

**DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES ÚTILES
PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS SARS-COV-2 CAUSANTE DE LA ACTUAL
PANDEMIA**



Presentado por:

Verónica Ortiz Méndez

Estudiante de Bacteriología

Trabajo de Grado

Presentado como requisito para la obtención de título:

Bacteriólogo (a)

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Carrera de bacteriología

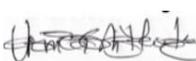
Bogotá D.C

2020

**DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES ÚTILES
PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS SARS-COV-2 CAUSANTE DE LA ACTUAL
PANDEMIA**



Presentado por: Verónica Ortiz Méndez



Estudiante de Bacteriología

Trabajo de Grado

Presentado como requisito para la obtención de título:

Bacteriólogo (a)

Director del trabajo de grado:

PhD. Fredy Omar Gamboa Jaimes



Facultad de odontología del centro de investigación

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Carrera de bacteriología

Bogotá D.C

2020

FACULTAD DE CIENCIAS

Doctora
MELVA LINARES
Directora Carrera de Bacteriología
Facultad de Ciencias

Respetado(a) Doctor(a):

Con la presente comunicación, hacemos constar que el trabajo de grado titulado: “**DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES ÚTILES PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS SARS-COV-2 CAUSANTE DE LA ACTUAL EPIDEMIA**”. Realizado por la estudiante VERONICA ORTIZ MENDEZ identificada con C.C. No. 1.075.243.476, ha sido revisado y corregido de acuerdo con las observaciones sugeridas por el par evaluador en la sustentación.

En constancia se firma, a los 16 días del mes de diciembre del año 2020.

Cordialmente,

NOMBRE: FREDY OMAR GAMBOA

NOMBRE: DIEGO ANDRÉS CASTAÑEDA.

FIRMA



DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

FIRMA



PAR EVALUADOR



MELVA LINARES., MSc.
DIRECTORA

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

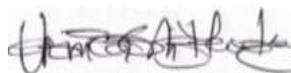
Carrera 7ª #43 82, piso 5. Edificio Carlos Ortiz S.J. - Bogotá D.C., Colombia

Teléfono: +57 (1) 320 8320 Ext. 4057-4058

DERECHO DE AUTOR

El contenido del presente proyecto de investigación, corresponde exclusivamente a Verónica Ortiz Méndez como responsable de las ideas, investigaciones y de los resultados expuestos en el presente trabajo de investigación, bajo la tutoría y responsabilidad de PhD. Fredy Omar Gamboa Jaimes y del patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Pontificia Universidad Javeriana.

Atentamente



Verónica Ortiz Méndez

CC. 1075243476

DEDICATORIA

El presente trabajo de grado está dedicado a Dios, por permitir la realización de este proyecto de grado; por brindar a mi vida las herramientas necesarias para mi desarrollo personal y mi formación educativa como Bacterióloga y por motivarme cada día a continuar en progreso y crecimiento como persona.

A mí amado padre por haber sido el impulso, fortaleza y apoyo más grande para que yo pudiera lograr mis sueños a pesar de las adversidades. Gracias por estar dispuesto a acompañarme en cada decisión importante que tomo en esta vida y a suplir roles importantes para el desarrollo de mi personalidad y mi criterio tanto personal como profesional, afianzando mi ética y mi moral.

A mi familia, a mi hermana mayor quien es una mujer siempre preocupada por el bienestar de la familia, emprendedora y luchadora, que se ha caracterizado por darme apoyo incondicional, ya que ha sido un pilar para mi desarrollo profesional supliendo todas mis necesidades básicas. A mis otros hermanos que siempre están al pendiente de mis cosas. A mi hijo quien es mi motor para siempre salir a delante y brindarle el máximo bienestar posible.

A mis maestros que dedicaron un espacio de sus vidas a transmitir su conocimiento y sus experiencias para ser profesionales íntegros.

Para finalizar, también agradezco a todos los que fueron mis compañeros de clase durante todos los niveles de la carrera, ya que, gracias al compañerismo, amistad, apoyo y sin esperar nada a camino compartieron su conocimiento, tristezas y alegrías.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por darme la capacidad y la oportunidad de culminar mis estudios de pregrado.

Agradecer a la pontificia Universidad Javeriana por acogerme y brindarme una educación de excelencia, formando mi vida en el ámbito profesional, laboral y personal. De igual manera agradezco a la facultad de ciencias de la PUJ la oportunidad de haberme integrado a sus aulas y hacer posible mis sueños.

A mi director de tesis, el doctor Fredy Omar Gamboa Jaimés por su esfuerzo y dedicación, quien con su sapiencia, experiencia, paciencia y motivación ha logrado que culmine mis estudios con éxito.

También me gustaría agradecer a todos aquellos que fueron mis profesores durante la carrera, porque aparte de enseñarme la teoría para llevarla a la práctica, fortalecieron mi esencia como persona.

Contenido

CAPITULO I	8
RESUMEN	8
ABSTRACT	8
CAPITULO II	9
JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
CAPITULO III	11
MARCO TEORICO.....	11
REFERENTES CONCEPTUALES	11
PREVENCIÓN POR VACUNAS	25
CAPITULO IV	27
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
CAPITULO V	28
METODOLOGIA.....	28
Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.....	28
Prueba de RT-PCR COVID-19	29
COVID19-NAAT basado en amplificación isotérmica	29
Amplificación isotérmica mediada por bucle	30
Inmunoensayos COVID-19.....	30
Pruebas serológicas	30
Pruebas de diagnóstico rápido	31
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	31
Ensayo de detección de antígenos	32
Prueba molecular de la empresa Bosch (Alemania)	32
Prueba Neokit-Plus-Covid 19 (Argentina).....	34
Prueba 2019-nCoV RT-PCR	34
Prueba de Feluda (India)	35
La prueba COVID-19 mRT-LAMP-LFB (China).....	36

Prueba ID NOW COVID-19 de Abbott (USA)	36
Flu SC2, ensayo multiplexado de RT-PCR (CDC).....	37
Panel respiratorio BioFire 2.1 (RP2.1) (USA).....	37
Argene SARS-CoV-2 R-GENE (Alemania).....	38
Cobas SARS-CoV-2 & Influenza A/B. Roche Molecular Systems, Inc. (Suiza)	38
Panel respiratorio QIAstat-Dx SARS-CoV-2 (Alemania).....	38
Prueba de Elisa: Elipse-Col (Colombia)	39
Prueba de Elisa: Coavid Kavach (India)	39
Test de Abbott Laboratories: BinaxNOW COVID 19 Ag Card (USA)	40
Prueba Coris COVID-19 Ag Respi-Strip (Belgica)	41
Prueba rápida qSARS-CoV-2 IgG / IgM de Cellex (CDC)	42
Prueba rápida Autobio Diagnostics Anti-SARS-CoV2	42
CAPITULO VI	44
RESULTADOS / DISCUSION	44
CAPITULO VII	46
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	46
CAPITULO VIII	47
IMPACTO ESPERADO	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Genoma del coronavirus SARS-COV-2.....	15
Figura 2 Reacción de la polimerasa positiva del Genoma del coronavirus SARS-COV-2	16
Figura 3 Detección directa de antígenos virales	17
Figura 4 Detección de anticuerpos frente al virus.....	18
Figura 5 Flujograma de diagnóstico de la Infección por SARS-CoV-2/COVID-19	20
Figura 6 Diagnóstico y manejo de la Infección por SARS-CoV-2/COVID-19	21
Figura 7 Flujograma de las pruebas (serológicas) en el paciente asintomático con contacto positivo SARS-CoV-2/COVID-19.....	22
Figura 8 Respuesta ante el Covid-19. Evolución de la concentración de ARN, IgM e IgG a lo largo de la enfermedad.....	23
Figura 9 Combinación de resultados de pruebas para el diagnóstico de SARS-CoV-2.	24

CAPITULO I

RESUMEN

La enfermedad por coronavirus (COVID-19) es una infección viral altamente transmisible que se manifiesta por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-COV-2) (1)(2). A finales de diciembre del 2019, se notificó un grupo de casos de neumonía inexplicables en Wuhan, China y se extendió por todo el mundo (3). Esta enfermedad constituye un gran problema de salud pública mundial por la alta propagación del virus y el gran contagio que representa. El aumento exponencial de casos de infección por COVID-19 por contacto directo a través de acercamiento físico entre una persona infectada y una persona susceptible ha generado nuevas políticas públicas para mitigar la propagación del virus y poder controlar el brote (2). En esta revisión, destacamos características del virus, epidemiología, enfermedad producida por el virus, técnicas fenotípicas y moleculares útiles para la detección del virus.

ABSTRACT

Coronavirus disease (COVID-19) is a highly communicable viral infection manifested by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-COV-2) (1) (2). In late December 2019, a cluster of unexplained pneumonia cases was reported in Wuhan, China and spread across the world (3). This disease constitutes a major global public health problem due to the high spread of the virus and the great contagion it represents. The exponential increase in cases of COVID-19 infection by direct contact through physical contact between an infected person and a susceptible person has generated new public policies to mitigate the spread of the virus and to control the outbreak (2). In this review, we highlight characteristics of the virus, epidemiology, disease caused by the virus, phenotypic and molecular techniques useful for the detection of the virus.

Keywords: Covid-19, SARS-Cov 2, diagnostico microbiológico, técnicas fenotípicas y moleculares.

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El coronavirus es uno de los principales patógenos que ataca el sistema respiratorio humano provocando un típico resfriado común, no obstante, algunos brotes anteriores de coronavirus (CoV) incluyendo el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)-CoV, el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS)-CoV, se caracterizaron por ser agentes altamente patógenos y colapsar la salud pública mundial (2). El SARS-CoV surgió en la provincia de Guangdong de China en 2002 y se extendió a los cinco continentes a través de rutas aéreas, infectando a 8.098 personas y causando 774 muertes. En 2012, el MERS-CoV surgió en la Península Arábiga, donde sigue siendo un importante problema de salud pública, y se exportó a 27 países, infectando un total de 2,494 personas y cobrando 858 vidas (4). A finales de diciembre del año 2019 se presentó un grupo de personas con diagnóstico inicial de neumonía de etiología desconocida pero vinculados epidemiológicamente a un mercado de mariscos y animales exóticos en Wuhan, provincia de Hubei, China. (1,2) Los primeros informes predijeron el inicio de un posible brote de coronavirus dada la estimación de un aumento del número de casos para una nueva cepa de coronavirus de 2019 (COVID-19, nombrado por la OMS el 11 de febrero de 2020) (2). El SARS-CoV-2 (Covid-2019) afectó a más de 90.000 personas y mató a más de 3.000 de los afectados en más de 60 países al 3 de marzo de 2020 (4). El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud declaró que la epidemia de SARS-CoV-2 era una emergencia de salud pública de importancia internacional (4).

En Latinoamérica, el primer caso fue reportado en México a finales de febrero, en Colombia el primer caso fue confirmado el día 6 del mes de marzo del 2020, el cual fue importado de Italia (5). Los datos que se informaron entre el 28 a 29 de marzo de 2020, reportó que Chile tiene la mayor tasa de infectados con 106 por millón de habitantes (total de 1,909 casos) y entre los países con menor tasa encontramos a México y Colombia, con 7 y 13 casos por millón de habitantes (5) cuyos datos se ven afectados por factores internos de los planes de salud de cada país; las pruebas diagnósticas limitadas y la rapidez con la que se emite un resultado de las mismas (5). En Colombia, hasta el 29 de marzo de 2020 se

reportó 608 casos confirmados, 8 muertes, 8 recuperados y 11.514 casos descartados (9). La mayoría de casos se encontraron concentrados en Bogotá (264 casos, 43%), Antioquia (67 casos, 11%) y Cartagena (27 casos, 4%)(5). De todos los casos confirmados al finalizar marzo, el 91% de los casos cursan con enfermedad leve, el 5% tienen enfermedad severa que requiere manejo intrahospitalario, 2% de los casos se encuentran en estado crítico con manejo en unidad de cuidados intensivos y el 2% fallecieron(5).

En segundo lugar se planteó que el MERS-CoV se origina en los murciélagos, pero el reservorio que interviene a la propagación hacia los humanos son los camellos dromedarios definitivamente (6). Tanto el SARS-CoV como el SARS-CoV-2 están estrechamente relacionados y se originan en los murciélagos, que muy probablemente sirven como reservorios de estos dos virus(4); Mientras que las civetas de la palma y los perros mapache han sido reconocidos como huéspedes intermediarios para la transmisión zoonótica del SARS-CoV entre murciélagos y humanos (6), el huésped intermedio del SARS-CoV-2 sigue siendo desconocido.

Esta revisión técnica o monografía de trabajo de grado tuvo como fin analizar y describir las características y utilidad de las técnicas fenotípicas y moleculares disponibles en el mercado para la detección del virus SARS-COV-2, teniendo en cuenta que son tecnologías de diagnóstico clave para la enfermedad COVID-19. El trabajo está enmarcado en: 1. explicar los fundamentos de las pruebas principales para la detección del COVID-19, 2. comparar parámetros analíticos y limitaciones de cada prueba en los diferentes estadios de la enfermedad y 3. Conocer los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas fenotípicas y moleculares útiles para detectar el virus SARS-COV-2.

El proyecto permite generar un informe comparativo que ayudará al personal de salud, investigadores, y a organismos de atención médica a evaluar las pruebas existentes en el mercado.

CAPITULO III

MARCO TEORICO

REFERENTES CONCEPTUALES

El coronavirus es un virus ARN monocatenario positivo y envuelto. Pertenece a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, con características en puntas "en forma de corona" en sus superficies (6). Pertenece al género beta- coronavirus que a su vez se puede dividir en varios subgrupos. El 2019-nCoV, el SARS-CoV y el CoV similar al SARS en murciélagos pertenecen al *Sarbecovirus*, mientras que el MERS-CoV al *Merbecovirus*. El SARS-CoV, MERS-CoV y 2019-nCoV causan enfermedades en los seres humanos, pero cada subgrupo puede tener características biológicas y virulencia levemente diferentes (7); esta enfermedad es de notificación obligatoria por parte de los entes competentes; una vez que las personas están infectadas por el 2019-nCoV, la carga viral aumenta inicialmente y aún puede detectarse 12 días después del inicio de los síntomas dependiendo del tamizaje realizado; por lo tanto, la infectividad de los pacientes con 2019-nCoV puede durar aproximadamente 2 semanas; sin embargo, si existen partículas virales infecciosas de pacientes en una etapa posterior se requiere validación por parte de personal competente (7).

Las diferentes cepas de coronavirus circulaban en el ambiente sin otorgar mayores complicaciones de salud a las personas, referentes a manifestaciones respiratorias (8). En Wuhan, China. Inicialmente se generó un brote que involucro a un mercado local, el Huanan Seafood Market, con un significativo número de personas, al menos 41 personas (7). La autoridad sanitaria local emitió una "alerta epidemiológica" y el mercado cerró el primero de enero de 2020. Un total de 59 casos sospechosos con fiebre y tos seca fueron remitidos a un hospital designado (el Jin Yin -tan Hospital). De los 59 casos sospechosos, 41 pacientes fueron confirmados mediante secuenciación de próxima generación o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) (8). En los días siguientes, una explosión de casos se extendió desde Wuhan a toda la provincia de Hubei. Posteriormente, muchas ciudades y provincias fueron atacadas por este virus.

Una de las razones puede deberse a la gran carga de transporte durante el período del Año Nuevo Lunar chino (el 25 de enero). El primer caso exportado fue a Tailandia el 13 de enero

de 2020. Sin embargo, la enfermedad se propagó rápida y globalmente (7,8). No solo se notificaron grupos familiares, sino también brotes en transatlánticos. Al 6 de febrero de 2020, la OMS había documentado un total de 28.276 casos confirmados con 565 muertes en todo el mundo, en al menos 25 países (1)(8). La OMS emitió una alarma de emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) el 30 de enero de 2020. Se estaban llevando a cabo muchos procedimientos de cuarentena estrictos y vigilancia de la fiebre. Se estimó que las tasas de mortalidad inicial para los pacientes en el hospital eran del 11% al 15%, pero los datos más recientes eran del 2% al 3%(8). Las transmisiones se producen a través de aerosoles emitidos al hablar y por contacto con mucosas (8) Es muy probable que el contagio de persona a persona se produzcan a través de aerosoles al hablar, toser o incluso respirar, y por contacto directo (2)(8).

El COVID-19 tiene un período de incubación medio de 5,2 días (4). La infección es aguda, muchos pacientes sintomáticos y muchos pacientes asintomáticos. Los síntomas suelen comenzar con síndromes inespecíficos, que incluyen fiebre, tos seca y fatiga (1)(2)(6)(7). Pueden estar involucrados múltiples sistemas, incluidos el respiratorio (tos, dificultad para respirar, dolor de garganta, rinorrea, hemoptisis y dolor en el pecho), gastrointestinal (diarrea, náuseas y vómitos), músculo esquelético (dolor muscular) y neurológico (dolor de cabeza o confusión) (7). Los signos y síntomas más comunes son fiebre (83% - 98%), tos (76% - 82%) y dificultad para respirar (31% - 55%). Aproximadamente el 15% presenta fiebre, tos y dificultad para respirar (3). Después del inicio de la enfermedad, los síntomas son de alguna manera leves y la mediana del tiempo hasta el primer ingreso hospitalario es de 7 días (4 a 8). Pero la enfermedad progresa a dificultad para respirar (8 días), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) (9 días) y ventilación mecánica (10,5 días) en aproximadamente el 39% de los pacientes (7). Los pacientes con enfermedad crónica desarrollan SDRA y evolucionan en un periodo de tiempo corto, y mueren por falla orgánica múltiple (2)(7). El virus COVID 19 puede ingresar al huésped a través del tracto respiratorio o superficies mucosas (como la conjuntiva), no se ha confirmado la transmisión oral-fecal (8). El virus tiene un tropismo preferencial por las células epiteliales de las vías respiratorias humanas y el receptor celular, como el SARS, es el ACE2 (7).

Teniendo en cuenta que en la actualidad se presentan diversos patógenos que inducen a infecciones del tracto respiratorio se debe considerar muchos diagnósticos diferenciales que causan la neumonía viral común y que se relacionen con el COVID-19. La influenza, parainfluenza, infección por adenovirus, infección por virus respiratorio sincitial, infección por metapneumovirus y patógenos atípicos, como *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, etc. Son algunos de los patógenos a relacionar (1)(7). Por lo tanto, es crucial rastrear el historial de viajes y exposición al acercarse a un paciente sospechoso que regresa de un área epidémica. Conjuntamente, los kits comerciales de diagnóstico sindrómico respiratorio que detectan múltiples agentes etiológicos (como el panel respiratorio Filmarray) pueden ayudar al diagnóstico diferencial oportuno (7).

El diagnóstico de laboratorio para COVID-19 debe realizarse en un laboratorio bien equipado con instalaciones de hasta nivel de bioseguridad 3 para el cultivo viral (2). Condiciones de laboratorio adecuado, con cualquiera de los siguientes: muestra clínica (hisopado nasofaríngeo, esputo o aspirados de las vías respiratorias inferiores, etc.) que se aislaron e identificaron como 2019-nCoV Muestra clínica que dio positivo por RT-PCR (2). Condiciones epidemiológicas, con cualquiera de los siguientes 14 días antes del inicio de los síntomas (3). También a tener en cuenta el historial de viajes o evidencia de contacto con pacientes con fiebre o síntomas respiratorios en el área epidémica de primera clase de COVID-19 (actualmente Hubei, incluyendo Wuhan y Guangdong) historial de viajes desde o viviendo en otra parte de China continental (incluidos Hong Kong y Guacamayos) (3) historial de contacto con casos probables o confirmados de COVID-19, incluido el proveedor de servicios de salud, bajo el mismo techo, contacto directo del moco o fluidos corporales o condición clínica y condición epidemiológica o cualquier condición de laboratorio (2). Si el primer informe de laboratorio es negativo pero los síntomas del paciente persisten sin una etiología explicable, se debe examinar una segunda muestra 24 horas después en caso de que el primer resultado sea negativo, para descartar un resultado falso negativo inicial (guía de los CDC de Taiwán) (9).

El diagnóstico de laboratorio confirmatorio generalmente se basa en un ensayo de RT-PCR en tiempo real para detectar el ARN viral al dirigirse a una región. Los datos de laboratorio de rutina en la etapa temprana de la epidemia de COVID-19 son similares a la infección viral

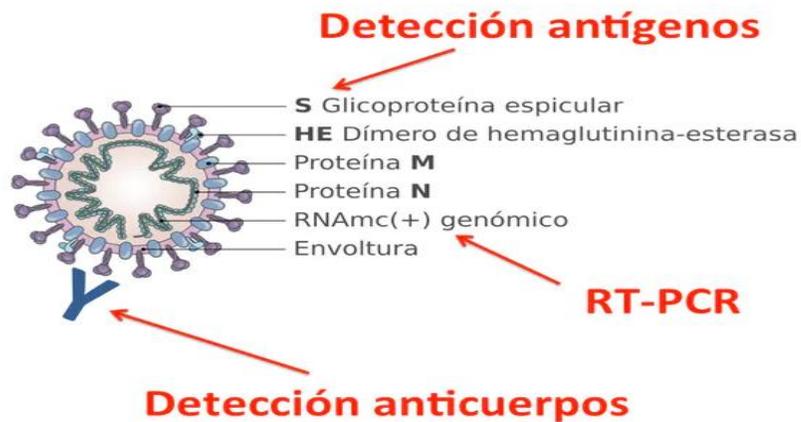
común: linfopenia, tiempo de protrombina prolongado, dímero D elevado, enzimas hepáticas (alanina aminotransferasa), bilirrubina total y lactato deshidrogenasa, con datos de empeoramiento en casos de UCI. 1 Puede ocurrir leucocitosis si se complica con una infección bacteriana secundaria. Teniendo en cuenta la seguridad de los pacientes y del laboratorio, los médicos deben evaluar cuidadosamente la necesidad de tomar muestras de sangre con frecuencia y realizar una aspiración para evitar el riesgo de exposición inesperada (9).

Las pruebas centralizadas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. (US-CDC) y otras organizaciones de atención médica han dado paso a las pruebas automatizadas que utilizan plataformas comerciales (10). Se conoce que hasta julio de 2020, más de 110 pruebas moleculares comerciales han recibido la autorización de uso de emergencia (EUA) de la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA), mientras que más de 300 pruebas basadas en anticuerpos, que no requieren autorización de la FDA, ahogaron el mercado (10). La utilidad diagnóstica de las pruebas disponibles se le ha dado diferentes interpretaciones, lo que podría generar resultados confusos y, a veces, políticas desacertadas(11).

A lo largo de la infección, el virus se multiplica activamente. En la fase inicial se puede encontrar en muestras biológicas (frotis faríngeo o nasofaríngeo, aspirado traqueal o lavado broncoalveolar). Primero hay un período de latencia en el que todavía no es posible detectar la respuesta del sistema inmune, posteriormente en unos días, comienza a producir anticuerpos (12). Se producen primero anticuerpos del tipo IgM hasta alcanzar un máximo a los 7-10 días para, más tarde, casi desaparecer. Esta respuesta primaria es indicativa de una infección aguda. Posteriormente se producirá la respuesta inmune secundaria, más rápida, intensa y prolongada y la producción de anticuerpos de tipo IgG, que durarán más tiempo en circulación(12). Para detectar la presencia del virus (detección directa) se emplea dos tipos de test: la PCR, que detecta el genoma del virus, y los test inmunológicos, que detectan las proteínas (antígenos) del virus. El tercer tipo es el que detecta los anticuerpos producidos como respuesta a la infección: son los test serológicos de detección indirecta (12).

Para detectar el genoma del virus se tiene que conocer el virus, las proteínas virales a detectar, cuyas proteínas sean propias del SARS-COV-2 y cuales partes del gen del virus se podría detectar.

Figura 1 Genoma del coronavirus SARS-COV-2

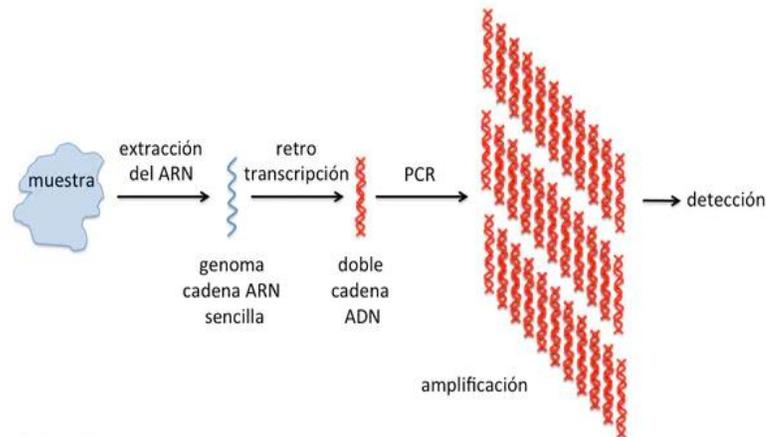


Fuente: Ignacio López-Goñi, Catedrático de Microbiología, Universidad de Navarra

El genoma del virus SARS-CoV-2 es una molécula de ARN monocadena de unos 30 mil bases (11). Cuando se toma la muestra, lo primero que se debe hacer es extraer el genoma del virus mediante un kit de extracción de ácidos nucleicos. Así, además de inactivar el virus, se obtiene su genoma ARN (12).

Para la amplificación del ARN viral hay que pasarlo de ARN a ADN y este proceso se realiza con otro kit que emplea la enzima transcriptasa inversa o retro-transcriptasa (RT de allí el nombre)(10). Posteriormente el genoma del virus ya constituido en ADN se amplifica por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) haciendo millones de copias de un fragmento del ADN de manera que se pueda visualizar y su posterior cuantificación; es decir saber cuántas copias del virus tenemos por mililitro en la muestra. Si la reacción es positiva, se demuestra que había ARN viral y por tal motivo la persona estaba infectada (12).

Figura 2 Reacción de la polimerasa positiva del Genoma del coronavirus SARS-COV-2



Fuente: Ignacio López-Goñi, Catedrático de Microbiología, Universidad de Navarra

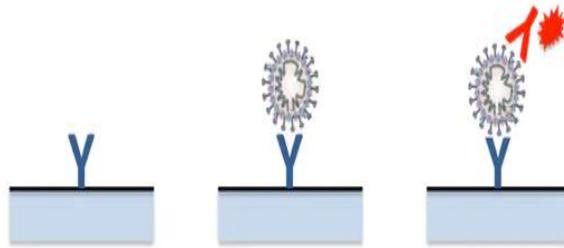
Generalmente lo primero que se obtiene del virus es el genoma, este tipo de pruebas son las primeras que se desarrollaron; el 13 de enero la OMS ya publicó el primer protocolo. Normalmente se suelen realizar dos ensayos: uno de cribado y un segundo confirmatorio. Incluso se puede hacer un tercero de confirmación. Estos tres ensayos de RT-PCR se diseñan para detectar tres genes distintos del virus(12).

Estos test de PCR son altamente específicos y altamente sensibles. Suelen tardar en realizarse unas cuantas horas, requieren un equipamiento y un personal técnico especializado. Pueden dar resultado positivo en personas antes de que manifiesten síntomas, pero que ya tengan el virus. A lo largo de la enfermedad pueden permitir hacer un seguimiento de cómo va la infección, porque cuando la persona ya se ha curado y no tiene el virus activo, en principio debería dar negativo. Aun así, no se puede descartar que pacientes convalecientes sin síntomas puedan dar positivo y seguir siendo portadores del virus (12).

También se podrían detectar las proteínas del virus por medio de test antigénicos que se hace sobre un soporte (membrana de nitrocelulosa) se fijan anticuerpos específicos que reaccionarán contra alguna proteína del virus (12). En este caso es contra las proteínas de la superficie de la envoltura (proteína S), las que se proyectan hacia el exterior y forman esas espículas que dan el nombre a este tipo de virus, corona-virus (12).

Si en la muestra hay partículas virales, se formara un complejo antígeno-anticuerpo quedando fijadas; simulando que el virus hubiera sido capturado por el anticuerpo. Después se añade un segundo anticuerpo contra el virus de manera que se forme un emparedado: anticuerpo-virus-anticuerpo. Este segundo anticuerpo estará marcado o señalado de alguna manera para poner de manifiesto la reacción (12).

Figura 3 Detección directa de antígenos virales

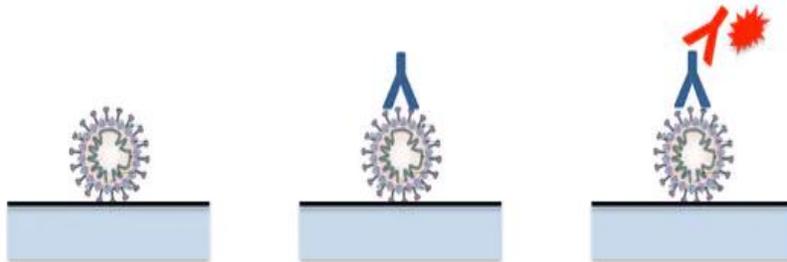


Fuente: Ignacio López-Goñi, Catedrático de Microbiología, Universidad de Navarra

El test basado en la detección de moléculas es muy habitual en diagnóstico clínico; su fundamento es el mismo que las tradicionales pruebas de detección de drogas y los test de embarazo (12). La ventaja es que son mucho más rápidos y, según el tipo de soporte, se pueden realizar en unos pocos minutos. No necesitan un equipamiento específico ni un personal técnico altamente calificado y son más baratos. La desventaja es que son mucho menos específicos y sensibles que la RT-PCR (12).

Las pruebas serológicas consisten en detectar la respuesta inmunológica que presenta un individuo frente al virus, los anticuerpos, esta detección es indirecta en la que no se detecta el virus sino los anticuerpos que se generaron frente al virus y se emplea una muestra de sangre. Sobre el soporte se fijan proteínas del virus, normalmente las proteínas más expuestas hacia el exterior, como la proteína S de la envoltura. Esto es así porque el sistema inmune lo primero que reconoce es lo que está más hacia el exterior del virus, con este test se detecta los anticuerpos que se producen. Si en la muestra hay anticuerpos contra el virus, se adherirán y quedarán fijados a las proteínas del virus(12). Luego se añadirá un segundo anticuerpo contra el anticuerpo humano; estos suelen ser anticuerpos de otro animal que reaccionan en contra de los anticuerpos humanos, porque los anticuerpos humanos en realidad actúan como antígenos en otros animales. Se forma así un tríptico: proteínas del virus - anticuerpo humano - anticuerpo de otro animal. Este segundo anticuerpo estará marcado o señalado de alguna manera para poner de manifiesto la reacción(12).

Figura 4 Detección de anticuerpos frente al virus



Fuente: Ignacio López-Goñi, Catedrático de Microbiología, Universidad de Navarra

Si la reacción es positiva, demuestra que hay anticuerpos contra el virus y que la persona en algún momento, ha estado en contacto con el virus y su sistema inmune ha reaccionado produciendo anticuerpos; esto no implica necesariamente que esté infectado, quizá se haya curado, o simplemente ha estado en contacto con el virus y no ha tenido síntomas (12).

Esta técnica es mucho más rápida que la PCR y, según el tipo de soporte, se pueden realizar en pocos minutos, no necesitan un equipamiento específico ni un personal técnico altamente calificado y son más baratos, la desventaja es que son mucho menos específicos que la RT-PCR (12).

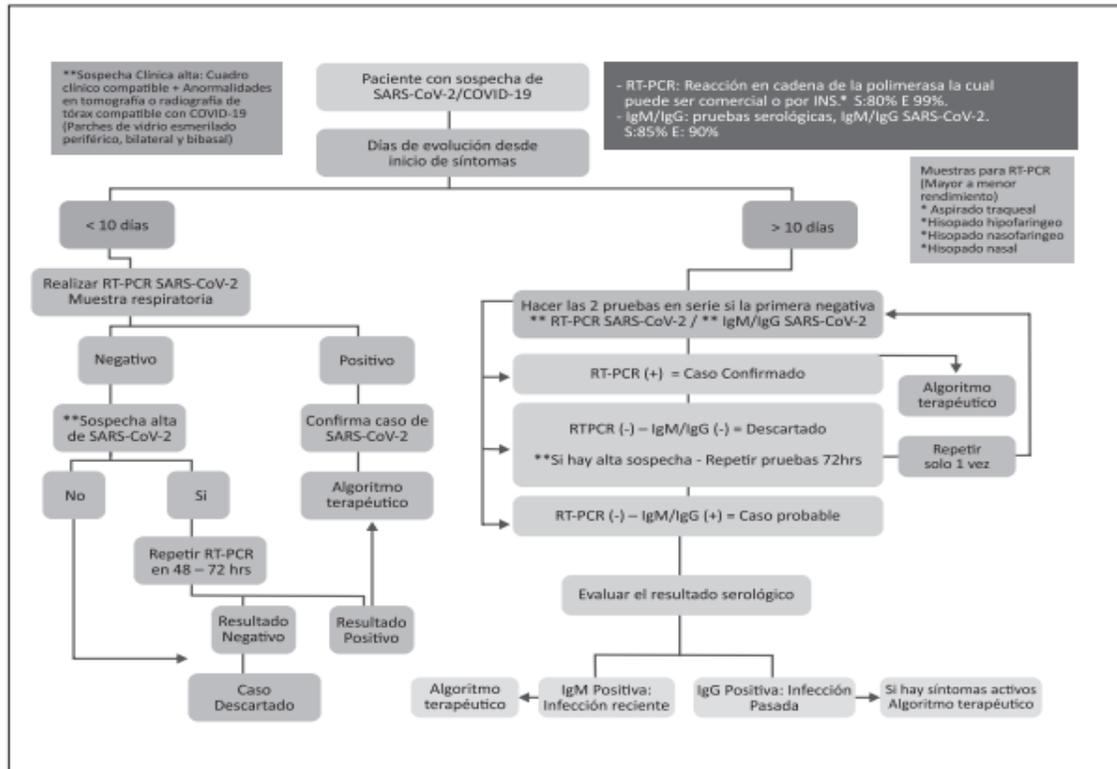
Otra importante desventaja de este tipo de test es que el organismo necesita varios días para producir anticuerpos detectables, es decir, que una persona puede estar infectada, pero durante los primeros días no dar positivo en este tipo de test. Algunos test de anticuerpos pueden distinguir el tipo de inmunoglobulina, si es IgM, indicativo de una infección reciente, o IgG, indicativo de una respuesta secundaria y, por tanto, más prolongada (12).

La asociación colombiana de infectología ha desarrollado un consenso en el que participaron muchos expertos para la elaboración de guías prácticas clínicas para el diagnóstico oportuno y preciso del COVID-19.

La prueba de oro recomendada tanto para el seguimiento epidemiológico de la pandemia en cada país, como para la evaluación de pacientes en los ensayos de diagnóstico y de evaluación de intervenciones, es, la basada en amplificación de ácidos nucleicos virales, la RT-PCR en tiempo real, basada en sondas TaqMan fluorescentes (13).

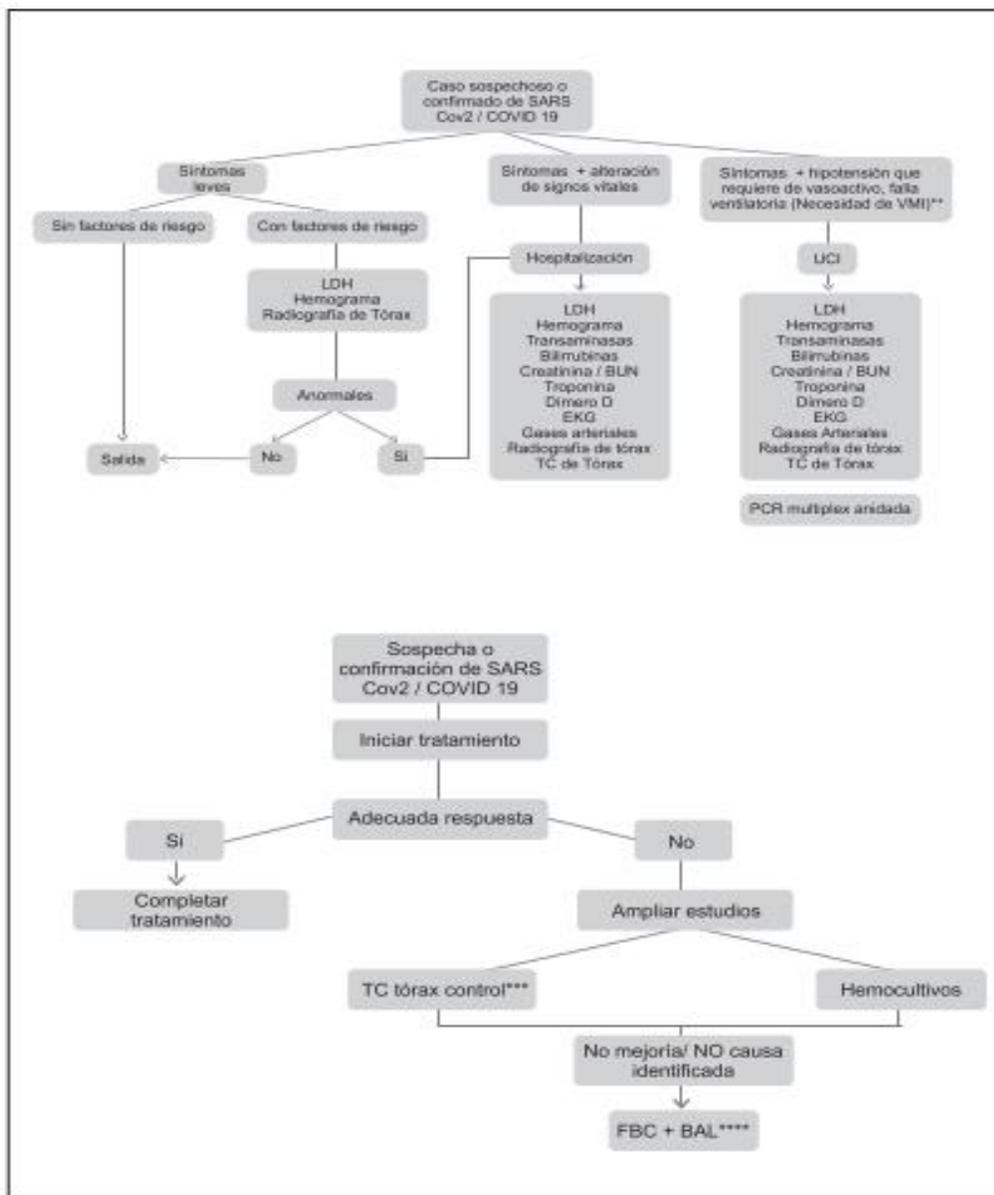
Existen varios protocolos, desde el primero (Corman, 2020) reportado por el Instituto de Virología de Charité (Berlín, Alemania) hasta las estandarizadas en Tailandia, Japón y China. La mayor parte de los países han implementado el protocolo que fue diseñado por los CDC (por sus siglas en inglés Centers for Diseases Control) de EE. UU. (12). Esta prueba ha demostrado alta sensibilidad y especificidad, no tiene reactividad cruzada con otros coronavirus ni con virus respiratorios estacionales, además pueden ser usada en cualquier contexto(14). Los coronavirus tienen varios blancos moleculares dentro de su genoma para ser utilizados para ensayos de amplificación por PCR (14)

Figura 5 Flujograma de diagnóstico de la Infección por SARS-CoV-2/COVID-19



Fuente: Asociación colombiana de infectología / instituto de evaluación tecnológica en salud

Figura 6 Diagnóstico y manejo de la Infección por SARS-CoV-2/COVID-19



*INS: Instituto Nacional de Salud de Colombia; ** VMI: Ventilación Mecánica

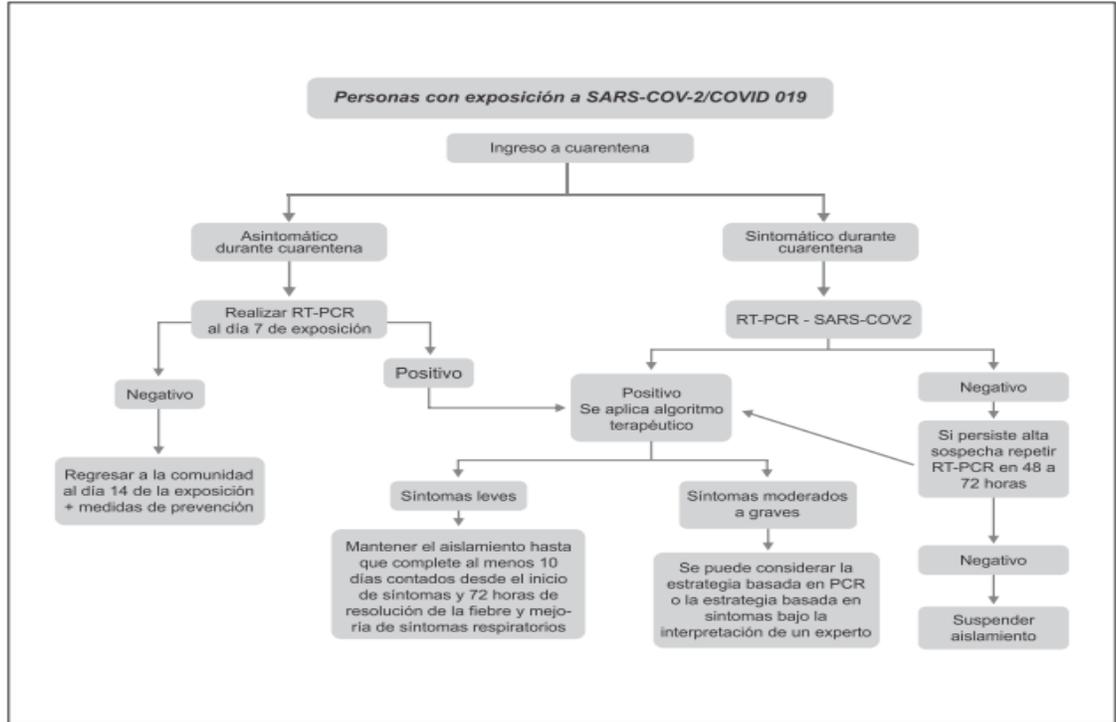
Invasiva ***TC: Tomografía Computarizada; ****FBC: Fibrobroncoscopia, BAL:

Lavado de líquido broncoalveolar

Fuente: Asociación colombiana de infectología / instituto de evaluación

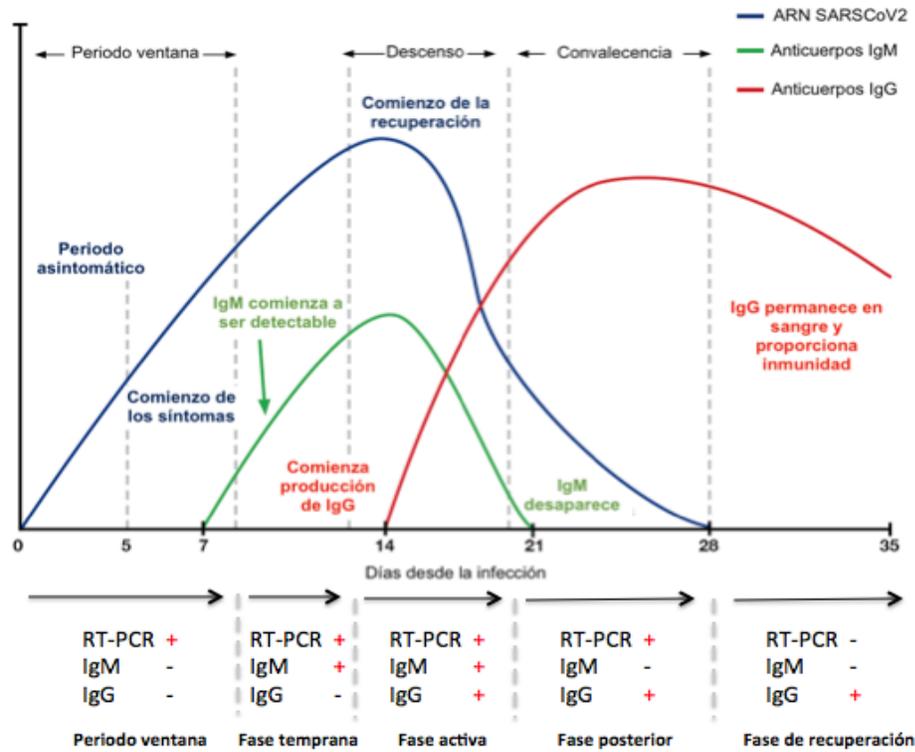
tecnológica en salud

Figura 7 Flujograma de las pruebas (serológicas) en el paciente asintomático con contacto positivo SARS-CoV-2/COVID-19



Fuente: Asociación colombiana de infectología /instituto de evaluación tecnológica en salud

Figura 8 Respuesta ante el Covid-19. Evolución de la concentración de ARN, IgM e IgG a lo largo de la enfermedad.



Fuente: Ignacio López-Goñi, Catedrático de Microbiología, Universidad de Navarra

Los test de detección de anticuerpos indican quién estuvo infectado y quizá está inmunizado, al menos durante un tiempo contra el coronavirus(14). Si se combinan los resultados de RT-PCR, con detección de anticuerpos (IgM e IgG) se podría plantear lo siguiente

Figura 9 Combinación de resultados de pruebas para el diagnóstico de SARS-CoV-2.

RT-PCR - / Ac -	no infectado, no inmune
RT-PCR + / Ac -	infectado, no inmune
RT-PCR + / Ac +	infectado, inmune
RT-PCR - / Ac +	recuperado, inmune

IgM - / IgG -	no inmune
IgM + / IgG -	infección aguda
IgM + / IgG +	infección aguda
IgM - / IgG +	infección pasada

Fuente: Ignacio López-Goñi, Catedrático de Microbiología, Universidad de Navarra

No obstante, este planteamiento es una simplificación y tiene sus limitaciones(14). El que no se detecten anticuerpos puede no significar que no esté inmunizado. En el caso de infecciones por virus, que son intracelulares, la inmunidad celular no mediada por anticuerpos es tan importante o más que la mediada por anticuerpos, es decir, en ocasiones, no hay anticuerpos pero el individuo puede estar “inmunizado”(12).

Toda esta información basada en evidencia puede ayudar a controlar, monitorizar y desarrollar políticas públicas que permitan controlar y minimizar el impacto del virus a lo largo de la pandemia.

PREVENCIÓN POR VACUNAS

Según las últimas investigaciones realizadas por el Departamento de Epidemiología, Facultad de Salud Pública, Universidad de Zhengzhou, en China, se deben considerar posibles blancos terapéuticos y/o agentes terapéuticos para minimizar los efectos del COVID-19. En este momento se deben considerar los estudios realizados a la fecha para obtener el mejor candidato de inmunización, ya que se tienen diversos candidatos, entre ellos se tienen:

Vacuna de células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC)

Las aAPC acelulares son agentes inmunoterapéuticos prometedores que pueden estimular y amplificar eficazmente las células T CD4 + específicas de antígeno (15). Los receptores ACE2 median la unión de la proteína espiga del SARS-CoV-2 para la replicación viral. El objetivo principal de la vacuna aAPC es utilizar aAPC genéticamente modificados para reactivar inmunológicamente las células T, tratando y previniendo así COVID-19(15).

Vacuna ChAdOx1

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 es un vector de vacuna contra adenovirus desarrollado por el Centro de Biofabricación Clínica de la Universidad de Oxford, Reino Unido. La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 tiene como objetivo desarrollar una fuerte respuesta inmune a partir de una sola dosis e inhibir la replicación del virus. La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 contiene la secuencia genética de la proteína de pico de superficie COVID-19, lo que hace que el sistema inmunológico ataque el virus SARS-CoV-2 (15).

Vacuna lentiviral (LV-SMENP-DC) y linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTL)

El LV-SMENP utiliza minigenes COVID-19 diseñados en una vacuna y fue desarrollado por el Instituto Médico Geno-Immune de Shenzhen, China. LV-SMENP se desarrolla a partir de

múltiples genes a través del sistema de vector lentiviral (NHP / TYF) para expresar antígenos COVID-19, lo que provoca modificaciones de células dendríticas (DC) y activación de células T. Los CTL son activados por el LV-DC presente en el antígeno específico de COVID-19. Después de la vacunación con LV-DC, los CTL específicos de antígeno se preparan en 7 a 21 días y se administran a los sujetos mediante inyección subcutánea o infusión intravenosa [14]. LV-SMENP se encuentra actualmente en un ensayo multicéntrico de fase I / II en voluntarios sanos y pacientes infectados por COVID-19 entre niños (> 6 meses), adultos y población de edad avanzada (≤ 80 años) para evaluar su seguridad (15).

Vacuna mRNA-1273: mRNA-1273

Es una nueva vacuna basada en mRNA encapsulada en nanopartículas lipídicas (LNP) que codifica una proteína, estabilizada por prefusión de longitud completa del virus SARS-CoV-2. La vacuna mRNA-1273 fue desarrollada por el Instituto Nacional de Alergias y enfermedades Infecciosas (NIAID), EE. UU; actualmente se encuentra en la fase I de desarrollo clínico para evaluar la seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna en voluntarios sanos(15).

Ad5-nCoV: Ad5-nCoV

Es la primera nueva vacuna modificada genéticamente para COVID-19 desarrollada por CanSino Biologics y el Instituto de Biotecnología de Beijing, China. La vacuna utiliza adenovirus tipo 5 de replicación defectuosa como vector para expresar la proteína de pico de SARS-CoV-2. Actualmente, la vacuna AD5-nCoV se encuentra en un ensayo clínico de fase I activo para investigar su seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad en voluntarios sanos entre 18 y 60 años de edad (15).

Vacuna BCG: desde 1921

La vacuna BCG se ha utilizado ampliamente para prevenir la tuberculosis y la lepra. Sin embargo, actualmente no hay evidencia de que la vacuna BCG sea eficaz contra las infecciones por coronavirus, se cree que la vacuna BCG puede ayudar a reforzar el sistema inmunológico, reduciendo así las tasas de infección del SARS-CoV-2

CAPITULO IV

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar y describir las características y utilidad de las técnicas fenotípicas y moleculares disponible en el Mercado para la detección del virus SARS-COV-2.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Explicar los fundamentos de las pruebas principales para la detección del COVID 19.
- Comparar parámetros analíticos y limitaciones de cada prueba en los diferentes estadios de la enfermedad.
- Conocer los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas fenotípicas y moleculares útiles para detectar el virus SARS-COV-2.

CAPITULO V

METODOLOGIA

Se realizó una búsqueda sistemática de artículos en español e inglés, sobre las bases de datos PubMed, ScienceDirect, Scopus, Medline y Web of Science relacionados con la enfermedad COVID-19. Se tendrá en cuenta artículos recientes (desde Dcbre 2019 hasta el mes de septiembre) para obtener la información. Se espera con esta revisión mostrar la utilidad y la sensibilidad, especificidad y limitaciones de las diferentes técnicas fenotípicas y genotípicas que ayuden a un diagnóstico temprano del COVID – 19. Este trabajo se desarrollará dando forma a los objetivos planteados.

Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) para el diagnóstico de COVID-19 están diseñadas para detectar secuencias de ARN vírico únicas en genes N, E, S o ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). El genoma viral del SARS-CoV-2 original se secuenció y se lanzó en enero de 2020 (10), lo que permitió un rápido desarrollo de las NAAT de COVID-19, ya que ofrecen una alta precisión. Después de tomar muestras y transportarlas a los laboratorios, los resultados se obtienen normalmente en un par de horas con un límite de detección (LOD) de hasta 0,02 copias / μ L (11). Este tipo de ensayo se recomiendan para la detección de enfermedades en fase aguda incluso cuando los pacientes tienen síntomas leves o inespecíficos (p. Ej., Fiebre, tos). Hay varios NAAT disponibles para el diagnóstico de COVID-19 (10). Un factor preanalítico importante la recolección y el almacenamiento de muestras porque si no se realizan adecuadamente afecta el rendimiento general del ensayo. enumeran muestras del tracto respiratorio superior e inferior, como hisopos nasofaríngeos (NP) u orofaríngeos (OP), esputo, aspirados del tracto respiratorio inferior, lavado broncoalveolar y lavado / aspirado nasofaríngeo o aspirado nasal (CDC, 2020a). Las fuentes alternativas incluyen saliva (10), hisopos anales, orina y heces, lágrimas y secreciones conjuntivales, para los diagnósticos iniciales, el US-CDC recomienda recolectar una muestra de las vías respiratorias superiores, dando prioridad al hisopo NP, aunque los hisopos OP siguen siendo un tipo de muestra aceptable (11).

Prueba de RT-PCR COVID-19

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) fue el primer método desarrollado para la detección de COVID-19 y es el Gold standard actual(10). Los ácidos nucleicos cargados negativamente se unen selectivamente a la superficie de sílice cargada positivamente en presencia de iones caotrópicos. Después de los pasos de lavado, los ácidos nucleicos adsorbidos se eluyen con una solución baja en sal, para eliminar la contaminación del ADN, el eluato se trata con DNasa, seguido de un tratamiento térmico (15 min, 70 ° C) para inactivar la DNasa (10). El ARN viral extraído se mezcla con reactivos que contienen cebadores de genes diana, sondas y controles de RT-PCR y se amplifica. Dependiendo del diseño de la sonda, los productos de la PCR se pueden detectar durante el proceso de amplificación (PCR cuantitativa, qPCR) o después de su finalización. La precisión analítica de COVID-19 RT-PCR se basa principalmente en el diseño del cebador, debido a la alta similitud genómica entre las diferentes especies de coronavirus, la identificación de secuencias genéticas únicas es importante para eliminar la reactividad cruzada (10). RT-PCR ofrece alta precisión y rendimiento.

El panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV de los CDC demostró una sensibilidad clínica del 100% (13/13; IC del 95%: 77,2% -100%) y una especificidad clínica del 100% (104/104; IC del 95% : 96,4% -100%)(16).

COVID19-NAAT basado en amplificación isotérmica

La utilización de amplificación isotérmica permitió el desarrollo de COVID-19-NAAT. Esta técnica de amplificación utiliza ADN polimerasas especializadas con capacidad de desplazamiento de cadena; las polimerasas pueden abrirse camino y descomprimir un ADN de doble hebra mientras sintetizan una hebra complementaria. Es importante destacar que la reacción tiene lugar a una temperatura fija, eliminando los pasos de ciclos térmicos y simplificando así el diseño del dispositivo. Se han adaptado varios métodos de amplificación isotérmica para detectar dianas de ARN del SARS-CoV-2 (10). Se demostró que las sensibilidades analíticas de esos métodos de amplificación isotérmica eran comparables a las de la RT-PCR, pero con un tiempo de ensayo más corto (<1 h). Los NAAT isotérmicos tienen aplicaciones únicas en el diagnóstico del COVID-19, proporcionando resultados rápidos sin necesidad de equipo especializado(10). Las pruebas basadas en amplificación isotérmica

mediada por transcriptasa inversa mostraron una sensibilidad entre 80% y 100%, y una especificidad entre 73% y 100% para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (17).

Amplificación isotérmica mediada por bucle

Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) utiliza 4 o 6 cebadores, la orientación 6-8 regiones en el genoma, y Bsm ADN polimerasa (11). Cuando comienza la reacción, los pares de cebadores generan una estructura de ADN en forma de mancuerna, que posteriormente funciona como el iniciador LAMP (10). El método puede generar ~10⁹ copias de ADN en una hora, y la reacción tiene lugar a una temperatura constante entre 60 ° C y 65 ° C. La enzima es resistente a los inhibidores en muestras complejas, por lo que es posible utilizar muestras biológicas (sangre, orina o saliva) con un procesamiento mínimo. La reacción LAMP produce pirofosfato de magnesio como subproducto, que se puede aprovechar para la lectura visual del ensayo utilizando indicadores sensibles a los metales o tintes sensibles al pH. Las pruebas LAMP aprobadas por la FDA ya están disponibles para la detección de Salmonella y Citomegalovirus (10). (10). Las pruebas basadas en amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP) mostraron una sensibilidad entre 90% y 100%, y una especificidad entre 80% y 100% para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (17).

Inmunoensayos COVID-19

Los inmunoensayos detectan la presencia de antígenos específicos de virus o anticuerpos contra virus. Los NAAT son ideales para diagnosticar infecciones virales durante su fase inicial; Los inmunoensayos, en específico las pruebas de anticuerpos, pueden permitir la detección de infecciones pasadas o en curso, promoviendo una mejor comprensión de la dinámica de transmisión(11). Los inmunoensayos también pueden aumentar las NAAT para reducir los resultados falsos negativos; los antígenos y anticuerpos son más estables que el ARN y, por lo tanto, menos susceptibles a la degradación durante el transporte y almacenamiento (10). La sensibilidad de las distintas pruebas de diagnóstico rápido en comparación con la RT-PCR en muestras de las vías respiratorias superiores (hisopados nasofaríngeos) es muy variable, por el contrario, la especificidad es alta (18).

Pruebas serológicas

Se basa en pruebas realizadas a través de sangre o/y sus componentes para detectar anticuerpos contra virus producidos por el huésped (11). Epidemias de SARS anteriores

mostraron que la inmunoglobulina M (IgM) específica del virus aparece dentro de una semana de la infección, seguida de la producción de IgG para la inmunidad a largo plazo (~ 2 años) (10). Los datos inmunológicos para COVID-19 aún no han salido, pero un estudio reciente (4) indicó un patrón temprano similar, la positividad de IgM fue mayor que la de IgG durante los primeros días de inicio de la enfermedad, y luego se redujo en aproximadamente 1 mes (10). La utilidad potencial de las pruebas serológicas, no para diagnosticar COVID-19, sino como una amplia herramienta de detección ya que la prueba de anticuerpos data de para un muestreo aleatorio (es decir, una encuesta serológica), las agencias de salud pública pueden estimar el tamaño real de la infección (prevalencia) y su tasa de mortalidad(10). La sensibilidad del ensayo es aproximadamente de 93,8% y la especificidad del ensayo es de 96,0% (16).

Pruebas de diagnóstico rápido

Las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) se basan en la detección de anticuerpos del huésped en una membrana de nitrocelulosa. Fáciles de operar y portátiles, estas pruebas son adecuadas para análisis POC de sangre por punción digital, saliva o fluidos de hisopos nasales. Las muestras se dejan caer en una plataforma de carga y se transfieren mediante movimiento capilar. Durante este flujo, los anticuerpos de la muestra se unen a las nanopartículas y todo el complejo se captura aguas abajo en puntos designados de la membrana mediante anticuerpos antihumanos (10). Los resultados finales generalmente se muestran como líneas de colores para la detección a simple vista: una línea de control que confirma la confiabilidad de la prueba y una (s) línea (s) de prueba que indica la presencia de anticuerpos diana (10). Esta prueba tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad del 98%.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ELISA es una prueba de laboratorio con alta sensibilidad y rendimiento, por lo general, utiliza una placa de múltiples pocillos recubierta con proteínas virales. Las muestras de sangre, plasma o suero de los pacientes se introducen en estos pocillos para la captura de anticuerpos y luego se lavan. Posteriormente, se agregan anticuerpos secundarios marcados con enzimas, lo que cataliza la generación de señales. El formato de ensayo se puede adaptar para diferentes modalidades de detección, incluidos los métodos colorimétricos, fluorescentes y electroquímicos (10). La sensibilidad del ensayo es aproximadamente de 88.66% y la especificidad del ensayo es de 95% (16).

Ensayo de detección de antígenos

Este ensayo detecta la presencia de proteínas virales (antígenos) a través de un formato de inmunocaptura convencional, los antígenos virales pueden detectarse cuando el virus se está replicando activamente, lo que hace que este tipo de ensayo sea muy específico. El ensayo, sin embargo, tiene una sensibilidad subóptima y generalmente requiere concentraciones suficientes de antígeno en las muestras. Los datos de las pruebas de antígenos de la influenza mostraron una sensibilidad del 61% y una especificidad del 98%. Por lo tanto, el uso potencial de los ensayos de antígenos podría ser una prueba de triaje para identificar rápidamente a los pacientes que probablemente tengan COVID-19, reduciendo o eliminando la necesidad de pruebas moleculares de confirmación prolongadas. Se han generado anticuerpos monoclonales contra la proteína N del SARS-CoV-2 y se están desarrollando varios kits de prueba rápida (10). Sin embargo, la utilidad analítica de estas pruebas antigénicas rápidas depende de diferentes factores, tales como la carga viral, la calidad de la muestra y cómo se procesa (18); Entre las ventajas se encuentra que es de rápida respuesta, menor costo y no exige equipos o habilidades especiales en comparación con las técnicas moleculares, no obstante tienen baja sensibilidad en comparación de la RT-PCR (18). La prueba de detección rápida de antígenos es capaz de detectar SARS-CoV-2 con alta sensibilidad en muestras nasofaríngeas con alta carga viral equivalente al menos a $1,7 \times 10^5$ copias / mL (CT <25), pero la sensibilidad disminuye sustancialmente cuando la carga viral disminuye con valores de CT más de 30, lo que equivale a $9,4 \times 10^3$ copias / ml, que es a menudo el caso en pacientes que sufren de COVID-19 (18).

Muchas empresas e institutos se esfuerzan por desarrollar métodos eficaces para la detección rápida del ácido ribonucleico (ARN) del SARS-CoV-2, los anticuerpos, los antígenos y el virus.

Prueba molecular de la empresa Bosch (Alemania)

Vivalytic. La nueva prueba totalmente automatizada ofrece resultados fiables que permiten un diagnóstico diferencial en menos de 2,5 horas, funcionando con el dispositivo de análisis Vivalytic de Bosch Healthcare Solutions, puede apoyar instalaciones médicas como consultorios médicos, hospitales, laboratorios y centros de salud en la realización de diagnósticos rápidos. La prueba rápida de Bosch es una de las primeras pruebas de diagnóstico molecular completamente automatizadas del mundo que pueden ser utilizadas

directamente por todas las instituciones médicas. Además, permite analizar una sola muestra no solo para COVID-19 sino también para otras nueve enfermedades respiratorias, incluidas la gripe A y B, simultáneamente. “La característica especial de la prueba de Bosch es que ofrece un diagnóstico diferencial, lo que ahorra a los médicos el tiempo adicional necesario para realizar más pruebas. También les proporciona un diagnóstico confiable rápidamente para que puedan comenzar un tratamiento adecuado más rápido “, dice Marc Meier, presidente de Bosch Healthcare Solutions GmbH. La prueba es el resultado de la colaboración entre la filial Bosch Healthcare Solutions de la compañía y la compañía de tecnología médica de Irlanda del Norte Randox Laboratories Ltd. “Junto con nuestro socio Randox, hemos logrado desarrollar esta prueba rápida innovadora en muy poco tiempo marco, y ahora estamos en condiciones de ofrecerlo al mercado. El dispositivo de análisis Vivalytic de Bosch evalúa la prueba de forma segura y confiable directamente en el hospital, en el laboratorio o en el consultorio del médico, garantizando la mejor protección posible para los pacientes y el personal médico”, dice Meier. Actualmente, la compañía está examinando cómo puede ayudar a los médicos y al personal de enfermería en instalaciones médicas como el Hospital Robert Bosch a hacerse la prueba de inmediato para que puedan estar en forma para trabajar el mayor tiempo posible, sin riesgo de infectar a otros. En varias pruebas de laboratorio con SARS-CoV-2, la prueba de Bosch arrojó resultados con una precisión de más del 95% (sensibilidad de 98% y 100% de especificidad), la prueba rápida cumple con los estándares de calidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se toma una muestra de la nariz o garganta del paciente con un hisopo. Luego, el cartucho, que ya contiene todos los reactivos necesarios para la prueba, se inserta en el dispositivo Vivalytic para su análisis; el analizador Vivalytic está diseñado para ser tan fácil de usar que incluso el personal médico que no ha sido especialmente capacitado en él, puede realizar la prueba de manera confiable; esta prueba es similar al ensayo Abbott RealTime SARS - CoV - 2 en el sentido de que reduce el tiempo de intervención y puede confirmar una prueba positiva en 2,5 h y se basa en la forma de prueba más abundante en este momento que se está utilizando, es decir, se basa en la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa RT-PCR (19).

Prueba Neokit-Plus-Covid 19 (Argentina).

Científicos argentinos presentaron el nuevo NEOKIT PLUS. El nuevo test de COVID-19 más eficiente y sencillo de utilizar, que cuenta con la aprobación de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina (ANMAT). El NEOKIT PLUS es un test diagnóstico molecular sensible y específico, simplificado y abreviado con varias características únicas:

- Indica si esta, o no, presente el virus de COVID-19, tanto en casos sintomáticos como asintomáticos
- Puede aplicarse en una muestra de saliva o en hisopado directo – es decir que evita el paso de “extracción de ARN”, necesario para la versión anterior y para la rtPCR
- Simplifica procesos y ahorra tiempo
- Reduce gastos de reactivos e inversiones en equipamientos de laboratorio
- Es accesible para centros de salud de baja complejidad.

“El paso inicial, de inactivación del virus, permite realizar el test de forma segura en condiciones de infraestructura muy simple, ampliando la posibilidad de hacer testeos en ciudades y pueblos donde, hasta ahora, no se podían procesar localmente las muestras. Son aptos también para la apertura de industrias, testeo de turistas, controles laborales y control de arribos de personas de otros distritos”. Y agregaron: “Contar con una herramienta de diagnóstico molecular simplificada y abreviada como NEOKIT PLUS permite rastrear y testear activamente - es decir: identificar y diagnosticar a todos los contactos estrechos de una persona infectada (sintomática o asintomática, cuya capacidad de contagio, cuando presenta alta carga viral, ha sido ampliamente demostrada) así como testeos poblacionales al azar, por necesidades específicas”. Esta prueba tiene (sensibilidad de 100% y 99,88% de especificidad),

Prueba 2019-nCoV RT-PCR

Los CDC desarrollaron uno de los primeros paneles de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real para el SARS-CoV-2. El panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV de los CDC. Es una prueba diseñada para detectar cualitativamente dos regiones diferentes del gen N: N1 y N2, así como el gen RNasa P(RP) a partir de hisopos NP / OP, esputo, aspirados traqueales o muestras de líquido de lavado broncoalveolar. La prueba del gen RP actúa como

un control interno para verificar que la RT-PCR se realizó correctamente. La RT-PCR está diseñada para ejecutarse en el instrumento Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx RT-PCR y tarda unos 35 minutos en completarse. La sensibilidad analítica de la prueba se determinó en una serie de estudios de dilución utilizando muestras caracterizadas con ARN de longitud completa enriquecido del gen N de títulos conocidos. La concentración más baja en la que al menos el 95% de las réplicas fueron positivas se estableció como límite de detección (LoD). Se encontró que el LoD del panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV de los CDC era de 10 copias / μ L. Para evaluar su desempeño clínico, los CDC evaluaron un total de 117 muestras respiratorias recolectadas de un puñado de sujetos sospechosos que también fueron probados con un comparador compuesto que consta de dos ensayos de RT-PCR validados analíticamente que se enfocaron en dos regiones únicas del gen N, N4 y N5. Las muestras que dieron positivo en la prueba del Panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV, así como el comparador compuesto, se investigaron más a fondo y se confirmó que eran positivas para el SARS-CoV-2 mediante secuenciación genética. El panel de diagnóstico de RT-PCR en tiempo real 2019-nCoV de los CDC tiene una sensibilidad clínica del 100% (13/13; IC del 95%: 77,2% -100%) y una especificidad clínica del 100% (104/104; IC del 95%: 96,4% -100%) (16).

Prueba de Feluda (India)

Un grupo de científicos en la India ha creado una prueba, similar a las rápidas de embarazo, que utiliza la técnica de ‘tijeras moleculares’ CRISPR-Cas9, para detectar de manera confiable y a bajo costo el nuevo coronavirus. Se trata de un desarrollo hecho por la genetista francesa Emmanuelle Charpentier y la estadounidense Jennifer Doudna, que acaban de ser galardonadas con el Premio Nobel de Química.

Las expertas han informado que el nuevo test estará disponible pronto en la India y funciona con la apariencia de un kit, con muestras tomadas por hisopos nasales. Tiene una tira donde aparecen dos trazos de color si el resultado es positivo. El tiempo de espera que se estima para el diagnóstico es de una hora. Es un test Feluda, porque utiliza una tira de papel reactivo apodada así, ya ha recibido la luz verde de las autoridades de regulación indias. El ministro de Salud Harsh Vardhan aseguró la semana pasada que podría ser desplegado en el país por el conglomerado industrial Tata en las próximas semanas. El prototipo necesita el uso de un termociclador o una máquina PCR, pero se está trabajando en una versión basada en la saliva

o hisopos susceptibles de poder ser utilizados en casa, esta nueva prueba tiene una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98%. El Dr. Bhan dijo a la BBC que cree que la prueba de Feluda podría potencialmente reemplazar las pruebas de antígenos porque podría ser comparativamente más barata y más precisa.

La prueba COVID-19 mRT-LAMP-LFB (China)

Es una prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa múltiple (mRT-LAMP) junto con un ensayo de biosensor de flujo lateral (LFB) basado en nanopartículas (mRT-LAMP-LFB) para diagnosticar COVID-19. Usando dos conjuntos de cebadores LAMP, los genes ORF1ab (marco de lectura de apertura 1a / b) y N (nucleoproteína) del SARS-CoV-2 se amplificaron simultáneamente en una reacción de un solo tubo y se detectaron con los resultados del diagnóstico fácilmente interpretados por LFB. En presencia de cebadores marcados con FITC (fluoresceína) / digoxina y biotina, mRT-LAMP produjo numerosos amplicones dúplex unidos a FITC / digoxina y biotina, que fueron determinadas por LFB a través de inmunorreacciones (FITC / digoxina en el dúplex y anti-FITC / digoxina en la línea de prueba de LFB) y la interacción biotina / treptavidina (biotina en el dúplex y estrptavidina en la nanopartícula de polimerasa). La acumulación de nanopartículas condujo a una banda carmesí característica, lo que permitió el análisis multiplex de ORF1ab y el gen N sin instrumentación. El límite de detección (LoD) de COVID-19 mRT-LAMP-LFB fue de 12 copias (para cada objetivo de detección) por reacción, y no se generó reactividad cruzada a partir de plantillas que no eran de SARS-CoV-2. La sensibilidad analítica del SARS-CoV-2 fue del 100% (33/33 muestras de hisopos de orofaringe recolectadas de pacientes con COVID-19) y la especificidad del ensayo también fue del 100% (96/96 muestras de hisopos de orofaringe recolectadas de pacientes sin COVID-19). La prueba de diagnóstico total se puede completar en 1 h desde la recolección de la muestra hasta la interpretación de los resultados. En resumen, el ensayo COVID-19 mRT-LAMP-LFB es una herramienta prometedora para el diagnóstico de infecciones por SARS-CoV-2 en el campo de la salud pública y laboratorios clínicos de primera línea, especialmente en regiones de escasos recursos.

Prueba ID NOW COVID-19 de Abbott (USA)

El principio de ID NOW COVID-19 es el uso de una reacción de amplificación isotérmica de endonucleasa mellada para generar rápidamente amplicones cortos, donde la detección se

logra en tiempo real utilizando balizas moleculares marcadas con fluorescencia (17). (sensibilidad de 96,2% y 99,5% de especificidad).

Flu SC2, ensayo multiplexado de RT-PCR (CDC)

El ensayo múltiple de los CDC Influenza SARS-CoV-2 (Flu SC2) es una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real que detecta y diferencia el ARN del SARS-CoV-2, el virus de la influenza A y la influenza B virus en muestras respiratorias superiores o inferiores. El ensayo proporciona una herramienta de diagnóstico sensible a base de ácido nucleico para la evaluación de muestras de pacientes en la fase aguda de la infección. Esta prueba es altamente sensible y con una especificidad alta (sensibilidad de 100% y 100% de especificidad).

Panel respiratorio BioFire 2.1 (RP2.1) (USA)

La filial de BioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francia), BioFire Diagnostics, recibió la autorización de uso en emergencias de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos para el panel BIOFIRE RP2.1, que abarca 22 patógenos que causan infecciones respiratorias, incluido el SARS-CoV-2. La inclusión del SARS-CoV-2 en el panel BIOFIRE RP2.1 permite a los proveedores de atención médica identificar rápidamente a los pacientes con patógenos respiratorios comunes, así como a aquellos con COVID-19, utilizando una prueba simple. El panel BIOFIRE RP2.1 se demora aproximadamente 45 minutos y analiza muestras de torunda nasofaríngea en medios de transporte. Funciona en los sistemas FILMARRAY 2.0 y FILMARRAY TORCH totalmente automatizados y es extremadamente fácil de usar. La prueba BIOFIRE RP2.1 es la tercera prueba molecular de BioMérieux en respuesta a la pandemia de COVID-19, luego del lanzamiento de la prueba ARGENE SARS-CoV-2 R-GENE y la prueba BIOFIRE COVID-19 por parte de la compañía en marzo. BioMérieux planea presentar el panel BIOFIRE RP2.1 para la aprobación de novo de la FDA. Fuera de los EUA, BioMérieux busca simultáneamente la certificación de Marca CE para el panel BIOFIRE Respiratory 2.1plus (RP2.1plus), que también incluye la detección del MERS-CoV, en una línea de tiempo acelerada. La compañía destacó la necesidad del enfoque sindrómico de BioFire al señalar que los datos emergentes sugieren que los pacientes con COVID-19 con frecuencia pueden estar coinfectados con otros virus y/o bacterias. Esta prueba presenta una sensibilidad de 98% y 100% de especificidad.

Argene SARS-CoV-2 R-GENE (Alemania)

El Kit de PCR en tiempo real para la detección del agente causal de COVID-19, de la gama ARGENE®. Esta es la primera de tres nuevas pruebas de diagnóstico que bioMérieux ha desarrollado. ARGENE SARS-CoV-2 R-GENE (IVD-CE) aprobado por la A.N.M.A.T., Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, cuenta con un sistema de verificación (control interno) que permite descartar presencia de inhibidores. Consta de una PCR específica para SARS-COV-2 dirigida a los genes N & RdRp y la posibilidad de realizar una segunda PCR genérica para beta-coronavirus y un gen celular que permite evaluar la calidad de la muestra.

Ante la urgencia de la epidemia de COVID-19, bioMérieux se compromete a proporcionar un enfoque de diagnóstico integral que cumpla con los más altos estándares de rendimiento y calidad para ayudar a los médicos a dar una respuesta efectiva al brote, comentó el Dr. Mark Miller, Vicepresidente Ejecutivo y Director Médico de bioMérieux

Al igual que todas las pruebas en la gama ARGENE®, la prueba SARS-COV-2 R-GENE® puede ser realizada por cualquier laboratorio utilizando tecnología de PCR en tiempo real en la mayoría de las plataformas de extracción y amplificación de ácido nucleico disponibles comercialmente. Una gran cantidad de muestras de pacientes pueden procesarse simultáneamente entregando resultados en 4 a 5 horas. Esta prueba tiene una sensibilidad de 98% y 100% de especificidad.

Cobas SARS-CoV-2 & Influenza A/B. Roche Molecular Systems, Inc. (Suiza)

La prueba cobas ® SARS-CoV-2 & Influenza A / B es un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa multiplex (RT-PCR) diseñado para la detección cualitativa simultánea y la diferenciación de SARS-CoV-2, virus de la influenza A y / o influenza. Virus B en muestras de hisopos nasales o nasofaríngeos recolectadas de individuos sospechosos de una infección viral respiratoria consistente con COVID-19. Con una sensibilidad de 97,1% y 99,3% de especificidad.

Panel respiratorio QIAstat-Dx SARS-CoV-2 (Alemania)

Es un panel de pruebas moleculares diseñado para ayudar en el diagnóstico de pacientes con síndromes respiratorios, en aproximadamente una hora, al diferenciar el nuevo coronavirus de otros 21 patógenos respiratorios bacterianos y virales. El panel de QIAGEN incluirá

ensayos dirigidos a dos genes utilizados para detectar el patógeno detrás de la enfermedad, el coronavirus 2 relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). Este panel tiene una sensibilidad de 98% y una especificidad del 99% (16).

Prueba de Elisa: Elipse-Col (Colombia)

Es una prueba que detecta anticuerpos (PRUEBA COLOMBIANA DE Universidad Nacional). Prueba serológica en sangre capaz de detectar si alguien que estuvo en contacto con el SARS-CoV-2 y generó anticuerpos, e incluso si fue sintomático o asintomático, es el resultado del trabajo de investigadores de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), en conjunto con el Instituto Nacional de Salud (INS) al que llamaron ELIPSE-COL. Si alguien quiere saber si se infectó con el nuevo coronavirus, le toman una muestra de sangre que centrifugan y separan la parte sólida de la líquida para obtener el líquido conocido como plasma o suero, en el que encuentran los anticuerpos que produjo como respuesta al virus. Por último, el plasma se analiza con la prueba ELIPSE-COL (20). Los investigadores señalan tres oportunidades primordiales de esta prueba diagnóstica:

- El equipo necesario para esta prueba (espectrofotómetro o lector de ELISA) se encuentra en laboratorios del país desde hace cuatro décadas.
- El costo de este equipo puede estar cercano a los 7 millones de pesos, por tanto, los laboratorios de diagnóstico podrían adquirirlos con facilidad.
- Las pruebas permitirían llegar con rapidez a municipios y zonas apartadas del país (20).

Esta prueba presenta una sensibilidad de 91% y 91% de especificidad.

Prueba de Elisa: Coavid Kavach (India)

El kit Kavach IgG ELISA aprobado en la India para detectar anticuerpos Ig G en estudios de seroprevalencia, se desarrolló en mayo/2020 y obtuvo la licencia de Zydus Cadila, Ahmedabad. Los informes sugieren que es uno de los kits más utilizados en los estudios epidemiológicos de seroprevalencia. Presenta una sensibilidad de 95% y 98% de especificidad.

Test de Abbott Laboratories: BinaxNOW COVID 19 Ag Card (USA)

Detecta antígeno del virus. La prueba rápida de antígeno BinaxNOW™ COVID-19 Ag Card, que ha recibido la autorización de uso de emergencia (EUA) de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). Esta prueba ofrece resultados en 15 minutos y está disponible como una ayuda para diagnosticar el virus que causa COVID-19.

La prueba BinaxNOW se puede mostrar en nuestra nueva aplicación opcional, disponible sin cargo, para dispositivos iPhone y Android llamada NAVICA™. Esta aplicación, la primera en su tipo, permitirá a las personas con resultados negativos tener un pase de salud digital cifrado temporal que muestre sus resultados. "Diseñamos intencionalmente la prueba BinaxNOW y la aplicación NAVICA para poder ofrecer una solución de prueba integral para ayudar a los estadounidenses a sentirse más seguros acerca de su salud y sus vidas", dijo Robert B. Ford, presidente y director ejecutivo de Abbott. "BinaxNOW y la aplicación NAVICA nos brindan una prueba asequible, fácil de usar y escalable, y una herramienta de salud digital que nos ayuda a tener un poco más de normalidad en nuestra vida diaria".

Así es como funciona

- El trabajador de la salud abre la tarjeta y la deja plana sobre una mesa.
- Se agrega reactivo de extracción a la tarjeta de prueba, que es aproximadamente del tamaño de una tarjeta de crédito.
- Se toma un hisopo nasal del paciente.
- Un técnico inserta el hisopo en la tarjeta de prueba, dobla la cubierta y en 15 minutos lee el resultado.
- Las personas que utilicen la aplicación y reciban un resultado negativo en la prueba recibirán un pase de salud digital encriptado temporal a través de un código QR (similar al pase de abordar de una aerolínea) enviado a la aplicación NAVICA. El pase digital se renueva cada vez que una persona recibe un resultado negativo de la prueba e incluye la fecha del último envío del resultado de la prueba. Las organizaciones podrán ver y verificar la información en un dispositivo móvil para facilitar la entrada a estos lugares, junto con el lavado de manos, el distanciamiento social, la limpieza mejorada y el uso de máscaras.

- Aquellos que den positivo recibirán un mensaje a través de la aplicación diciéndoles que se pongan en cuarentena y hablen con su médico.
- La prueba BinaxNOW, que es para uso de profesionales de la salud, tiene características que la hacen deseable para probar millones.
- Fácil de usar.
- Asequible.
- Altamente portátil, no requiere instrumentación.
- Fiable, con una sensibilidad del 97,1% y una especificidad del 98,5%.
- Rápido, con resultados en 15 minutos.

BinaxNOW COVID-19 Ag Card se une a nuestras pruebas lanzadas anteriormente, incluidos los sistemas de laboratorio molecular de alto volumen m 2000 y Alinity™ m, las plataformas moleculares rápidas de punto de atención ID NOW™, las pruebas de anticuerpos para nuestro ARCHITECT® i1000SR e i2000SR de alto rendimiento e instrumentos de laboratorio Alinity i. Todos están disponibles en los EE. UU. A través de FDA EUA.

Prueba Coris COVID-19 Ag Respi-Strip (Belgica)

Esta prueba está lista para usar y se basa en una tecnología de membrana con nanopartículas de oro coloidal. Se sensibiliza una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos monoclonales frente al antígeno de la nucleoproteína del SARS-CoV y el SARS-CoV-2, altamente conservado; otro anticuerpo monoclonal se conjuga con nanopartículas de oro coloidal. El conjugado se inmoviliza en una membrana. El objetivo de esta prueba es la detección del SARS-CoV-2 tanto en las secreciones nasofaríngeas como en el sobrenadante del cultivo tras varios días, con el fin de lograr una mejor sensibilidad. Cuando las SNF (secreciones nasofaríngeas) o la solución extraída del cultivo entran en contacto con la tira, el conjugado solubilizado migra con la muestra mediante difusión pasiva y tanto el conjugado como el material de la muestra entran en contacto con el anticuerpo anti-SARS adsorbido en la tira de nitrocelulosa; si la muestra contiene SARS-CoV-2, el complejo conjugado-SARS-CoV permanecerá unido al anticuerpo anti-SARS-CoV-2 inmovilizado en la nitrocelulosa. El resultado es visible a los 15 minutos en forma de una línea roja que aparece en la tira, la

solución continúa migrando hasta que se encuentra con un reactivo de control que se une a un conjugado de control, lo que produce una segunda línea roja.

Es una prueba inmunocromatográfica rápida para la detección del antígeno SARS-CoV-2. COVID-19 Ag Respi-Strip (Coris BioConcept, Gembloux, Belgium) Se probaron 148 hisopos nasofaríngeos. Entre las 106 muestras positivas de RT-qPCR, 32 fueron detectadas por la prueba rápida de antígenos, dada una sensibilidad general del 30,2%. Todas las muestras detectadas positivas con la prueba rápida de antígenos también fueron positivas con RT-qPCR. La tira tiene una precisión del 50% (18).

Prueba rápida qSARS-CoV-2 IgG / IgM de Cellex (CDC)

Es un inmunoensayo de flujo lateral que proporciona resultados en 15 a 20 minutos y se utiliza para detectar anticuerpos IgG e IgM del paciente contra el SARS-CoV-2. La prueba se puede utilizar en muestras de suero, plasma o sangre completa. Para evaluar el rendimiento clínico del ensayo, se analizaron 128 pacientes positivos para SARS-CoV-2 y 250 pacientes de control negativo. La sensibilidad clínica del ensayo fue del 93,8% (120/128; IC del 95%: 88,2% -96,8%) y la especificidad clínica del ensayo fue del 96,0% (240/250; IC del 95%: 92,8% -97,8%). La prueba Cellex abrió el camino para otras pruebas de inmunoensayo de flujo lateral para detectar IgG e IgM, como la prueba rápida Autobio Diagnostics Anti-SARS-CoV2 y el sistema DPP COVID-19 IgM / IgG de Chembio Diagnostic System, que también fue aprobado para EUA por la FDA. Esta prueba es ventajosa porque no depende de la detección visual para la detección de IgG / IgM; en cambio, utiliza el microlector DPP para una lectura cualitativa, evitando la posibilidad de sesgos o malas interpretaciones del usuario. La especificidad clínica del ensayo es del 97,6% para IgM, 96,8% para IgG y 94,4% para IgM e IgG combinadas (16).

Prueba rápida Autobio Diagnostics Anti-SARS-CoV2

La prueba rápida de inmunoensayo Anti-SARS-CoV-2 (COVID-19) se basa en un método de oro coloidal para la determinación rápida y cualitativa de Anti-SARS-CoV-2 (anticuerpos IgG/IgM del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2) en suero humano, plasma o sangre total en aproximadamente 15 minutos. Presenta una Sensibilidad: 88,15% y una Especificidad: 99,04%.

Este ensayo se basa en el método de captura en un solo paso. Contiene una membrana, que está recubierta previamente con dos anticuerpos monoclonales antihumanos de ratón (anti-IgG y anti-IgM) en dos líneas de prueba separadas.

La prueba rápida Anti-SARS-CoV-2 (COVID-19) fue desarrollada por Autobio Diagnostics, socio clave de ReactLab. Autobio es una compañía líder en diagnóstico clínico en el mercado chino y a nivel mundial (16).

CAPITULO VI

RESULTADOS / DISCUSION

La prueba RT-PCR es la técnica de referencia y de elección en la actualidad para el diagnóstico de COVID-19. Es la prueba más sensible y fiable de los métodos disponibles. Tarda entre 2 y 4 horas en dar un resultado. Este puede ser positivo (presencia del virus en la muestra) o negativo (ausencia del virus) a pesar de ser una prueba segura no está exenta a errores aleatorios por parte del operador de las técnicas y equipos utilizados para la realización de la prueba. Su sensibilidad y especificidad es de 100%. Limitación de la prueba: Esta prueba se realiza en laboratorios de microbiología clínica y necesita personal experto en microbiología molecular y además medidas de bioseguridad. Por otro lado, se necesitan entre 3 a 4 horas para obtener resultados, esto implica un límite en la cantidad de pruebas que un laboratorio puede llevar a cabo, por ello se está poniendo en marcha pruebas rápidas de PCR que permiten realizar hasta 1200 pruebas al día con un procedimiento automatizado. Otra limitación es la disponibilidad de los reactivos necesarios, especialmente en estos momentos en los que la demanda a nivel mundial de estas pruebas ha provocado escasez. La contaminación o la degradación también pueden causar problemas por falsos negativos. También por la acción de inhibidores presentes en la muestra que afecta la sensibilidad de la prueba causando falsos negativos.

Las pruebas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo son pruebas cualitativas que solo ofrecen resultado positivo o negativo. La limitación de estas pruebas depende en gran medida de la calidad de la muestra (presencia suficiente del virus o sus proteínas) ya que poseen una sensibilidad baja.

Las pruebas rápidas ofrecen un resultado de 10 a 15 minutos y a pesar de su rapidez, son mucho menos fiables que la RT-PCR por lo que se completa con esta técnica si es resultado es dudoso; para infección inicial no servirían. Las pruebas serológicas consisten en la detección de anticuerpos que produce el organismo frente a la infección, la limitación más grande estaría que al inicio de la infección aun no se genera producción de anticuerpos por eso no es efectiva en esta fase. Las cargas virales más altas se asocian con mejores tasas de detección de antígenos en las pruebas de detección de antígeno.

Queda en evidencia que todos los métodos desarrollados para el COVID-19 son sistemas que cumplen con los criterios establecidos para la detección del SARS-CoV-2, y se compararon los sistemas para evaluar cuál de ellos se ejecuta más rápido, y queda demostrado que el sistema con mayor rendimiento en tiempo son las pruebas rápidas, seguidos de las pruebas inmunológicas, y luego las pruebas de detección de ARN del virus.

Las diferentes técnicas descritas anteriormente demuestran que no todas se pueden utilizar como prueba diagnóstica para el COVID-19 ya que todas no presentan la misma sensibilidad y la misma especificidad. Las pruebas más recientes para detección de COVID-19 que salen al mercado se deberán valorar en el futuro en forma suficiente en la población para determinar su eficacia analítica, sensibilidad y especificidad para mostrar casos falsos negativos y falsos positivo, y en consecuencia su utilidad. Las cargas virales más altas se asocian con mejores tasas de detección de antígenos en las pruebas de detección de antígeno. Basados en la experiencia se ha demostrado que la prueba RT-PCR es sumamente eficaz para un buen diagnóstico del COVID - 19 ya que permite evidenciar la replicación del virus en tiempo real; es decir, que si en una muestra procesada se presenta amplificación en la secuenciación génica para epítopes buscados compatibles con SARS-CoV-2 daría como resultado una muestra positiva. No obstante, para el seguimiento inmunológico se representaría mejor con una prueba serológica que detectan la respuesta inmunológica frente al virus.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta la investigación realizada se puede concluir: La mejor manera de garantizar que una persona no es portador de SARS-CoV-2, es mediante realización de pruebas diagnósticas (pruebas de RT-PCR y Antigénico) al mismo tiempo. Actualmente la RT-PCR es la prueba diagnóstica de referencia, por su sensibilidad y especificidad alta. La positividad de la RT-PCR nasofaríngea casi nunca coincide al tiempo, con la positividad de la prueba de anticuerpos IgM; Es probable que al principio solo sea positiva la RT-PCR luego durante unos días podrán coincidir ambas positivas, y posteriormente la PCR dejará de detectarse persistiendo algunos días más la IgM o incluso seguir siendo ambas positivas y que el individuo esté generando anticuerpos, pero continúe aún con carga viral. Puede haber variables como la sensibilidad y especificidad de la técnica diagnóstica o el estado inmunológico del individuo que alteren los resultados. Las diferentes metodologías descritas anteriormente demuestran que las técnicas de detección de ácidos nucleicos y/o amplificación de regiones del genoma del virus, son unos de los mejores procesos para el diagnóstico del COVID 19, y para el seguimiento de la infección son las pruebas serológicas y observar respuesta inmunológica. Las pruebas rápidas (Ag) para detectar el virus, tienen baja sensibilidad, ya que dependen de la carga viral. Una prueba serológica negativa no descarta una infección primaria en el individuo. Las pruebas más rápidas son las pruebas de detección de Antígeno, luego las pruebas inmunológicas, y finalmente las pruebas de RT-PCR. A pesar de la alta especificidad y alta sensibilidad de las pruebas de RT-PCR hay que tener en cuenta que éstas disminuye considerablemente, por errores aleatorios reduciendo su especificidad y su sensibilidad.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar tamizajes en una cantidad considerable de la población para obtener los posibles positivos y después realizar la prueba confirmatoria para descartar los falsos positivos.

CAPITULO VIII

IMPACTO ESPERADO

Se requiere generar nuevos estudios que ayuden al desarrollo de estándares que sirvan como referencia global en COVID-19; tener en cuenta (por ejemplo, pseudovirus, ácidos nucleicos virales, antígeno viral, anticuerpos) para permitir una comparación objetiva entre pruebas. También es necesario establecer pautas (por ejemplo, especificaciones del sensor, costo, precisión) para diferentes propósitos de prueba, por ejemplo, diagnóstico de infecciones agudas en hospitales o centros de atención a largo plazo, monitoreo en el hogar y encuestas de población.

USUARIOS DIRECTOS E INDIRECTOS POTENCIALES DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

Esta información va dirigida a profesionales de la salud, médicos, enfermeras, bacteriólogos, empresas prestadoras de servicios de salud y/o instituciones prestadoras de servicios de salud, ya que estos puedan ver los resultados de las técnicas de diagnósticas más factibles para el diagnóstico del COVID 19.

BIBLIOGRAFIA

1. Bhagavathula AS, Aldhaleei WA, Rovetta A, Rahmani J. Vaccines and Drug Therapeutics to Lock Down Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Systematic Review of Clinical Trials. *J Adv Res.* 2020;12(05).
2. Yuefei J, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *J Adv Res.* 2020;12(4):372.
3. ACIN. Diagnóstico de los casos de infección por SARS-CoV-2/COVID-19. *J Adv Res.* 2020;24(2):50–67.
4. Sun B, Feng Y, Mo X. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *J Adv Res.* 2020;9(1):940–8.
5. López-Goñi I. Coronavirus: los 3 test que juntos nos ayudarán a controlar la pandemia de covid-19. *J Adv Res.* 2020;0.
6. Kilic T, Weissleder R, Lee H. Molecular and Immunological Diagnostic Tests of COVID-19: Current Status and Challenges. *J Adv Res.* 2020;23.
7. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Adv Res.* 2020;10.1016.
8. Otoyá-Tono AM, García M, Jaramillo Moncayo C, Wills C, Campos mahecha AM. COVID-19: generalidades, comportamiento epidemiológico y medidas adoptadas en medio de la pandemia en Colombia. *J Adv Res.* 2020;
9. Coskun Dalgic A, Byrareddy S. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Adv Res.* 2020;109(109).
10. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J Adv Res.* 2020;395(395):497–506.
11. I RP de L, J UA, O O, L MR, J RH. SARS-CoV-2 in pediatrics. History of a pandemic from China to Colombia. *J Adv Res.* 2020;3(1).
12. Wu Y, Chen C, Chan YJ. The outbreak of COVID-19: An overview. *J Adv Res.* 2020;83(83):217–20.
13. Walls AC, Young-jun P, Tortorici A. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *J Adv Res.* 2020;181(181):281–92.
14. Haagmans BL, Dhahiry DH Al, Reusken CB, Raj VS, Galiano M, Koopmans MP. Síndrome respiratorio de Oriente Medio coronavirus en dromedario camellos: una investigación de br. *J Adv Res.* 2014;14(14):93.

15. Rivera Forero C, Yáñez Dukon luis alejandro, Herrera Khenayzir C, Arias J camilo, Niño Vargas J. Integración de herramientas bioinformáticas y métodos en biología molecular para el diseño de un kit diagnóstico del covid-19: un ejemplo de aprendizaje significativo. *J Adv Res.* 2019;9(9):62–80.
16. Adnan Shereen M, Khan suliman, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24(24):91–8.
17. Scohy A, Anantharajah A, Bodeus M, Kabamba-Mukadi B, Verroke A, Rodriguez-villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Adv Res.* 2020;129.
18. Ravi N, Coratade DL, Ng E, Wang SX. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *J Adv Res.* 2020;165.
19. Ji T, Liu Z, Wang G, Guo X. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *J Adv Res.* 2020;116.
20. Salazar luz mary, Lozano jose manuel, Salud instituto nacional de. Prueba diagnóstica colombiana de COVID-19, lista para su uso. *J Adv Res.* 2020;
21. Atzrodt CL, Insha Maknojia RDM, Oldfield T m, Kenny TT, Po J, Stepp H e, et al. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. *J Adv Res.* 2020;287(17).