensibilidad (IC 95%)	% Especificidad (IC 95%)	
Individuos sintomáticos											
IgG	LFIA	POCT	283	187	96	160	1	95	27	85,6 (79,7-90,3)	99,0 (94,3-100)
	CLIA	iFlash LIAISON XL	284	188	96	170	2	94	18	90,4 (85,3-94,2)	97,9 (92,7-99,7)
			284	188	96	154	2	94	34	81,9 (75,7-87,1)	97,9 (92,7-99,7)
	ECLIA	Elecsys	284	188	96	164	0	96	24	87,2 (81,6-91,6)	100 (96,2-100)
IgM	LFIA	POCT	283	187	96	94	2	94	93	50,3 (42,9-57,6)	97,9 (92,7-99,7)
	CLIA	iFlash	284	188	96	107	5	91	81	56,9 (49,5-64,1)	94,8 (88,3-98,3)
IgA	ELISA	Euro-immune I	244	168	76	144	19	57	24	85,7 (79,5-90,6)	75,0 (63,7-84,2)
Individuos asintomáticos											
IgG	LFIA	POCT	53	19	34	13	0	34	6	68,4 (43,4-87,4)	100 (89,7-100)
	CLIA	iFlash LIAISON XL	53	19	34	16	0	34	3	84,2 (60,4-96,6)	100 (89,7-100)
			53	19	34	15	1	33	4	78,9 (54,4-93,9)	97,1 (84,7-99,9)
	ECLIA	Elecsys	53	19	34	15	0	34	4	78,9 (54,4-93,9)	100 (89,7-100)
IgM	LFIA	POCT	53	19	34	4	0	34	15	21,1 (6,0-45,6)	100 (89,7-100)
	CLIA	iFlash	53	19	34	6	0	34	13	31,6 (12,6-56,6)	100 (89,7-100)
IgA	ELISA	Euro-immune I	50	17	33	12	1	32	5	70,6 (44,0-89,7)	97,0 (84,2-99,9)

Tabla 6 | Sensibilidad y especificidad de los ensayos serológicos para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en individuos sintomáticos y asintomáticos.

Adaptado de Chierighin *et al.* (2021).

Ensayos serológicos		Tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas y la toma de muestras de sangre					
		≤ 14 días			> 14 días		
		Nro de RT-PCR positivos	Positivos verdaderos	% Sensibilidad (IC 95%)	Nro de RT-PCR positivos	Positivos verdaderos	% Sensibilidad (IC 95%)
IgG	LFIA	65	48	73,8 (61,5-84,0)	122	112	91,8 (85,4-96,0)
	POCT						
	iFLASH	65	52	80 (68,2-88,9)	123	118	95,9 (90,8-98,7)
	CLIA LIAISON XL	65	46	70,8 (58,2-81,4)	123	108	87,8 (80,7-93,0)
ECLIA	Elecsys	65	47	72,3 (59,8-82,7)	123	117	95,1 (89,7-98,2)
IgM	LFIA	65	23	35,4 (23,9-48,2)	122	71	58,2 (48,9-67,1)
	CLIA	65	35	53,8 (41-66,3)	123	72	58,5 (49,3-67,3)
IgA	ELISA	57	39	68,4 (54,8-80,1)	111	105	94,6 (88,6-98,0)

Tabla 7 / Sensibilidad de los ensayos serológicos para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en base al tiempo desde la aparición de síntomas.

Adaptado de Chierighin et al. (2021).

Un análisis adicional realizado por Chiereghin *et al.* (2021) fue determinar la concordancia entre los ensayos serológicos en base a la clase de inmunoglobulina detectada (IgG o IgM) aplicando el estadístico Kappa (κ). Los resultados de las pruebas basadas en la detección de IgG mostraron un grado de concordancia muy bueno con valores de κ que oscilaron entre 0,78 (LFIA versus CLIA-LIAISON ® XL) y 0,94 (LFIA versus ECLIA-Elecsys ®). En cambio, el grado de concordancia fue moderado ($\kappa = 0,57$) entre los ensayos utilizados que detectan IgM anti-SARS-CoV-2.

En conclusión, el estudio de Chiereghin *et al.* (2021) demuestra que los ensayos serológicos basados en la detección de IgG son una herramienta confiable para la serovigilancia epidemiológica y para el diagnóstico retrospectivo de la infección por SARS-CoV-2 en determinados grupos poblacionales. En cambio, el elevado número de falsos negativos obtenidos en los ensayos para IgM indica que no es aconsejable su uso como marcador de infección aguda. Por otra parte, teniendo en cuenta que la cantidad de resultados indeterminados con el kit ELISA IgA fue alta, resulta difícil definir un área de aplicación para las pruebas serológicas basadas en esta clase de inmunoglobulina.

Cabe mencionar que, dado que el objetivo de este estudio fue analizar la sensibilidad y especificidad de los cinco ensayos para detectar los diferentes isotipos de anticuerpos, no se evaluó el desempeño de los ensayos serológicos cuantitativos utilizados para detectar anticuerpos neutralizantes respecto de los ensayos de neutralización viral en cultivos celulares.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El surgimiento del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 en China en diciembre de 2019 representó el tercer coronavirus altamente patogénico, causante de un síndrome respiratorio agudo severo, que se transmite a la población humana en los últimos 20 años, luego de SARS-CoV-1 en 2002 y de MERS-CoV, identificado en Arabia Saudita en 2012. Debido a su impacto epidemiológico a nivel mundial, SARS-CoV-2 y su patología asociada, COVID-19, generaron mucha preocupación tanto en el ámbito médico como científico. En este sentido, la pandemia de COVID-19 disparó el desarrollo de innumerables métodos moleculares para el diagnóstico de SARS-CoV-2 basados ya sea en ácidos nucleicos o en la detección de proteínas. De hecho, luego de más de dos años desde el comienzo de la pandemia, las medidas para controlar la transmisión e infección por SARS-CoV-2 se basan principalmente en el testeo generalizado y en la vacunación masiva (Vindeirinho *et al.*, 2022).

Un aspecto clave para el control de la pandemia de COVID-19 fue la disponibilidad de pruebas diagnósticas que aseguraron el diagnóstico temprano y preciso de la infección viral. Esto permitió brindar el tratamiento adecuado a los pacientes y limitar la propagación viral con el objetivo de eliminar la circulación de SARS-CoV-2 a nivel global. En efecto, las pruebas diagnósticas fueron un componente esencial de la respuesta a la pandemia de COVID-19, ya que permitieron implementar medidas rápidas y efectivas que ayudaron a contener la pandemia mediante la identificación de los individuos infectados y de los que eran aún asintomáticos durante el período de incubación de la enfermedad, así como rastrear los contactos de un individuo enfermo.

El desarrollo de las pruebas diagnósticas sigue evolucionando, es por ello que es importante tener una comprensión clara de la naturaleza de estas pruebas y de la información que éstas proveen. Cabe destacar que la experticia de la industria farmacéutica en el área del diagnóstico ha conducido al desarrollo continuo de nuevas estrategias para la detección y monitoreo de COVID-19. En lo que respecta a la Argentina, desde marzo de 2020, se han unido institutos de investigación científica, universidades y empresas para desarrollar y producir kits para diagnóstico de fabricación nacional, los cuales, junto a los numerosos kits desarrollados por empresas farmacéuticas y de base tecnológica internacionales, constituyen una respuesta rápida para el diagnóstico de COVID-19 (Meza Calvache *et al.*, 2020; Woloshin *et al.*; 2020).

De lo expuesto se desprende que las pruebas diagnósticas son una estrategia clave para controlar la transmisión viral a nivel poblacional, no solo para la pandemia de COVID-19, sino también para potenciales brotes de otras enfermedades infecciosas. Es por ello que en este Trabajo de Tesina se analizaron diferentes aspectos de los ensayos para el diagnóstico molecular e inmunológico de COVID-19. Para ello, se seleccionaron artículos científicos que evaluaran la sensibilidad, precisión y desempeño de las pruebas moleculares e inmunológicas.

La prueba molecular de RT-qPCR es la prueba de elección recomendada por la OMS para la infección aguda por SARS-CoV-2, y constituye el método de laboratorio más empleado (Schohy *et al.*; 2020). Sin embargo, el uso de este método molecular es costoso, requiere personal experto en Microbiología Molecular y medidas de bioseguridad, y se realiza en equipos específicos. Además,

debido a su complejidad, esta prueba molecular puede no estar disponible en todos los centros de atención médica y entornos ambulatorios.

Con respecto a los ensayos moleculares, el Instituto de Virología junto con la Unidad de Evaluación de Métodos de Diagnóstico y Estadística Aplicada del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS-Malbrán evaluaron la sensibilidad analítica y el desempeño de los kits para SARS-CoV-2 disponibles en la Argentina (Fellner *et al.*, 2021). El estudio de estos investigadores mostró que, si bien todos los kits tienen 100% de especificidad, las pruebas alcanzan mayor sensibilidad cuando utilizan como blanco a los genes virales *E* y *N*. En cambio, los ensayos RT-LAMP tienen un desempeño diagnóstico variable e inferior al de RT-qPCR (ver Punto 1 de Resultados).

Un aspecto importante a tener en cuenta en los ensayos moleculares para diagnóstico es la tasa de mutación de los genomas virales. En este sentido, seleccionamos como trabajo representativo el estudio de Ramírez *et al.* (2020), que investigó cómo la diversidad genómica de los aislamientos sudamericanos de SARS-CoV-2 afecta el rendimiento de las pruebas de RT-qPCR. Los resultados de este estudio demuestran que el gen *E* de SARS-CoV-2 se halla conservado en todos los aislamientos analizados y que, por lo tanto, es el candidato ideal para ser utilizado como blanco en las pruebas moleculares (ver Punto 2 de Resultados).

Por otra parte, el estudio de Arévalo-Rodríguez *et al.* (2020) demuestra y remarca la necesidad de realizar pruebas repetidas en pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2, dado que hasta el 54% de los pacientes con COVID-19 pueden tener una RT-qPCR inicial falsamente negativa (ver Punto 3 de Resultados).

En cuanto a los tests serológicos que detectan la presencia de anticuerpos IgM/IgG específicos contra SARS-CoV-2 como respuesta inmune durante las diferentes fases de la infección, pueden ser necesarios en casos tales como pacientes sospechosos de infección por SARS-CoV-2 en fase aguda, o pacientes clínicamente diagnosticados que no han sido confirmados por pruebas de ARN viral. Además, el resultado positivo para anticuerpos contra SARS-CoV-2 es un dato clave ya que seropositivo indica que se han inducido los anticuerpos específicos, en particular si el ensayo se basa en el RBD de la glicoproteína S, y señalaría la necesidad de hacer un seguimiento de los contactos estrechos sanos que se encuentran en el período de cuarentena. En este sentido, deben tenerse en cuenta los resultados del estudio de revisión realizado por Deeks *et al.* (2020) que señalan que los tests de anticuerpos no pueden ser utilizados como diagnóstico primario para COVID-19 ya que su sensibilidad es muy baja en la primera semana desde el comienzo de los síntomas, pero que podrían tener un papel complementario en individuos que se presentan en una etapa más tardía a la aparición de los síntomas con resultado negativo para el ensayo de RT-PCR. Otra conclusión importante de este trabajo es que no se pudo establecer si los ensayos de anticuerpos contra SARS-CoV-2 serían útiles en sondeos de seroprevalencia para la decisión de medidas sanitarias, ya que los investigadores no encontraron datos suficientes más allá de los 35 días posteriores al inicio de los síntomas (ver Punto 4 de Resultados). Los resultados del trabajo de Deeks y colaboradores (2020) también destaca la necesidad de realizar estudios que muestren datos sobre la sensibilidad de los ensayos a través del tiempo desde el inicio de los síntomas, es decir, los mismos pacientes en varios

puntos temporales a lo largo del tiempo para comprender completamente cómo el tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas afecta directamente el rendimiento de las pruebas diagnósticas.

Otro punto crítico es que tampoco se ha definido claramente hasta el momento la duración de los anticuerpos neutralizantes ni por infección natural ni por vacunación. Un análisis reciente de datos de COVID-19 en una cohorte laboral multicéntrica sugiere que la inmunidad adquirida por infección natural con SARS-CoV-2 protege contra la reinfección en la mayoría de los individuos, al menos durante un período de 6 meses (Finch *et al.*, 2022). En este sentido, la nueva variante Ómicron de SARS-CoV-2 de Sudáfrica, detectada en noviembre de 2021, ha sido incluida en la lista de “variante de preocupación” (VOC, *variant of concern*) de la OMS (Araf *et al.*, 2022). Sin embargo, se desconoce el grado de protección contra esta nueva variante conferido por inmunización con las vacunas disponibles contra COVID-19 (Araf *et al.*, 2022).

En lo que respecta al desempeño de los ensayos serológicos, el estudio de Chiereghin *et al.* (2021) demuestra que las pruebas basadas en la detección de IgG son una herramienta confiable para la serovigilancia epidemiológica y para el diagnóstico retrospectivo de la infección por SARS-CoV-2 en determinadas poblacionales (ver Punto 5 de Resultados). En cambio, el elevado número de falsos negativos obtenidos en los ensayos para IgM indica que no es aconsejable su uso como marcador de infección aguda. Por otro lado, el hecho de que en este estudio se obtuvo un número elevado de resultados indeterminados en pruebas ELISA que detectan IgA hace difícil definir un área de aplicación para las pruebas serológicas basadas en esta clase de inmunoglobulina.

En conclusión, es imprescindible contar con métodos precisos para la detección de la infección por SARS-CoV-2. Si bien las manifestaciones clínicas y los estudios por imágenes pueden ser indicativos de COVID-19, no son métodos adecuados para el diagnóstico definitivo de la infección. Por otra parte, resulta crucial establecer las limitaciones de cada una de las pruebas de diagnóstico para la infección por SARS-CoV-2 para realizar una interpretación correcta de los resultados obtenidos.

Finalmente, el surgimiento de SARS-CoV-2 y la pandemia que originó subrayan la necesidad de contar con organizaciones de vigilancia epidemiológica bien financiadas. Por otra parte, la rápida propagación de este virus a nivel global exigió que la comunidad científica mundial actuara inmediatamente no solo para comprender en detalle la etiología, las propiedades biológicas y la patogénesis de este nuevo virus respiratorio sino también para difundir conocimientos precisos y claros sobre COVID-19 que pudieran ser aprovechados para el diseño e implementación de políticas y estrategias de salud pública.

REFERENCIAS

- Araf Y, Akter F, Tang YD, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, Hossain MG. Omicron variant of SARS-CoV-2: (2022). Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol* 94:1825-1832.
- Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, Zambrano-Achig P, Del Campo R, Ciapponi A, Sued O, et al. (2020). False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One* 15:e0242958.
- Bachelet VC. (2020). Do we know the diagnostic properties of the tests used in COVID-19? A rapid review of recently published literature. *Medwave* 20:e7890.
- Beavis KG, Matushek SM, Abeleda AP, Bethel C, Hunt C, Gillen S, et al. (2020). Evaluation of the EUROIMMUN anti-SARS-CoV-2 ELISA assay for detection of IgA and IgG antibodies. *J Clin Virol* 129:104468.
- Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF. (2006). Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol* 13:751-752.
- Bläckberg A, Fernström N, Sarbrant E, Rasmussen M, Sunnerhagen T. (2021). Antibody kinetics and clinical course of COVID-19 a prospective observational study. *PLoS One*. 16:e0248918.
- Bonelli F, Sarasini A, Zierold C, Calleri M, Bonetti A, Vismara C, et al. (2020). Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2 neutralizing IgG in Covid-19 patients semiquantitatively. *J Clin Microbiol* 58:e01224-20.
- Byrne RL, Kay GA, Kontogianni K, Aljajoussi G, Brown L, Collins AM, et al. (2020). Saliva alternative to upper respiratory swabs for SARS-CoV-2 diagnosis. *Emerg Infect Dis* 26:2769-2770.
- Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, D Pedro L, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 370:856-860.
- Chen X, Jiang Q, Ma Z, Ling J, Hu W, Cao Q, et al. (2020). Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 and hepatitis B virus co-infection. *Virology* 535:842-845.
- Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, Zambelli F, Picardi E, Pavesi G, et al. (2021). Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform* 22:616-630.
- Chiereghin A, Zagari RM, Galli S, Moroni A, Gabrielli L, Venturoli S, Bon I, Rossini G, Saracino IM, Pavoni M, Lafratta S, Deni A, Felici S, Borghi M, Guerra L, Raumer L, Lodi V, Viale P, Attard L, Lazzarotto T; IRCCS St. Orsola Polyclinic of Bologna COVID-19 Research Team. (2021). Recent advances in the evaluation of serological assays for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Front Public Health* 8:620222.
- Ching KH. (2015). Lateral flow immunoassay. *Methods Mol Biol* 1318:127-137.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25:2000045.
- Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen KE, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* 370:861-865.
- Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, Freistaedter A, et al. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med* 12:eabc7075.

- D’Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. (2020). Laboratory testing methods for novel severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Front Cell Dev Biol* 8:468.
- Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, Adriano A, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, et al. (2020). Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD013652.
- Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Ditttrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, et al. (2020). Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD013705.
- Dove A. (2021). Pandemic pivot: How scientists answered the call for diagnostic tests. <https://www.sciencemag.org/features/2021/01/pandemic-pivot-how-scientists-answered-call-diagnostic-tests>.
- ecdc.europa.eu [a]. European Centre for Disease Prevention and Control. Case Definition Coronavirus Disease 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/case-definition>.
- Egger M, Bundschuh C, Wiesinger K, Gabriel C, Clodi M, Mueller T, et al. (2020). Comparison of the Elecsys R Anti-SARS-CoV-2 immunoassay with the EDITM enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARSCoV-2 antibodies in human plasma. *Clin Chim Acta* 509:18-21.
- Fehr AR, Perlman S. (2015). Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1282:1-23.
- Fellner MD, Bonaventura R, Basiletti J, Avaro M, Benedetti E, Campos A, Dattero ME, Russo M, Vladmirsky S, et al. (2021). Evaluation of RT-qPCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of SARS-CoV-2 in Argentina. *Genes (Basel)* 12:659.
- Finch E, Lowe R, Fischinger S, de St Aubin M, Siddiqui SM, Dayal D, Loesche MA, Rhee J, Beger S, Hu Y, Gluck MJ, Mormann B, Hasdianda MA, Musk ER, Alter G, Menon AS, Nilles EJ, Kucharski AJ; CMMID COVID-19 working group and the SpaceX COVID-19 Cohort Collaborative. (2022). SARS-CoV-2 antibodies protect against reinfection for at least 6 months in a multicentre seroepidemiological workplace cohort. *PLoS Biol* 20:e3001531.
- Harrison AG, Lin T, Wang P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol* 41:1100-1115.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181:271-280.
- Huang WE, Lim B, Hsu CC, Xiong D, Wu W, Yu Y, Jia H, Wang Y, et al. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 4:950-961.
- Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. (2020). Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol* 10:331.
- Kashir J, Yaqinuddin A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid

- diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses* 141:109786.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, et al. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581:215-220.
- Lebeau G, Vagner D, Frumence E, Ah-Pine F, Guillot X, Nobécourt E, Raffray L, Gasque P. (2020). Deciphering SARS-CoV-2 virologic and immunologic features. *Int J Mol Sci* 21:5932.
- Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, Lan Z, Law S, MacLean E, Trajman A, Menzies D, Benedetti A, Ahmad Khan F. (2020). Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 370:m2516.
- Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, Liao P, Qiu JF, et al. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 26:845–848.
- Masters PS, Perlman S. (2013). Coronaviridae. En: Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, EE.UU., pp. 825-858.
- McInnes MDF, Moher D, Thombs BD, McGrath TA, Bossuyt PM and the PRISMA-DTA Group (2018). Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test accuracy studies: The PRISMA-DTA Statement. *JAMA* 319:388-396.
- Meza Calvache JM, Estrada Rodriguez AD, Chabusa Martinez CB, Velasco Paucar VA. (2020). Usefulness of polymerase chain tests, rapid tests and tomography in patients with Covid-19. *JAH* 3:32-39.
- Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V. (2020). COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathog* 16:e1008762.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA Statement. *PLoS Medicine* 6:e1000097.
- Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, Droese B, Klaus JP, Makino S, et al. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* 174:11-22.
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol* 53:1-5.
- Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, Molenaar RJ, Munger E, Molenkamp R, Van Der Spek A, Tolsma P, Rietveld A, Brouwer M, Bouwmeester-Vincken N, Harders F, et al. (2021). Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science* 371:172-177.
- Ramírez JD, Muñoz M, Hernández C, Flórez C, Gomez S, Rico A, Pardo L, Barros EC, Paniz-Mondolfi AE. (2020). Genetic diversity among SARS-CoV2 strains in South America may impact performance of molecular detection. *Pathogens* 9:580.
- Ravi N, Cortade DL, Ng E, Wang SX. (2020). Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosens Bioelectron* 165:112454.
- Resman Rus K, Korva M, Knap N, Avšič Županc T, Poljak M. (2021). Performance of the rapid high-throughput automated electrochemiluminescence immunoassay targeting total antibodies to the

- SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain in comparison to the neutralization assay. *J Clin Virol* 139:104820.
- Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, et al. (2021). Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clin Microbiol Rev* 34:e00228-20.
- Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler LA, Leibundgut M, Thiel V, Mühlemann O, Ban N. (2020). SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol* 27:959-966.
- Schünemann HJ, Mustafa RA, Brozek J, Steingart KR, Leeflang M, Murad MH, Bossuyt P, Glasziou P, Jaeschke R, Lange S, Meerpohl J, Langendam M, Hultcrantz M, Vist GE, Akl EA, Helfand M, Santesso N, Hooft L, Scholten R, Rosen M, Rutjes A, Crowther M, Muti P, Rantz H, Ansari MT, Williams J, Kunz R, Harris J, Rodriguez IA, Kohli M, Guyatt GH; GRADE Working Group. (2020a). GRADE guidelines: 21 part 1. Study design, risk of bias, and indirectness in rating the certainty across a body of evidence for test accuracy. *J Clin Epidemiol* 122:129-141.
- Schünemann HJ, Mustafa RA, Brozek J, Steingart KR, Leeflang M, Murad MH, Bossuyt P, Glasziou P, Jaeschke R, Lange S, Meerpohl J, Langendam M, Hultcrantz M, Vist GE, Akl EA, Helfand M, Santesso N, Hooft L, Scholten R, Rosen M, Rutjes A, Crowther M, Muti P, Rantz H, Ansari MT, Williams J, Kunz R, Harris J, Rodriguez IA, Kohli M, Guyatt GH; GRADE Working Group. (2020b). GRADE guidelines: 21 part 2. Test accuracy: inconsistency, imprecision, publication bias, and other domains for rating the certainty of evidence and presenting it in evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol* 122:142-152.
- Schohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. (2020). Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol* 129:104455.
- Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, et al. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci* 117:11727-11734.
- Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N, Tsao SW, Nicholls JM, Altmeyer R, Peiris JSM, Bruzzone R, Nal B. (2008). The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J Virol* 82:11318-11330.
- Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WCW. (2020). Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano* 14:3822-3835.
- Vindeirinho JM, Pinho E, Azevedo NF, Almeida C. (2022). SARS-CoV-2 diagnostics based on nucleic acids amplification: from fundamental concepts to applications and beyond. *Front Cell Infect Microbiol* 12:799678.
- V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19:155-170.
- Volpicelli G, Fraccalini T, Barba M, Fischetto C, Maggiani G, Veltri A, Cardinale L. (2022). Retrospective analysis of the application of CT scan in the emergency department to screen

- clinically asymptomatic COVID-19 before hospital admission. *Emerg Radiol* 29: 235-241.
- Wagner A, Guzek A, Ruff J, Jasinska J, Scheikl U, Zwazl I et al. (2021). Neutralising SARS-CoV-2 RBD-specific antibodies persist for at least six months independently of symptoms in adults. *Commun Med* 1:13.
- Woloshin S, Patel N, Kesselheim AS. (2020). False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection—Challenges and Implications. *N Engl J Med* 383:e38.
- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. (2020) Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 367:1260-1263.
- Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, et al. (2020) Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 8:475-481.
- Yoshimoto FK. (2020). The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19. *Protein J* 39:198-216.