



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS
PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI SARS COV-2**

PRESENTADO POR

ARTURO PAREJA CRUZ

TESIS

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN MEDICINA

ASESOR

PhD. EDWARD VALENCIA AYALA

LIMA – PERÚ

2021



Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA

El autor permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSGRADO**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA LA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI SARS COV-2**

TESIS

PARA OPTAR

EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN MEDICINA

**PRESENTADA POR
ARTURO PAREJA CRUZ**

ASESOR

PhD. EDWARD VALENCIA AYALA

LIMA, PERÚ

2021

JURADO

Presidente: Frank Antonio Octavio Lizaraso Soto, doctor en Medicina

Miembro: Pedro Javier Navarrete Mejía, doctor en Salud Pública

Miembro: Joel De León Delgado, doctor en Ciencias Biológicas

DEDICATORIA

Al magnifico arquitecto de este gran universo;
a mis padres, Beatriz y José; a mi esposa Lina
y a mi pequeña hija, María Fernanda; a los
grandes héroes de bata blanca; a mi alma
mater.

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos colegas y amigos que prestaron su apoyo para la realización de esta tesis que, estoy seguro, servirá de soporte técnico en esta pandemia que padece el mundo.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Resumen	vi
Abstract	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
III. METODOLOGÍA	21
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES	37
FUENTES DE INFORMACIÓN	38
ANEXOS	
1. Instrumentos de recolección de datos	
2. Consentimiento informado	

RESUMEN

La pandemia por el SARS-CoV-2, tiene un impacto actual con más de 114 millones de casos y una cifra mayor a 2.5 millones de fallecidos. En el contexto diagnóstico aparecen nuevas técnicas inmunológicas dentro de ellas el inmunoensayo magnético con soporte de nanopartículas. El objetivo del estudio fue evaluar un nuevo ensayo de aglutinación inmunomagnética (IMA) microfluídica rápida y semicuantitativa de anticuerpos anti- SARS CoV-2 IgA-IgM/IgG basado en la agregación de nanopartículas magnéticas detectadas por un lector electrónico (Virotrack Ab. COVID-19 y Blubox, Blusense diagnostics). El estudio es de diseño analítico, transversal y prospectivo. Se evaluó 141 muestras de voluntarios con o sin la infección y se comparó con el método rápido de inmunoensayo de flujo lateral (IEFL) para la detección de los anticuerpos anti- SARS CoV-2. La sensibilidad y especificidad de la prueba IMA (IgA+IgM/IgG) es del 76% y el 97%, respectivamente; mientras que para la IEFL (IgM/IgG) es del 62% y el 91% respectivamente. La detección es potencialmente mayor cuando se combinan los resultados de ambas Igs. En las pruebas IMA, se observa un mejor desempeño de esta combinación, evidenciándose su potencialidad en la sensibilidad. Se concluye que IMA, como técnica para la detección de anticuerpos anti- SARS CoV-2, presenta un perfil de sensibilidad y especificidad superior a la prueba IEFL; es una prueba rápida y fácil de usar en el punto de atención sin la necesidad de contar con mayor maquinaria de laboratorio.

Palabras clave: SARS CoV-2, COVID-19, inmunoensayo, inmunocromatografía.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 pandemic has a current impact with more than 114 million cases diagnosed and a figure greater than 2.5 million deaths. In the diagnostic context, new immunological techniques appear, including the magnetic immunoassay with nanoparticle support. The aim of the study was to evaluate a new rapid and semiquantitative microfluidic immunomagnetic agglutination (IMA) assay of anti-SARS CoV-2 IgA-IgM / IgG antibodies based on the aggregation of magnetic nanoparticles detected by an electronic reader (Virotrack Ab. COVID-19 and Blubox, Blusense diagnostics). An analytical, cross-sectional and prospective study was designed. 141 samples from volunteers with or without infection were evaluated and compared with the rapid lateral flow immunoassay method (IEFL) for the detection of anti-SARS CoV-2 antibodies. The sensitivity and specificity of the IMA test (IgA + IgM / IgG) is 76% and 97% respectively, while for IEFL (IgM / IgG) it is 62% and 91% respectively. Detection is potentially higher when the results of both Igs are combined. In the IMA tests, a better performance of this combination is observed, evidencing its potentiality in sensitivity. It is concluded that IMA as a technique for the detection of anti-SARS CoV-2 antibodies presents a sensitivity and specificity profile superior to the IEFL test, it is a quick and easy-to-use test at the point of care without the need for more machinery from laboratory.

Keywords: SARS CoV-2, COVID-19, immunoassay, immunochromatography.

I. INTRODUCCIÓN

Descripción de la situación problemática

La infección por el coronavirus SARS-CoV-2, declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene un significativo impacto socioeconómico a escala mundial (1). Con más de 114 millones de casos diagnosticados y una cifra que rebasa los dos millones y medio de fallecidos (2), esta pandemia ha requerido la inmediata movilización de cuantiosos recursos materiales y humanos, tanto para limitar su propagación, como para manejar a los pacientes con la COVID-19 (enfermedad que este virus provoca).

Para el manejo adecuado de esta pandemia, lo crucial es contar con apropiados métodos de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, con alta sensibilidad y especificidad. En este sentido, es muy importante resaltar que alrededor del 80% de las personas infectadas con SARS-CoV-2 no desarrollan síntomas, o esos son leves, por lo que contar con un sistema de tamizaje poblacional, con técnicas costo-efectivas, de simple implementación y difusión, es muy importante. El *gold standar* para el diagnóstico de la COVID-19 es la detección del material genético del virus, con técnicas de biología molecular (3). Sin embargo, esta prueba se ha complementado con la valiosa determinación de anticuerpos (Acs), fundamentalmente IgG e IgG en el suero de los sospechosos, o de pacientes diagnosticados con COVID-19 (4-6).

Las pruebas, tipo inmunoensayo, para la detección de Acs específicos contra antígenos del SARS-CoV-2 son diversas. En esta diversidad influye significativamente el fundamento de la técnica, la clase de Ac que se detecta, y la estrategia que permite revelar la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Estos elementos, así como el origen de la técnica (laboratorio fabricante), influyen en la sensibilidad y especificidad de estas. Los inmuno-ensayos de flujo lateral han sido muy utilizados para detectar Acs IgM e IgG específicos contra SARS-CoV-2. Lo anterior se basa, fundamentalmente, en la facilidad con que se realiza la determinación (no se requiere laboratorio) y la rapidez del resultado. En Perú, de los más de 7.5 millones de muestras procesadas, alrededor del 75% han sido a partir de ensayos serológicos (7). Las pruebas serológicas utilizadas concentran la atención en la detección de Acs IgM e IgG, a pesar de que en la respuesta del sistema inmune contra virus respiratorios, la secreción de Acs IgA es muy importante. Adicionalmente, estas pruebas no cuantifican la presencia de los Ac específicos contra el virus.

En este aspecto juega un rol importante el uso de herramientas diagnósticas y de seguimiento que sean muy complejas para la detección de elementos relacionados al nuevo coronavirus, entre ellos las pruebas indirectas que detectan anticuerpos anti SARS COV-2, las cuales han presentado diversas plataformas, pero con mucha variabilidad en su detección. En este contexto aparecen nuevas técnicas inmunológicas dentro de ellas el inmunoensayo magnético con soporte de nanopartículas.

Entre la diversidad de pruebas para detectar la presencia de Ac contra antígenos de SARS-CoV-2, se incluye el uso de ensayos inmuno-magnéticos (IMA, de sus siglas en inglés). Estos ensayos se basan en el uso de nanopartículas recubiertas con antígenos o con Acs (8). Esta técnica ofrece la posibilidad de cuantificar la presencia de Acs contra antígenos virales, como el dengue e influenza (9, 10). Variantes de este tipo de ensayo se han desarrollado para detectar Acs anti-SARS-CoV-2, como prueba serológica cuantitativa que permite detectar Acs IgM, IgG e IgA (11). No obstante, no se ha realizado un estudio comparativo de nuevas plataformas como es el ensayo inmunomagnético con los inmuno-ensayos de flujo lateral utilizados, en el contexto de la población peruana abierta.

En consecuencia, se planteó el siguiente **problema de investigación**: ¿Existen diferencias significativas en la capacidad de detectar Acs específicos contra SARS-CoV-2 entre el método rápido tradicional de inmunoensayo de flujo lateral y el nuevo método de ensayo inmunomagnético? El **objetivo general** fue evaluar un nuevo ensayo de aglutinación inmunomagnética (IMA) microfluídica rápida y semicuantitativa de anticuerpos anti SARS CoV-2 IgA-IgM/IgG basado en la agregación de nanopartículas magnéticas detectadas por un lector electrónico (Virotrack Ab. COVID-19 y Blubox, Blusense diagnostics). El rendimiento de la prueba se evaluó en muestras de voluntarios con o sin la infección y se comparó con el método rápido de inmunoensayo de flujo lateral para la detección de los anticuerpos anti SARS CoV-2, en una población abierta. Los **objetivos específicos** fueron identificar Acs contra SARS-CoV-2 en suero proveniente de individuos, con o sin diagnóstico previo de COVID-19 y detectar Acs específicos contra SARS-CoV-2 con el uso del inmuno-ensayo de flujo lateral y el ensayo inmuno-magnético.

La **justificación, importancia y viabilidad** de la investigación es la siguiente:

Alrededor del 75% de las pruebas que se realizan en Perú en pacientes sospechosos con COVID-19 son inmunoensayos de flujo lateral, cualitativos y solo centrados en Acs IgM e IgG. En consecuencia, es muy importante contrastar esta técnica, en población abierta, con una evaluación serológica alternativa, que ha mostrado alta sensibilidad y especificidad, y que aporta además la cuantificación de Acs, incluyendo la IgA.

El proyecto cuenta con los recursos humanos, técnicos y las muestras para su ejecución en el plazo de tiempo propuesto. Se cuenta con el apoyo del personal de Laboratorios Ravettino e.i.r.l y de Corporación ICASA para el acceso a los voluntarios a evaluar mediante estas pruebas. Los costos de este proyecto, incluyendo los materiales y el equipamiento requerido, así como los EPPs, y los costos de traslado de las muestras serán cubiertos por WAREM, distribuidor de los Viro Track Covid-19 de la empresa danesa Blusense.

Limitaciones del estudio

La principal limitante fue el agrupamiento de los trabajadores voluntarios de cada una de las empresas que aceptaron participar en el estudio, los turnos de trabajo eran diferentes, así como el acceso para cubrir el total de todos ellos.

II. MARCO TEORICO

Antecedentes de la investigación

Como antecedentes del uso de los ensayos inmunomagnéticos, estos se han realizado de manera más amplia en infecciones por el virus del dengue, y en otras infecciones virales semejantes.

Hung LY (12) publicó en 2013, una investigación de desarrollo de una herramienta de diagnóstico de influenza, rápida, precisa y automática. Este estudio presentó un nuevo sistema microfluídico integrado para la detección rápida de infecciones por influenza; integró un módulo de control de microfluidos de tipo succión, un inmunoensayo fluorescente basado en perlas magnéticas (FIA) y un módulo de detección óptica de punto final. Este nuevo sistema puede distinguir con éxito entre la influenza A y B mediante una prueba de un solo chip en 15 minutos automáticamente y reduce el volumen de muestra requerido a 40 μ L. Resultados de ensayos de diagnóstico de 86 muestras de pacientes demostraron que este sistema tiene una sensibilidad del 84,8% y una especificidad del 75,0%.

Antunes P (13) presentó en 2015, una nueva plataforma de biosensores automatizada de bajo costo para la detección del biomarcador NS1 de la infección por dengue y lo demostró en NS1 enriquecido en suero humano; las nanopartículas magnéticas (MNP) estaban recubiertas con anticuerpos monoclonales de alta afinidad contra NS1 a través de una química de "clic" bioortogonal sin Cu en una arquitectura molecular de superficie antiincrustante. La presencia del antígeno objetivo NS1 desencadena la aglutinación de MNP y la formación de nanoclusters con una cinética rápida mejorada por la actuación magnética externa. La cantidad y el tamaño de los nanoclusters se correlacionan con la concentración objetivo y se pueden cuantificar utilizando un método de lectura optomagnética. El análisis automatizado del dengue resultante tomó solo 8 minutos, requirió 6 μ L de muestra de suero y muestra un límite de detección de 25 ng / mL con un rango superior de 20000 ng / mL. La tecnología tiene un gran potencial para aplicarse a la detección de NS1 en muestras de pacientes. Como el ensayo se implementa en un disco de microfluidos de bajo costo, la plataforma es adecuada para una mayor expansión a la detección multiplexada de un amplio panel de biomarcadores.

Partha R (14) evaluó en 2019, un total de 309 muestras de forma anónima y no vinculada. Cada muestra se analizó utilizando NS1 Ag ELISA (Microlisa, J. Mitra), ViroTrack y NS1 RDT (SD Alere) y las que eran discordantes se analizaron adicionalmente mediante ELISA dengue NS1 AG (Panbio) y dengue IgG / IgM Maclisa. En comparación con los kits ELISA aprobados que se utilizan a nivel mundial, la prueba Virotrack arrojó una sensibilidad del 94,74%; especificidad del 97,44%; VPP del 97,30%; VPN del 95% y precisión del 96,10%. El rendimiento por hora es de 5-6 muestras. Concluyó que el sistema Virotrack y su equipo son muy adecuados; el primero es rápido, fácil de usar y comparable al ELISA en sensibilidad y especificidad; el segundo, y puede funcionar tanto con plasma/ suero como con sangre total.

Izaskun AC (15) presentó en 2020, una nueva técnica de detección de antígenos basada en la agregación de nanopartículas magnéticas. El método combina un corto tiempo de obtención de resultados (12 minutos) con un alto rendimiento diagnóstico. Analizó un panel de 135 muestras de suero de viajeros que regresaban de países donde el dengue era endémico (74 positivas para DENV, incluidos los cuatro serotipos DENV, 26 positivas para el virus del Zika, 25 positivas para el virus chikungunya, 5 positivas para la malaria y 5 muestras negativas). Estas se analizaron mediante tres métodos diferentes de detección de antígenos: SD Dengue NS1 Ag ELISA, SD BIOLINE Dengue Duo y ViroTrack Dengue Acute. La sensibilidad observada para SD Dengue NS1 Ag ELISA, ViroTrack Dengue Acute y SD BIOLINE Dengue Duo fue del 97,2%, 91,1% y 68,1%, respectivamente. Todos los métodos mostraron una alta especificidad (98,4% para ViroTrack Dengue Acute y 100% para SD Dengue NS1 Ag ELISA y SD BIOLINE Dengue Duo). Por tanto, concluyó que esta nueva técnica podría ser una herramienta útil para el diagnóstico del dengue.

Chong ZL (16) publicó en 2020, la evaluación de la precisión y la utilidad de ViroTrack Dengue Acute, una nueva combinación de SD Bioline Dengue Duo NS1 / IgM / IgG de detección de dengue NS1 basada en biosensores, una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) disponible comercialmente y de SD Dengue NS1 Ag, para el diagnóstico de infección aguda. Reclutó a 494 pacientes con sospecha de dengue de una clínica de salud en Malasia. El ELISA evaluado y las pruebas de referencia se realizaron en un laboratorio de virología. Las pruebas de referencia consistieron en una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa y tres ELISA para la detección del antígeno NS1 del dengue, anticuerpos IgM e IgG, respectivamente.

La sensibilidad y especificidad de ViroTrack fueron 62,3% (IC 95% 55,6-68,7) y 95,0% (IC 95% 91,7-97,3), frente a 66,5% (IC 95% 60,0-72,6) y 95,4% (IC 95% 92,1 –97,6) para SD NS1 ELISA, y 52,4% (95% CI 45,7–59,1) y 97,7% (95% CI 95,1–99,2) para el componente NS1 de SD Bioline, respectivamente. La combinación de este último con sus componentes IgM e IgG fue capaz de aumentar la sensibilidad de la prueba al 82,4% (IC del 95%: 76,8 a 87,1) con la correspondiente disminución de la especificidad al 87,4% (IC del 95%: 82,8 a 91,2). Aunque una prueba positiva en cualquiera de las de NS1 aumentaría la probabilidad de dengue por encima del 90% en un paciente, un resultado negativo solo reduciría esta probabilidad a 23,0-29,3%. Por el contrario, esta probabilidad de diagnóstico falso negativo se reduciría aún más al 14,7% (IC del 95%: 11,4 a 18,6) si la combinación SD Bioline NS1/ IgM/ IgG fuera negativa. Por lo tanto, el rendimiento de ViroTrack Dengue Acute fue comparable al ELISA de SD Dengue NS1 Ag. La adición de componentes serológicos a SD Bioline Dengue Duo mejoró significativamente su sensibilidad y redujo su tasa de falsos negativos, de modo que pasó por alto la menor cantidad de pacientes con dengue, lo que la convierte en una mejor herramienta de diagnóstico en el punto de atención.

Liao T (17) público en 2020, la evaluación de pruebas diagnósticas para las infecciones por dengue (DENV) y Zika (ZIKV). Emplearon la tecnología de ensayo inmunomagnético en un cartucho de microfluidos (ViroTrack Sero Zika IgG/ IgM) para el diagnóstico de la infección por ZIKV basado en la agregación de nanopartículas magnéticas. Se realizó tres estudios serológicos que incluyeron muestras de República Dominicana, EE. UU. y Nicaragua, con el objetivo de detectar IgG e IgM específicas del ZIKV mediante la prueba ViroTrack Sero Zika IgG/ IgM. Los resultados de la seroconversión fueron comparables con la reactividad de IgG e IgM de ZIKV medida por el kit comercial de ELISA de ZIKV. La sensibilidad y la especificidad para ZIKV IgG e IgM probadas por ViroTrack Sero Zika IgG/ IgM fue de aproximadamente 98% y 93%, respectivamente. Concluye que la detección serológica de la infección por ZIKV mediante la nueva prueba ViroTrack Sero Zika IgG/ IgM muestra un rendimiento prometedor y una reactividad cruzada limitada con DENV.

Pietschmann J (18) en una prepublicación de 2020, evalúan las pruebas de diagnóstico serológico para el SARS-CoV-2 mencionando que todos los sistemas de diagnóstico en el punto de atención disponibles, como los ensayos de flujo lateral, tienen un gran potencial para realizar pruebas de anticuerpos *in situ* de forma rápida

y sencilla, pero carecen de especificidad, sensibilidad o posibilidad de realizar mediciones cuantitativas. Describe un nuevo enfoque en el punto de atención para la detección de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en suero humano basado en inmunodetección magnética y lo compara con ELISA estándar. Para la inmunodetección magnética, las columnas de inmunofiltración se recubrieron con un péptido de proteína de pico de SARS-CoV-2. Los anticuerpos reactivos al péptido SARS-CoV-2, enriquecido a diferentes concentraciones en PBS y suero humano, se aclararon a través de columnas de inmunofiltración. Los anticuerpos específicos se retuvieron dentro del IFC y se marcaron con un anticuerpo biotinilado específico de isotipo. Se aplicaron nanopartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina para marcar los anticuerpos secundarios. Las nanopartículas magnéticas enriquecidas se detectaron mediante tecnología de detección de mezcla magnética de frecuencia, utilizando un dispositivo portátil de lectura magnética. Las señales de medición correspondieron a la cantidad de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 en la muestra. La configuración preliminar de inmunodetección magnética resultó en una mayor sensibilidad y un rango de detección más amplio y fue cuatro veces más rápido que ELISA. Otras optimizaciones podrían reducir los tiempos de análisis a los de un análisis de flujo lateral típico, permitiendo un enfoque rápido y fácil, muy adecuado para mediciones en el punto de atención sin costosos equipos de laboratorio.

Wu K (19), en una prepublicación de 2020, proponen el inmunoensayo magnético como un tema nuevo y emergente que representa las fronteras de las áreas actuales de biodetección y magnetismo. La última década ha experimentado un rápido crecimiento en la aplicación de estas herramientas para aplicaciones biológicas y biomédicas. Los avances recientes en materiales magnéticos y nanotecnologías han transformado los métodos de diagnóstico actuales a nanoescala y han llevado el límite de detección al diagnóstico de enfermedades en etapa temprana. Revisan la literatura de las plataformas de inmunoensayo magnético para la detección de virus y patógenos, antes de COVID-19. Revisaron las plataformas de inmunoensayo magnético populares, incluidos los sensores de magnetorresistencia (MR), la espectroscopia de partículas magnéticas (MPS) y la resonancia magnética nuclear (NMR). Los kits de diagnóstico de punto de atención magnético (POC) también se revisan con el objetivo de desarrollar diagnósticos listos para usar para manejar el brote de SARS-CoV-2, así como prevenir epidemias futuras. Además, también se

cubren otras plataformas que utilizan materiales magnéticos como herramientas auxiliares para la detección mejorada de patógenos y virus. El objetivo de esta revisión es informar a los investigadores sobre las plataformas de diagnóstico y vigilancia del SARS-CoV-2 y su desempeño.

Moeller ME (20), en una prepublicación de 2020, realizaron un estudio que incluyó 35 muestras de plasma de 22 individuos con COVID-19 confirmado por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real y 40 muestras de plasma sin la enfermedad. Se detectaron anticuerpos IgM/ IgA o IgG anti-SARS-CoV-2 mediante un ensayo inmunomagnético cuantitativo (IMA) de microfluidos (ViroTrack Sero COVID IgM + IgA / IgG Ab, Blusense Diagnostics, Dinamarca) y mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ((ELISA) (EuroImmune Medizinische Labordiagnostika, Alemania). De las 35 muestras de plasma de los pacientes con COVID-19, 29 (82,9%) fueron positivas para IgA/ IgM o IgG por IMA y 29 (82,9%) fueron positivas por ELISA. La sensibilidad para una sola muestra por paciente fue 68% para IgA + IgM y 73% IgG por IMA y 73% por ELISA. Para las recolectadas 14 días después del inicio de los síntomas, la sensibilidad tanto de IMA como de ELISA fue de alrededor del 90%. La especificidad de la IMA alcanzó el 100% en comparación con el 95% para ELISA IgA y el 97,5% para ELISA IgG. Concluye que IMA para COVID-19 es una prueba rápida y fácil de usar en el punto de atención con sensibilidad y especificidad similar a un ELISA comercial.

Bases teóricas

La presente pandemia debida al nuevo SARS CoV-2 causante de la COVID-19, es la tercera cepa mutada de coronavirus adquirida por el hombre a partir de animales. Estas son causadas por los virus SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Síndrome-Related Coronavirus) en el año 2003, MERS-CoV (Middle East Respiratory Síndrome-Related Coronavirus) en el 2012 y por el reciente SARS-CoV-2 a partir de fines del 2019 (21).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), este nuevo virus, al mes de marzo de 2021, ha infectado a más de ciento catorce millones de personas y provocando más de 2500 000 fallecidos y afectado a más de 200 países del mundo. La situación

del Perú, según la OMS, nos ubica actualmente en el país número 19 relacionado a habitantes infectados (22).

En este contexto, no se ha generalizado evidencia científica que indique una mayor sensibilidad al SARS-CoV-2 por parte de mujeres en estado de embarazo y niños pequeños (23, 24). Un reciente análisis de 33 neonatos, de madres con COVID-19 confirmado por RT-PCR, informó que dos de ellos, con 40 semanas, presentaron síntomas leves típicos de una infección por SARS-CoV-2 (fiebre y neumonía) y solo uno de 31 semanas, síntomas más severos (neumonía, síndrome distrés respiratorio, problemas respiratorios, cianosis, intolerancia alimentaria, AST alto, linfocitopenia sin fiebre) y necesitó asistencia respiratoria mecánica no invasiva. Este último estudio concuerda con recientes observaciones que relatan la probable infección horizontal (25, 26) y la presencia de altas concentraciones de anticuerpos en neonatos al poco tiempo de ser extraídos. Estas observaciones deben ser cuidadosamente tomadas en cuenta ya que se necesita mayores evidencias científicas tanto para confirmar o negar la posibilidad de una infección horizontal.

Los coronavirus tienen un diámetro entre 60nm-140nm, con RNA no segmentado, positivos y largo (27.9 kb y 30.1 kb), ellos forman parte de la familia Coronaviridae, subfamilia Coronavirinae, encapsulados y se dividen en 4 géneros: los deltacoronavirus, los gamacoronavirus, los α coronavirus, que incluyen a los agentes etiológicos CoV-229E y HCoV-NL63 y los Betacoronavirus, y que incluyen a los patógenos HCoV-OC43, HKU1, SARSCoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

La morfología del SARS-CoV-2, concuerda con el resto del coronavirus, está formado por pelómeros con espigas, las cuales están relacionadas con su tropismo e invasión a la célula. Adicionalmente a esta proteína, poseen en su estructura: proteínas de la cápsula, membrana y la nucleocápside. Estudios manifiestan que el SARS-CoV-2 posee lugares optimizados para su ligación a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), espigas modificadas en el sector S, entre las subunidades S1 y S2, que son cribados por la enzima furina, aumentando así el potencial infeccioso del virus.

Debido a la alta similitud del virus SARS-CoV-2 con SARSCoV, se especula que su mecanismo de infección celular es dependiente de la interacción de su dominio de

unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés), ubicado en el subdominio S1, con el receptor celular para ECA2 en las células del corazón, pulmón, riñones y del tracto gastrointestinal.

El receptor de ECA2 clivado por la proteína TMPRSS2 y la activación de la proteína S del SARS-CoV son esenciales para aumentar la capacidad de infección de este virus y probablemente del SARS-CoV-2 (27). La enzima ACE2 es una carboxidipeptidasa, que cataliza el clivaje de la angiotensina I a angiotensina 1-9 y de angiotensina II en el vasodilatador 1-7. El decaimiento de esta enzima probablemente puede ser una de las causas de las lesiones pulmonares por el aumento de la angiotensina II.

Una vez dentro de la célula el virus libera su RNA en el citoplasma, donde es traducido en dos poliproteínas y proteínas estructurales, y después el genoma viral es replicado. Las recién sintetizadas glicoproteínas son insertadas en la membrana del retículo endoplasmático (RE) o aparato de Golgi (AG). Los nucleocápsides serán formados por la combinación del RNA con las proteínas N. Posteriormente, los nuevos virus serán secretados a partir de compartimientos intermediarios al RE y del AG (ERGIC), y finalmente, son fusionados a la membrana plasmática y secretados al medio externo.

Tal invasión viral sería similar a la observada por el SARS CoV. La respuesta del cuerpo a la infección es probablemente encabezada por las células infectadas por el virus. Las células presentadoras de antígenos (APC, de sus siglas en inglés) estimulan la respuesta inmune y la cascada inflamatoria a través de la presentación de los antígenos virales. Estas APC presentan los antígenos externos a los linfocitos T CD4+ y estimulan los linfocitos T CD8+ por medio de la secreción de IL-12. Adicionalmente, los linfocitos T CD4+ contribuyen a la maduración de la respuesta de anticuerpos por parte de los linfocitos B, encargados de producir los anticuerpos específicos contra los antígenos virales.

Ciertas especies de coronavirus tienen la capacidad de infectar a los humanos. Los cuadros clínicos ocasionados por estos invasores pueden ser leves, como los síntomas ocasionados en niños y adultos por HKU1, NL63, OC43 y 229E, hasta severos como los producidos por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 (22-25). Estos tres últimos tienen de hospedero natural a los murciélagos, camélidos y

murciélagos, respectivamente (28-30). Sin embargo, recientes comparaciones genéticas entre el SARS-CoV-2, pangolín-CoV y RATG13 (coronavirus de murciélagos) han demostrado que la similitud genética entre el coronavirus del pangolín muestra mayor semejanza con el SARS-CoV-2 (31). El sitio de clivaje para la proteína furina, es único, y se propone como una de las principales causas de la alta patogenicidad del SARS-CoV-2.

La aparición de los primeros cuadros de SARS producidos por SARS-CoV-2, se reportaron a mediados de diciembre. China reportó a la OMS, a fines de diciembre, un brote de casos de neumonía severa en la provincia de Wuhan. El 7 de enero es aislado por primera vez el SARS-CoV-2 y es identificado como el responsable del brote descrito. La primera muerte producto de esta nueva infección se observó el 20 de enero; el 23, el nuevo virus comenzó a diseminarse por varias provincias de China y otros países aledaños. Investigaciones realizadas en la población infectada determinaron que su forma de propagación es principalmente de persona a persona. En Alemania se identificó el primer paciente asintomático con capacidad de contagiar durante el periodo de incubación.

Estudios hechos en Wuhan durante el inicio de la pandemia indicaron que el 56% de los pacientes eran varones y los grupos etarios más afectadas eran de 45 a 64 años (42%), mayores de 65 años (38%), de 15 a 44 (20%) y en menor porcentaje (0.9%) las personas entre 0 y 14 años (32, 33). Estudios en Jinan y Rizhao encontraron que las mujeres infectadas eran de 52.2% (34).

La clínica de la COVID-19 es variada, los casos asintomáticos y leves eran los más frecuentes en un inicio, pero poco a poco la mortalidad avanzó en sus cifras. Radiológicamente se observan infiltraciones pulmonares y en los casos más severos la clínica se acompaña de disnea a los cinco días. Los síntomas más frecuentes son dolor de cabeza, dolor de garganta, fiebre (88.7- 91%), tos seca (67.8%), fatiga (51%), náuseas y vómitos (5%) y en algunos casos diarrea (3.8%). Dentro de los parámetros de laboratorio se observan linfopenia (83.2%), trombocitopenia (36.2%), leucopenia (33.7%), aumento de la proteína C reactiva (PCR) (32, 33).

En los casos más severos, se observa disnea (30%), presentan luego un cuadro inflamatorio que pueden conllevar a daños alveolares, insuficiencias renales y

finalmente la muerte. El periodo de incubación promedio es de 5.2 días, y su pico es a los 7.4 días. El proceso de recuperación normalmente se da después de 14 días, los cuales se pueden prolongar hasta 21 días en aquellos pacientes con síntomas respiratorios avanzados. La letalidad de la enfermedad tiene una relación directa con la edad del infectado, así como con la presencia de comorbilidades como hipertensión (17%), diabetes (8%) patologías cardiovasculares (5%) (34 - 37) y tuberculosis (38). Luego de la fase viral, y entrando a la fase inflamatoria, se observa aumento en la LDH, IL-6 y PCR, y disminución del número de neutrófilos.

Considerando que hoy se conoce la secuencia genómica del SARS-CoV-2, se han diseñado e implementado abordajes para un diagnóstico preciso, rápido y oportuno, reduciendo la posibilidad de clasificar a personas como falsos negativos los cuales podrían contribuir a la propagación de esta enfermedad. Diversos centros de investigación a nivel mundial, asociados con laboratorios de salud pública, han implementado tecnologías de detección empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los métodos de diagnóstico para estos coronavirus son los siguientes: 1) RT-PCR; 2) rRT-PCR; 3) RT-LAMP y 4) Real-time RT-LAMP. Además, se han implementado los serológicos basadas en la detección de anticuerpos (Igs) específicas a los coronavirus, como 5) ELISA y 6) LFIA, para complementar el diagnóstico (39).

Las pruebas moleculares que actualmente están siendo aplicadas para el diagnóstico de la infección con SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 son: 1) RT-PCR (PowerCheck, DiaPlexQ, Anyplex, AccuPower, LightMix, UltraFast); 2) RTLAMP; 3) Detección múltiple en forma de arcos; 4) ELISA y 5) LFIA.

La reacción de PCR en tiempo real (RT-PCR), es una variación del PCR convencional, que nos permite cuantificar la expresión de un determinado gen en una muestra en particular. Para esta reacción se utiliza un Taq polimerasa con actividad 5' exonucleasa, que integra nucleótidos marcados con fluorescencia. Las sondas específicas del fragmento génico (blanco) contienen un fluoróforo en la posición 5' que puede absorber la energía luminosa emitida por el termociclador y disiparla en forma de longitud de onda. La fluorescencia eventualmente producida por la muestra es detectada por el sistema en el momento de la reacción de PCR y es comúnmente denominada CT (Threshold cycle). A mayor CT, mayor ADN amplificado.

Esta metodología permite que los procesos de amplificación, detección y cuantificación de ADN sean realizados en una única etapa.

La detección del SARS-CoV-2 por la técnica de RT-PCR, sigue dos protocolos: 1) la OMS, detecta la expresión del gen de la proteína E, seguida de la expresión del gen RdRp y por último el gen N que solo se utiliza en caso de un ensayo confirmatorio adicional. 2) los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), detectan primero la expresión y secuenciamiento del gen N diseñado para la detección de los coronavirus de este grupo, además de cebadores diferentes específicos de SARS-CoV-2 (40).

Ya que en Asia y Europa hay presencia de coronavirus hospederos de murciélagos, se propuso una estrategia para diferenciar SARS-CoV de SARS-like bat (murciélago) CoVs y MERS-CoV de MERS bat (murciélago) CoVs a partir de muestras humanas (sangre, fluidos nasofaríngeos) y heces de murciélagos, respectivamente. Los cebadores y sondas de secuencias conservadas fueron diseñados del gen de la proteína 2S. El plásmido fue diseñado a partir de un fragmento del gen de la proteína S de SARS-CoV (3221-3620 nts) e insertado en el vector pUC57. El gen de la proteína S2 de MERS-CoV S2 (765–1288 nts) fue insertado en el vector pGEM vector. Los plasmidios recombinantes formados (pUC57-SARS-pS2 and pGEM-MERS-S2) fueron insertados en *E. coli*, haciendo que estas secuencias sean amplificadas por PCR con los cebadores correspondientes. Los fragmentos obtenidos fueron amplificados por real time RT PCR, secuenciadas y alineadas, observándose diferencias entre los coronavirus hospederos de humanos respecto a los de murciélago.

La técnica de RT-PCR puede ser usada sobre una variedad de muestras como hisopado del tracto respiratorio, esputo y lavado broncoalveolar para detectar diversas secuencias génicas. Para detectar SARS-CoV, fueron secuenciadas fragmentos génicos de ORF1ab y de la nucleocápside (NP). Se debe tener en cuenta qué protocolos utilizar, los autores indican pacientes positivos a los que expresan los dos fragmentos, y aquellos de cuidado con seguimiento a los que expresan uno. En el hisopado naso-faríngeo, NP fue detectado en el 39.8% de los pacientes, mientras que ORF1ab en el 40.98%, siendo los doble positivos el 38.42%. En el esputo, NP fue expresado en 49.12% de pacientes, mientras que ORF1ab en 50.88% y los que

expresaron ambos fragmentos fue 49.12% y en la muestra de lavado broncoalveolar, NP fue expresado en el 80%, mientras que ORF1ab en el 100%, los que expresaron ambos fragmentos fue 80%. Lo anterior indica que la mejor muestra para analizar SARS-CoV es el lavado broncoalveolar (41).

Los genes expresos por RT-PCR también pueden ser secuenciados, esto se utilizaría en el caso de ver diferencias en muestras del mismo género filogenético. Si fuese necesario se tendría que analizar varios de genes de la familia, a fin de encontrar alguna diferencia. Para ver estas entre SARSCoV-2 y SARS-CoV, se analizaron 297 muestras, diseñándose cebadores en base al secuenciamiento de la primera obtenida en la provincia de Wuhan, en diciembre de 2019 (NM908947 Wuhan-Hu-1) y de otras muestras virales NC-004718 SARS-CoV para: 1) ORF1ab- gen RdRp en la posición 15361-15460 nts; 2) gen de la proteína E, posición 26141-26253 nts; 3) y gen de la proteína N posición 28555-28682 nts. Si el alineamiento de los genes indicase similitud, las muestras analizadas pertenecerían a la misma familia, a los betacoronavirus. Por otro lado, las diferencias en las secuencias nucleotídicas indicarían que se analizan virus diferentes, en este caso, los genes confirmatorios serían RdRp y N son utilizados como prueba confirmatoria de diferenciación de una especie viral frente a otra.

En la actualidad la técnica de Reacción de Cadena Polimerasa de Transcripción reversa en tiempo real (rRT-PCR) está tan ampliamente utilizada en la identificación de los coronavirus que muchos kits están disponibles en la industria farmacéutica: 1) PowerChek (Kogene Biotech, Korea), 2) DiaPlexQ (SolGent, Korea), 3) Anyplex (Seegene, Korea), 4) AccuPower (Bioneer, Korea), 5) LightMix (Roche Molecular Diagnostics, Switzerland) y 6) (Nanobiosys, Korea). Kim et al., decidieron probarlos para la detección de los genes de las proteínas upE y ORF1a en muestras de hisopados nasofaríngeos de muestras de ARN MERS-CoV. Los autores encontraron que la sensibilidad y especificidad de los 7 kits para detectar upE y ORF1a es del 100%. No se encontró reactividad cruzada con otros virus respiratorios, por lo que se consideraron adecuados para diagnosticar la infección por MERS-CoV (42, 43).

Específicamente, en la detección del SARS-CoV-2 como prueba diagnóstica se utiliza la amplificación de una secuencia conservada de genes virales, fundamentalmente ORF1ab y N. Esta amplificación es a partir del ARN viral, su conversión a ADN y el

uso de cebadores específicos, además de una sonda marcada con fluorescencia, incluida en propios de los kits. En los de rRT-PCR se incluyen cebadores/sondas específicas, dNTPS, solución tampón, polimerasa y retrotranscriptasa en formatos estables y propios de cada sistema, así como un control interno para el ensayo.

La técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Buckle (RT-LAMP), al igual que la RT-PCR amplifica fragmentos específicos de ADN, pero es isotérmica, quiere decir que usa una sola temperatura. RT-LAMP también utiliza enzima polimerasa termoestable, pero es más sensible y específico. RT-LAMP amplifica el ADN blanco al punto de permitir una visualización directa de la reacción debida a la liberación de pirofosfatos que causan la turbidez. La diferencia con el PCR convencional es que esta técnica requiere de entre 4 y 6 cebadores. Los cebadores externos F3 y B3 hibridizan con las regiones externas de la secuencia blanco, mientras que los cebadores internos FIP y BIP poseen secuencias en ambos sentidos que permiten la formación de un bucle interno. Los cebadores se diseñan de manera que pueda reconocer 8 secuencias blanco lo que permite dar especificidad al método. Las enzimas utilizadas son Bst polimerasa aislada de *Bacillus stearothermophilus* y Bsm polimerasa con aislada de *Bacillus smithii*, ambas con actividad helicasa con una actividad enzimática entre 63 y 66 °C, respectivamente. Esta enzima se desnaturaliza a temperaturas por encima de 70 °C. RT-LAMP es un nuevo método de amplificación de ADN potencialmente rápido, preciso y rentable que es utilizado como técnica de diagnóstico clínico, no existe necesidad de equipos sofisticados ni de personal altamente especializado.

La técnica de RT-LAMP también se usa para detectar a los virus MERS-CoV de varias cepas de virus respiratorios humanos. Los genes como base para MERS-CoV EMC, serian la secuencia N y la secuencia ORF1a usando los primers. Por otro lado, la detección de MERS-CoV fue confirmada por Q probe RT-LAMP mediante la visualización de su turbidez y RT-PCR de upE y ORF1a. La eficacia de Qprobe RT-LAMP es comparable con RT-PCR, por lo que estos resultados indican que RT-AMP puede ser utilizado como una fuerte herramienta diagnóstica para la detección de infecciones de MERS-CoV en corto tiempo.

La plataforma de detección múltiple en forma de arco para la identificación de blancos específicos (Arch-shaped multipltarget sensing) puede distinguir patógenos

emergentes de patógenos relacionados. Koo et al. diseñaron un nuevo sensor de múltiples blancos en forma de arco, que pueden identificar rápidamente patógenos usando amplificación directa de cada muestra clínica. Esta amplificación en forma de arco contiene secuencias iniciadoras siendo proyectada para amplificar rápidamente varios blancos. Esta plataforma permite la detección sensible y específica del coronavirus humano MERS-CoV, virus Zika (VZ) y virus Ebola (VE). Mediante esta técnica también se puede diferenciar de forma simultánea estos virus de los coronavirus extraídos de muestras clínicas en un lapso de 20 minutos, lo que permite que los diagnósticos sean rápidos, sensibles y precisos.

La técnica de Ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) se ha utilizado en la detección de proteínas de SARS y MERS. Fung et al. identificaron muestras positivas de MERS-CoV mediante ELISA sándwich, donde el antígeno a identificar fue la proteína del nucleocapside (NP) de MERS-CoV, se utilizó un anticuerpo monoclonal (AcM) específico para el nucleocápside y un AcM secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante, que también reconoce MERS-CoV NP, pero se une a un epítipo distinto de la proteína de interés. Esta técnica de ELISA tipo sándwich permite una especificidad mejorada para la nucleocápside MERS-CoV ya que combina las especificidades de los dos AcMs, lo que permite diferenciar e identificar una muestra enriquecida con MERS-CoV de otras muestras de pacientes sanos o aquellos que contrajeron otras infecciones en las vías respiratorias. La proteína escogida en estos ensayos, como antígeno, fue la de nucleocápside de MERS-CoV, porque es un antígeno estructural altamente inmunogénico y abundantemente, inclusive, mucho más que la proteína S.

Esta técnica tiene alta especificidad y sensibilidad. Para desarrollarla se clonó y purificó una proteína recombinante del nucleoplasma de MERS-CoV marcado con His6 para generar anti-MERS-CoV-rNP (MAb), los demás reactivos son de uso comercial.

Las pruebas rápidas serológicas son inmunocromatográficas o de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA), que detectan anticuerpos IgM e IgG contra el virus. Se puede utilizar suero, plasma o sangre total. Una de sus limitaciones es la dificultad de saber certeramente cuándo estos anticuerpos aparecen en la sangre, lo que podría conducir a un diagnóstico falso negativo (44).

Estas pruebas inmunológicas se tendrán que realizar en el momento indicado, para pacientes SARS-CoV-2 positivos, los anticuerpos IgM e IgG específicos no fueron observados (40%) dentro de la primera semana de la infección, esto se evidenció (100.0%) en el día 15 (45).

Los ensayos de aglutinación inmunomagnética (IMA) son métodos recientemente desarrollados que utilizan partículas magnéticas recubiertas con moléculas de captura (por ejemplo, anticuerpos, ligandos, nucleótidos) que se unen específicamente al biomarcador diana, formando grupos que permiten la detección. Se han desarrollado diferentes ensayos para la detección de patógenos, moléculas pequeñas y proteínas. Estos métodos son fáciles de usar y pueden mejorar la sensibilidad y el tiempo a los resultados de los métodos clásicos como ELISA. Se ha desarrollado un ensayo para detectar los anticuerpos contra SARS CoV-2 basado en tecnología IMA y en nanopartículas (46, 47).

Una prueba de diagnóstico rápida y confiable para las infecciones por SARS CoV-2 contribuiría a un mejor manejo del paciente y sería útil para los programas de vigilancia con el fin de monitorear la transmisión local del virus (48).

Los ensayos inmunomagnéticos, en particular, se refieren a la identificación del analito diana (por ejemplo, antígeno o anticuerpo) a través de restos de captura (es decir, anticuerpos, antígenos, ligandos, nucleótidos) conjugados sobre la superficie de partículas magnéticas. Específicamente, los restos de captura detectan el objetivo deseado (es decir, biomarcador de proteína, ADN, ARN) para la posterior separación de la solución restante mediante un simple imán y, en consecuencia, para varios métodos de análisis (49-50).

La naturaleza simple y no invasiva de este método continúa permitiendo el uso generalizado de partículas magnéticas. Además, la alta relación superficie-volumen de estas confiere una probabilidad correspondientemente alta de interacción con el que se dirigen a biomarcadores y, en esencia, aumenta la eficiencia del sistema (51). La estabilidad de las partículas en varios entornos químicos trabaja para aumentar aún más su uso en una amplia gama de aplicaciones (52).

Además, la tridimensionalidad de las partículas en solución se puede utilizar para aumentar la eficiencia de recolección y separación de biomarcadores; el uso de kits

de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) convencionales, por otro lado, está limitado por su enfoque bidimensional para la selección de biomarcadores. Por último, las partículas magnéticas a menudo se funcionalizan en la superficie y se conjugan con otros nanomateriales, incluidas partículas de oro, puntos cuánticos y nanocajas de proteínas, para generar una plataforma para la cuantificación altamente sensible de biomarcadores (53 – 55).

El diagnóstico de enfermedades debe ser rápido, preciso y versátil. Para reflejar tales necesidades, los desarrollos actuales dentro de los ensayos inmunomagnéticos incluyen la detección simultánea de múltiples biomarcadores y el uso de dispositivos a micro/ nanoescala para minimizar el volumen de muestra.

Los medios convencionales de ensayos inmunomagnéticos de microfluidos implican el uso de un imán simple para separar y recolectar partículas magnéticas unidas a biomarcadores desde dentro de un canal de microfluidos que contiene, tanto biomarcadores como partículas magnéticas conjugadas con restos de captura (56– 58).

Para una detección precisa del biomarcador, la solución de prueba debe estar bien mezclada dentro del canal de microfluidos. En consecuencia, se han desarrollado ensayos inmunomagnéticos microfluídicos mejorados para abordar el problema de la no mezcla inducida por flujo laminar, un fenómeno comúnmente observado en ensayos convencionales de este tipo.

Por ejemplo, Sasso et al. demostraron la capacidad de detectar el factor de necrosis tumoral α e interleucina-6 colocando un imán en la unión de dos entradas para la solución de biomarcadores y partículas magnéticas funcionalizadas. Aquí, el imán trabaja para asegurar una mezcla completa de los dos mediante la aplicación de una fuerza magnética perpendicular al flujo de la solución de prueba (59, 60).

Kim et al. mejoraron aún más el ensayo conservando el mismo sistema de entrada y modificando las salidas para incluir un imán para la separación y purificación del biomarcador objetivo en una salida y la solución restante de proteína no objetivo en otra (61).

Además de garantizar una mezcla uniforme, los ensayos de microfluidos también debe poder preservar el microambiente de detección. Para satisfacer estas necesidades, se han propuesto ensayos inmunomagnéticos de microfluidos que utilizan gotitas para encapsular tanto las partículas magnéticas funcionalizadas como los reactivos en un único microambiente (62 – 66).

Dichos ensayos de microfluidos de gotitas son ventajosos en su capacidad para mantener un microambiente estable dentro de la gotita, minimizar la adsorción superficial del biomarcador diana en las paredes del canal y prevenir la propagación de contaminantes inducida por difusión y las fluctuaciones en la concentración de reactivo. Sin embargo, la falta de reconfigurabilidad, debido al formato de flujo continuo basado en canales y sus problemas de obstrucción siguen siendo obstáculos. Por tanto, se necesita la capacidad de controlar y manipular las gotitas. Sista et al., por ejemplo, detectaron interleucina-6 dentro de las gotas, seguido de la eliminación del exceso de sobrenadante, lavado de partículas magnéticas y resuspensión de partículas dentro de cada gota (67).

Las partículas magnéticas también se utilizan junto con los canales de microfluidos. Por ejemplo, las partículas magnéticas se utilizan como soporte sólido mediante su inmovilización sobre los canales de microfluidos.³⁹ La relación superficie-volumen aumentada y, por lo tanto, la sensibilidad amplificada, junto con la alta reproducibilidad, presentan ventajas adicionales que han sido utilizadas por otros (68 – 71).

En otro ejemplo, las partículas con código de barras segmentadas en dos partes para la detección del biomarcador y las señales fluorescentes se utilizan junto con dos canales microfluídicos a través de los cuales fluye la muestra (72). Dichos métodos utilizan cantidades mínimas de reactivo y son capaces de detectar biomarcadores multiplexados.

Definición de términos básicos

SARS-CoV-2: Nueva mutación del grupo de coronavirus humano el cual se asemeja al SARS-CoV aparecido por primera vez en China en el año 2002. Actualmente, el SARS-CoV-2 es el responsable de la pandemia originada desde principios del 2020.

COVID-19: Es el nombre de la enfermedad producida por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2.

Inmunoensayo: Métodos cuyo principio se basa en la interacción antígeno-anticuerpo.

Inmunomagnético: Se basa en el uso de nanopartículas magnéticas recubiertas con anticuerpos o antígenos específicas para un determinado microorganismo.

Cromatografía de flujo lateral: Se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual uno de ellos está unido a una membrana de nitrocelulosa.

Nanoclusters: Son pequeños números de átomos que se componen de uno o varios elementos que exhiben propiedades electrónicas atractivas, químicas y ópticas.

Lectura optomagnética: En este sistema la lectura se realiza con un láser; para leer esta información la luz que se utiliza es de menor intensidad; cuando este haz pasa por el material a examinar su plano de polarización gira debido al efecto Faraday.

Disco de microfluidos: Contiene una centrifuga microfluídica que permite la separación, dilución y mezcla del plasma.

En este estudio no se plantea una **hipótesis de trabajo**.

III. METODOLOGÍA

Diseño metodológico

Investigación de enfoque cuantitativo. Según la intervención del investigador, experimental; según el alcance, analítica; según el número de mediciones de las variables de estudio, transversal y, según el momento de recolección de datos, prospectiva.

Diseño muestral

Población universo

Trabajadores de Laboratorios Ravettino e. i. r. l. empresa de fabricación de caramelos medicinales, y Corporación ICASA, empresa constructora; ambos ubicados en la ciudad de Lima.

Población de estudio

El total de los trabajadores de Laboratorios Ravettino e. i. r. l. y Corporación ICASA.

Criterios de elegibilidad

Inclusión

Trabajadores que hayan tenido o no diagnóstico previo de COVID-19:

- mayores de 18 años.
- con o sin diagnóstico previo de COVID-19,
- con o sin comorbilidades.

Exclusión

Trabajadores que hayan tenido o no diagnóstico previo de COVID-19:

- menores de 18 años,
- que no firmaron el consentimiento informado.

Tamaño de la muestra

Se incluyeron, en este estudio, a 141 individuos, trabajadores activos de Laboratorios Ravettino y Corporación ICASA, de ambos sexos, entre 18-75 años, con o sin diagnóstico previo de COVID-19, que consientan voluntariamente a participar en este estudio.

Muestreo o selección de la muestra

La muestra lo constituye el total de trabajadores voluntarios que cumplen los criterios de inclusión.

Técnicas y procedimiento de recolección de datos

Los trabajadores voluntarios de ambas empresas, que cumplieron con los criterios de inclusión (141 voluntarios), fueron invitados a participar en esta investigación. Para ello, fueron citados individualmente a una oficina de la instalación y se les explicó detalladamente el objetivo, su importancia y en qué consistiría su aporte voluntario. Así mismo, se les brindó la facilidad de revisar el formulario de Consentimiento Informado donde se detallan las características del estudio, y se menciona explícitamente como se protegerá su privacidad. Se les dio la facilidad de tomar la decisión de participar en ese momento o de adoptar la decisión posteriormente.

Una vez firmado el Consentimiento Informado, se procedió a la toma de la muestra. A los individuos enrolados en el estudio se les extrajeron, por venopunción, 5ml de sangre venosa, mediante el uso de un tubo colector sin anticoagulante. Para este procedimiento se cumplió con lo establecido en la resolución 448-2020-Minsa, referida al uso de implementos de seguridad por parte del personal que tomó las muestras. Además, a cada paciente se le midió la temperatura para cumplir con el reglamento establecido.

En cuanto al traslado de muestras, se gestionaron los permisos requeridos para este fin y se siguieron las medidas de bioseguridad indicadas por el Instituto Nacional de Salud, según la NTS N.º 153-MINSA/2019/INS: "Norma Técnica de salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias". Las muestras se trasladaron desde las instalaciones de ambas empresas hasta la Facultad de Medicina Humana de la USMP. Específicamente, fueron procesadas, almacenadas y evaluadas en el Centro de Investigación de Infectología e Inmunología (CENINII).

Para el aislamiento del suero, las muestras fueron centrifugadas a 1500rpm, durante 10 minutos. El suero se colectó con una pipeta automática y se almacenó a 4 °C, en viales correctamente identificados, según el código asignado a cada paciente. Se procedió a detectar la presencia de Acs. Anti-SARS-CoV-2, en un plazo no mayor a 48h. Con cada suero se realizó un inmunoensayo de flujo lateral (NADAL COVID 19 IgG/IgM test), y un ensayo inmunomagnético IMA (VIROTRACK SERO COVID-19

IgA+IgM/IgG Ab, Blusense Diagnostic), como prueba de referencia se usó el método de Electroquimioluminiscencia, ECLIA COVID-19 (Linfotronic Technology Co, China), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. La muestra remanente se almacenó, en dependencia de lo que haya indicado el participante al momento de firmar el Consentimiento Informado (consentimiento de uso ampliado).

Procesamiento y análisis de datos

Se calcularon la sensibilidad, la especificidad, las razones de probabilidad y los valores de concordancia para todos los métodos utilizados, así como para el método comparador. La sensibilidad se calculó como verdaderos positivos/ (verdaderos positivos + falsos negativos) y la especificidad como verdaderos negativos/ (verdaderos negativos + falsos positivos). El intervalo de confianza para la sensibilidad y la especificidad se calculó utilizando el método de puntuación de eficiencia descrito por Newcomb con base en el procedimiento detallado por Wilson. Las razones de probabilidad indican el aumento o la disminución de la probabilidad de una enfermedad para los resultados de la prueba dados y se calcularon de la siguiente manera: razón de probabilidad positiva (LR +) = sensibilidad / (1-especificidad); razón de verosimilitud negativa (LR-) = (1-sensibilidad) / especificidad) e interpretada según Hayden et al. El coeficiente Kappa, una medida de la concordancia no aleatoria, también se calculó e interpretó siguiendo los criterios de Landis y Koch.

Aspectos éticos

El presente estudio se realizó bajo la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación de la FMH-USMP. El reclutamiento de los participantes se realizó posterior a que estos firmen su consentimiento para participar en el estudio. El manejo de la información de los pacientes fue de manera anónima, con códigos de identificación que no fueron revelados en ninguna fase de la investigación, incluyendo la divulgación de los resultados.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Distribución de la población de estudio según sexo

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Masculino	77	54,6	54,6
Femenino	64	45,4	100,0
Total	141	100,0	

La tabla 1 exhibe que el 54.6% (77/141) de las muestras pertenece a población de sexo masculino.

Tabla 2. Distribución de la población de estudio según edad

Edad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
<= 29	47	33,3	33,3
30 - 41	61	43,3	76,6
42 - 53	20	14,2	90,8
54+	13	9,2	100,0
Total	141	100,0	

La tabla 2 evidencia que el 33.3% (47/141) de las muestras pertenece a población joven.

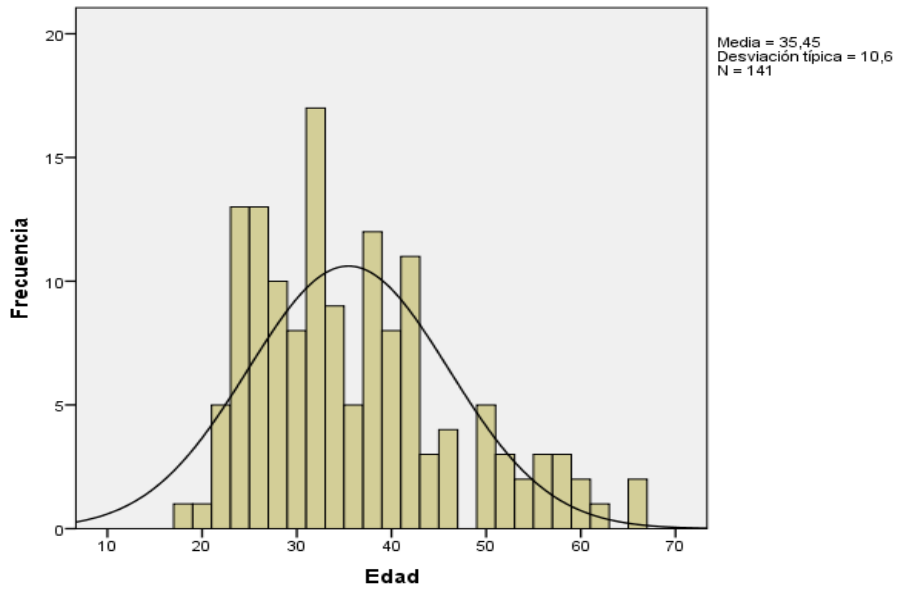


Figura 1. Distribución de la población de estudio según edad

El figura 1 indica que la edad media de la población a la que pertenecen las muestras fue de 35.45 años.

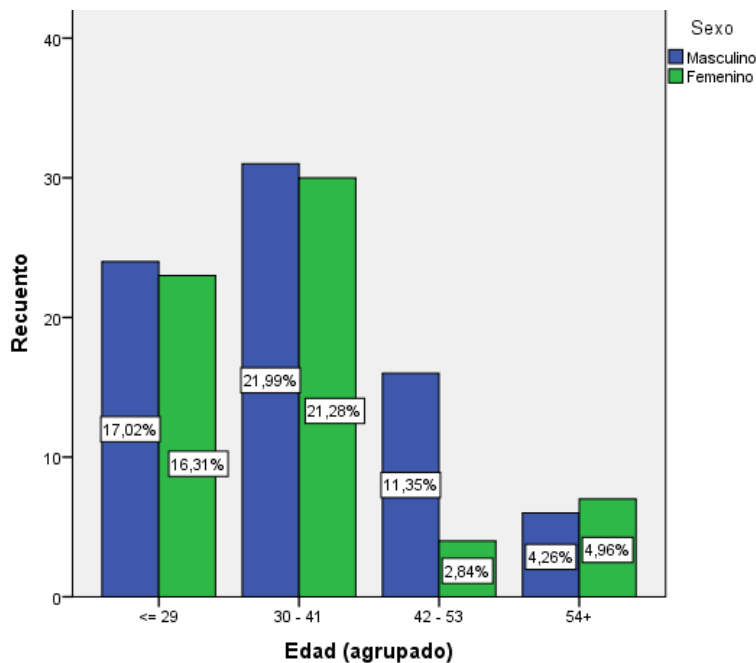


Figura 2. Distribución de la población de estudio según edad

El grafico 2 muestra que el sexo masculino predominó en la mayoría de los grupos etarios, con excepción de los mayores de 54 años.

Tabla 3. Distribución de la población de estudio según comorbilidades

Comorbilidad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
No	135	95,7	95,7
Asma	1	,7	96,5
Diabetes	1	,7	97,2
Hipertensión arterial	2	1,4	98,6
Hepatopatía	1	,7	99,3
Hipotiroidismo de Hashimoto	1	,7	100,0
Total	141	100,0	

La tabla 3 indica que el 95.7% (135/141) de las muestras pertenece a población sin comorbilidades.

Tabla 4. Resultado de pruebas según sexo (IgM)

Sexo	IEFL IgM		IMA IgM		ECLIA IgM	
	React.	No React.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Masculino	42.9%	55.2%	42.9%	55.9%	30.0%	56.5%
Femenino	57.1%	44.8%	57.1%	44.1%	70.0%	43.5%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 4 señala un mayor porcentaje de positividad en el género femenino para todas las pruebas evaluadas relacionada a la IgM, la captación de la positividad fue mayor por el método ECLIA.

Tabla 5. Resultado de pruebas según sexo (IgG)

Sexo	IEFL IgG		IMA IgG		ECLIA IgG	
	React.	No React.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Masculino	48.6%	56.6%	48.4%	56.4%	41.9%	60.2%
Femenino	51.4%	43.4%	51.6%	43.6%	58.1%	39.8%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 5 muestra un mayor porcentaje de positividad en el género femenino para todas las pruebas evaluadas relacionadas a la IgG; con el método ECLIA, fue mayor la captación de positividad.

Tabla 6. Resultado de pruebas según edad (IgM)

Edad	IEFL IgM		IMA IgM		ECLIA IgM	
	React.	No React.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
<= 29	0.0%	35.1%	7.1%	36.2%	30.0%	33.6%
30 - 41	71.4%	41.8%	85.7%	38.6%	60.0%	42%
42 - 53	14.3%	14.2%	0.0%	15.7%	0.0%	15.3%
54+	14.3%	9.0%	7.1%	9.4%	10.0%	9.2%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 6 presenta que el mayor porcentaje de positividad a la IgM se observa en el grupo de 30 a 41 años, la captación de positividad fue mayor, en este grupo, con IMA. El método IEFL no captó ningún positivo en el grupo de menores de 29 años comparado con los otros.

Tabla 7. Resultado de pruebas según edad (IgG)

Edad	IEFL IgG		IMA IgG		ECLIA IgG	
	React.	No React.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
<= 29	31.4%	34.0%	38.7%	31.8%	34.9%	32.7%
30 - 41	54.3%	39.6%	45.2%	42.7%	53.5%	38.8%
42 - 53	5.7%	17.0%	6.5%	16.4%	4.7%	18.4%
54+	8.6%	9.4%	9.7%	9.1%	7.0%	10.2%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 7 indica que el mayor porcentaje de positividad a la IgG se observa en el grupo de 30 a 41 años, fue mayor la captación de positividad en este grupo por el método IEFL muy similar con los otros.

Tabla 8. Resultado de pruebas según comorbilidad (IgM)

Comorbilidad	IEFL IgM		IMA IgM		ECLIA IgM	
	React.	No React.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
No	100.0%	95.5%	92.9%	96.1%	100%	95.4%
Asma	0.0%	0.7%	0%	0.8%	0.0%	0.8%
Diabetes	0.0%	0.7%	0%	0.8%	0.0%	0.8%
Hipertensión arterial	0.0%	1.5%	0%	1.6%	0.0%	1.5%
Hepatopatía	0.0%	0.7%	7.1%	0%	0.0%	0.8%
Hipotiroidismo de Hashimoto	0.0%	0.7%	0.0%	0.8%	0.0%	0.8%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La table 8 muestra la mayor positividad a IgM en voluntarios con antecedentes de hepatopatía captado por el método IMA.

Tabla 9. Resultado de pruebas según comorbilidad (IgG)

Comorbilidad	IEFL IgG		IMA IgG		ECLIA IgG	
	React.	No React.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
No	97.1%	95.3%	96.8%	95.5%	97.7%	94.9%
Asma	0.0%	0.9%	0.0%	0.9%	0.0%	1.0%
Diabetes	0.0%	0.9%	0.0%	0.9%	0.0%	1.0%
Hipertensión arterial	0.0%	1.9%	0.0%	1.8%	0.0%	2.0%
Hepatopatía	2.9%	0.0%	3.2%	0.0%	2.3%	0.0%
Hipotiroidismo de Hashimoto	0.0%	0.9%	0.0%	0.9%	0.0%	1.0%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 9 expresa la mayor positividad a IgG en voluntarios con antecedentes de hepatopatía captado por todos los métodos evaluados.

Tabla 10. Comparación de métodos. ECLIA vs. Inmuno-ensayo magnético (Ig M)

Inmuno-ensayo magnético (Ig M)	ECLIA IgM		Total
	Positivo	Negativo	
Reactivo	4	3	7
No Reactivo	6	128	134
Total	10	131	141

- **Sensibilidad** = 40.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente a los casos verdaderamente positivos, es decir, detectar correctamente que la presencia de enfermedad es muy baja.
- **Especificidad** = 98.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente los casos verdaderamente negativos, es decir, detectar correctamente que la ausencia de enfermedad es alta (sanos).
- **VPP** = 56.9%; porcentaje de casos clasificados como positivos por ECLIA respecto al total de casos positivos según Inmuno-ensayo magnético
- **VPN** = 96.0%; porcentaje de casos clasificados como negativos por ECLIA respecto al total de casos negativos según Inmuno-ensayo magnético.
- **Cociente de probabilidad para un test positivo (LR+)** = 20
- **Cociente de probabilidad para un test negativo (LR-)** = 0.61

- **Prior Odds** = 0.08; **Probabilidad pretest** = 7.0%
- **Post Odds+** = 1.53; **Probabilidad posttest+** = 60.0%
- **Post Odds-** = 0.57; **Probabilidad posttest-** = 36.0%

La tabla 10 exhibe un desempeño mayor de IMA (IgA-M) en las variables de especificidad y VPN (98% - 96%).

Tabla 11. Comparación de métodos. ECLIA vs. Inmuno-ensayo magnético (Ig G)

Inmuno-ensayo magnético	ECLIA IgG		Total
	Positivo	Negativo	
Reactivo	33	2	35
No Reactivo	10	96	106
Total	43	98	141

- **Sensibilidad** = 77.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente a los casos verdaderamente positivos, es decir, detectar correctamente que la presencia de enfermedad es moderada.
- **Especificidad** = 98.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente los casos verdaderamente negativos, es decir, detectar correctamente que la ausencia de enfermedad es alta (sanos).
- **VPP** = 94.0%; porcentaje de casos clasificados como positivos por ECLIA respecto al total de casos positivos según Inmuno-ensayo magnético
- **VPN** = 91.0%; porcentaje de casos clasificados como negativos por ECLIA respecto al total de casos negativos según Inmuno-ensayo magnético.
- **Cociente de probabilidad para un test positivo (LR+)** = 38.5
- **Cociente de probabilidad para un test negativo (LR-)** = 0.23
- **Prior Odds** = 0.44; **Probabilidad pretest** = 31.0%
- **Post Odds+** = 16.89; **Probabilidad posttest+** = 94.0%
- **Post Odds-** = 0.16; **Probabilidad posttest-** = 14.0%

La tabla 11 muestra un desempeño mayor de IMA (IgG) en las variables de sensibilidad y especificidad (77% - 98%), así como el VPP y VPN (94% - 91%), respectivamente.

Tabla 12. Comparación de métodos. ECLIA vs. Inmuno-ensayo de flujo lateral (Ig M)

Inmuno-ensayo de flujo lateral	ECLIA IgM		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	12	14
Negativo	8	119	127
Total	10	131	141

- **Sensibilidad** = 20.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente a los casos verdaderamente positivos, es decir, detectar correctamente que la presencia de enfermedad es baja.
- **Especificidad** = 91.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente los casos verdaderamente negativos, es decir, detectar correctamente que la ausencia de enfermedad es alta (sanos).
- **VPP** = 14.0%; porcentaje de casos clasificados como positivos por ECLIA respecto al total de casos positivos según Inmuno-ensayo de flujo lateral
- **VPN** = 94.0%; porcentaje de casos clasificados como negativos por ECLIA respecto al total de casos negativos según Inmuno-ensayo de flujo lateral.
- **Cociente de probabilidad para un test positivo (LR+)** = 2.22
- **Cociente de probabilidad para un test negativo (LR-)** = 0.88
- **Prior Odds** = 0.08; **Probabilidad pretest** = 7.0%
- **Post Odds+** = 0.17; **Probabilidad postest+** = 15.0%
- **Post Odds-** = 0.82; **Probabilidad postest-** = 45.0%

La tabla 12 muestra un desempeño muy bajo de IEFL (IgM) respecto a ECLIA en las variables de especificidad y VPP (20% - 14%), respectivamente.

Tabla 13. Comparación de métodos. ECLIA vs. Inmuno-ensayo de flujo lateral (Ig G)

Inmuno-ensayo de flujo lateral (Ig G)	ECLIA IgG		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	26	5	31
Negativo	17	93	110
Total	43	98	141

- **Sensibilidad** = 60.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente a los casos verdaderamente positivos, es decir, detectar correctamente que la presencia de enfermedad es moderada.

- **Especificidad** = 95.0%; la capacidad de la prueba de clasificar correctamente los casos verdaderamente negativos, es decir, detectar correctamente que la ausencia de enfermedad es alta (sanos).
- **VPP** = 84.0%; porcentaje de casos clasificados como positivos por ECLIA respecto al total de casos positivos según Inmuno-ensayo de flujo lateral
- **VPN** = 85.0%; porcentaje de casos clasificados como negativos por ECLIA respecto al total de casos negativos según Inmuno-ensayo de flujo lateral.
- **Cociente de probabilidad para un test positivo (LR+)** = 12
- **Cociente de probabilidad para un test negativo (LR-)** = 0.42
- **Prior Odds** = 0.44; **Probabilidad pretest** = 31 %
- **Post Odds+** = 5.27; **Probabilidad postest+** = 84 %
- **Post Odds-** = 0.29; **Probabilidad postest-** = 22 %

La tabla 13 señala un desempeño mayor de IEFL (IgG) en la variable de especificidad (95%).

Tabla 14. Resumen. ECLIA vs. Inmuno-ensayo magnético (IgM)

Prueba		ECLIA (IgM)
Inmuno-ensayo magnético (IgM)	Sensibilidad	40%
	Especificidad	98%
	VPP	56.9%
	VPN	96%
		ECLIA (IgG)
Inmuno-ensayo magnético (IgG)	Sensibilidad	77%
	Especificidad	98%
	VPP	94%
	VPN	91%

La tabla 14 indica valores altos de desempeño en IMA IgA-M/G, en las variables medidas al combinar el total de la Igs.

Tabla 15. Resumen. ECLIA vs. Inmuno-ensayo de flujo lateral

	Prueba	ECLIA (IgM)
Inmuno-ensayo de flujo lateral (IgM)	Sensibilidad	20%
	Especificidad	91%
	VPP	14%
	VPN	94%
		ECLIA (IgG)
Inmuno-ensayo de flujo lateral (IgG)	Sensibilidad	60%
	Especificidad	95%
	VPP	84%
	VPN	85%

La tabla 15 muestra valores bajos de desempeño en el método IEFL IgM y mejores valores en cuanto a la IgG.

V. DISCUSIÓN

A más de un año de la actual pandemia, se hace indispensable contar con métodos de diagnóstico y seguimiento más eficaces, capaces de ser realizados sin la complejidad de los laboratorios de alto nivel de seguridad biológica.

La última década ha experimentado un rápido crecimiento en la aplicación de herramientas magnéticas para aplicaciones biológicas y biomédicas. Los avances recientes en materiales magnéticos y nanotecnologías han transformado los métodos de diagnóstico actuales a nanoescala y han llevado el límite de detección al diagnóstico de enfermedades en etapa temprana.

Las diversas plataformas tecnológicas nos van ofreciendo estas alternativas y es por ello que se decide comparar el método más reciente, el ensayo inmunomagnético versus el método de inmunocromatografía de flujo lateral, más conocida como “prueba rápida” y la de mayor difusión y uso a pesar de los altos valores negativos positivos que presenta en la actualidad.

Al analizar Pietschmann J (18) pruebas de diagnóstico serológico para el SARS-CoV-2, destacó que los ensayos de flujo lateral tienen un gran potencial para realizar pruebas de anticuerpos *in situ* de forma rápida y sencilla, pero carecen de especificidad, sensibilidad o posibilidad de realizar mediciones cuantitativas, para ello se comparó el nuevo método de inmunodetección magnética (IMA) con ELISA estándar; se encontró que la inmunodetección magnética resultó en una mayor sensibilidad y un rango de detección más amplio y fue cuatro veces más rápido. En la presente investigación, la comparación realizada de IMA fue con ECLIA, se hallaron resultados similares, que permitieron un enfoque rápido y fácil, muy adecuado para mediciones en el punto de atención y sin costosos equipos de laboratorio.

En el estudio de Moeller ME (20), realizado para comparar IMA, ELISA y PCR, en 35 muestras de plasma de pacientes con COVID-19 (29), 82,9% fueron positivas para IgA / IgM o IgG por IMA y 29 muestras (82,9%) fueron positivas por ELISA. La sensibilidad para una sola muestra por paciente fue 68% para IgA + IgM y 73% IgG por IMA y 73% por ELISA. Para las muestras recolectadas 14 días después del inicio

de los síntomas, la sensibilidad tanto de IMA como de ELISA fue de alrededor del 90%. La especificidad de la IMA alcanzó el 100% en comparación con el 95% para ELISA IgA y el 97,5% para ELISA IgG. En nuestra investigación, se midió el desempeño entre IMA y ECLIA (prueba referencial). La sensibilidad y especificidad de IMA (IgA+IgM) es mucho mayor (40% - 98%) al comparar con la prueba rápida (IgM, 20% - 91%), teniendo en cuenta que la IgM es el marcador de la fase viral, por lo tanto, de la infección todavía activa, la prueba IMA en este aspecto resulta prometedora más aún al estar también ligada a una inmunoglobulina específica de mucosa y precoz en su aparición como es la IgA, fundamental en las invasiones infecciosas de las mucosas como es la respiratoria en este caso. Este aspecto es fundamental en la captación de infectados y contactos en la comunidad, así como el estadiaje de las fases de infección en pacientes hospitalizados.

El desempeño de la IgG, en cuanto a la sensibilidad y especificidad de IMA (IgG) es mucho mayor (77% - 98%) al comparar con la prueba rápida IEFL (IgG, 60% - 95%), teniendo en cuenta que la IgG es el marcador de la fase convaleciente, por lo tanto, de la infección inactiva o el recuerdo de ella, la prueba IMA, en este aspecto, resultó mucho más sensible y específica en la captación de pacientes con un real conteo en la producción de IgG circulante, siendo este aspecto fundamental para el seguimiento de pacientes Covid-19, tanto en la comunidad como pacientes hospitalizados.

Al comparar el desempeño del total de inmunoglobulinas usando los ensayos de IMA, teniendo como prueba de referencia o comparador a la técnica ECLIA, la sensibilidad y especificidad de IMA (IgA+IgM/IgG) es del 76% y el 97% respectivamente; mientras que para la Prueba Rápida (IgM/IgG) es del 62% y el 91%, respectivamente. La detección es potencialmente mayor cuando se combinan los resultados de ambas Igs, y si se añade IgA, mejoraría aún más.

En las pruebas IMA usando el cartucho ViroTrack se observa un mejor desempeño de esta combinación, evidenciándose su potencialidad en la variable de la sensibilidad.

En cuanto a otras variables estadísticas de evaluación de desempeño de las pruebas diagnósticas, el Valor Predictivo Positivo (VPP), que es el porcentaje de clasificados como positivos respecto del total de casos positivos, para IMA estaría alrededor del 92%, mientras que, para la prueba rápida –IEFL- estaría alrededor del 76%; se demuestra así la mayor captación de infectados a SARS CoV-2. Respecto al Valor Predictivo Negativo (VPN), que es el porcentaje de clasificados como negativos respecto al total de casos negativos, IMA muestra un VPN alrededor del 89%, mientras que la prueba rápida IEFL un 84%; de esta manera, IMA mejora la captación de falsos negativos en los muestreados.

VI. CONCLUSIONES

IMA como técnica para la detección de anticuerpos anti- SARS CoV-2 presenta un perfil de sensibilidad y especificidad superior a la prueba rápida por el método de inmunocromatografía de flujo lateral.

IMA como técnica para la detección de anticuerpos anti- SARS CoV-2 presenta un perfil de sensibilidad y especificidad comparable a la prueba ECLIA.

IMA incorpora la IgA específica de mucosa para ampliar el rango de tiempo precoz en la detección de anticuerpos anti- SARS CoV-2.

IMA presenta mayor porcentaje de captación de pacientes falso negativos comparada con las pruebas rápidas.

IMA, para COVID-19, es una prueba rápida y fácil de usar en el punto de atención sin necesidad de contar con mayor maquinaria de laboratorio.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar incrementando las investigaciones comparativas con IMA como plataforma serológica cuantitativa en SARS CoV-2.

Difundir la plataforma IMA como un método rápido y eficaz a ser utilizado por su ventaja de portabilidad en lugares con laboratorio de nivel básico.

Incluir la plataforma IMA en el SISCOVID de reporte a Minsa.

Incluir su uso a nivel hospitalario para monitoreo de anticuerpos anti-SARS CoV-2 en el manejo del paciente Covid-19.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews of Microbiology*. [Internet]. 2020; [Citado marzo 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
2. WHO Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. [Internet]. [Citado marzo 2021]. Disponible en: who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019.
3. Esbin MN, Whitney ON, Chong S, Maurer A, Darzacq X, Tjian R. Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA*. 2020; 26(7):771-783.
4. Lisboa M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et. al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2020;370:m2516.
5. Rashid ZZ, Othman SN, Abdul Samat MN, Ali UK, Wong KK. Diagnostic performance of COVID-19 serology assays. *Malays J Pathol*. 2020; 42(1):13-21.
6. Vashist SK. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. *Diagnostics* 2020; 10(4):202.
7. Minsa. Sala situacional COVID-19. Consultado Octubre 2020. Disponible en: covid19.minsa.gob.pe/sala_situacional.asp.
8. Park H, Hwang MP, Lee KH. Immunomagnetic nanoparticle-based assays for detection of biomarkers. *International Journal of Nanomedicine* 2013; 8:4543-4552.
9. Alejo-Cancho I, Navero-Castillejos J, Peiró-Mestres A, Albarración R, Barrachina J, Navarro A, et. al. Evaluation of a novel microfluidic immunomagnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(2): e000808210.
10. A microfluidic immunomagnetic bead-based system for the rapid detection of influenza infections: from purified virus particles to clinical specimens. *Biomed Microdevices*. 2013; 15:539–551.
11. Bluesense Diagnostics. [Internet]. Consultado Octubre 2020. Disponible en: warem.pe/wp-content/uploads/2019/09/Blusense-Brochure-COVID19.pdf.
12. Hung LY, Huang TB, Tsai YC, Yeh CS, Lei HY, Lee GB. A microfluidic immunomagnetic bead-based system for the rapid detection of influenza infections: from purified virus particles to clinical specimens. *Biomed Microdevices*. 2013 Jun;15(3):539-51.
13. Antunes P, Watterson D, Parmvi M, Burger R, Boisen A, Young P, Cooper MA, Hansen MF, Ranzoni A, Donolato M. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. *Sci Rep*. 2015 Nov 5;5:16145.

14. Partha R, Ravi G,; Ankita A. Evaluation of a novel immuno-magnetic assay technology for rapid detection of dengue NS1 antigen. *International Journal of Research in Medical Sciences*, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 129-134, dec. 2019
15. Alejo-Cancho I, Navero-Castillejos J, Peiró-Mestres A, Albarracín R, Barrachina J, Navarro A, Gonzalo V, Pastor V, Muñoz J, Martínez MJ. Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Feb 18;14(2):e0008082.
16. Chong ZL, Sekaran SD, Soe HJ, Peramalah D, Rampal S, Ng CW. Diagnostic accuracy and utility of three dengue diagnostic tests for the diagnosis of acute dengue infection in Malaysia. *BMC Infect Dis*. 2020 Mar 12;20(1):210.
17. Liao T, Wang X, Donolato M, Harris E, Cruz MM, Balmaseda A, Wang RYL. Evaluation of ViroTrack Sero Zika IgG/IgM, a New Rapid and Quantitative Zika Serological Diagnostic Assay. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Jun 4;10(6):372.
18. Jan Pietschmann, Nadja Vöpel, Holger Spiegel, Hans-Joachim Krause, Florian Schröper Brief Communication: Magnetic Immuno-Detection of SARS-CoV-2 specific Antibodies. *bioRxiv* 2020.06.02.131102
19. Wu, Kai & Saha, Renata & Su, Diqing & Dk, Venkatramana & Liu, Jinming & Cheeran, Maxim. (2020). Magnetic Immunoassays: A Review of Virus and Pathogen Detection Before and Amidst the Coronavirus Disease-19 (COVID-19).
20. Engel M, Fock J, Pah, De La Campa A, Bade M, Donolato M, Bastrup S, Eugen-Olsen J, Benfield T, Neess Engsig F. Evaluation of commercially available immuno-magnetic agglutination and enzyme-linked immunosorbent assays for rapid point-of-care diagnostics of COVID-19. *medRxiv* 2020.08.15.20172080
21. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. 2020.
22. Organization WH. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report. Geneva: WHO; 2020.
23. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARSCoV-2 Infection in Children. *New England Journal of Medicine*. 2020.
24. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The Lancet*. 2020;395(10226):809-15.
25. Zeng L, Xia S, Yuan W, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal Early-Onset Infection With SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatrics*. 2020.
26. Wang S, Guo L, Chen L, Liu W, Cao Y, Zhang J, et al. A case report of neonatal COVID-19 infection in China. *Clinical Infectious Diseases*. 2020.
27. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *bioRxiv*. 2020:2020.01.22.914952.

28. Ge X-Y, Li J-L, Yang X-L, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013;503(7477):535-8.
29. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(19):1814-20.
30. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
31. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology*.
32. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2020.
33. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, Liang W-h, Ou C-q, He J-x, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*. 2020.
34. Du W, Yu J, Wang H, Zhang X, Zhang S, Li Q, et al. Clinical characteristics of COVID-19 in children compared with adults in Shandong, China. *Research Square [Internet]*. 2020 21 marzo 2020.
35. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia Ja, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a singlecentered, retrospective, observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020.
36. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *The Lancet Respiratory Medicine*.
37. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020.
38. Liu Y, Bi L, Chen Y, Wang Y, Fleming J, Yu Y, et al. Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. *medRxiv*. 2020:2020.03.10.20033795.
39. Lippi G, Plebani M, Graber ML. Building a bridge to safe diagnosis in health care. The role of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54:1–3.
40. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med*. 2020.
41. Noh JY, Yoon S-W, Kim D-J, Lee M-S, Kim J-H, Na W, Song D, Jeong D G, Kim H k. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR. *Springer*. February 2017.

42. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, Feng Y, Zhu C. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta*. 2020; 505:172-175.
43. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, KW Chu D, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, *Euro Surveill*. 2020; 25(3).
44. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020;38(1):1-9.
45. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et.al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4): 424-32.
46. Liandris E, Gazouli M, Andreadou M, Sechi LA, Rosu V, Ikonomopoulos J. Detection of pathogenic mycobacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation. *PLoS One*. 2011;6(5):e20026.
47. Yu LSL, Uknalis J, Tu SI. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *J Immunol Methods*. 2001;256(1–2):11–18.
48. Keating CD. Nanoscience enables ultrasensitive detection of Alzheimer's biomarker. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(7):2263–2264.
49. Botto L, Masserini M, Cassetti A, Palestini P. Immuno separation of Prion protein-enriched domains from other detergent-resistant membrane fractions, isolated from neuronal cells. *FEBS Lett*. 2004;557(1–3): 143–147.
50. Song LA, Shan DD, Zhao MW, et al. Direct detection of bacterial genomic DNA at sub-femtomolar concentrations using single molecule arrays. *Anal Chem*. 2013;85(3):1932–1939.
51. Sun Y, Bai YP, Song DQ, Li XZ, Wang U, Zhang HQ. Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with magnetic microbeads. *Biosens Bioelectron*. 2007;23(4):473–478.
52. Rife JC, Miller MM, Sheehan PE, Tamanaha CR, Tondra M, Whitman LJ. Design and performance of GMR sensors for the detection of magnetic microbeads in biosensors. *Sens Actuators A Phys*. 2003;107(3): 209–218.
53. Liu GD, Lin YH. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta*. 2007;74(3):308–317.
54. Tennico YH, Hutanu D, Koesdjojo MT, Bartel CM, Remcho VT. On-chip aptamer-based sandwich assay for thrombin detection employing magnetic beads and quantum dots. *Anal Chem*. 2010;82(13): 5591–5597.
55. Wang J, Liu GD, Wu H, Lin YH. Quantum-dot-based electrochemical immunoassay for high-throughput screening of the prostate-specific antigen. *Small*. 2008;4(1):82–86.
56. Gijs MAM. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluid Nanofluidics*. 2004;1(1):22–40.

57. Zhang RQ, Liu SL, Zhao W, et al. A simple point-of-care microfluidic immunomagnetic fluorescence assay for pathogens. *Anal Chem.* 2013;85(5):2645–2651.
58. Sasso LA, Undar A, Zahn JD. Autonomous magnetically actuated continuous flow microimmunofluorocytometry assay. *Microfluid Nanofluidics.* 2010;9(2–3):253–265.
59. Sasso LA, Johnston IH, Zheng M, Gupte RK, Undar A, Zahn JD. Automated microfluidic processing platform for multiplexed magnetic bead immunoassays. *Microfluid Nanofluidics.* 2012;13(4):603–612.
60. Sasso LA, Aran K, Guan YL, Undar A, Zahn JD. Continuous monitoring of inflammation biomarkers during simulated cardiopulmonary bypass using a microfluidic immunoassay device – a pilot study. *Artif Organs.* 2013;37(1):E9–E17.)
61. Kim J, Lee HH, Steinfeld U, Seidel H. Fast capturing on micromagnetic cell sorter. *IEEE Sens J.* 2009;9(8):908–913.
62. Tsuchiya H, Okochi M, Nagao N, Shikida M, Honda H. On-chip polymerase chain reaction microdevice employing. a magnetic droplet-manipulation system. *Sens Actuators B Chem.* 2008;130(2):583–588.
63. Bronzeau S, Pamme N. Simultaneous bioassays in a microfluidic channel on plugs of different magnetic particles. *Anal Chim Acta.* 2008;609(1):105–112.
64. Boles DJ, Benton JL, Siew GJ, et al. Droplet-based pyrosequencing using digital microfluidics. *Anal Chem.* 2011;83(22):8439–8447.
65. Yoon S, Kim JA, Lee SH, Kim M, Park TH. Droplet-based microfluidic system to form and separate multicellular spheroids using magnetic nanoparticles. *Lab Chip.* 2013;13(8):1522–1528.
66. Witters D, Knez K, Ceysens F, Puers R, Lammertyn J. Digital microfluidics-enabled single-molecule detection by printing and sealing single magnetic beads in femtoliter droplets. *Lab Chip.* 2013;13(11): 2047–2054.
67. Sista RS, Eckhardt AE, Srinivasan V, Pollack MG, Palanki S, Pamula VK. Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital micro-fluidic platform. *Lab Chip.* 2008;8(12):2188–2196.
68. Lim CT, Zhang Y. Bead-based microfluidic immunoassays: the next generation. *Biosens Bioelectron.* 2007;22(7):1197–1204.
69. Herrmann M, Veres T, Tabrizian M. Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA. *Lab Chip.* 2006;6(4): 555–560.
70. Yu X, Xia HS, Sun ZD, et al. On-chip dual detection of cancer biomarkers directly in serum based on self-assembled magnetic bead patterns and quantum dots. *Biosens Bioelectron.* 2013;41:129–136.
71. Ren L, Wang JC, Liu WM, et al. An enzymatic immunoassay microfluidics integrated with membrane valves for microsphere retention and reagent mixing. *Biosens Bioelectron.* 2012;35(1):147–154.)

72. Pregibon DC, Toner M, Doyle PS. Multifunctional encoded particles for high-throughput biomolecule analysis. *Science*. 2007;315(5817): 1393–1396.

ANEXOS

Anexo 1. Instrumentos de recolección de datos

		FICHA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA COVID-19	
I. DATOS GENERALES			

1. Fecha: ____/____/____

2. Lugar de trabajo: _____

II. DATOS DEL PACIENTE			
-------------------------------	--	--	--

3. Apellidos y nombres: _____

4. Fecha de nacimiento: ____/____/____ 5. Edad: ____ |

6. Sexo: Masculino Femenino 7. N° DNI: _____ N° Teléfono: _____

INFORMACIÓN DEL DOMICILIO DEL PACIENTE

8. Dirección de residencia actual: _____

País: _____ Provincia: _____ Distrito: _____

III. CUADRO CLÍNICO			
----------------------------	--	--	--

9. Sintomático: _____ Si No

10. Hospitalizado: Si No

11. Síntomas:

- Fiebre/escalofrío
- Malestar general
- Tos
- Dolor de garganta
- Congestión nasal
- Otros, especificar: _____

- Dificultad respiratoria
- Diarrea
- Náuseas/vómitos
- Cefalea
- Irritabilidad/confusión

- Dolor Marque todos los que aplica:
- () Muscular () Pecho
- () Abdominal () Articulaciones

12. Condiciones de comorbilidad

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Embarazo (Trimestre: _____) | <input type="checkbox"/> Pos parto (< 6 semanas) |
| <input type="checkbox"/> Enfermedad cardiovascular (incluye hipertensión) | <input type="checkbox"/> Inmunodeficiencia (incluye VIH) |
| <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Enfermedad renal |
| <input type="checkbox"/> Enfermedad hepática | <input type="checkbox"/> Daño hepático |
| <input type="checkbox"/> Enfermedad crónica neurológica o neuromuscular | <input type="checkbox"/> Enfermedad pulmonar crónica |
| <input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____ | <input type="checkbox"/> Cáncer |

IV. Información de viaje y exposición

13. Ocupación

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Estudiante | <input type="checkbox"/> Trabajador de salud |
| <input type="checkbox"/> Trabaja con animales | <input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____ |
| <input type="checkbox"/> Trabajador de salud en laboratorio | |

14. ¿Ha viajado 14 días antes a zonas de riesgo de COVID 19? Sí No Desconocido

15. Si la respuesta es Si, especifique los lugares a los que el paciente viajó:

País	Ciudad
1	
2	
3	

16. ¿Ha visitado algún establecimiento de salud en los 14 días previos por síntomas respiratorios?

Sí No Desconocido

17. ¿Ha tenido contacto cercano con una persona con infección respiratoria aguda en los 14 días previos? Si la respuesta es si, marque según corresponda:

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Entorno de salud | <input type="checkbox"/> Entorno familiar | <input type="checkbox"/> Lugar de trabajo |
| <input type="checkbox"/> Desconocido | <input type="checkbox"/> Otros, especifique: _____ | |

18. ¿Ha tenido contacto con un caso confirmado o probable en los 14 días previos?

Sí No Desconocido

Si la respuesta es si, liste los datos de los casos confirmados o probables:

Caso 1: _____

Caso 2: _____

Caso 3: _____

Si la respuesta es si, marque el entorno, según corresponda:

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Entorno de salud | <input type="checkbox"/> Entorno familiar | <input type="checkbox"/> Lugar de trabajo |
| <input type="checkbox"/> Desconocido | <input type="checkbox"/> Otros, especifique: _____ | |

Si la respuesta es si, registre el país/departamento/localidad de exposición: _____

V. LABORATORIO (Para ser llenado por laboratorio)

19. Fecha de toma de muestra: ____/____/____

20. Tipo de muestra: _____ 21. Tipo de prueba: _____

22. Fecha de resultado de laboratorio: ____/____/____

Anexo 3. Consentimiento informado

PROTOCOLO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE TESIS:

“Estudio comparativo de dos técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2”

NOMBRE: _____ EDAD: _____

FECHA: _____

Por medio del presente documento acepto participar voluntariamente en la investigación:

Estudio comparativo de dos técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2.

Hago constar que se me ha informado claramente en qué consiste mi aporte al proyecto.

Estoy consciente que mi participación implica la donación voluntaria de sangre. Estoy informado de las condiciones en que se me tomará la muestra y de los riesgos que implica, así como, que no interfiere con ningún tratamiento que recibiré para mi enfermedad.

Si al finalizar la investigación hubiera muestras más restantes, yo AUTORIZO / NO AUTORIZO a que sean almacenadas para ser empleadas en proyectos de investigación futuros.

.....

Firma del participante

Nombre:.....

DNI: Índice derecho

.....

Firma del Investigador Principal

Nombre:.....

DNI:

Fecha: