



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“Evaluación de una prueba rápida *versus* un
inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas
(CMIA) para la detección de anticuerpos contra SARS-
CoV-2”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

FREDY LARA SANJUAN

ASESORA DE TESIS: DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ
COASESOR (A): DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional**

Evaluación de una prueba rápida versus un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2.

Que presenta el pasante: **Fredy Lara Sanjuan**

Con número de cuenta: **314018155** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de mayo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	L.B.D Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/javg

AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA

A mis padres que siempre me han apoyado y comprendido incondicionalmente, por haberme hecho lo que soy hoy, ya que sin ellos yo no hubiese podido haber concluido uno de tantas metas por cumplir, que es este trabajo. Me motivaron día con día, confiaron en mí y sobre todo siempre me protegen como solo un padre sabe hacerlo. Los amo tanto y es por eso que este trabajo es gracias a ustedes.

A mi abuela que en paz descanse por enseñarme a ver el lado bueno de la vida, por no rendirse nunca y por la que decidí estudiar una carrera del área de la salud, le prometí que nada me va a vencer y se cumpliré, fuerte abrazo donde quiera que estés, te amo.

A mis profesores y amigos que siempre me transmitieron un poco de su conocimiento, por darme su amistad y hacerme mejor persona.

A mi asesora de tesis la Dra. Briceida López Martínez por su apoyo y paciencia, además de la virtud por quererme superar.

Las personas con las que nos relacionamos no son una coincidencia, de todas se aprende algo diferente, eso lo encontré en mi amiga Diana Michelle, gracias por tu amistad, tus consejos y paciencia.

A la UNAM por brindarme la oportunidad de estudiar en la mayor casa de estudios de México y por proporcionarme las herramientas necesarias en el ámbito académico.

Indice de Imágenes

Fig 1. Coronavirus de origen zoonotico y sus respectivos hospederos Intermediarios, SARS-CoV (Civeta), MERS (Camellos) y SARS-CoV-2 (Pangolín).	14
Fig 2. Árbol filogénico de la comparación del genoma completo del SARS-CoV-2;	15
Fig 3. Alineación de múltiples secuencias de la proteína Spike mediante Kaling-EBI	17
Fig 4. Estructura del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2), Características genómicas (Secuencia completo y Glicoproteína Spike); ID Uniprot P0DTC2 (SPIKE_SARS2); 6VXX-PDB.....	18
Fig 5. Mecanismo de formación de la caperuza 5' RNAm del SARS-CoV-2 modificado de	24
Fig 6. Mecanismo de replicación del SARS-CoV-2.....	25
Fig 7. Síntomas causados por el SARS-CoV-2.....	27
Fig 8. Cascada de señalización mediada por TLR4 dependiente de MyD88 y TIRAP/TRAM.	28
Fig 9. Activación de linfocitos T y diferenciación a Th1.....	29
Fig 10. Obtención del molde DNAc mediante la reacción transcripción inversa por las enzimas Transcriptasa inversa y Taq polimerasa	31
Fig 11. Etapas de la PCR y Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman.....	32
Fig 12. ELISA INDIRECTA del SARS-CoV-2	33
Fig 13. Ilustración esquemática de un test rápido de anticuerpos SARS-CoV-2 IgG/IgM35	
Fig 14. Componentes del kit VAZYME 2019n-CoV IgG/IgM.....	41
Fig 15. Resultados de las pruebas rápidas VAZYME 2019-nCoV IgG/IgM.....	44

Indice de Tablas

Tabla 1. Comparación genética de la cepa Mexicana de SARS-CoV-2 con la de otros coronavirus.	16
Tabla 2. Comparación de aminoácidos de la cepa Mexicana de SARS-CoV-2 con la de otros coronavirus	17
Tabla 3. Clasificación de las variantes de SARS-CoV-2.....	22
Tabla 4. Citocinas producidas por células Th1 y Th2 tomada de [35]	29
Tabla 5. Muestras de diagnóstico para el SARS-CoV-2 (15, 22, 76).....	30
Tabla 6. Cálculos de las pruebas diagnosticas	37
Tabla 7. Valores que determinan la eficiencia diagnostica de una prueba.....	37
Tabla 8. Grado de concordancia kappa.....	37
Tabla 9. Resultados obtenidos de los VPP de IgG tanto en CMIA y VAZYME 2019n-CoV IgG	42
Tabla 10. Resultados obtenidos de los VPP de IgG tanto en CMIA y VAZYME 2019n-CoV IgM	43
Tabla 11. Resultados obtenidos de los VNN tanto para CMIA y VAZYME 2019n-CoV IgG/IgM	44
Tabla 12. Comparación de VAZYME 2019-nCoV versus ARCHITEC IgM para la detección de anticuerpos Anti-IgM de SARS-CoV-2.....	45
Tabla 13. Comparación de VAZYME 2019-nCoV versus ARCHITEC IgG para la detección de anticuerpos Anti-IgG de SARS-CoV-2.....	45
Tabla 14. Tasa de positividad entre las pruebas	46

Indice de Contenido

Abreviaturas	8
1. Resumen	12
2. Marco Teórico	13
2.1 Coronavirus	13
2.1.1 Origen, características estructurales y genómicas	14
2.1.2 Ciclo de replicación	22
2.1.3 Incubación y transmisión	25
2.1.4 Patogenicidad e inmunidad	27
2.2 Pruebas de diagnóstico	30
2.2.1 Tipos de muestra	30
2.2.2 RT-qPCR	30
2.2.3 Serología	32
2.2.3.1 ELISA-INDIRECTA	33
2.2.3.2 CMIA o CLIA	33
2.2.4 Prueba rápida para anticuerpos	34
3. Características de las pruebas diagnosticas	35
3.1 Validez	36
3.2 Seguridad	36
3.3 Fiabilidad	36
4. Planteamiento del problema	38
5. Justificación	38
6. Hipótesis	39
7. Objetivo General	39
7.1 Objetivos particulares	39
8. Materiales y metodología	39
8.1 Descripción del estudio	39
8.2 Criterios del estudio	39
8.2.1 Muestras de suero que componen el panel negativo	39
8.2.2 Muestras de suero que componen el panel positivo	40
8.2.3 Criterios de exclusión	40
8.3 Procesamiento de las muestras	40
8.3.1 RT-qPCR	40
8.3.2 Obtención y conservación de las muestras	40
8.3.2.1 CMIA ARCHITEC Abotte IgM	40

8.3.2.2 CMIA ARCHITEC Abbott IgG	41
8.3.3 Prueba rápida VAZYME 2019-nCoV IgG/IgM.....	41
8.3.4 Análisis estadístico.....	41
9. Resultados	42
10. Discusión	47
11. Conclusion	49
12. ANEXO 1	50
ANEXO 2.	51
ANEXO 3.	52
13. Referencias	54

Abreviaturas

3CLpro Proteasa similar a 3-quimiotripsina

Ac Anticuerpo

ACE2 Enzima Convertidora de Angiotensina 2

Ag Antígeno

Ap1 Proteína Activadora-1

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido Ribonucleico mensajero

C Línea Control

Ca Calcio

CCL2 Ligando 2 de quimiocina motivo CC

CCL20 Ligando 20 de quimiocina motivo CC

CCL8 Ligando 8 de quimiocina motivo CC

CD Dominio conector

CH Hélice Central

CMIA Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Macropartículas

COVID-19 Enfermedad del Coronavirus 2019

CT Cola citoplasmática

CXCL-1 Ligando de quimiocina motivo CXC-1

CXCL-10 Ligando de quimiocina motivo CXC-10

CXCL16 Ligando de quimiocina motivo CXC-16

CXCL-2 Ligando de quimiocina motivo CXC-2

CXCL-3 Ligando de quimiocina motivo CXC-3

CXCL-5 Ligando de quimiocina motivo CXC-5

CXCL-6 Ligando de quimiocina motivo CXC-6

CXCL-8 Ligando de quimiocina motivo CXC-8

CXCL-9 Ligando de quimiocina motivo CXC-9

DNA Acido Dexoribonucleico

DNAc Acido Dexoribonucleico complementario

dNTPs Desoxinucleótido Trifosfatos

DPP4 Dipeptidil peptidasa 4

E Proteína de Envoltura

ELISA “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ESP Especificidad

FGF Factor de crecimiento de fibroblastos

FN Falso Negativo

FP Falso Positivo

G-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos

G-MCSF Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GTP Guaniltransferasa

HCoV Coronavirus Humano

HR1 Repetición de Heptada 1

HR2 Repetición de Heptada 2

IgG Inmunoglobulina G

IgM Inmunoglobulina M

IL-1RA Receptor Antagonista de interleucina 1

IL-1 β Interleucina Beta 1

IL-2 Interleucina-2

IL-6 Interleucina-6

IL-7 Interleucina-7

IL-8 Interleucina-8

IL-9 Interleucina-9

IL-10 Interleucina-10

IL-12 Interleucina-12

IL-13 Interleucina-13

IL-18 Interleucina-18

INF γ Interferón gamma

K Índice Kappa

Kb Kilobases

M Proteína de Membrana

MERS-CoV Síndrome respiratorio de Oriente Medio asociado a coronavirus

Mg Magnesio

MHC I Complejo de Histocompatibilidad tipo 1

MHC II Complejo de Histocompatibilidad tipo 2

MIP-1 α Proteína Inflamatoria de Macrófagos Alfa

MIP-1 β Proteína Inflamatoria de Macrófagos Beta

N Proteína de Nucleocapside

N-CoV Nuevo Coronavirus

NF- κ B Factor Nuclear Kappa B

NK Células Natural Killer

ORF1ab Marco abierto de lectura a/b

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PLpro Proteína similar a la papaína

PMN Polimorfo nucleares

PP Poliproteína

R.P.M Revoluciones por minuto

RBD Dominio de unión al receptor

RdRP RNA-polimerasa dependiente de RNA

RE Retículo Endoplasmático

RNP Ribonucleocapside Helicoidal

RT-qPCR "Quantitative reverse transcripción PCR" o PCR de transcripción inversa cuantitativa

RV – Razón de verosimilitud negativo

RV + Razón de verosimilitud positivo

S Glicoproteína "Spike"

SAH S-adenosil-L-homocisteína

SAM S-adenosil-L-metionina

SARS-CoV Síndrome Respiratorio Agudo Severo asociado a coronavirus

SARS-CoV-2 Síndrome Respiratorio Agudo Severo asociado a coronavirus 2

SEN Sensibilidad

ssRNA Ácido Ribonucleico monocatenario

STAT 1/2 El transductor de señal y activador de la transcripción 1/2

T1/2 Línea de ensayo 1 o 2

Th1 Células T colaboradoras

TLR Receptores tipo Toll

TM Dominio transmembrana

TMD Dominio transmembrana Hidrofóbico

TMPRSS2 Proteasa transmembrana serina 2

TNF α Factor de necrosis tumoral-Alfa

TNF β Factor de necrosis tumoral-Beta

TOM70 Subunidad del receptor de importación mitocondrial

UB Ubiquitina

UTR Región no traducida

VEGF Factor de crecimiento de endotelio vascular

VN Verdadero Negativo

VP verdadero positivo

VPN Valor predictivo negativo

VPP Valor predictivo positivo

1. Resumen

A finales de diciembre del 2019, se detectaron en la provincia de Wuhan, China múltiples casos de neumonía, los cuales eran causados por un nuevo coronavirus, primero fue llamada 2019-nCoV, al ser aislado de esos pacientes una semana después, posteriormente de un análisis genético, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus nombro al virus SARS-CoV-2 oficialmente y la OMS a la enfermedad como COVID-19 [48,59]. Los coronavirus son virus de ARN monocateriano de sentido positivo, pertenecen a la familia *Coronaviridae*, afectan principalmente a mamíferos y aves siendo para los humanos una zoonosis [59]. Se pueden diferenciar en 4 géneros: Alfa, Beta, Gama y Delta. En el género alfa están incluidos 229E (1a) y NL63 (1b), mientras que en el beta están OC43 (2a) y el HKU1 (2a), éstos son endémicos y representan del 10-30% de las infecciones a nivel mundial [53,55]. Adicionalmente se incluyen las variantes que han causado diversos brotes como son el SARS-CoV (2b), el actual SARS-CoV-2 (2b) y MERS (2c). [66]

La detección del virus se hace por a través de RT-qPCR y/o mediante una prueba rápida que detecta antígenos (Ag), mientras que la serología nos permite comprobar la presencia de anticuerpos en pacientes positivos al SARS-CoV-2, una prueba rápida nos permite identificar entre aquellos que son positivos de los negativos y así aislarlos, cortando la cadena epidemiológica; por ello se han diseñado ensayos de flujo lateral (LFA) que identifican anticuerpos IgG/IgM en suero. En México la COFEPRIS aprobó distintas pruebas rápidas, usadas para el diagnóstico de COVID-19. Entre ellas el kit Vazyme 2019-nCoV IgG / IgM, un ensayo de flujo lateral (LFA), mediante un inmunoensayo automatizado, SARS-CoV-2 IgG/IgM (ARCHITECT, Abbott), utilizando suero de 75 pacientes con diagnóstico de SARS-CoV-2 y 25 negativos confirmados por RT-qPCR. Obteniendo una sensibilidad y especificidad de forma individual (100% y 52% IgG Vazyme, 15.2% y 100% IgM Vazyme) y global 100%, 60%, respectivamente. Se demostró que la prueba rápida Vazyme tiene bajo rendimiento en comparación con las prueba ARCHITECT.

2. Marco Teórico

2.1 Coronavirus

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* del orden *Nidovirales*. Se pueden clasificar en cuatro géneros distintos *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* y *Gamacoronavirus*. Los primeros dos afectan a mamíferos; HCoV-NL63 y HCoV-229E perteneciendo al género *Alfacoronavirus*; HCoV-OC43, HCoVHKU1, MERS, SARS-CoV y SARS-CoV-2 (COVID-19) al género *Betacoronavirus*; causando una variedad de enfermedades gastrointestinales y del tracto respiratorio. El delta y gama coronavirus infectan principalmente aves. [89,92]

Son virus envueltos con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, con una dirección 5' → 3', correspondiendo a un ARNm, estos virus tienen uno de los genomas más grandes de ARN aproximadamente de 26-32Kb [48]. Se ha demostrado que la variedad de cepas del coronavirus depende de tres aspectos, la infidelidad de la ARN polimerasa dependiente de ARN, incrementando su tasa de mutaciones 1×1000 ; alta frecuencia de recombinación de ARN homólogo; por último la flexibilidad de acomodar y modificar sus genes por el tamaño de su genoma al ser uno de los más grandes de su tipo. [96]

El grupo tanto del alfa y beta coronavirus se subdivide dependiendo de la filogenia y sus características genómicas, sin embargo, existe una diferencia en la proteína "Spike" permitiéndole el salto entre especies. [96]

En 1966 se identificaron a las primeras variantes de coronavirus que causaban una infección respiratoria aguda, siendo HCoV-E229 y OC43; sin embargo en 2005 se describió a HCoV-NL63 y HKU1 [20]. A pesar de reconocer la existencia de los coronavirus y que afectaban al humano no se siguió investigando. Actualmente se sabe que los coronavirus humanos, son de origen zoonótico.

No fue hasta 2002 y 2012 donde emerge el SARS-CoV (Guangdong, China) y MERS-CoV en Arabia Saudita respectivamente, asociados a neumonías graves en pacientes adultos, difiriendo en la letalidad, siendo para SARS-CoV de 20-30% y MERS de 35-45% [20].

A finales de diciembre del 2019 emergieron casos de neumonía en Wuhan, China, sin un agente etiológico determinado, pero no fue hasta enero del 2020 que se aisló de 5 pacientes una nueva variante de SARS-CoV-2. Desde entonces se extendió e infectó a 520.372.492 millones casos confirmados de COVID-19, incluidas 6.270.232 muertes hasta el 18 de mayo del 2022 [59,80, 95].

2.1.1 Origen, características estructurales y genómicas

El análisis filogénico de SARS-CoV-2 revela que tiene una estrecha relación con los Beta-coronavirus tales como SARS-CoV (2002) y MERS-CoV (2012), actualmente se conoce que son virus de origen zoonótico.

Tal como se muestra en la fig. 1, todos parten de un hospedero definitivo el cual es el murciélago herradura, la comparación genética del SARS-CoV-2 con otras especies de Beta-coronavirus, reveló una similitud del 82.3% respecto al SARS-CoV, 72.6% con MERS-CoV y 96% con el murciélago de herradura *Rhinolophus affinis*. [57, 26]

Comparte el mismo receptor de entrada a células epiteliales con el SARS-CoV, enzima convertidora de angiotensina II (ACE2). Adicionalmente y por la forma de transmisión de las anteriores coronavirus de origen animal, se propone que posee un hospedero intermediario el cual le permitió dar ese salto de especies y afectar actualmente al ser humano, éste es el pangolín, con el comparte una similitud del 90.32% del genoma del virus.[19]

Con lo anteriormente mencionado el origen propuesto actualmente del SARS-CoV-2 es a partir del coronavirus RaTG13 y Pangolín-CoV.

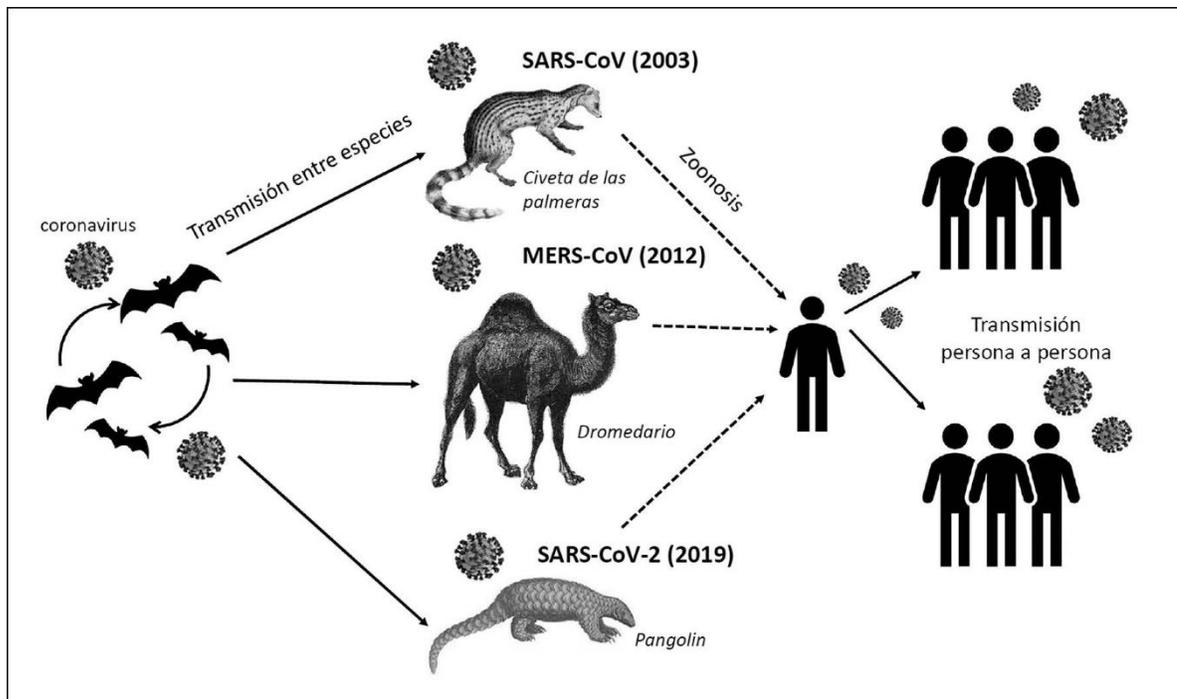


Fig 1. Coronavirus de origen zoonotico y sus respectivos hospederos Intermediarios, SARS-CoV (Civeta), MERS (Camellos) y SARS-CoV-2 (Pangolín). [104]

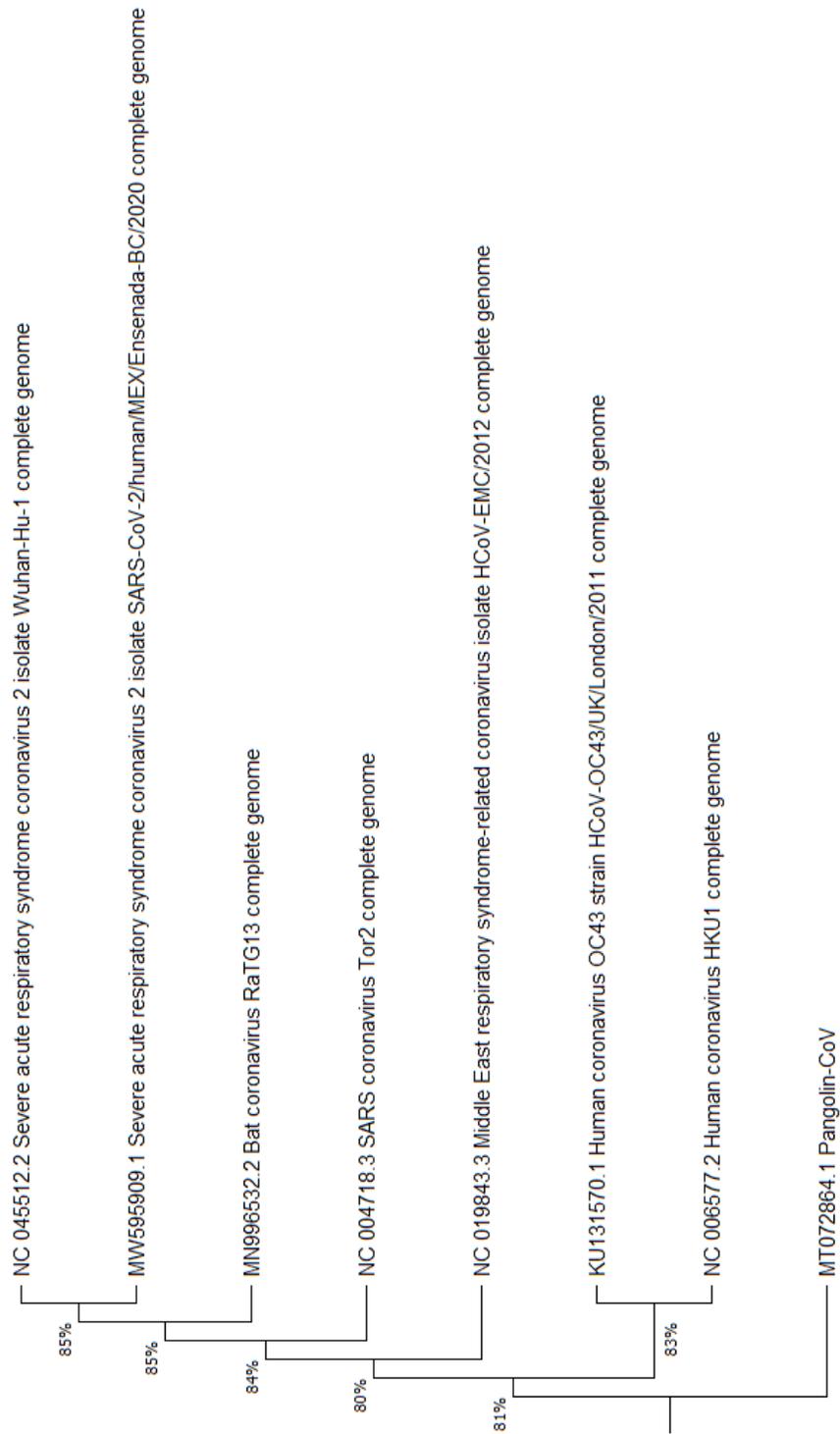


Fig 2. Árbol filogénico de la comparación del genoma completo del SARS-CoV-2; [29,78]

En la base de datos Genbank con ID MW595909, se encuentra el genoma completo del Síndrome respiratorio agudo severo aislado de coronavirus 2 SARS-CoV-2 / humano / MEX / Ensenada-BC / 2020. Al 19 de mayo del 2022 hay 5, 752,441 casos confirmados; 5, 050,420 personas recuperadas y 324,617 defunciones, de las cuales el 52.08% corresponden a mujeres y 47.92% hombres, en México. [Datos, covid-19]

La cepa Ensenada-BC/México comparte una similitud del 100% con el primer aislamiento de Wuhan, China. Lo que nos lleva a una baja variabilidad de SARS-CoV-2 con la de origen de la actual pandemia.

Sin embargo, el coronavirus posee una proteína denominada Spike o glicoproteína de pico, responsable de la interacción con el receptor ACE2, genómicamente esta proteína comparte una mayor similitud con la de RaTG13 (98.6%, 99.7%) y Pangolín-CoV (94.5%, 98.6). A diferencia con SARS (90.3%, 96.6%); MERS (68.1%, 77.6%); HCoV-OC43 (71.8%,80.4); HCoV-HKU1 (70.2%, 79.7%) Tabla 1 y 2.

Lo que ayuda a entender el origen de los hospederos, la glicoproteína se divide en dos subunidades la S1 y S2 a su vez posee una región llamada RBD, media la entrada viral en las células del hospedador uniéndose primero a su receptor ACE2, similitud que comparte con SARS-CoV, ya que MERS-CoV reconoce a dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) como su receptor, comparte una similitud del 78.6% con respecto a RaTG13, 73.3% SARS-CoV, 55 % MERS-CoV, 98% Pangolín-CoV; esto demuestra la adaptación de la regio RBD para dar el salto de especie del pangolín al ser humano, además de ser el blanco terapéutico actual.

Tabla 1. Comparación genética de la cepa Mexicana de SARS-CoV-2 con la de otros coronavirus.

Identidad de nucleótidos %						
	Genoma completo	S	RBD	N	E	ORF1ab
WH-SARS-CoV-2	100	100	98.7	100	100	100
RaTG13	96.1	98.6	78.6	99.9	100	99.8
SARS-CoV	82.3	90.3	73.3	99.5	97.8	95
MERS-CoV	72.6	68.1	55	76.2	78.5	74.9
HCoV-OC43	72.8	71.8	69.8	65	70.6	75.9
HCoV-HKU1	71.8	70.2	71	63.3	68	76
Pangolín-CoV	90.3	94.5	98	99	100	91.1

Comparación de secuencias genéticas completas del SARS-CoV-2 con 7 coronavirus, glicoproteína spike, RBD, Gen N, E y poliproteína ORF1ab. MX-BC (MW595909), WH (NC045512), RaTG13 (MN996532), SARS-CoV (NC004718), MERS-CoV (NC019843), HCoV-OC43 (KU131570), HCoV-HKU1 (NC006577) y Pangolín-CoV (MT072864). Alineación múltiple en Kaling-EBI.

Tabla 2. Comparación de aminoácidos de la cepa Mexicana de SARS-CoV-2 con la de otros coronavirus

Identidad de aminoácidos %						
	Genoma completo	S	RBD	N	E	ORF1ab
WH-SARS-CoV-2	99.8	100	100	100	100	100
RATG13	92.5	99.7	79.8	100	100	100
SARS-CoV	47.4	96.6	70.1	99.8	100	98.8
MERS-CoV	46.1	77.6	75.8	86.4	89.2	84.3
HCoV-OC43	61.2	80.4	80.7	86.6	81.1	85.7
HCoV-HKU1	60.5	79.7	82.1	84.7	83.8	85.9
Pangolín-CoV	47	98.6	98.2	99.5	100	99.6

Cotejo de secuencias proteicas del SARS-CoV-2 con 7 coronavirus glicoproteína spike, RBD, Gen N, E y poliproteína ORF1ab. MX-BC (MW595909), WH (NC045512), RaTG13 (MN996532), SARS-CoV (NC004718), MERS-CoV (NC019843), HCoV-OC43 (KU131570), HCoV-HKU1 (NC006577) y Pangolín-CoV (MT799523). Alineación múltiple en Kaling, EBI.

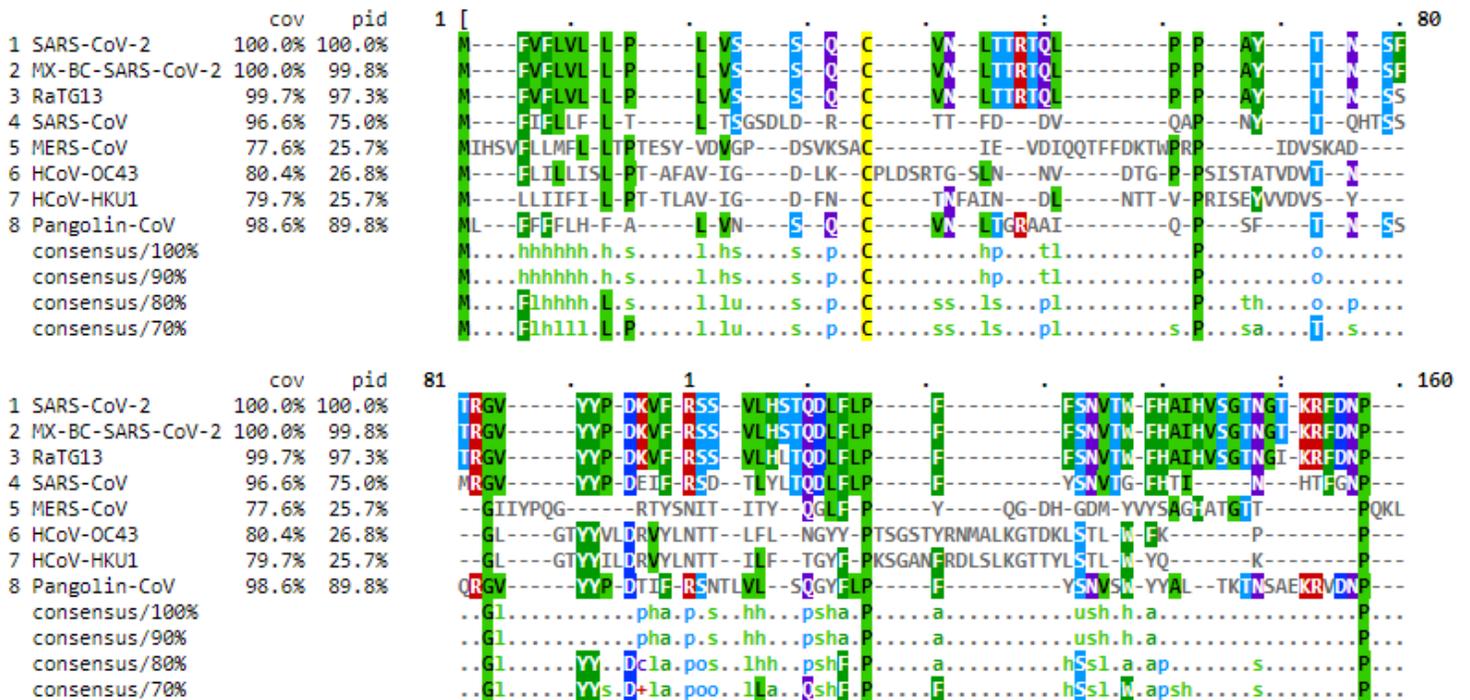


Fig 3. Alineación de múltiples secuencias de la proteína Spike mediante Kaling-EBI

Análisis comparativo de la glicoproteína de pico para evaluar su diversidad con otras variantes del coronavirus, incluida la secuencia reportada en México y su posible relación con el pangolín.

La organización del genoma se muestra en la figura 4C. Donde se visualizan 13 marcos abiertos de lectura ORF1ab, cuatro proteínas estructurales principales y 8 proteínas accesorias de las cuales se tiene o no conocimiento [7], la primera está ubicada en el extremo 5' que codifica para 2 poliproteínas pp1a y pp1b, estas son procesadas por 2 proteasas virales para producir 16 proteínas no estructurales (Nsp1-Nsp16). [7,85].

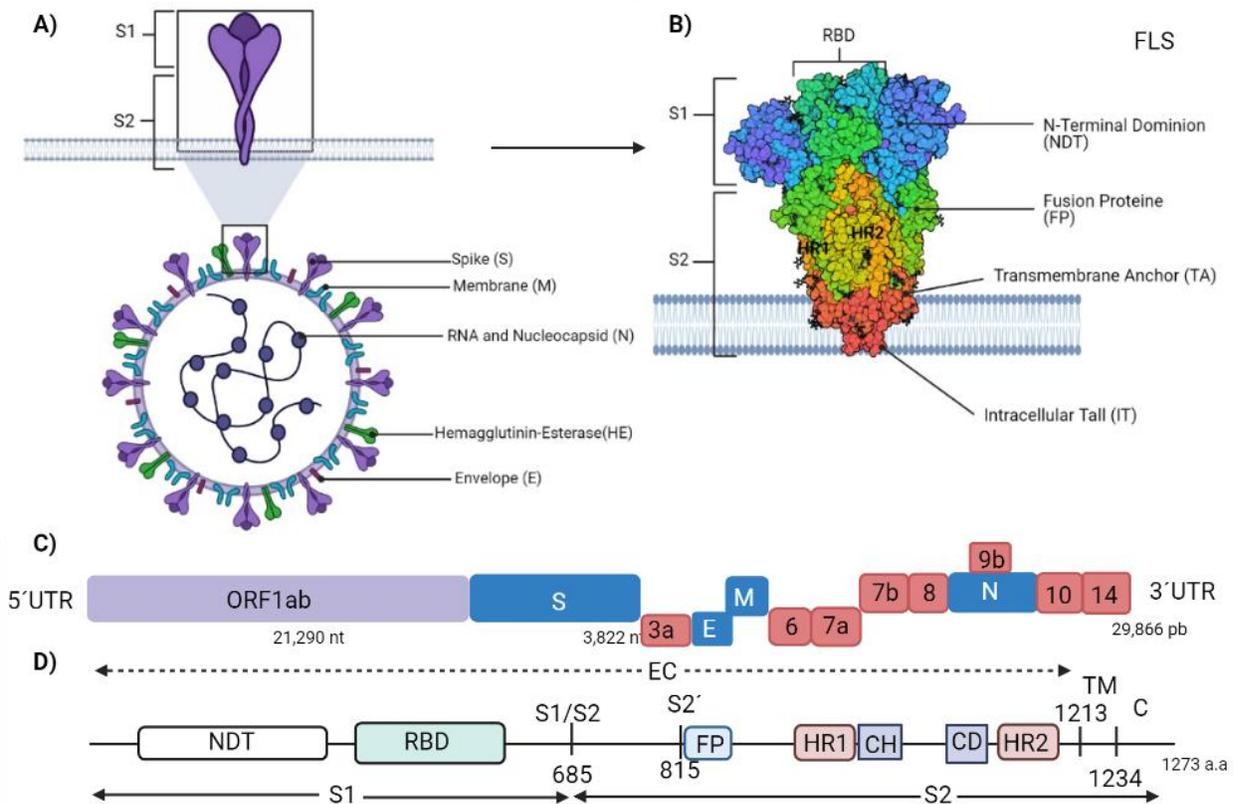


Fig 4. Estructura del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2), Características genómicas (Secuencia completo y Glicoproteína Spike); ID Uniprot P0DTC2 (SPIKE_SARS2); 6VXX-PDB. [29]

El inciso A corresponde a la estructura del SARS-CoV-2 con sus proteínas estructurales y ampliación de la glucoproteína "spike". Adicionalmente en el inciso B se ve una representación en 3D con las principales componentes que la conforman. Tanto el inciso C y D pertenecen al genoma del SARS-CoV-2, siendo el inciso C su representación de la secuencia completa, distribuyendo 13 marcos abiertos de lectura; dos proteínas principales, 4 estructurales y 8 accesorias. Por último de esta en el inciso D esta la secuencia completa de la proteína "Spike", visualizando en la región de unión entre la S1/S2, el sitio de unión con ACE2 (RBD) y la posición dentro del virus.

Proteínas no estructurales

Nsp1 es el producto de escisión N-terminal de las pp1a y pp1b mediante una proteasa viral similar a la papaína (PLpro), cuya función principal es su unión a la subunidad 40s del ribosoma en las células hospedadoras interfiriendo en la síntesis de proteínas pero no en las virales y la escisión endonucleolítica del ARNm. [7]

Nsp2 se cree que tiene su participación en la patogénesis del virus al interferir con PHB1 y PHB2 esenciales en la progresión del ciclo celular, apoptosis, biogénesis mitocondrial y diferenciación celular.

Nsp3 interactúa con Nsp4 y forma el complejo de replicación-transcripción (RTC) mediante su anclaje a la membrana y su interacción con otras Nsps, la proteína N y proteínas del hospedero, además está formado por dos dominios similares a la ubiquitina, (UB1, 2), región hipervariable (HVR), macrodominio-X y el dominio PLpro que codifica la proteasa similar a la papaína y está escinde la pp1a y pp1b en Nsp1, Nsp2 y Nsp3. [7, 42,82]

A diferencia de Nsp3, Nsp5 codifica para la proteasa similar a la 3 - quimotripsina (3CLpro o Mpro) y procesa las 12 proteínas no estructurales restantes. [68] Nsp7,8 y 12 forman el complejo de replicasa para la replicación y transcripción del genoma viral, además Nsp12 es una ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRP).[7,82]

Nsp6 forma autofagosomas visto por primera vez en el coronavirus aviar, protege los componentes virales de su degradación por lisosomas y facilita el ensamblaje de proteínas replicasas.

Nsp9 es codificada por ORF1a forma un núcleo de seis cadenas β que proyecta bucles extendidos hacia afuera e incluye una cadena β N-terminal y una hélice α C-terminal, media la replicación viral, su virulencia y reproducción del ARN monocatenario ya que se une y estabiliza al salir del complejo Nsp7-Nsp8 protegiéndolo de nucleasas. [21, 40]

La tapa 5'-Terminal es esencial para la traducción y estabilidad del ARNm, llevado a cabo por diversos procesos, participando Nsp10 formando un andamio para formar el complejo de metilación de la capa de ARNm, luego Nsp13, tiene función de helicasa y potencia su actividad al interactúa con Nsp12, pero su principal función es eliminar el gamma-fosfato del extremo 5' del ARNm naciente, ya que es una 5'-Trifosfatasa; Nsp14 es una exonucleasa y N7-metiltransferasa, metilando la tapa GpppA catalizando S-adenosil-metionina, lo que produce la estructura cap-0. Igualmente Nsp16 (2'-O-Ribosa-Metiltransferasa) utiliza el mismo catalizador solo que da una estructura cap-1 al metilar el grupo 2'-hidroxi de la adenina. [7, 70, 100]

Evadir el reconocimiento de dsRNA por el hospedero es llevado a cabo por Nsp15, el cual lo degrada al ser una endoribonucleasa utilizando el manganeso como cofactor. [100]

Proteínas estructurales

La proteína S es una glicoproteína trimérica transmembrana de clase tipo 1, está formada por dos dominios S1 y S2. Cada una con una función distinta, ya que la subunidad S1 lleva a cabo la unión con el receptor ACE2 mediado por RBD localizado en la región C-Terminal, mientras que la subunidad S2 la fusión de membranas por cambios conformacionales en la región S1/S2 y S2' llevado a cabo por una proteasa del hospedero TMPRSS2. El dominio S2 está conformado por un péptido de fusión (FP), repetición de heptada 1 (HR1), hélice central (CH), dominio conector (CD), repetición de heptada 2 (HR2), dominio transmembrana (TM) y cola citoplásmica (CT), Fig. 3D [7, 13, 41, 85,93]

Cada monómero de la proteína S está altamente glicosilado ya que contiene de 21 a 35 sitios de N-glicosilación. Además, también se predijeron tres sitios de O-glicosilación (Andersen et al. 2020). Por lo que es el principal blanco terapéutico actualmente. [8]

Actualmente se han identificado mutaciones en la glicoproteína de pico lo cual aumenta su transmisión, en la tabla 3 Se ve un resumen de los datos proporcionados por el CDC.

La proteína de envoltura (E) es codificada por RNA subgenómico, es el menos abundante en el virión, formado por tres dominios un ectodominio hidrofílico (N-terminal), un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) y un endo-dominio (C-terminal) [7]; es la proteína más conservada en los coronavirus.[11] Su función principal es el ensamblaje correcto del virión, sin embargo, se ha visto involucrado en liberación y patogénesis viral [65]; una función que se le atribuye es la formación de viroporinas por su tamaño e hidrofobicidad capaces de transportar selectivamente iones como Ca^{2+} provocando la pérdida del potencial de membrana y activación del inflammasoma del hospedero. [24, 75, 85].

Proteína de membrana (M) es la más abundante en el virión, dimérica y con tres dominios transmembrana, con una región C-terminal (Interior) y N-terminal (Exterior). Juega un papel importante en el ensamblaje del virión y su homeostasis interna. Participa en la interacción proteína-proteína a través del endodominio C-terminal y los residuos L218 y L219 necesarios para el empacamiento de la nucleocápside atribuyéndolo en la regulación del empacamiento del ARN viral maduro. [7, 41,85].

Por último tenemos a la proteína de nucleocápside (N), tiene dos dominios principales N-terminal y C-terminal, uniéndose al ARN viral empaquetando en una ribonucleocápsida helicoidal (RNP), interactuando con la proteína M durante el ensamblaje, además desencadena respuesta por parte del hospedero, a diferencia de la proteína S, E y M éste se sintetiza en el citoplasma ya que las otras se llevan

a cabo en el retículo endoplásmico y son transportados al aparato de Golgi. [7,63, 85].

Proteínas Accesorias

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada y este tiene dos vías la extrínseca e intrínseca, ORF3a es considerado un proapoptótico al activar la caspasa-8 y escinde Bid a tBid provocando la liberación del citocromo C, activando la caspasa-3 y culminando en apoptosis. [51,103]. ORF6 es un antagonista de interferón al inhibir la translocación nuclear STAT1 y STAT2 [102,52]; a diferencia de ORF9b utilizando TOM70 [37]; ORF8 es considerado un antagonista de interferón tipo pero no se sabe cómo actúa. [46]

ORF7a y b están involucrados en la apoptosis al interactuar con Bcl-XL secuestrándolo en el aparato de Golgi, liberando el Citocromo C, activación de p38 MAPK, inhibición de la síntesis de proteínas y de BST-2 [60,67]

Los ORF10 y 14 no tienen una función definida ya que muy pocos mapas genómicos los incluyen y falta más estudio. [12,60]

Variantes de SARS-CoV-2

Los virus como SARS-CoV-2 tienden a evolucionar constantemente llevando a cabo, cambios en su código genético provocado por mutaciones genéticas o recombinación viral durante la replicación de su genoma.

Definimos como **mutación**, cambio único en el código genético (genoma del virus), ocurriendo con frecuencia, pero pocas veces modificando las características del virus. Esto puede dar lugar a la **recombinación**; proceso de combinación, durante la replicación viral entre dos variantes de genomas del SARS-CoV-2, originando una nueva variante diferente de los dos **linajes** (grupo de virus relacionados estrechamente con un ancestro en común) de origen. Por último, una **variante** es un genoma viral con una o más mutaciones.

De acuerdo a las definiciones anteriores la OMS clasificó las variantes de SARS-CoV-2 en VBM (variante bajo monitoreo), VOC (variante de preocupación) y VOI (variante de interés). **Ver tabla 3.**

Tabla 3. Clasificación de las variantes de SARS-CoV-2

Nomenclatura	Linaje	Mutación	Primera detección	Designación
Alfa	B.1.1.7 y Q	$\Delta 69/70$, $\Delta 144Y$, (E484K*), (S494P*), N501Y, A570D, D614G, P681H.	Reino Unido	VOC: 29 de diciembre del 2020 VBM: 21 de septiembre del 2021
Beta	B.1.35	K417N, E484K, N501Y, D614G.	Sudáfrica	VOC: 29 de diciembre del 2020 VBM: 21 de septiembre del 2021
Gamma	P.1	K417N/T, E484K, N501Y, D614G.	Japón/ Brasil	VOC: 29 de diciembre del 2020 VBM: 21 de septiembre del 2021
Delta	B.1.617.2 y AY	L452R, E484Q, D614G, T478K	India	VOC: 15 de junio del 2021
Epsilon	B.1.43 B.1.43	L452R, D614G. S13I, W152C, L452R, D614G.	EE. UU.-California	VOC: 19 de marzo del 2021 VOI: 26 de febrero del 2021 VOI: 29 de junio del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Eta	B.1.52	A67V, $\Delta 69/70$, $\Delta 144$, E484K, D614G, Q677H, F888L	Nueva York	VOI: 26 de febrero del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Lota	B.1.53	(L5F*),T95I,D253G,(S477N*), (E484K*),D614G,(A701V*)		VOI: 26 de febrero del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Kappa	B.1.617.1	L452R, E484Q, D614G, P681R	India	VOI: 7 de mayo del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Zeta	P.2	E484K, D614G, V1176F	Brasil	VOI: 26 de febrero del 2021 VBM: 21 de septiembre del 2021
Omicron	B.1.1.529 BA.1 BA.1.1 BA.2	A67V, del69-70, T95I, del142-144, Y145D, del211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	Sudáfrica	VOC: 26 de noviembre del 2021

Datos obtenidos de "Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2", CDC.

2.1.2 Ciclo de replicación

La entrada de SARSCoV-2 es mediada por la glicoproteína "Spike" (S), utilizando la subunidad S1 (Responsable de la unión con el receptor ACE2); Subunidad S2 (Responsable de la fusión de membranas); presente en células epiteliales de las vías respiratorias, células epiteliales alveolares, células endoteliales vasculares y macrófagos pulmonares, los cuales expresan ACE2. [57,80]

También puede infectar células gliales e infectar el cerebro mediante transferencia retrograda a través del epitelio olfativo o el hueso cribiforme, causando pérdida del olfato. [86]

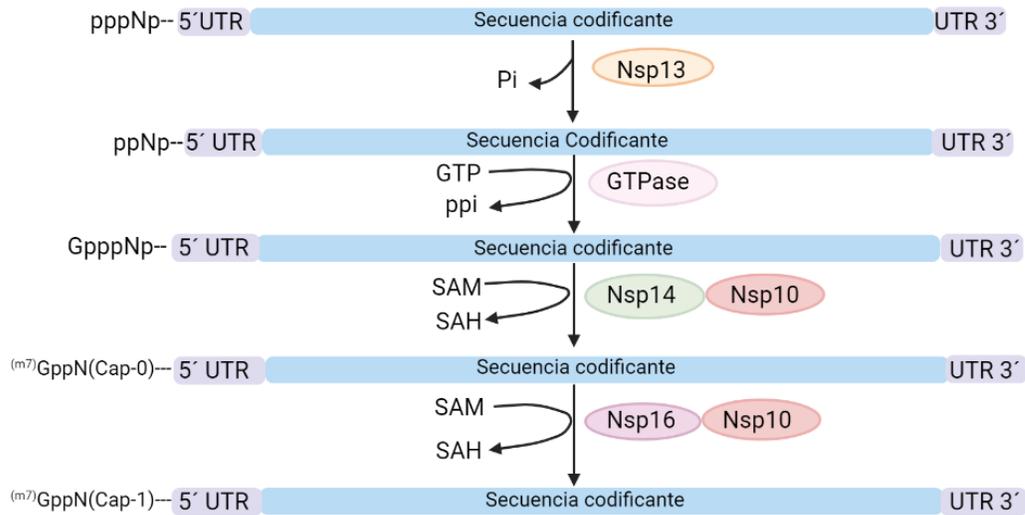
Existe evidencia que menciona un tratamiento previo con tripsina al virus provoca cambios conformacionales en la proteína spike de manera irreversible evitando su unión con ACE2, además la elastasa probablemente puede mediar la fusión del virus después de la unión, lo relevante es que es producida por células inflamatorias pulmonares durante la infección, promoviendo la progresión de infección. [80]

Cuando se une a su receptor, el segundo paso es la proteólisis por proteasas presentes en el hospedero (TMPRSS2 o CatB/L) en S1/S2 y S2', que separa las dos subunidades y produce un cambio de conformación para activar su estado de fusión.[26]

Una vez dentro de la célula, el genoma viral se libera al citoplasma y los ribosomas del hospedero inician la traducción del gen de la replicasa, que consiste en dos ORF que codifican para dos poli-proteínas (pp1a y pp1ab), originando 16 proteínas no estructurales tras la escisión proteolítica por dos cisteína proteasas que se encuentran dentro de Nsp3 (proteasa similar a la papaína; PL pro) y Nsp5 (proteasa similar a quimotripsina). [26,88]

La liberación rápida de Nsp1 permite que se dirija a la maquinaria de traducción del hospedero, los Nsp2-12 conforman el complejo viral de replicación-transcripción (RTC) formando vesículas de doble membrana a partir del retículo endoplásmico rugoso (RER), en donde tiene lugar la replicación viral mediada por Nsp2-11, además de la evasión inmune del hospedero y proporcionan cofactores para la replicación. [88]

Mientras que Nsp12-16 están involucradas en la síntesis de ARN, corrección y modificación. La síntesis de ARN es realizada por la ARN polimerasa dependiente de ARN nsp12 (RdRP) y sus dos cofactores Nsp7 y Nsp8 generando moldes de RNA de cadena negativa que utiliza para replicar nuevos genomas agregando una tapa 5' donde Nsp10 forman el complejo de metilación, Nsp13 elimina el gamma-fosfato del extremo 5' del ARNm naciente y nsp14 junto a Nsp16 metilan GpppN catalizando S-adenosil-metionina y transcribe siete a nueve RNA subgenómicos a partir de los cuales se sintetizan las proteínas estructurales. [7, 70, 82, 100]



FLS

Fig 5. Mecanismo de formación de la caperuza 5' RNAm del SARS-CoV-2 [69]

Las proteínas no estructurales involucradas son Nsp10, 13, 14 y 16. Además de guaniltransferasa (GTPase), S-adenosil-L-metionina (SAM), S-adenosil-L-homocisteína (SAH).

Una vez sintetizadas, las proteínas E, M y S se asocian al retículo endoplásmico y N forma la nucleocápside al unirse al RNA viral. Los viriones se ensamblan en el compartimiento intermedio retículo endoplásmico Golgi (ERGIC) de donde salen en vesículas que migran hacia la membrana y son liberados de la célula infectada mediante exocitosis. [26]

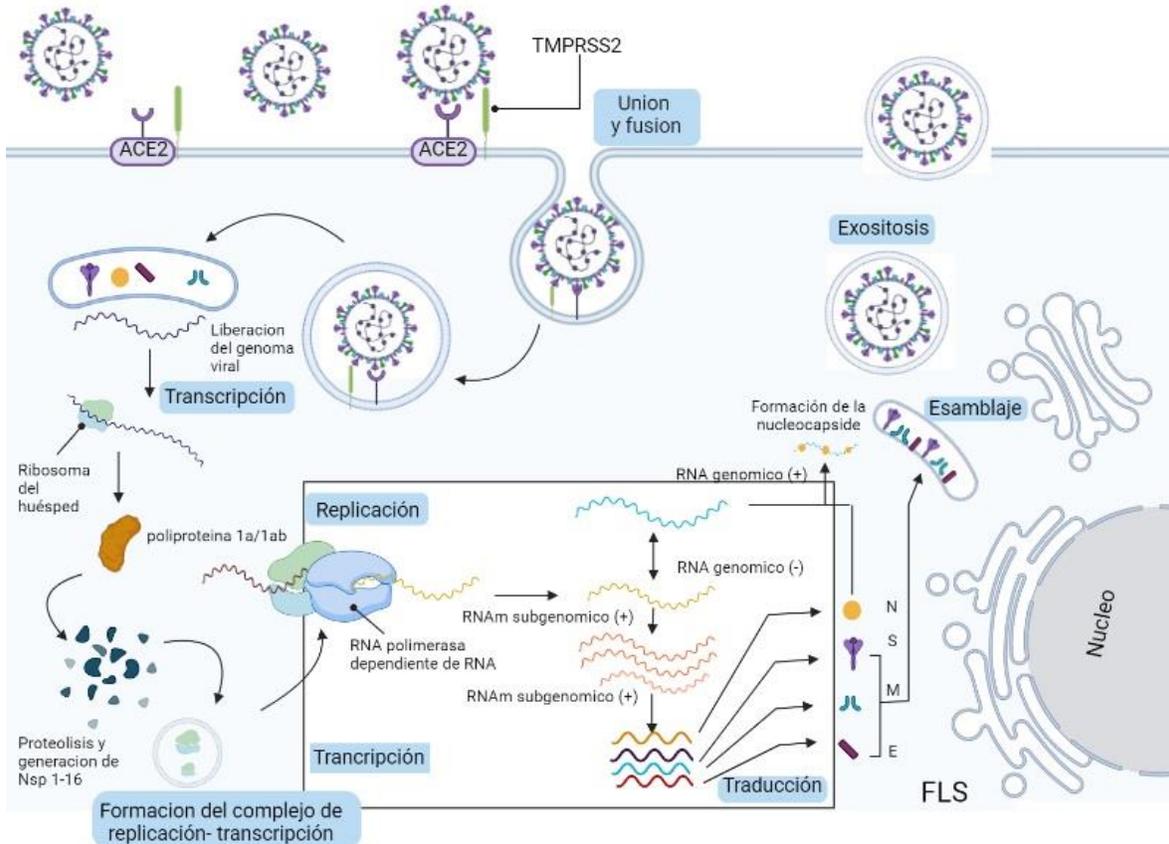


Fig 6. Mecanismo de replicación del SARS-CoV-2, modificado de [26,86]

2.1.3 Incubación y transmisión

Se replica principalmente en el tracto respiratorio superior e inferior afectando las células ciliadas, secretoras de moco además de epitelio bronquial, neumocitos tipo 1 y la mucosa conjuntival; recientemente se ha confirmado que puede infectar el bazo y ganglios linfáticos mediante macrófagos CD169+, adicionalmente infecta glándulas salivales, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino delgado y colon; el SNC y SNP, se cree la infección es mediada por neuropilina-1 (NRP1) y CD147 como receptores alternos a ACE2; sin embargo, también se ha demostrado su interacción con células de la piel y plaquetas por mecanismos no específicos. El riñón se sugiere es blanco de SARS-CoV-2, al infectar podocitos y túbulos contorneados proximales, como posibles células hospedadoras a las que se dirige el SARS-CoV-2. (34, 47, 67, 84)

La transmisión es de humano a humano por gotitas respiratorias y aerosoles a altas concentraciones por tiempos prolongados en lugares cerrados. Por lo tanto, se recomienda el uso de filtros virales, succión cerrada y cambios de flujo de aire. [71,91]

En un estudio donde evaluaron la humedad máxima, velocidad máxima del viento y temperatura máxima, demostraron que estos factores disminuyen la prevalencia de la enfermedad. Por lo que el calor, el pH alto o bajo y la luz solar facilitan la eliminación del coronavirus; un estudio demostró que al aumento de un grado 1°C de la temperatura ambiente, el número acumulado de casos disminuye en un 0,86%. [91]

Con ello se demuestra el bajo riesgo de transmisión por alimentos, sin embargo se sugiere el lavado de manos o desinfección regularmente, uso de cubrebocas, almacenamiento de los alimentos en el refrigerador y cocinar a altas temperaturas. [91]

Solo el 2-10% de los casos presentan diarrea y su presencia en heces por lo que el virus puede estar presente en aguas residuales y sobrevivir pero eso depende de la temperatura, la luz solar, presencia de microorganismos antagonistas y tratamiento con oxidantes disminuyen su supervivencia y la capacidad de transmisión por este medio. [91]

Además de los ya mencionados mecanismos de transmisión, las superficies inanimadas, SARS-CoV-2 puede sobrevivir por más de 9 días a temperatura ambiente pero disminuye a temperaturas superiores de 30°C por lo que la desinfección de las superficies y el lavado de manos disminuyen el riesgo de transmisión, debido a que se necesita que dichas superficies (Manos, etc.) entren en contacto con la mucosa oral, conjuntiva y nasal. [26]

El periodo de incubación medio es de 5.0 a 6.4 días con un rango de 2 a 14 días, los síntomas se presentan de tres a seis días después de la exposición. Menos del 2.5% de las personas infectadas manifiestan síntomas en los siguientes 2.2 días de la infección, pero a los 11.5 días el 97.5% presentan síntomas y después de 14 días la probabilidad de desarrollarlos es muy bajo. [32,41]. Sin embargo, también se presenta de forma asintomática para aquellos que no desarrollan síntomas o son muy leves, estos son los principales involucrados en la transmisión del virus. [38].

2.1.4 Patogenicidad e inmunidad

Los coronavirus en general causan resfriados, sin embargo, unos más patógenos como el SARS-CoV-2, provocan síntomas graves como neumonía, insuficiencia renal, dificultad para respirar, complicándose y causando la muerte. Además de unos más leves como tos, fiebre, disnea, diarrea, dolor de cabeza y pérdida del sentido del olfato. [30]

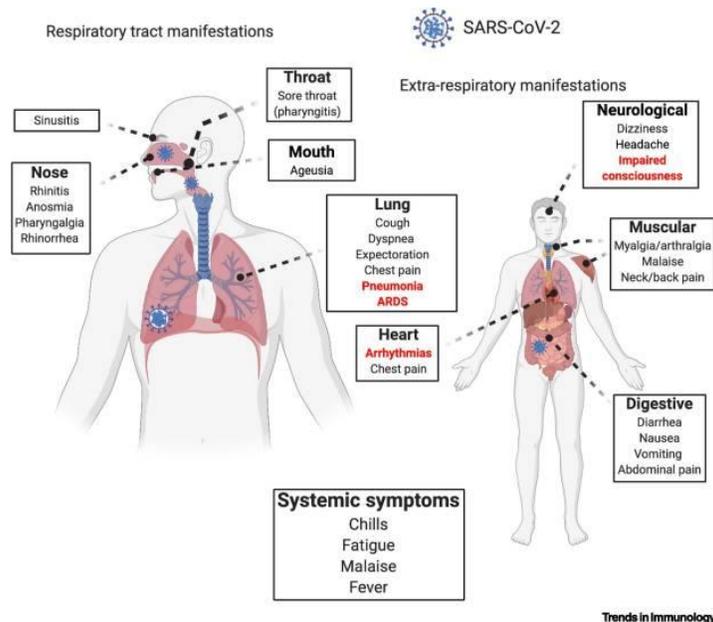


Fig 7. Síntomas causados por el SARS-CoV-2

La inflamación es un mecanismo llevado a cabo por células del sistema inmune poco después de la infección por SARS-CoV-2, con la finalidad de limitar la replicación así como la tormenta de citocinas, previniendo el daño tisular severo ya que éstas provocan un cuadro grave por la infección. [25]

Se ha descubierto que la infección de células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) con SARS-CoV-2 provoca un aumento de CCL20, CXCL1, IL-1B, IL-6, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL2, CXCL16 y TNF α . Además en suero de pacientes COVID-19 hay un aumento de los niveles de IL-6, IL1RA, CCL2, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9 y CXCL16 circulante. [14]

Otro estudio de pacientes en Wuhan, demostró que también hay aumento de IL1B, IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, FGF básico, GCSF, GMCSF, IFN γ , IP10, MCP1, MIP1A, MIP1B, PDGF, TNF α y VEGF en pacientes infectados en comparación con el grupo control. Adicionalmente, demostraron que existe una diferencia en los niveles de IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1A y TNF α entre pacientes en UCI de los que no. [33]

La respuesta inmune innata es el primer mecanismo de defensa viral contra el COVID-19, donde participan las células PMN (Polimorfonucleares), reconocen

agentes infecciosos, mediante la interacción de PRR (patern recognition receptors) y PAMs (pathogen-associated molecular pattern). [32]

En este proceso los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel muy importante al reconocer el material genético del virus por los TLR 7/8, estos se encuentran en los compartimientos endosomales y de ahí su accesibilidad al ssRNA. [38]

Además de inducir citocinas proinflamatorias y quimiocinas por el reconocimiento del material genético (ssRNA), el TLR4 también puede inducir la producción de IFN tipo I, por la misma vía, solo que se activa al reconocer la proteína “Spike”. [45]

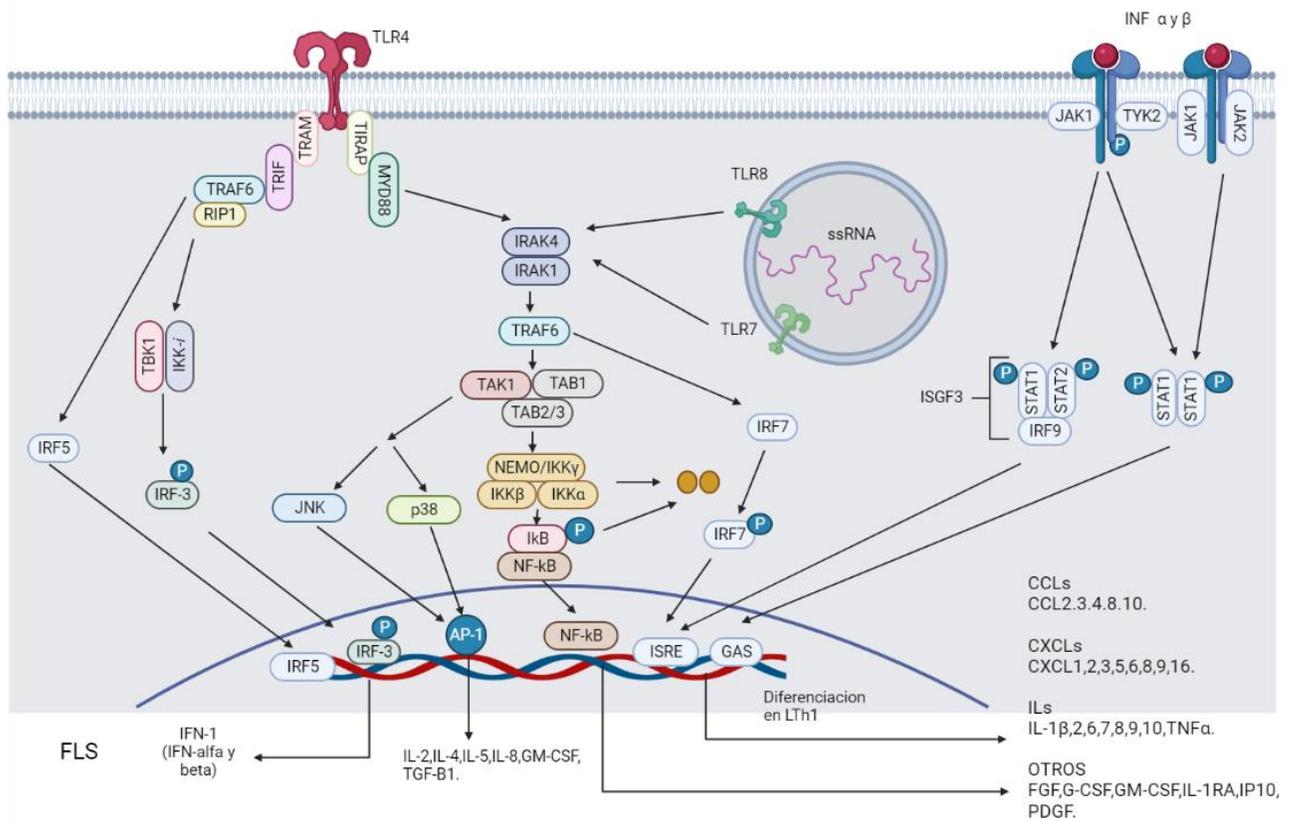


Fig 8. Cascada de señalización mediada por TLR4 dependiente de MyD88 y TIRAP/TRAM, modificado de (1, 5, 10, 56, 62, 64, 65, 73,78).

El receptor ACE2 también se encuentra en células endoteliales monocitos, macrófagos o células endoteliales, estas al verse infectadas llevan la presentación de antígeno a las células T. [3]

Mediante la vía MHC I (CD8) y MHC II (CD4), la primera marca las proteínas con ubiquitina e ingresan al proteasoma, llevándose su degradación y llevado al RE por proteínas asociadas a transporte (TAP 1 y 2), aquí mismo se sintetizan las cadenas MHC I y se ensamblan, formando el complejo MHC I/antígeno; La via MHC II utiliza el fagosoma, se une a la vesícula que contiene MHC II y la catepsina forma el sitio CLIP (péptido invariable ligado CPH); desplazado por HLADM y formando el

complejo MHC II/antígeno y transportado por vesículas hasta la membrana celular donde será presentado a los linfocitos CD4 y CD8. [3,54]

Durante la presentación de antígeno se llevará a cabo la activación de los linfocitos mediante la interacción del complejo MCH-Antígeno-TCR: CD3, se activan y producen INF-λ, El factor nuclear de la cadena K de células B (NF kB), el factor activador de proteína 1 (AP1) y el factor nuclear de células T (NF-AT). [50]

Este IFN-γ es captado por otras APCs a través de su receptor específico, activándose y liberando IL-12 e IL-18 estas activan a las células T y NK, vía receptor específico, induciendo la expansión de clonas Th1. [50]

Cuando hay una baja producción de interferones es el que se asocia con la patogénesis y progresión de la enfermedad al igual que las citocinas inflamatorias, amplificando el daño tisular.

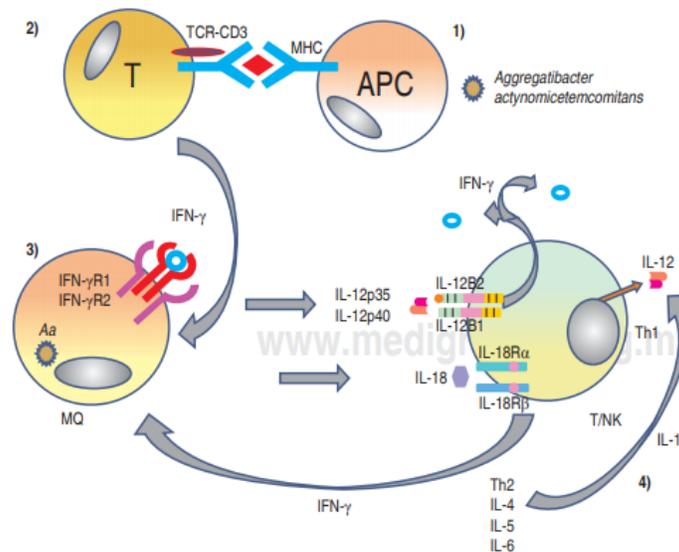


Fig 9. Activación de linfocitos T y diferenciación a Th1. [82].

Tabla 4. Citocinas producidas por células Th1 y Th2 tomada de [35]

Th1	Th2
TNF-β	IL-4
INF-γ	IL-5
IL-2	IL-6
IL-12	IL-9
	IL-10
	IL-13

2.2 Pruebas de diagnóstico

Desde el comienzo de la actual pandemia causada por el SARS-CoV-2, se ha buscado controlar su propagación, por ello es importante llevar a cabo un buen diagnóstico para identificar y aislar los casos positivos, esto con la finalidad de interrumpir la cadena de transmisión, sin embargo ha sido un reto ya que cada técnica utilizada en el laboratorio tiene ventajas y desventajas.

Los métodos de laboratorio actualmente utilizados se basan en la detección de genes virales (RT-qPCR), antígenos (Pruebas rápidas de inmunocromatografía en exudado nasofaríngeo) y anticuerpos IgG/IgM (ELISA, CMIA, pruebas rápidas de inmunocromatografía). Cada una tiene rendimientos y propiedades diferentes, cada una es precisa, dependiendo de la etapa en que se encuentra la enfermedad. [28, 101,105]

2.2.1 Tipos de muestra

El tipo de muestra que se utiliza es específica para cada método, la recolección de las muestras deben ser de buena calidad, ya que ésta afecta la sensibilidad y precisión del resultado.

Tabla 5. Muestras de diagnóstico para el SARS-CoV-2 (15, 22, 76)

Tipo de Muestra	Técnica	Tiempo recomendado
Hisopado Nasofaríngeo	RT-qPCR y LFIA (Ag)	Fase Aguda
Hisopado Orofaringeo	RT-qPCR y LFIA (Ag)	Fase Aguda
Lavado Bronquioalveolar	RT-qPCR	Fase Aguda
Lavado o aspirado nasal	RT-qPCR	Fase Aguda
Espuito	RT-qPCR	Fase Aguda
Suero	ELISA,CMIA y LFIA (Ac)	Fase de convalecencia (2-4 Semanas iniciada la enfermedad)
Sangre/plasma	LFIA (Ac)	Fase de convalecencia (2-4 Semanas iniciada la enfermedad)

Dependiendo del tipo de muestra se utiliza la técnica apropiada y también depende de la fase de la enfermedad para maximizar su sensibilidad.

2.2.2 RT-qPCR

La RT-qPCR o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real, es el estándar de oro usada actualmente en el diagnóstico por SARS-CoV-2 utilizando muestras del tracto respiratorio superior e inferior de pacientes con signos y síntomas de la enfermedad. [31,77]

Esta técnica molecular tiene una buena sensibilidad y especificidad, además de poder detectar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos (ARN viral) dependiendo de la carga viral, relacionada con la progresión de la enfermedad y el tipo de

muestra. Los genes que se detectan por esta técnica son N, S, E, ORF1ab y RdRp. [6,76].

Combina la amplificación y la detección en un mismo paso al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia, utilizando como molde una plantilla de RNA mediante una reacción conocida como transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa reversa y la hibridación del cebador en el extremo 3' entre 50-60°C. Los elementos que utiliza son el molde (DNAc), Taq-polimerasa, cebadores, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) el ion magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y agua. [79]

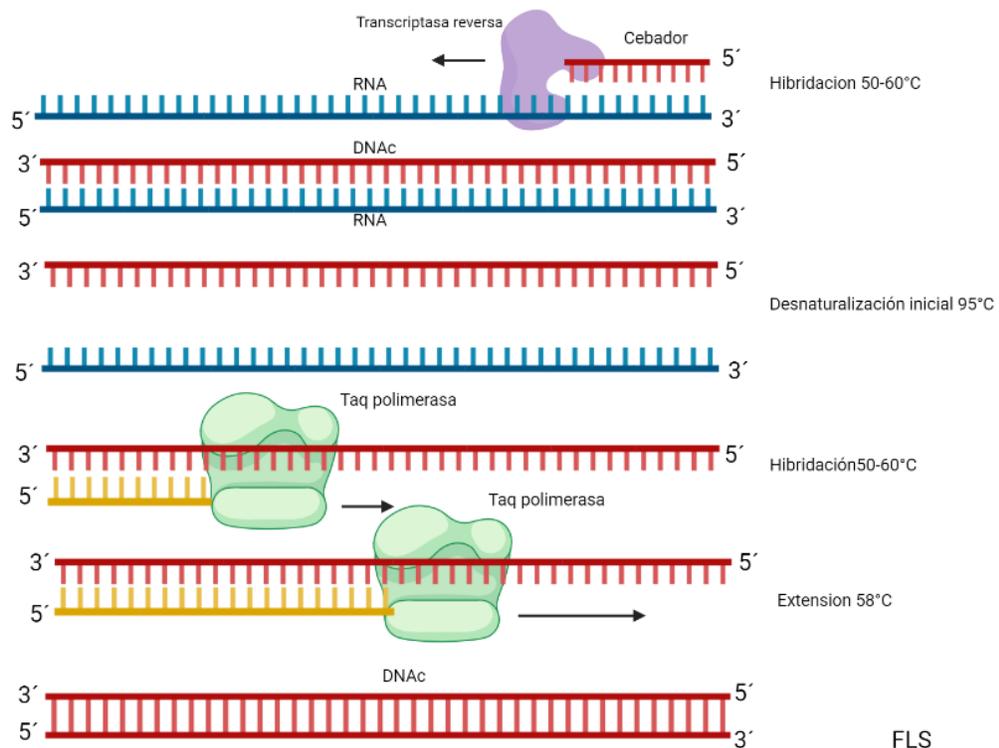


Fig 10. Obtención del molde DNAc mediante la reacción transcripción inversa por las enzimas Transcriptasa inversa y Taq polimerasa

Las tres etapas de la RT-qPCR son:

1. Desnaturalización: Las cadenas de DNAc son calentadas y separadas a 95°C durante 20-30 seg, dependiendo de la cantidad de G-C.
2. Hibridación: Se alinean los cebadores en el extremo 3' de cada hebra entre 50-60°C y las sondas Taqman a su secuencia blanco, esta compuesta por un reportero fluorescente (R) y un "quencher" (Q), provocando cambios conformacionales entre ellos tras la hibridación con su secuencia blanco.

3. Extensión: La Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-cebadores-sondas Taqman y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios a una temperatura de 72 °C, para crear las cadenas completas de ADN. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones y emitido la señal fluorescente, debido a la ruptura de la sonda, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada, medido por el equipo y sea proporcional a las plantillas generadas.

La prueba puede dar falsos positivos por toma inadecuada de la muestra, recolección tardía o en etapas tempranas de la enfermedad, mutaciones virales, mala manipulación de la muestra e inhibición de la RT-qPCR. [22]

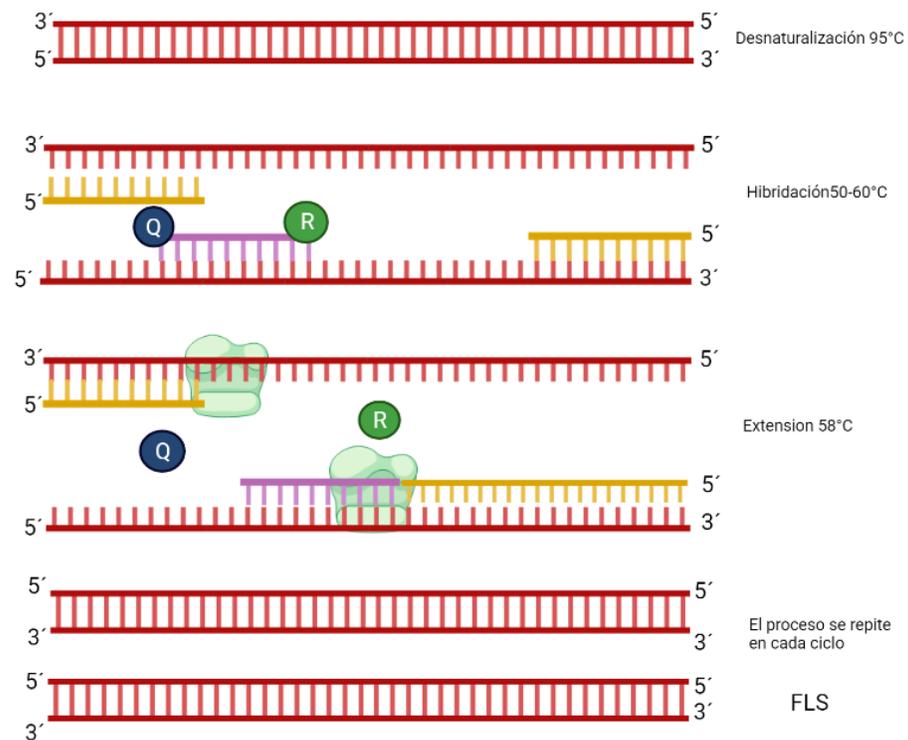


Fig 11. Etapas de la PCR y Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman.

2.2.3 Serología

La ventana de tiempo útil y la carga viral dificultan la detección de genes virales. Por ello se han desarrollado ensayos serológicos permitiendo el análisis de la sangre y diagnosticar indirectamente el SARS-CoV-2 al identificar anticuerpos IgG/IgM en suero humano tras una respuesta inmunológica, más fáciles de realizar, disponibles y apoyo en la vigilancia epidemiológica; Actualmente los más utilizados son ELISA

(ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) y CLIA (Inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia). [55]

2.2.3.1 ELISA-INDIRECTA

Se basa en la reacción de los anticuerpos (Anticuerpo primario) de la muestra con el antígeno (proteína "Spike" trimerizada) unido a la superficie de la microplaca como primera reacción, posteriormente se agrega un segundo anticuerpo Anti-IgG/IgM humana conjugada con una enzima (Peroxidasa de rabano picante o "HRP") reaccionando con el primer complejo antígeno-anticuerpo, la que no se une es eliminada por lavados; se agrega una solución de sustrato (TMB) que reacciona con el complejo enzimático, para dar una señal colorimétrica medible directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgG/IgM anti-SARS-CoV-2 presente en la muestra. [9]

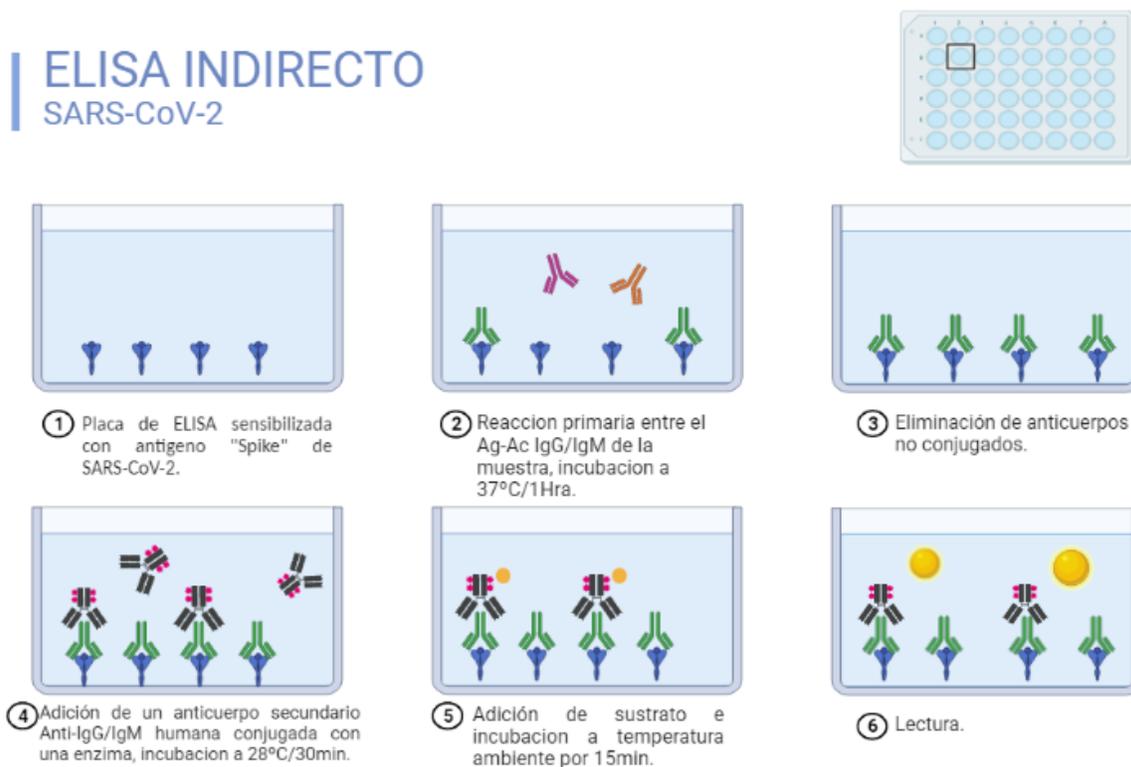


Fig 12. ELISA INDIRECTA del SARS-CoV-2

2.2.3.2 CMIA o CLIA

Los ensayos comerciales son de dos pasos, primero se combina e incuba la muestra del paciente con las micropartículas recubiertas con antígeno (Spike o nucleocápside) del SARS-CoV-2 y el diluyente del ensayo, llevando una reacción entre Ag-Ac de tipo IgG/IgM presentes en la muestra, posteriormente una reacción de tipo Ac-Ac entre el anticuerpo primario y un segundo anti-IgG/IgM humano

marcado con acridina formando la mezcla de reacción y se incuban. Después de los ciclos de lavado, se añaden las soluciones pre activador y activador, dando como resultado una reacción de quimioluminiscencia que se mide en URL en el equipo Architec i1000. **Ver Anexo 1**

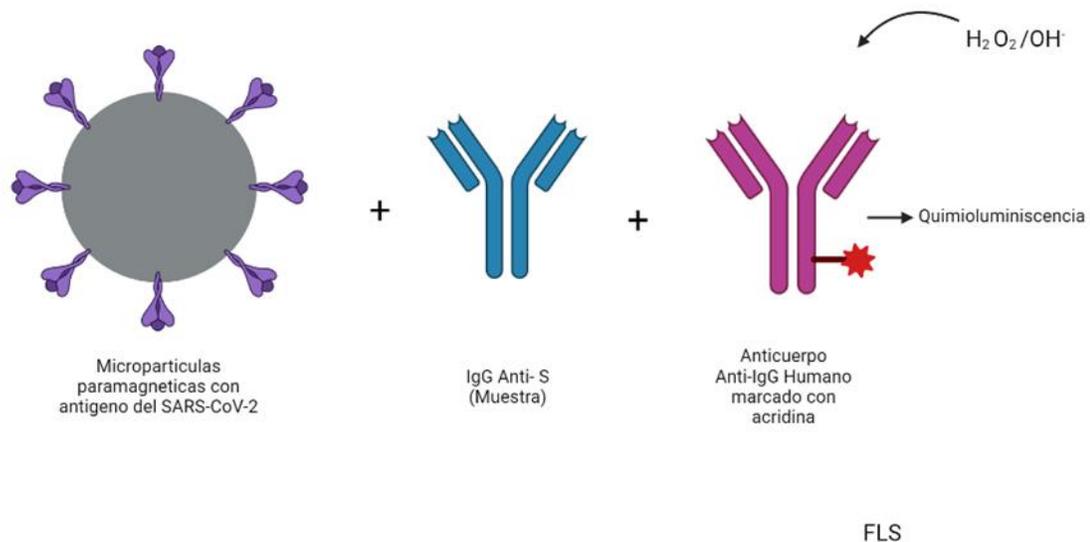


Fig 13. Fundamento de la técnica por CMIA

2.2.4 Prueba rápida para anticuerpos

Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) o inmunocromatografía de fase sólida, al igual que las pruebas serológicas automatizadas o semiautomatizadas complementan el diagnóstico y apoyan en la vigilancia epidemiológica, además de que, son más baratas, fáciles de realizar y se obtiene el resultado entre 10-15 min, mucho menor que un ensayo RT-qPCR, ELISA y CMIA que en promedio tarda 1-4hrs. [9]

Éstas se basan en la detección de inmunoglobulinas IgM e IgG contra el SARS-CoV-2 por el método de inmunocromatografía en fase sólida para su captura. La muestra (Suero/plasma), fluye desde la almohadilla (Zona de la muestra) y termina sobre la almohadilla de conjugación.

El complejo de conjugación se lleva a cabo entre los anticuerpos IgG/IgM presentes en la muestra con partículas de antígeno recubiertas con oro coloidal; debido a la acción capilar migran a la zona de captura (Membrana de nitrocelulosa) el cual tiene tres zonas de lectura, una para IgG (T1), IgM (T2) y Línea control (C), la primera es inmoviliza por un anticuerpo Anti-IgG humana en la línea T1, formando el complejo inmunológico oro coloidal/antígeno-anticuerpos IgG y anticuerpo Anti- IgG humana, generando una línea roja sobre la zona de captura T1.

Para IgM la zona de captura es en la línea T2 y se usa un anticuerpo Anti-IgM humana. Está presente otro conjugado de oro coloidal pero con anticuerpos de

conejo IgG, fluyen hasta la zona de captura control y se inmovilizan por un anticuerpo IgG anti-Conejo, sobre la línea C, indicando que se agregó el volumen adecuado de muestra y se ha producido la absorción de la membrana. **Ver Anexo 2.**

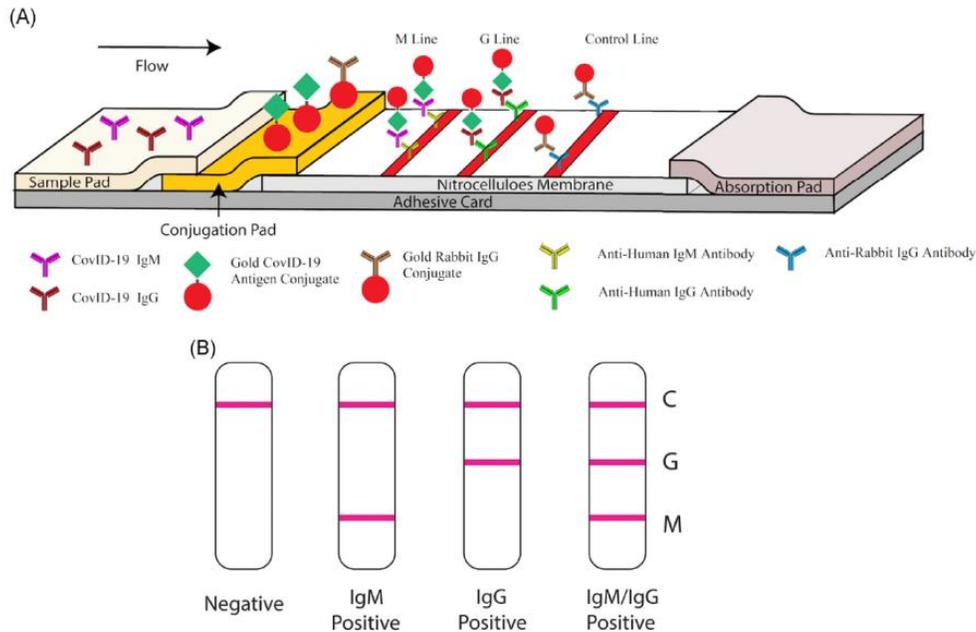


Fig 13. Ilustración esquemática de un test rápido de anticuerpos SARS-CoV-2 IgG/IgM [9]

3. Características de las pruebas diagnósticas

Una prueba diagnóstica o examen, forman parte de la práctica habitual del médico, por lo que es de suma importancia que dichas pruebas puedan discriminar entre un individuo sano (Resultado normal) de un individuo enfermo (Resultado anormal); así que deben de cubrir ciertas características de validez, seguridad y fiabilidad.

Los elementos a utilizar siempre es un estándar de referencia que tenga una alta sensibilidad y especificidad para discriminar entre individuos sanos de los enfermos, lo que nos permite definir aquellos que padecen una enfermedad determina y se confirma que la sufre (**Verdadero positivo o VP**), al contrario de los que no padecen la enfermedad, confirmando que no la sufren (**Verdadero Negativo o VN**).

Sin embargo, bajo el mismo concepto anterior, se define un **Falso positivo (FP)** cuando tenemos un resultado positivo hacia una enfermedad determinada, pero no la padece, en cambio un **Falso negativo (FN)** es aquel con resultado negativo pero que padece la enfermedad. [16]

3.1 Validez

Es la capacidad de una prueba diagnóstica y el grado de concordancia entre los resultados de la pruebas para definir una enfermedad, entre ellas podemos encontrar dos características muy importantes.

Sensibilidad (SEN): Probabilidad de una prueba para identificar correctamente a individuos que padecen la enfermedad con resultado positivo.

Especificidad (ESP): Probabilidad de una prueba para identificar correctamente a individuos que no padecen la enfermedad con resultado negativo.

3.2 Seguridad

Esta dada por los **VPP** Y **VPN**, determinando la capacidad de una prueba para predecir la ausencia o presencia de una enfermedad específica.

Valor predictivo positivo (VPP): Probabilidad de un individuo con resultado positivo tenga la enfermedad.

Valor predictivo negativo (VPN): Probabilidad de un individuo con resultado negativo no tenga la enfermedad. [16,23]

3.3 Fiabilidad

Nos permite determinar la confianza de los resultados de una prueba diagnóstica.

Índice de Youden: Nos resume el rendimiento global de una prueba, su valor puede ir de -1 a 1, se usa en conjunto con las curvas ROC, indicando su fiabilidad, entre más se acerque al 0.0 la prueba se hace inútil en el diagnóstico.

Razón de verosimilitud: Describe cuántas veces es más probable que reciba un resultado determinado una persona con la enfermedad.

Índice Kappa: Se resume como la concordancia entre los resultados de ambas pruebas.

Exactitud: La probabilidad de que el resultado del test prediga correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad. [16,23]

3.2 Construcción de una tabla de contingencia

Con todo lo definido anteriormente podemos construir una tabla de contingencia con los valores de las pruebas para obtener los datos de validez, seguridad y fiabilidad, lo cual nos va a permitir determinar el rendimiento de nuestra prueba. [16,23]

Tabla 6. Cálculos de las pruebas diagnósticas

Tabla 1. Calculo de las pruebas diagnósticas					
		Prueba de referencia			
		+	-		
Prueba diagnóstica	+	VP a	FP b	a+b	VPP=a/(a+b)
	-	FN c	VN d	c+d	VPN=d/(c+d)
		a+c	b+d	a+b+c+d	
		S=a/(a+c)	E=d/(b+d)		

RV (+) = sensibilidad/(1-especificidad)
RV(-) = (1-sensibilidad)/especificidad
Índice de Youden= Sensibilidad + Especificidad-1
Exactitud: (a+d) / (a+b+c+d)
Índice Kappa= $P_0 - P_e / 1 - P_e$
 $P_0 = (a + d) / N$
 $P_e = \left[\frac{(a + b)(a + c)}{N} \right] + \left[\frac{(c + d)(b + d)}{N} \right]$

La tabla 6. Muestra como obtener los datos que nos permiten definir el rendimiento de una prueba diagnóstica así como su interpretación de algunos valores, con ayuda de la tabla 7 y 8.

Tabla 7. Valores que determinan la eficiencia diagnóstica de una prueba.

Valores IEP Capacidad	
IEP(+) ≥ 10 o IEP(-) ≤ 0.1	Suficiente
IEP(+) $\geq 5 < 10$ o IEP (-) $> 0.1 \leq 0.2$	Moderado
IEP(+) $\geq 2 < 5$ o IEP (-) $> 0.2 \leq 0.5$	Escasa
IEP(+) $\geq 1 < 2$ o IEP (-) $> 0.5 < 1$	Insignificante

Muestra la interpretación de la razón de verosimilitud o IEP

Tabla 8. Grado de concordancia kappa

Índice kappa	< 0	0-0.2	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.8-1
Grado de concordancia	Sin acuerdo	Insignificante	Bajo	Moderado	Bueno	Muy bueno

4. Planteamiento del problema

Al surgimiento de un nuevo beta coronavirus llamado SARS-CoV-2 causante de un cuadro de neumonía, propagándose por todo el mundo, se hizo necesario contar con técnicas eficientes para su diagnóstico; rápidas, disponibles, fáciles de realizar y baratas. Tal ejemplo son las pruebas rápidas de antígeno y anticuerpos.

En las pruebas que sirven o se usan para detectar Ac's, es necesario considerar la etapa de la infección en la que se encuentra el paciente, conocer los periodos de incubación del virus y de preferencia la posible fuente de contaminación/infección para contar los días de evolución de la enfermedad para saber qué tipo de inmunoglobulina esperamos encontrar con la finalidad de poder determinar la seroprevalencia en una población, sin embargo, no son usados como parámetro de diagnóstico primario, sino de seguimiento o complementarias a otras pruebas en la detección de antígenos.

No obstante son utilizadas como una alternativa a la RT-PCR o algunas veces remplazada por la de antígeno para el diagnóstico, por lo que debe haber información científica que respalde su rendimiento y que su objetivo de uso sea el adecuado y ayude al seguimiento de los pacientes, más no de diagnóstico.

5. Justificación

La necesidad de contar con técnicas más rápidas y eficientes para el diagnóstico de SARS-CoV-2 ha llevado a su aprobación prematura, sin estudios epidemiológicos en población acerca de su rendimiento, esto puede traer como consecuencia fallas en la identificación de pacientes positivos y su aislamiento, por consecuente no se interrumpe la cadena epidemiológica, evitando controlar la propagación del virus. Así que este estudio evaluará el rendimiento de una prueba comercial aprobada para su uso de emergencia en México sustentando su apoyo en el diagnóstico por primera vez y seguimiento de la enfermedad o rechazo de la misma, además de usar como estándar de referencia un ensayo CLIA basado en la experiencia que se tiene, prestigio de la marca y en la capacidad de estas pruebas para detectar Ac's contra otros virus.

6. Hipótesis

El ensayo VAZYME 2019-nCoV IgG/IgM SARS-CoV-2 podría tener una sensibilidad y especificidad mayor del 80%, tanto para IgG como IgM comparada con el estándar de referencia ARCHITEC IgG/IgM SARS-CoV-2.

7. Objetivo General

Determinar el rendimiento de una prueba rápida versus un inmunoanálisis quimioluminiscente de macropartículas (CMIA) en pacientes atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2.

7.1 Objetivos particulares

- Determinar la sensibilidad y especificidad para la prueba VAZYME.
- Establecer el uso del ensayo CMIA como referencia en la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2.

8. Materiales y metodología

8.1 Descripción del estudio

A. Estudio experimental, longitudinal y prospectivo.

B. Lugar del estudio: Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Laboratorio de serología.

C. Descripción de la población de estudio: Entre Mayo de 2020 y julio de 2020, se inscribieron 257 pacientes consecutivos que fueron ingresados al Hospital Infantil de México Federico Gómez por síntomas de COVID-19. Se recolectó de cada sujeto hisopado nasofaríngeo para la prueba RT-qPCR sangre venosa para las pruebas de anticuerpos 34 días después de confirmar el diagnóstico. Se realizó una base de datos donde incluía datos clínicos de los pacientes tales como edad, género, nombre, resultados de la RT-qPCR, título de anticuerpos para IgG/IgM La prueba RT-PCR se realizó previamente en el departamento de biología molecular, mientras que los ensayos de anticuerpos correspondieron al laboratorio de serología, ambos en el HIMFG (CDMX, México).

8.2 Criterios del estudio

8.2.1 Muestras de suero que componen el panel negativo

Un total de 25 individuos (mujeres, n=15), los cuales fueron descartados con títulos séricos de IgG e IgM contra SARS-CoV-2 obtenidos mediante dos

pruebas comerciales SARS-CoV-2 IgG (ARCHITECT, Abbott) y SARS-CoV-2 IgM (ARCHITECT, Abbott).

8.2.2 Muestras de suero que componen el panel positivo

Un total de 75 individuos (mujeres, n=38; Mediana de edad, 38 años; intervalo, 0.8-68 años), los cuales fueron confirmados con títulos séricos de IgG e IgM contra SARS-CoV-2 obtenidos mediante dos pruebas comerciales SARS-CoV-2 IgG (ARCHITECT, Abbott) y SARS-CoV-2 IgM (ARCHITECT, Abbott).

8.2.3 Criterios de exclusión

Se descartaron aquellos pacientes sin diagnóstico COVID-19 y muestras hemolizadas después de su recolección.

8.2 Procesamiento de las muestras

8.3.1 RT-qPCR

Este ensayo se realizó en el laboratorio de biología molecular del HIMFG, previamente al estudio, confirmando el diagnóstico por COVID-19 en los 100 pacientes mediante la técnica de RT-qPCR (en inglés, Quantitative reverse transcription PCR, el cual contiene tres conjuntos de cebadores o sondas específicos a diferentes regiones genómicas del SARS-CoV-2 (Gen ORF1a,S y N) que combina la amplificación y la detección en un mismo paso al correlacionar el producto de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia en muestras obtenidas de las vías respiratorias superiores tales como hisopado nasofaríngeo, orofaríngeos, nasales y de cornete medio, aspirado nasofaríngeo y lavado bronco alveolar (BAL).

8.3.2 Obtención y conservación de las muestras

Las muestras utilizadas previamente se obtuvieron por punción venosa en tubos estériles sin anticoagulante y aditivos, siliconado; para obtener el suero se centrifugaron a 3500 r.p.m /10 min, posteriormente en una campana de seguridad se separa el suero depositándose en tubos criogénicos para su almacenamiento (-70°C) y posterior análisis.

8.3.2.1 CMIA ARCHITEC Abotte IgM

Previamente a su uso las muestras se descongelaron por completo y mezclaron con un agitador tipo vortex a baja velocidad o invirtiéndolos 10 veces, tomando 150 µl de muestra depositándolos en copas de recolección. Se procesaron en el instrumento Abbott Architect i1000 usando el ensayo Abbott SARS-CoV-2 IgM, previamente se calibra el equipo y cargan los reactivos. **ANEXO 2**

8.3.2.2 CMIA ARCHITEC Abbott IgG

Al igual que la prueba IgM previamente las muestras se descongelaron por completo y mezclaron con un agitador tipo vortex a baja velocidad o invirtiéndolos 10 veces, tomando 150 μ l de muestra depositándolos en copas de recolección. Se procesaron en el instrumento Abbott Architect usando el ensayo Abbott SARS-CoV-2 IgG, previamente se calibra el equipo y cargan los reactivos. **ANEXO 1**

8.3.3 Prueba rápida VAZYME 2019-nCoV IgG/IgM

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los kits de prueba se atemperaron previamente a su uso, se sacaron de la bolsa de aluminio y se colocaron horizontalmente sobre una superficie plana. Usando el gotero provisto, se agregaron 1 gota (20 μ L) de suero / plasma y 3 gotas (60 μ L) de tampón de dilución en la almohadilla de muestra. El resultado se lee después de 10 min y antes de 15 min ya que después de este tiempo el resultado es invalido. **ANEXO 3**



Fig 14. Componentes del kit VAZYME 2019n-CoV IgG/IgM

Cada caja contiene 50 pruebas en su respectivo sobre térmico, además incluye un buffer de 5 ml y 50 goteros para depositar la muestra sobre el caset.

8.3.4 Análisis estadístico

La sensibilidad y especificidad de las pruebas rápidas se obtuvieron al definir los verdaderos positivos y negativos, respectivamente. Tomando como base los resultados obtenidos en el inmunoensayos de quimioluminiscencia (CMIA). Para determinar el rendimiento de los ensayos también se calculó el área bajo la curva (AUC), Índice Kappa, Valor de P, Índice de Youden y la precisión utilizando la base de datos WinEpi y Epidat 3.1.

9. Resultados

Se incluyeron en el estudio a 100 pacientes a los cuales se les tomó la muestra y proceso con el ensayo CMIA de Abbott SARS-CoV-2 IgM/IgG, siendo este nuestro estándar de comparación versus un ensayo LFIA de VAZYME 2019-nCoV IgG/IgM SARS-CoV-2.

Los VPP fueron 75 y 25 VNN para la prueba de IgG, mientras que para IgM 45 VPP y 10 VNN, debido a que después del procesamiento de las muestras para IgG los sueros se hemolizaron o fueron insuficiente.

Tabla 9. Resultados obtenidos de los VPP de IgG tanto en CMIA y VAZYME 2019n-CoV IgG

No de Muestra	ARCHITEC IgG	VAZYME IgG
1	1.87	+
2	6.43	+
3	5.04	+
4	9.4	+
5	3.38	+
6	5.62	+
7	7.52	+
8	2.2	+
9	9.34	+
10	5.07	+
11	4	+
12	4.81	+
13	3.58	+
14	3.37	+
15	2.9	+
16	5.85	+
17	8.92	+
18	6.32	+
19	7.66	+
20	7.28	+
21	5.28	+
22	5.04	+
23	7.44	+
24	5.86	+
25	5.93	+
26	6.29	+
27	6.14	+
28	6.88	+
29	8.39	+
30	5.67	+
31	7.48	+
32	9.45	+
33	2.99	+
34	3.99	+
35	3.52	+
36	4.71	+
37	8.01	+
38	4.08	+
39	3.91	+
40	8.35	+
41	8.56	+
42	6.88	+
43	7.65	+
44	8.09	+
45	2.91	+
46	5.36	+
47	5.97	+
48	4.32	+
49	1.4	+
50	5.68	+
51	5.02	+
52	7.62	+
53	7.52	+
54	7.97	+
55	7.8	+
56	8.42	+
57	4.66	+
58	3.86	+
59	7.23	+
60	3.59	+
61	7.05	+
62	2.02	+
63	4.47	+
64	5.8	+
65	5.42	+
66	6.59	+
67	9.39	+
68	2.93	+
69	6.35	+
70	2.22	+
71	7.92	+
72	4.21	+
73	5.09	+
74	6.76	+
75	7.95	+

Tabla 10. Resultados obtenidos de los VPP de IgG tanto en CMIA y VAZYME 2019n-CoV IgM

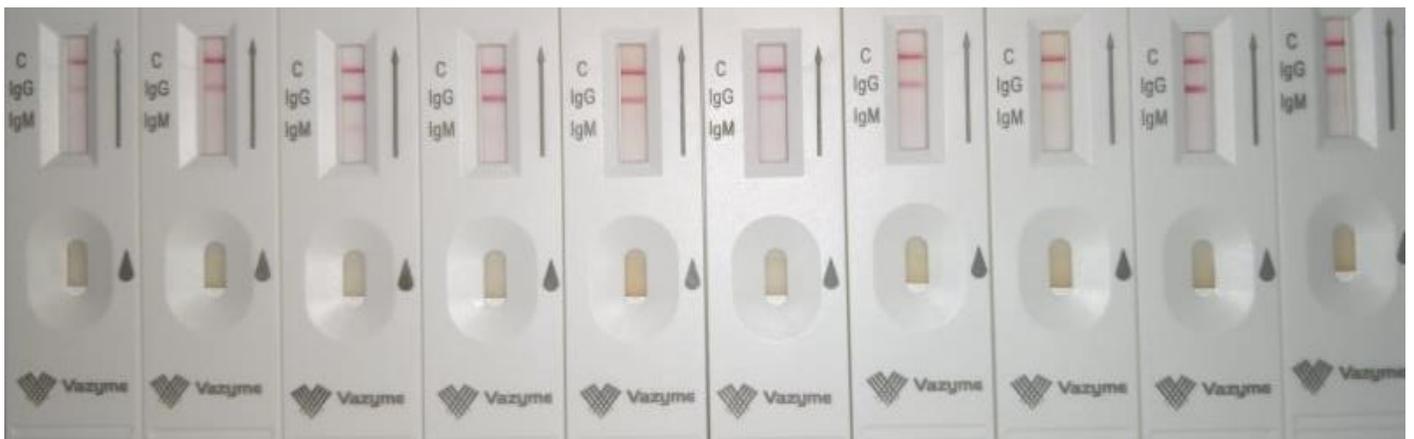
No. de muestra	ARCHITEC IgM	VAZYME IgM				
1	2.42	+		23	21.56	+
2	20.43	-		24	11.86	-
3	1.07	-		25	3.03	-
4	2.99	+		26	1.52	-
5	5.59	+		27	1.42	-
6	1.41	-		28	26.3	-
7	11.15	-		29	3.09	-
8	3.55	-		30	2.34	-
9	4.26	-		31	1.61	-
10	5.49	+		32	4.27	-
11	2.63	-		33	11.2	-
12	14.64	+		34	2.55	-
13	2.37	-		35	2.62	-
14	3.67	-		36	1.31	-
15	3.5	-		37	1.45	-
16	4.54	-		38	2.89	-
17	2.78	-		39	1.2	-
18	10.61	-		40	1.34	-
19	13.72	+		41	2.48	-
20	1.31	-		42	28.75	-
21	4.82	-		43	1.55	-
22	14.5	-		44	1	-
				45	2.55	-

La prueba de ARCHITEC IgG/IgM Anti SARS-CoV-2 determina como resultado positivo para IgG un valor ≥ 1.4 índice (S/C) en IgG y ≥ 1.0 para IgM con el equipo **ARCHITECT i1000**, mientras que la presencia de una línea de color rojo (Reacción Ag-Ac), en la línea T1, T2 o C del ensayo **VAZYME 2019n-CoV IgG/IgM** se consideró positivo; los títulos de anticuerpos IgG obtenidos por CMIA o CLIA tuvieron un rango de 1.87-9.4 índice (S/C) y 1.0-28.75 índice (S/C) para IgM, lo que confirma presencia de anticuerpos Anti SARS-CoV-2 IgG/IgM en los 75 sueros tomados como VPP, en cambio para VNN fueron 25 y 10 sueros para IgG/IgM respectivamente, definiendo un valor menor ≤ 1.4 índice (S/C) para IgG y ≤ 1.0 índice (S/C) para IgM respectivamente.

Tabla 11. Resultados obtenidos de los VNN tanto para CMIA y VAZYME 2019n-CoV IgG/IgM

No de muestra	ARCHITEC IgG	VAZYME IgG
1	0.49	-
2	0.11	-
3	0.03	-
4	0.48	+
5	0.11	-
6	0.02	-
7	0.1	-
8	0.67	+
9	0.11	-
10	0.67	-
11	0.61	+
12	0.7	+
13	0.64	+
14	0.46	-
15	0.71	+
16	0.09	+
17	0.15	-
18	0.45	+
19	0.33	+
20	0.05	+
21	0.7	-
22	0.53	+
23	0.07	-
24	0.14	-
25	0.23	+

No de muestra	ARCHITEC IgM	VAZYME IgM
1	0.04	-
2	0.08	-
3	0.05	-
4	0.41	-
5	0.06	-
6	0.41	-
7	0.06	-
8	0.06	-
9	0.05	-
10	0.05	-

**Fig 15. Resultados de las pruebas rápidas VAZYME 2019-nCoV IgG/IgM**

Ninguna de las muestras analizadas resultó como no inválida, indicada por la línea control (Línea superior). La primera línea corresponde a IgM y la segunda línea corresponde a IgG, los resultados por muy tenue que hayan sido se tomaron como positivos.

Tabla 12. Comparación de VAZYME 2019-nCoV versus ARCHITEC IgM para la detección de anticuerpos Anti-IgM de SARS-CoV-2

IgM SARS-CoV-2	ARCHITEC IgM			
		Positivo	Negativo	Total
VAZYME 2019-nCoV	Positivo	7 (13%)	0	7 (13%)
	Negativo	38 (69%)	10 (18%)	48 (87%)
	Total	45 (82%)	10 (18%)	55 (100%)
Sensibilidad (%) 15.6, IC95% (3.9-27.3)				
Especificidad (%) 100, IC95% (95-100)				
Índice de validez (%) 30.9, IC95% (17.8-44)				
Valor predictivo + (%) 100, IC95% (92.9-100)				
Valor predictivo - (%) 20.8, IC95% (8.3-33.4)				
Índice de Youden 0.16, IC95% (0.05-0.26)				
Razón de verosimilitud (-) 0.84, IC95% (0.74-0.96)				

Tabla 13. Comparación de VAZYME 2019-nCoV versus ARCHITEC IgG para la detección de anticuerpos Anti-IgG de SARS-CoV-2

IgG SARS-CoV-2	ARCHITEC IgG			
		Positivo	Negativo	Total
VAZYME 2019-nCoV	Positivo	75 (75%)	12 (12%)	87 (87%)
	Negativo	0	13 (13%)	13 (13%)
	Total	75 (75%)	25 (25%)	100 (100%)
Sensibilidad (%) 100, IC95% (99-100)				
Especificidad (%) 52, IC95% (30.4-73.6)				
Índice de validez (%) 88, IC95% (81.1-94.9)				
Valor predictivo + (%) 86.2, IC95% (78.4-94)				
Valor predictivo - (%) 100, IC95% (96.2-100)				
Índice de Youden 0.5, IC95% (0.3-0.7)				
Razón de verosimilitud (+) 2.1, IC95% (1.4-3.1)				

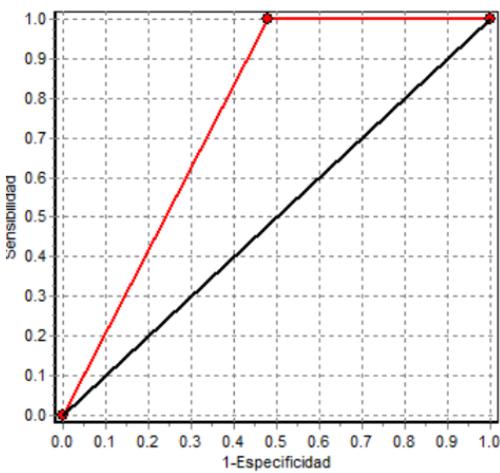
Se evaluó el rendimiento de la prueba VAZYME, obteniendo la sensibilidad y especificidad 100% [IC 95% (99.33-100)], 52% [IC 95% (30.4-73.6)] para IgG mientras 15.6% [IC 95% (3.9-27.3)], 100% [IC 95% (95-100)] para IgM, como se muestra en la tabla 9 y 10. Teniendo una concordancia de datos de 88% con un índice kappa de 0.619 IC95% (0.438-0.800) para IgG y 30.9% con un índice kappa de 0.063 IC95% (-0.029-0.155) para IgM (WinEpi).

Tabla 14. Tasa de positividad entre las pruebas

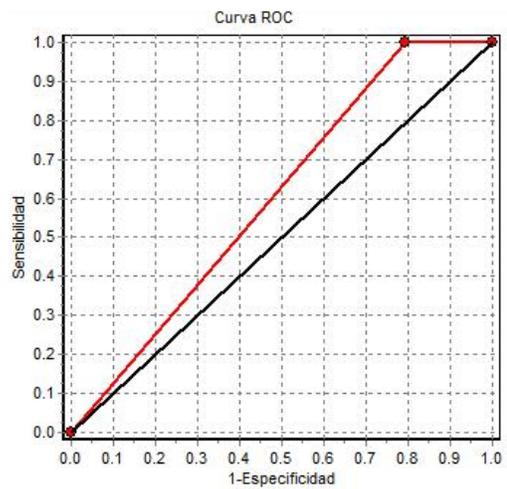
	VAZYME IgG	VAZYME IgM	ARCHITECT IgG	ARCHITECT IgM
Muestras positivas	100 (75/75)	15.6 (7/45)	98.67 (74/75)	100 (45/45)
Muestras negativas	52 (13/25)	100 (10/10)	100 (25/25)	100 (10/10)

En general, la prueba rápida VAZYME 2019-nCoV mostró una buena precisión para la detección de IgG de SARS-CoV-2 y una validez baja para IgM en comparación con las CLIA ARCHITEC IgG/IgM (Tabla 6-7).

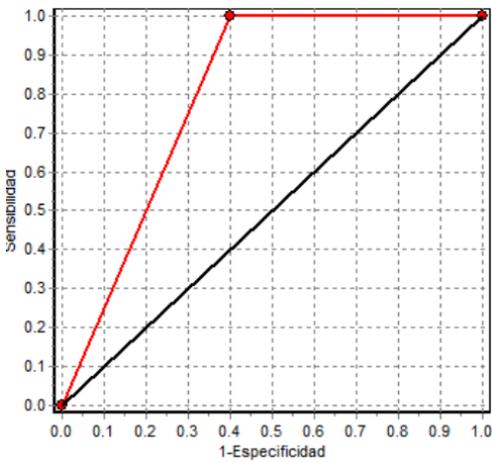
Vazyme IgG (AUC=0.76)



Vazyme IgM (AUC=0.69)



VAZYME IgG/IgM (AUC=0.80)



Dentro del análisis, el área bajo la curva de las pruebas de IgG, las pruebas de IgM y las pruebas combinadas de IgM / IgG para el diagnóstico de COVID-19 fueron 0.76 (IC del 95%: 0.66–0.85), 0.60 (IC del 95%: 0.36-0.84) y 0.80 (IC del 95%: 0.64-0.96), respectivamente.

10. DISCUSIÓN

Desde el comienzo de la actual pandemia causada por un nuevo betacoronavirus, llamado SARS-CoV-2, aislado en diciembre 2019, causante de un cuadro de neumonía, se utilizó como estándar de referencia, un ensayo CLIA o CMIA en pacientes confirmados por medio de una RT-qPCR, esta última cuenta con una tasa de positividad baja, debido a la toma de muestra, condición y carga viral. [27,74]

Sin embargo se han buscado nuevas alternativas que mejoren la sensibilidad o complementen el diagnóstico, para ello la serología juega un papel importante en la seroprevalencia de la enfermedad, permitiendo evaluar su presencia en una población dada, son pruebas indirectas que detectan anticuerpos IgG/IgM Anti-SARS-CoV-2, en plasma o suero. [22,25]

El incremento de los casos generó la necesidad de tener ensayos más eficaces para identificar pacientes positivos, así como asintomáticos lo cual interrumpirá la cadena de transmisión al aislarlos de los negativos, tal ejemplo son las pruebas rápidas. [14,18]. Por la demanda de los mismos se han aprobado sin comprobación de exactitud y no se han retirado. [94]

En este estudio experimental, longitudinal y prospectivo actual, incluimos a 75 pacientes confirmados de COVID-19 y 25 negativos, para investigar el rendimiento clínico de Vazyme un ensayo de flujo lateral que detecta cualitativamente anticuerpos IgG/IgM del SARS-CoV-2 utilizando como método de referencia un ensayo automatizado CMIA IgG/IgM (ARCHITECT, Abbott).[19,20]

El estándar de referencia (CMIA), clasificó positivo un resultado ≥ 1.4 índice (S/C) para IgG y ≥ 1.0 para IgM utilizando suero sin hemólisis, icterico o lipémico, ya que éste fue un factor para descartarlos e interferencia. La prueba rápida utilizó las mismas condiciones y se leyó tras haber transcurrido 15 min, reportando un dato positivo si hay presencia de una línea en el área de captura y negativo su ausencia, como se muestra en la Fig 14. **(Anexo 1, 2, 3)**

Demostramos que la prueba rápida Vazyme 2019-nCoV IgG / IgM no era congruente con nuestro estándar de referencia IgG/IgM ARCHITECT en la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2, ya que nuestro estándar de referencia obtuvo una sensibilidad de 98.67%, IC95% (95.4-100) con especificidad del 100% IC95% (99-100) en IgG y 100%, IC95% (99-100) en IgM, mientras que en la prueba rápida, una sensibilidad de 100%, IC95%, (99-100), especificidad de 52% (IC95%, 30.4-73.6) en IgG, con una sensibilidad del 15.6%, IC95% (3.9-27.3) y especificidad 100%, IC95% (95-100) en IgM para la prueba Vazyme 2019-nCoV.

Una especificidad del 52% para anticuerpos de clase IgG, demostrando que hay reacción cruzada probablemente con otros anticuerpos, en cambio para anticuerpos de clases IgM, su sensibilidad fue de 15.6% lo cual demuestra que los anticuerpos fijados en la almohadilla tienen una baja afinidad contra los anticuerpos anti-SARS-

CoV-2, eso es atribuible al tipo de anticuerpo de captura utilizado.[9] Todas las muestras se tomaron en un promedio de 34 días después de presentar los síntomas por lo que debe estar presente anticuerpos IgM, ya que éstos se mantienen unos meses después. [12]

Esto último se confirmó, ya que las muestras analizadas anteriormente, se evaluaron primero con el ensayo CMIA IgG/IgM (ARCHITECT, Abbott) en la cual tanto las muestras positivas y negativas fueron confirmadas por los ensayos anteriores.

Adicionalmente se obtuvo el índice de validez o valor global de la prueba, siendo 88%, IC95% (81.1-94.9) para IgG y 30.9%, IC95% (17.8-44) para IgM, asimismo un grado de concordancia sustancial, índice kappa de 0.619 IC95% (0.438-0.800) e insignificante, índice kappa de 0.116 IC95% (0.007-0.226) respectivamente, lo cual hace evidente que la prueba rápida tiene mas probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente con anticuerpos IgG que IgM (23,87).

Las curvas ROC nos ayudaron a obtener el punto de corte junto con el índice de youden, al ser una prueba que solo determina como positivo o negativo, se consideró no-discriminativo si la curva ROC coincide con la línea de no-discriminación, la cual posee AUC = 0,50. A medida que el AUC se acerca al valor 1.00, mayor será su capacidad discriminativa. (17)

Para IgG su curva ROC mostro una tendencia moderada, con un área bajo la curva de 0.76 (IC del 95%: 0.66–0.85), junto a un Índice de Youden de 0.5, IC95% (0.3-0.7), indicando que la prueba tiende a tener una discriminación entre una persona sana de una enferma, si a eso le sumamos su valor predictivo positivo (VPP 86.2%, IC95%, 78.4-94) y valor predictivo negativo (VPN 100%, IC95%, 96.2-100).

En comparación con IgM que tuvo un área bajo la curva de 0.60 (IC del 95%: 0.36-0.84) adicionalmente un índice de Youden 0.16, IC95% (0.05-0.26), VPP (100%, IC95% [92.9-100]) y VPN (20.8, IC95% [8.3-33.4]), la prueba VAZYME 2019-nCov IgG tiene más probabilidad de discriminar a una persona enferma que por anticuerpos IgM, al igual que mayor concordancia con la prueba de referencia. [17]

Un estudio realizado en Polonia que evaluó la misma prueba cromatografía con una población de 516 voluntarios asintomáticos, demostraron que no sirve en la detección de casos asintomáticos ya que solo detectó 7 para IgM y 3 para IgG, bajo rendimiento en las pruebas. [22] Además, en otro estudio determinaron que esta prueba rápida tiene un buen rendimiento para IgG pero uno pésimo para IgM, similar al demostrado en este estudio, solo que la prueba de referencia fue diferente. [21]

Por lo que este ensayo concordó con otros dos, demostrando que la prueba VAZYME 2019-nCov IgG/IgM, tiene un rendimiento moderado para IgG, un 48% de probabilidad en falsos positivos, junto a uno bajo al tener un 84.4% de probabilidad en un falso negativo para IgM.

Actualmente las pruebas serológicas nos permiten activar una vigilancia epidemiológica en una población y así identificar a personas que han tenido contacto con el SARS-CoV-2, además de la fase en la que se encuentre el paciente por la clase de inmunoglobulina presente, y una posible inmunidad a futuro. Por ello son de importancia al ser rápidos y fáciles de realizar a gran escala, al haber una necesidad sanitaria se aprobaron desenfrenadamente una gran serie de pruebas que aun con evidencia científica no se han sacado del mercado. [27]

Durante su evaluación encontramos una serie de limitaciones en este estudio. Primero, algunos resultados clínicos no estuvieron disponibles, en segundo lugar, utilizamos el ensayo ARCHITEC IgG/IgM como estándar de referencia al no haber uno establecido como estándar de oro para evaluación comparativa, tercero algunas muestras se hemolizaron por lo que fue un criterio de exclusión, finalmente, otra limitación es la falta de estimación de la prevalencia de la población infectada; sin embargo, tiene un gran impacto en la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica. [27]

Esto último al gran impacto que ha tenido el virus y la necesidad de frenar la propagación, pero con pruebas que no discriminan esto se amplía más.

11. CONCLUSION

Demostramos que la prueba rápida Vazyme tiene bajo rendimiento para detectar anticuerpos IgM contra SARS-CoV-2 y reacción cruzada en IgG, por lo que no se recomienda su uso para el diagnóstico y seguimiento de COVID-19.

12. ANEXO 1

SARS-CoV-2 IgGFOR USE WITH
ARCHITECT

en
 CoV-2 IgG
 6R86
 H14806R05

Read Highlighted Changes: Revised January 2021.

REF 6R86-20

REF 6R86-30

For use under an Emergency Use Authorization (EUA) Only
Prescription Use only.For *In Vitro* Diagnostic Use Only.

Instructions must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from these instructions.

For laboratory professional use only.

NAME

SARS-CoV-2 IgG (also referred to as CoV-2 IgG)

INTENDED USE

The SARS-CoV-2 IgG assay is a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) intended for the qualitative detection of IgG antibodies to SARS-CoV-2 in human serum, serum separator tube and plasma (ACD, CPD, CPDA-1, dipotassium EDTA, tripotassium EDTA, lithium heparin, lithium heparin separator tube, sodium citrate, sodium heparin). The SARS-CoV-2 IgG assay is intended for use as an aid in identifying individuals with an adaptive immune response to SARS-CoV-2, indicating recent or prior infection. At this time, it is unknown for how long antibodies persist following infection and if the presence of antibodies confers protective immunity. The SARS-CoV-2 IgG assay should not be used to diagnose acute SARS-CoV-2 infection. Testing is limited to laboratories certified under the Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) of 1988, 42 U.S.C 263a, to perform moderate or high complexity test.

Results are for the detection of SARS CoV-2 antibodies. IgG antibodies to SARS-CoV-2 are generally detectable in blood several days after initial infection, although the duration of time antibodies are present post-infection is not well characterized. Individuals may have detectable virus present for several weeks following seroconversion.

Laboratories within the United States and its territories are required to report all results to the appropriate public health authorities. The sensitivity of SARS-CoV-2 IgG early after infection is unknown. Negative results do not preclude acute SARS-CoV-2 infection. If acute infection is suspected, direct testing for SARS-CoV-2 is necessary.

False positive results for SARS-CoV-2 IgG assay may occur due to cross-reactivity from pre-existing antibodies or other possible causes. Due to the risk of false positive results, confirmation of positive results should be considered using a second, different IgG assay.

The SARS-CoV-2 IgG assay is only for use under the Food and Drug Administration's Emergency Use Authorization.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The SARS-CoV-2 IgG assay is designed to detect immunoglobulin class G (IgG) antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 in serum and plasma from individuals who are suspected to have had coronavirus disease (COVID-19) or in serum and plasma of subjects that may have been infected by SARS-CoV-2.

COVID-19 is defined as illness caused by a novel coronavirus now called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2, formerly called 2019-nCoV).¹ On March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared COVID-19 a global pandemic.²

The incubation period of COVID-19 ranges between 1 and 14 days, with the majority of cases manifesting within 3 to 5 days. The most common symptoms of COVID-19 are fever, tiredness, dry cough, and difficulty breathing. A severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) may develop.³ Reported case fatality rates depend on geographic location,⁴ age, and comorbidities.

The causative agent of COVID-19 is a beta coronavirus and belongs to a family of viruses that may cause respiratory symptoms ranging from common cold to severe pneumonia. These viruses are common in animals worldwide and may eventually transfer to humans, as has likely happened with SARS-CoV-2.¹

The host immune system reacts to the infection by SARS-CoV-2 by producing specific antibodies. These antibodies have been reported to appear in serum or plasma of infected individuals after the detection of viral ribonucleic acid (RNA) in swabs⁵ in as early as a few days to 2 weeks after the onset of symptoms.⁶ Specific IgG antibodies to SARS-CoV-2 may be detectable in COVID-19 patients during the symptomatic phase of the disease after RNA is no longer detectable.^{5, 6} The persistence of IgG antibodies allows identification of people who have been infected in the past, and likely have recovered from the illness.⁷ It is unknown if IgG antibodies to SARS-CoV-2 confer immunity to infection. IgG detection and other serological assays will likely play an important role in research and surveillance.⁸

BIOLOGICAL PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

This assay is an automated, two-step immunoassay for the qualitative detection of IgG antibodies to SARS-CoV-2 in human serum and plasma using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology.

Sample, SARS-CoV-2 antigen coated paramagnetic microparticles, and assay diluent are combined and incubated. The IgG antibodies to SARS-CoV-2 present in the sample bind to the SARS-CoV-2 antigen coated microparticles. The mixture is washed. Anti-human IgG acridinium-labeled conjugate is added to create a reaction mixture and incubated. Following a wash cycle, Pre-Trigger and Trigger Solutions are added.

The resulting chemiluminescent reaction is measured as a relative light unit (RLU).

The presence or absence of IgG antibodies to SARS-CoV-2 in the sample is determined by comparing the chemiluminescent RLU in the reaction to the calibrator RLU, which is calculated by the system as an Index (S/C).

For additional information on system and assay technology, refer to the ARCHITECT System Operations Manual, Section 3.

REAGENTS**Kit Contents**

SARS-CoV-2 IgG Reagent Kit 6R86

NOTE: Some kit sizes may not be available for use on all ARCHITECT i Systems. Please contact your local distributor.

Volumes (mL) listed in the following table indicate the volume per bottle.

ANEXO 2.

SARS-CoV-2 IgM

FOR USE WITH
ARCHITECT

es

CoV-2 IgM
6R87
H13124R02
B6R873

Consulte las modificaciones marcadas. Revisado en septiembre de 2020.

REF 6R87-22

REF 6R87-32

Siga cuidadosamente estas instrucciones de uso. No se puede garantizar la fiabilidad de los resultados del ensayo si no se siguen exactamente las instrucciones indicadas.

Para uso exclusivo por profesionales del laboratorio.

NOMBRE

SARS-CoV-2 IgM (denominado también CoV-2 IgM)

FINALIDAD DE USO

El ensayo SARS-CoV-2 IgM es un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) utilizado para la detección cualitativa de anticuerpos IgM frente al virus del SARS-CoV-2 en suero y plasma humanos en ARCHITECT i System.

El ensayo SARS-CoV-2 IgM se utiliza como ayuda en el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, junto con las manifestaciones clínicas y otras pruebas de laboratorio. Los resultados obtenidos con el ensayo SARS-CoV-2 IgM no se deben utilizar por sí solos para establecer un diagnóstico.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo SARS-CoV-2 IgM se ha diseñado para detectar anticuerpos, las inmunoglobulinas de clase M (IgM), frente a la proteína de la espícula del SARS-CoV-2, en suero y plasma procedentes de individuos con sospecha de haber padecido la enfermedad del coronavirus (COVID-19) o de individuos que puedan haber estado infectados por el SARS-CoV-2.

La COVID-19 se define como una enfermedad causada por un nuevo coronavirus denominado coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2, anteriormente denominado 2019-nCoV).¹ El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la pandemia global por COVID-19.² El periodo de incubación de la COVID-19 es de 1 a 14 días, manifestándose la mayoría de los casos transcurridos de 3 a 5 días. Los síntomas más comunes de la COVID-19 son fiebre, cansancio, tos seca y dificultad respiratoria. Se puede desarrollar un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) grave.³ La tasa de mortalidad comunicada depende de la ubicación geográfica, la edad y la presencia de comorbilidades.⁴ Estos virus son comunes en los animales en todo el mundo y pueden transmitirse a los humanos, como probablemente ha sucedido con el SARS-CoV-2.¹

El sistema inmunitario del anfitrión reacciona a la infección por el SARS-CoV-2 produciendo anticuerpos específicos. Estos anticuerpos aparecen en el suero o el plasma de los individuos infectados después de la detección del ácido ribonucleico vírico (RNA) en los hisopados (frotis)⁵ y después de unos días a 2 semanas de la aparición de los síntomas.⁶ Los anticuerpos IgM específicos frente al SARS-CoV-2 se pueden detectar en los pacientes con COVID-19 durante la fase sintomática de la enfermedad, después de que el RNA ya no sea detectable.^{5, 6} Actualmente, la duración e intensidad de la respuesta de los anticuerpos IgM siguen pendientes de descripción; la cinética de esta respuesta no se conoce. La sensibilidad comunicada de la combinación de RNA con los resultados de los anticuerpos es > 99 %.⁵ La presencia de anticuerpos IgM permiten identificar una infección reciente y evaluar el curso de la enfermedad. En la actualidad se desconoce si se puede alcanzar una inmunidad protectora.⁷ El ensayo SARS-CoV-2 IgM, junto con otros ensayos serológicos IgG, desempeñará un papel importante en la investigación y el seguimiento de este nuevo virus patológico.⁸

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo es un inmunoanálisis automatizado de dos pasos para la detección cualitativa de anticuerpos IgM frente al virus SARS-CoV-2 en suero y plasma humanos que utiliza la tecnología de inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA).

Se combinan y se incuban la muestra, las micropartículas paramagnéticas recubiertas de antígeno del SARS-CoV-2 y el diluyente del ensayo. Los anticuerpos IgM frente al SARS-CoV-2 presentes en la muestra se unen a las micropartículas recubiertas de antígeno del SARS-CoV-2. Se lava la mezcla. Se añade el conjugado de anticuerpo anti-IgM humana marcado con acridinio para crear una mezcla de reacción y se incuba. Después de un ciclo de lavado, se añaden las soluciones preactivadora y activadora.

La reacción quimioluminiscente resultante se mide en unidades relativas de luz (URL). Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de anticuerpos IgM frente al virus SARS-CoV-2 en la muestra y las URL detectadas por el sistema óptico.

Esta relación se refleja en el Index (S/C) calculado.

La presencia o la ausencia de anticuerpos IgM frente al virus SARS-CoV-2 en la muestra se determina comparando las URL quimioluminiscentes presentes en la reacción con las URL del calibrador.

Si desea información adicional sobre el sistema y la tecnología del ensayo, consulte el Manual de operaciones del sistema ARCHITECT, capítulo 3.

REACTIVOS**Contenido del equipo**

SARS-CoV-2 IgM Reagent Kit (equipo de reactivos) 6R87

NOTA: algunas presentaciones del equipo pueden no estar disponibles para todos los ARCHITECT i Systems. Si desea más información, póngase en contacto con su distribuidor local de Abbott.

Los volúmenes (mL) enumerados en la tabla siguiente indican el volumen por frasco.

REF	6R87-22	6R87-32
Análisis por equipo	100	500
Número de equipos por caja	1	1
Determinaciones por caja	100	500
MICROPARTICLES	6.6 mL	27.0 mL
CONJUGATE *	5.9 mL	26.3 mL
ASSAY DILUENT	11.4 mL	40.7 mL

MICROPARTICLES Micropartículas recubiertas de antígeno recombinante de SARS-CoV-2 purificado en tampón TRIS con agente tensioactivo. Concentración mínima: 0.0675 % de partículas sólidas. Conservantes: ProClin 950 y azida sódica.

CONJUGATE Conjugado de anticuerpo (monoclonal, de ratón) anti-IgM humana, marcado con acridinio en tampón MES con agentes tensioactivos y estabilizante proteínico (bovino). Concentración mínima: 20 ng/mL. Conservantes: ProClin 300 y agente antimicrobiano.

ASSAY DILUENT Tampón TRIS y detergente. Conservantes: ProClin 300, azida sódica y agentes antimicrobianos.



[BASIC INFORMATION]

Manufacturer: Nanjing Vazyme Medical Technology Co., LTD.
 Address: Floor 1-3, Building C2, Red Maple Park of Technological Industry, Kechuang Road, Economy & Technology Development Zone, Nanjing, China.
 Tel: +86 25 8436 5701
 Customer Service Provider: Nanjing Vazyme Medical Technology Co., LTD.
 Tel: +86 25 8436 5701
 Address: Floor 1-3, Building C2, Red Maple Park of Technological Industry, Kechuang Road, Economy & Technology Development Zone, Nanjing, China.
 E-mail: support@vazyme.com
 Website: www.vazymemedical.com
 Manufacturing License: SSYJXSCX 20170028

[MEDICAL DEVICE REGISTRATION CERTIFICATE NO./PRODUCT TECHNICAL REQUIREMENT NO.]

GXZZ 20203400239

[APPROVAL DATE & MODIFICATION DATE OF INSTRUCTIONS FOR USE]

June 4, 2020

[Symbols]

	Authorized Representative In the European Community
	For in vitro diagnostic use only
	Stored at 4 ~ 30°C
	Production Date

	Tests per kit
	Catalog #
	Batch Code

	Manufacturer
	Expire Date
	Consult instructions for use
	CE Mark

Nanjing Vazyme Medical Technology Co., LTD.
 Floor 1-3, Building C2, Red Maple Park of Technological Industry, Kechuang Road, Economy & Technology Development Zone, Nanjing, China
 www.vazymemedical.com

Poigen Sp. z o.o. Sp.K.
 92-516 Lodz, Puszkina Str. 80, Poland

[Address] Floor 1-3, Building C2, Red Maple Park of Technological Industry, Kechuang Road, Economy & Technology Development Zone, Nanjing, China
 [Tel] +86 25 8436 5701
 [Website] www.vazymemedical.com

**2019-nCoV IgG/IgM Detection Kit (Colloidal Gold-Based)
 Instructions for Use**

[PRODUCT NAME]

Generic Name: 2019-nCoV IgG/IgM Detection Kit (Colloidal Gold-Based)

[SPECIFICATION]

10 tests/kit, 20 tests/kit, 25 tests/kit, 30 tests/kit, 40 tests/kit, 50 tests/kit

[INTENDED USE]

This test kit is suitable for in vitro qualitative detection of 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) IgM/IgG antibodies in human serum or plasma. This test kit is only used as a supplementary detection marker for suspected cases with negative 2019-nCoV nucleic acid test result, or for diagnosis of suspected cases in conjunction with nucleic acid test. The test result of this kit should not be used as a basis for diagnosis and elimination of COVID-19. This test kit is not suitable for screening of general population.
 The product can only be used by medical institutions.
 Positive test results need further confirmation. Negative test results cannot rule out the possibility of 2019-nCoV infection. The test kit is limited to clinical use and emergency stockpiles. It cannot be used in clinic as routine in vitro diagnostic reagent. The test result of this kit is for clinical reference only. It is suggested that the patients' clinical manifestations and other laboratory tests should be combined to make a comprehensive analysis of patients.

[PRINCIPLE OF DETECTION]

This product is based on capture and solid-phase immunochromatography methods for detection. The specimen (serum/plasma) flows from the specimen addition end through to the conjugate release pad (which causes the conjugation reaction between 2019-nCoV IgM/IgG antibodies in the specimen and the antigen colloidal gold of 2019-nCoV to form a complex of IgM/IgG antibody and colloidal gold-labeled antigen) due to capillary action. It then migrates to a capture zone of nitrocellulose membrane-immobilized antibody (mouse-anti-human IgM antibody, T1 line) to form an immune complex of colloidal gold-labeled antigen, IgM antibody and mouse-anti-human IgM antibody, thereby generating a T1 red line. The uncaptured colloidal gold conjugate complex continues to flow upward and will be captured by the mouse-anti-human IgG antibodies (T2 line) to form an immune complex of colloidal gold-labeled antigen, IgG antibody and mouse-anti-human IgG antibody, thereby generating a T2 red line. The remaining uncaptured colloidal gold conjugate complex moves upward, combining with C line (quality control line) to indicate the completion of this reaction.

[MAIN COMPONENTS PROVIDED IN THIS KIT]

Component	Main Ingredients
Test Cassette	Aluminum foil pouch, desiccant, test strip and plastic card. Test strip composing blotting paper, nitrocellulose membrane, specimen pad, colloidal gold-labeled pad and PVC plate. Nitrocellulose membrane T1 line (Test line) coating 1.0 mg/mL mouse-anti-human IgM antibody. Nitrocellulose membrane T2 line (Test line) coating 1.0 mg/mL mouse-anti-human IgG antibody. C line (quality control line) coating 1.0 mg/mL actin protein C. Conjugate release pad containing 400D 2019-nCoV antigen-colloidal gold conjugate complex.
Specimen Dilution	HEPES Buffer containing casein (0.1 M), 5 mL/bottle.
Dropper	According to different specifications, 10 droppers/ pack, 20 droppers/ pack, 25 droppers/ pack, 30 droppers/ pack, 40 droppers/ pack, 50 droppers/ pack.

Note: DO NOT interchange the components from different batches.

[STORAGE CONDITIONS & SHELF LIFE]

The shelf life of this kit is 6 months at 4~30°C.
 Once the package of the Test Cassette is opened (4~30°C, humidity < 65%), it must be used within 1 hour. The period of validity of specimen diluent is 28 days after opening.
 See labels for production date and expiration date.

[SPECIMEN REQUIREMENTS]

1. Applicable specimen types are serum and plasma.
2. Sediment and suspended matter in the specimen may affect the test result. Those should be removed by centrifugation at 3000 g for 10 minutes.
3. Severe hemolytic, lipemic and turbid specimens should not be used.
4. Plasma specimens can be treated with heparin sodium or EDTA anticoagulant. After specimen collection, the test should be completed within the same day. If not, please store the specimens using as the following protocol: for Serum/plasma specimens, store at 2-8°C for 7 days, or at < -20°C for 12 months.
5. Specimens must be fully restored to room temperature (18°C-28°C) before testing. Freeze-preserved specimens should be completely melted, reheated and mixed thoroughly before use.

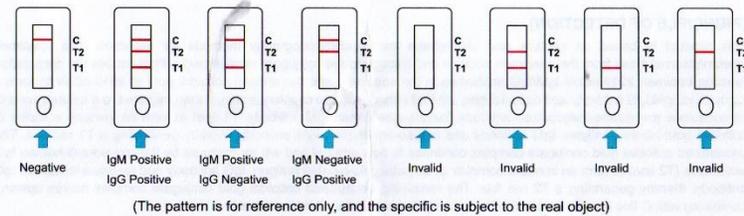
[TEST METHODS]

Read the instructions for use carefully before use.

1. The test cassette must be at room temperature before use, and the test must be operated at room temperature.
2. Remove the test cassette from the foil pouch and place on a flat, dry table.
3. Using the dropper provided, add 1 drop (about 20 µL) of the serum, or plasma specimens to the specimen addition port. Then add 3 drops of dilution buffer (about 60 µL) to the specimen. Begin timing.
4. Read the results after 10 minutes. The result is invalid after 15 minutes.

[INTERPRETING TEST RESULTS]

The test results are interpreted as follows:



(The pattern is for reference only, and the specific is subject to the real object)

1. Negative result: Only one red quality control line (C line) appears in the detection area.
2. IgM positive, IgG positive results: Three clear red lines appear in the detection area, one is the quality control line (C line), one is T2 detection line, and the other is T1 detection line.
3. IgM positive, IgG negative results: Two clear red lines appear in the detection area, one is the quality control line (C line) and another is T1 detection line.
4. IgM negative, IgG positive results: Two clear red lines appear in the detection area, one is the quality control line (C line) and another is T2 detection line.
5. Invalid result: No red quality control line (C line) appears in the detection area (e.g. without any red lines or only test lines (T1, T2 line)), indicating that the test error or the test result is invalid, and the test should be retested.

[LIMITATIONS OF TEST METHODS]

1. The test results of this product are only for clinical reference and should not be used as the only basis for clinical diagnosis and treatment. The final diagnosis result should be made by the doctor after integrating all the test indicators and clinical symptoms. The clinical management of patients should be considered in combination with their signs/symptoms, medical history, other laboratory tests and treatment reactions and epidemiology. It is recommended to repeat the test for suspicious specimens at intervals.
2. The accuracy of detection is affected by the specimen collection process. Improper specimen collection and storage process will affect the test results and should avoid high temperature and direct sunlight.
3. This reagent provides a qualitative detection for the 2019-nCoV IgM antibody and IgG antibody in the specimen, but not quantified detection.
4. Due to the limitation of the testing methodologies, it cannot rule out the possibility of a 2019-nCoV infection based on negative results. It is recommended to combine other test results and clinical symptoms to make an accurate diagnosis.

[PRODUCT PERFORMANCE INDICATORS]

1. Minimum Limit of Detection (LOD): Test with the in-house LOD references. S1 and S2 are positive for 2019-nCoV IgG antibody, negative for IgM antibody; S3 is negative for 2019-nCoV IgG/IgM antibodies; S4 and S5 are positive for 2019-nCoV IgM antibody, negative for IgG antibody; and S6 is negative for 2019-nCoV IgG/IgM antibodies.
2. Negative coincidence rate: Test with the in-house negative references and the results are all negative for 2019-nCoV IgG/IgM antibodies, with a coincidence rate of 100%.
3. Positive coincidence rate: Test with the in-house positive references. PC01-PC05 are all positive for 2019-nCoV IgM/IgG antibodies, with a coincidence of 100%; PC06-PC10 are all negative for 2019-nCoV IgG antibody and all positive for IgM antibody, with a coincidence rate of 100%; PC11-PC15 are all negative for 2019-nCoV IgM antibody, and all positive for IgG antibody, with a coincidence rate of 100%.
4. Precision:
 - Intra-batch difference: Test with the in-house repetitive references. CV1 and CV2 are positive for 2019-nCoV IgG antibody and negative for IgM antibody; CV3 and CV4 are negative for 2019-nCoV IgG antibody and positive for IgM antibody, with uniform color development.
 - Inter-batch difference: Test with the in-house repetitive references. The results of the kit of three batch numbers: CV1 and CV2 are positive for 2019-nCoV IgG antibody and negative for IgM antibody; CV3 and CV4 are negative for 2019-nCoV IgG antibody and positive for IgM antibody, with uniform color development.
5. Analytical specificity
 - 5.1 Cross-reactivity: This product will not cross react with positive specimens of human coronavirus HKU1, OC43, 229E, influenza A H1N1 virus, seasonal H1N1 influenza virus, H3N2, H5N1, H7N9, influenza B Yamagata, Victoria, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, rhinovirus species A, B and C, adenovirus types 1, 2, 3, 4, 5, 7 and 55, coxsackievirus (enterovirus species B), enterovirus 71 (enterovirus species A), enterovirus 68 (EV-D68) (enterovirus species D), EB virus, measles virus, human cytomegalovirus, rotavirus, norovirus, mumps virus, varicella-zoster virus, mycoplasma pneumoniae, chlamydia pneumoniae IgG/IgM antibodies.
 - 5.2 Interferents: When bilirubin ≤ 0.2 g/L, triglyceride ≤ 10 g/L, hemoglobin ≤ 5 g/L, rheumatoid factor ≤ 500 IU/mL, antinuclear antibody titer $\leq 1:240$, anti-mitochondrial antibody titer $\leq 1:160$, HAMA ≤ 20 ng/mL, total IgG ≤ 50 mg/L and total IgM ≤ 5 mg/L, they will not interfere with the test results. Oseltamivir, levofloxacin, ceftriaxone, zanamivir, interferon alpha (IFN- α), ribavirin, peramivir, lopinavir, ritonavir, arbidol, azithromycin, meropenem, tobramycin, histamine hydrochloride, phenylephrine, oxymetazoline, sodium chloride, beclomethasone, dexamethasone, flunisolide, triamcinolone acetonide, budesonide, mometasone and fluticasone have no effect on the test results.
6. Hook effect: Hook effect will occur at the concentration levels that exceed the lowest limit of detection of IgG antibody of this product by more than 1280 times and the lowest limit of detection of IgM antibody by more than 640 times. If 2019-nCoV infection is highly suspected but the antibody test result is negative, the specimen should be re-tested after dilution.
7. After the specific IgM positive specimen is destroyed, the IgM antibody test result is negative, and the IgG antibody test is not affected.
8. Heparin sodium and EDTA anticoagulants have no effect on the detection of this kit.
9. The precision test is conducted by different test personnel at a different time with this kit, and the results comply with product performance requirements.
10. For virus infection specimens from different regions, the lowest limit of detection and detection repeatability of the reagents comply with the requirements.
11. Clinical study: The clinical trial of this product was carried out at 5 sites. The enrolled cases were suspected cases of 2019-nCoV infection, and included 201 confirmed cases and 369 excluded cases, with 51 early cases in confirmed cases. Clinical sensitivity of this product: 91.54% (95% CI: 86.87%, 94.65%) and specificity: 97.02% (95% CI: 94.74%, 98.33%). The specimen types for clinical evaluation were serum and plasma. After a preliminary evaluation, it was confirmed that the clinical performance of the product meets the emergency needs of the COVID-19 epidemic. The clinical data for the product after marketing will be further collected to confirm the clinical performance of the product.

[PRECAUTIONS]

1. This test kit is only for in-vitro diagnosis.
2. This test kit is intended to be used by testing personnel after professional training only. Read the instructions for use carefully before use and conduct the test strictly in accordance with the kit instructions for use.
3. Specimens should always be treated as if infectious and treatment of reagents and specimens shall be in accordance with infectious disease laboratory procedures. Pay attention to biosafety operation. All used specimens and reagents shall be handled as medical waste.

13. REFERENCIAS

1. Adriana, F. (2019). Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity* 51, 451–464
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.007>
2. Alberto, Salido; Narrative review of the immune response against coronavirus: An overview, applicability for SARS-COV-2, and therapeutic implications. *Revista anales de pediatría*. (2020). Vol. 93. Núm. 1. Páginas 60.e1-60.e7.
3. Alonso, G. (2006). Presentación de antígeno. *Revista alergia, asma e inmunología pediátrica*. Vol. 15, Núm. 3.pp 90-93.
4. Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G. A., Jurczynszak, D., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydillo, T., Miorin, L., Fierer, D. S., Lugo, L. A., Kojic, E. M., Stoeber, J., Liu, S., Cunningham-Rundles, C., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature medicine*, 26(7), 1033–1036.
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>
5. Anka, A. U., Tahir, M. I., Abubakar, S. D., Alsabbagh, M., Zian, Z., Hamedifar, H., Sabzevari, A., & Azizi, G. (2021). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scandinavian journal of immunology*, 93(4), e12998.
<https://doi.org/10.1111/sji.12998>
6. Arevalo-Rodriguez, I., Buitrago-Garcia, D., Simancas-Racines, D., Zambrano-Achig, P., Del Campo, R., Ciapponi, A., Sued, O., Martinez-García, L., Rutjes, A. W., Low, N., Bossuyt, P. M., Perez-Molina, J. A., & Zamora, J. (2020). False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS one*, 15(12), e0242958.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242958>
7. Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology*, 433(2), 166725.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>
8. Asif Shajahan, Nitin T Supekar, Anne S Gleinich, and Parastoo Azadi. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*. 2020 Dec; 30(12): 981–988.
[doi: 10.1093/glycob/cwaa042](https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042)
9. Augustine, R., Das, S., Hasan, A., S, A., Abdul Salam, S., Augustine, P., Dalvi, Y. B., Varghese, R., Primavera, R., Yassine, H. M., Thakor, A. S., & Kevadiya, B. D. (2020). Rapid Antibody-Based COVID-19 Mass Surveillance: Relevance, Challenges, and Prospects in a Pandemic and Post-Pandemic World. *Journal of clinical medicine*, 9(10), 3372.
<https://doi.org/10.3390/jcm9103372>
10. Au-Yeung, N., & Horvath, C. M. (2018). Histone H2A.Z Suppression of Interferon-Stimulated Transcription and Antiviral Immunity Is Modulated by

- GCN5 and BRD2. *iScience*, 6, 68–82.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.013>
11. Bai, Y., Yao, L., Wei, T., Tian, F., Jin, D. Y., Chen, L., & Wang, M. (2020). Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA*, 323(14), 1406–1407. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2565>
 12. Baruah, C., Devi, P., & Sharma, D. K. (2020). Sequence Analysis and Structure Prediction of SARS-CoV-2 Accessory Proteins 9b and ORF14: Evolutionary Analysis Indicates Close Relatedness to Bat Coronavirus. *BioMed research international*, 2020, 7234961. <https://doi.org/10.1155/2020/7234961>
 13. Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011–1033. <https://doi.org/10.3390/v4061011>
 14. Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
 15. Boutin, C. A., Grandjean-Lapierre, S., Gagnon, S., Labbé, A. C., Charest, H., Roger, M., & Coutlée, F. (2020). Comparison of SARS-CoV-2 detection from combined nasopharyngeal/oropharyngeal swab samples by a laboratory-developed real-time RT-PCR test and the Roche SARS-CoV-2 assay on a cobas 8800 instrument. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 132, 104615. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104615>
 16. Bravo-Grau S., Cruz JP. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Rev Chil Radiol* 2015; 21(4): 158-164.
 17. Cerda, Jaime, & Cifuentes, Lorena. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 138-141. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
 18. Chan, C. W., Shahul, S., Coleman, C., Tesic, V., Parker, K., & Yeo, K. J. (2021). Evaluation of the Truvian Easy Check COVID-19 IgM/IgG Lateral Flow Device for Rapid Anti-SARS-CoV-2 Antibody Detection. *American journal of clinical pathology*, 155(2), 286–295. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa221>
 19. Cortés, Manuel E. (2020). Coronavirus zoonótico SARS-CoV-2: La búsqueda del misterioso hospedero intermediario. *Revista Medica Herediana*, 31(2), 138-140. <https://dx.doi.org/10.20453/rmh.v31i2.3781>
 20. Dabanch J. (2021). Emerging sars-cov-2. Basic information about epidemiology, origin source, structure and pathogenicity of sars-cov-2 for clinicians. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.12.003>
 21. Dene R. Littler, Benjamin S. Gully, Rhys N. Colson, and Jamie Rossjohn. Crystal Structure of the SARS-CoV-2 Non-structural Protein 9, Nsp9. *iScience*. 2020 Jul 24; 23(7): 101258. Doi: 10.1016/j.isci.2020.101258

22. Díaz-Jiménez. (2020). Interpretación de las pruebas diagnósticas del virus SARS-CoV-2. *Acta Pediatr Mex*; 41(Suppl: 1):51-57.
23. Donis, José H. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica (2012). *Avances en Biomedicina*, vol. 1, núm. 2, pp. 73-81
24. Duarte, G., García-Murria, M. J., Grau, B., Acosta-Cáceres, J. M., Martínez-Gil, L., & Mingarro, I. (2020). SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *Open biology*, 10(9), 200209. <https://doi.org/10.1098/rsob.200209>
25. Dyavar, S. R., Singh, R., Emani, R., Pawar, G. P., Chaudhari, V. D., Podany, A. T., Avedissian, S. N., Fletcher, C. V., & Salunke, D. B. (2021). Role of toll-like receptor 7/8 pathways in regulation of interferon response and inflammatory mediators during SARS-CoV2 infection and potential therapeutic options. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 141, 111794. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111794>
26. Fernández, D, Morales. L The biology of SARS-CoV-2. *Rev. Mexicana de trasplantes*. Vol. 9, Supl. 2 Mayo-Agosto 2020. pp s139-s148 <https://dx.doi.org/10.35366/94503>
27. Gambino, C. M., Lo Sasso, B., Colomba, C., Giglio, R. V., Agnello, L., Bivona, G., & Ciaccio, M. (2020). Comparison of a rapid immunochromatographic test with a chemiluminescence immunoassay for detection of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG. *Biochimica medica*, 30(3), 030901. <https://doi.org/10.11613/BM.2020.030901>
28. Gestoso-Pecellín, L., García-Flores, Y., González-Quintana, P., & Marrero-Arencibia, J. L. (2021). Recommendations for use of the diverse tests for detection of SARS-COV-2 infection. *Recomendaciones y uso de los diferentes tipos de test para detección de infección por SARS-COV-2. Enfermería clinica*, 31 Suppl 1, S40–S48. <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2020.10.001>
29. Giovanetti, M., Benedetti, F., Campisi, G., Ciccozzi, A., Fabris, S., Ceccarelli, G., Tambone, V., Caruso, A., Angeletti, S., Zella, D., & Ciccozzi, M. (2021). Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochemical and biophysical research communications*, 538, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>
30. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
31. He, J. L., Luo, L., Luo, Z. D., Lyu, J. X., Ng, M. Y., Shen, X. P., & Wen, Z. (2020). Diagnostic performance between CT and initial real-time RT-PCR for clinically suspected 2019 coronavirus disease (COVID-19) patients outside Wuhan, China. *Respiratory medicine*, 168, 105980. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105980>
32. Herrera J, María José, Gajardo O, Pilar, Bedoya M, Juliana, & González G, Claudia. (2010). Rol de los receptores tipo Toll en la patogénesis de la rinitis alérgica. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 70(1), 71-80. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162010000100012>

33. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
34. Hui KPY, Cheung MC, Perera RAPM, Ng KC, Bui CHT, Ho JCW, Ng MMT, Kuok DIT, Shih KC, Tsao SW, Poon LLM, Peiris M, Nicholls JM, Chan MCW. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir Med*. 2020 Jul;8(7):687-695. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30193-4. Epub 2020 May 7. PMID: 32386571; PMCID: PMC7252187.
35. Imelda, M. (2006). Alteración de la actividad inflamatoria regulada por TH1-TH2 en asma. *Rev inst nal enf resp mex volumen 19 - número 2*. Páginas: 136-142. <http://www.scielo.org.mx/pdf/iner/v19n2/v19n2a11.pdf>
36. InDRE .Listado De Pruebas Moleculares Útiles Por RT-PCR, Evaluadas Para El Diagnóstico De SARS-CoV-2 (Última Actualización 17 De Febrero De 2021). <https://www.gob.mx/salud/documentos/listado-de-pruebas-moleculares-por-rt-pcr-monoplexado-sars-cov-2?state=published>.
37. Jiang, H. W., Zhang, H. N., Meng, Q. F., Xie, J., Li, Y., Chen, H., Zheng, Y. X., Wang, X. N., Qi, H., Zhang, J., Wang, P. H., Han, Z. G., & Tao, S. C. (2020). SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. *Cellular & molecular immunology*, 17(9), 998–1000. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0514-8>
38. Joel de León Delgado; Arturo Pareja Cruz; Priscilia Aguilar Ramirez; Yanina Enriquez Valencia; Carlos Quiroz Carrillo; Edward Valencia Ayala. (2020). SARS-CoV-2 y sistema inmune: una batalla de titanes. *Revista Horiz Med*; 20(2): e1209. <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v20n2/1727-558X-hm-20-02-e1209.pdf>
39. Johansson, M. A., Quandelacy, T. M., Kada, S., Prasad, P. V., Steele, M., Brooks, J. T., Slayton, R. B., Biggerstaff, M., & Butler, J. C. (2021). SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA network open*, 4(1), e2035057. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.35057>
40. Junior, N. N., Santos, I. A., Meireles, B. A., Nicolau, M., Lapa, I. R., Aguiar, R. S., Jardim, A., & José, D. P. (2021). In silico evaluation of lapachol derivatives binding to the Nsp9 of SARS-CoV-2. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 1–15. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1875050>
41. Kadam, SB, Sukhramani, GS, Bishnoi, P, Pable, AA, Barvkar, VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol*. 2021; 61: 180– 202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>
42. Khan, M. T., Zeb, M. T., Ahsan, H., Ahmed, A., Ali, A., Akhtar, K., Malik, S. I., Cui, Z., Ali, S., Khan, A. S., Ahmad, M., Wei, D. Q., & Irfan, M. (2021). SARS-CoV-2 nucleocapsid and Nsp3 binding: an in silico study. *Archives of microbiology*, 203(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01998-6>

43. Krygier, R., Stępień, P. M., Zarębska-Michaluk, D. (2021). Rapid serological tests for SARS-CoV-2 IgG/IgM – not worth attention? *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 34(2), 203-209. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01756>
44. Lauer, S. A., Grantz, K. H., Bi, Q., Jones, F. K., Zheng, Q., Meredith, H. R., Azman, A. S., Reich, N. G., & Lessler, J. (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of internal medicine*, 172(9), 577–582. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>
45. Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Pan, P., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of medical virology*, 92(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
46. Li, Jin-Yan, Liao, Ce-Heng, Wang, Qiong, Tan, Yong-Jun, Luo, Rui, Qiu, Ye, Ge, Xing-Yi. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Journal Title: Virus Research*. Vol 286. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>
47. Liang, Y., Wang, M. L., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Yang, Y. P., Lai, W. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., Chen, Y. J., Chang, P. C., & Chiou, S. H. (2020). Highlight of Immune Pathogenic Response and Hematopathologic Effect in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-Cov-2 Infection. *Frontiers in immunology*, 11, 1022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01022>
48. Ludwig, S. Zarbock, A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesthesia and analgesia*, 131(1), 93–96. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004845>
49. Malagón, J., Gómez, C., Parra, E. L., Almentero, J., Palma, R., López, R., Toloza, Y. G., Rubio, V., Bedoya, J. F., López, F., Franco, C., Reales, J., Mercado, M. (2020). SARS-CoV-2 and RT-PCR in asymptomatic patients: Results of a cohort of workers at El Dorado International Airport in Bogotá. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 40(Supl. 2), 166–172. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5802>
50. Marcos, S. (2003). El rol de las proteínas tirosina quinasas ZAP-70 y Syk en la activación de las células T: Estudios preclínicos de terapia génica para la deficiencia en ZAP70. Tesis de Doctorado. Argentina Buenos aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3600_Steinberg.pdf
51. Meresman, Gabriela. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Investigación Clínica*, 52(3), 274-290. Recuperado en 23 de abril de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332011000300009&lng=es&tlng=es.
52. Miorin, L., Kehrer, T., Sanchez-Aparicio, M. T., Zhang, K., Cohen, P., Patel, R. S., Cupic, A., Makio, T., Mei, M., Moreno, E., Danziger, O., White, K. M., Rathnasinghe, R., Uccellini, M., Gao, S., Aydillo, T., Mena, I., Yin, X., Martin-Sancho, L., Krogan, N. J., ... García-Sastre, A. (2020). SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America, 117(45), 28344–28354.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2016650117>
53. Naaber P, Hunt K, Pesukova J, Haljasmägi L, Rumm P, et al. (2020) Evaluation of SARS-CoV-2 IgG antibody response in PCR positive patients: Comparison of nine tests in relation to clinical data. *PLOS ONE* 15(10): e0237548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237548>
 54. Neefjes, J., Jongsma, M., Paul, P. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823–836 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri3084>
 55. Nicol, T., Lefevre, C., Serri, O., Pivert, A., Joubaud, F., Dubée, V., Kouatchet, A., Ducancelle, A., Lunel-Fabiani, F., & Le Guillou-Guillemette, H. (2020). Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 129, 104511. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104511>
 56. Ning, S., Pagano, J. & Barber, G. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun* 12, 399–414 (2011). <https://doi.org/10.1038/gene.2011.21>
 57. Oliva Marín JE. SARS-CoV-2 origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta* 2020; 3(2) DOI: <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
 58. PAHO/WHO. COVID-19 Vaccines. [Citado 02/03/2021], Available from: <https://www.paho.org/en/covid-19-vaccines>
 59. Palacios, M., Santos, E., Velázquez, M., León, M. (2020). COVID-19, a worldwide public health emergency. *COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. Revista clinica espanola*, 221(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2020.03.001>
 60. Pancer, K., Milewska, A., Owczarek, K., Dabrowska, A., Kowalski, M., Łabaj, P. P., Branicki, W., Sanak, M., & Pyrc, K. (2020). The SARS-CoV-2 ORF10 is not essential in vitro or in vivo in humans. *PLoS pathogens*, 16(12), e1008959. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008959>
 61. Paules, C. Marston, H. Fauci, A. Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA*. 2020; 323(8):707–708. doi:10.1001/jama.2020.0757
 62. Pelka, K. and Latz, E. (2013), IRF5, IRF8, and IRF7 in human pDCs — the good, the bad, and the insignificant?. *Eur. J. Immunol.*, 43: 1693-1697. <https://doi.org/10.1002/eji.201343739>
 63. Qiaozhen Ye, Alan M. V. West, Steve Silletti, and Kevin D. Corbett. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Sci.* 2020 Sep; 29(9): 1890–1901. Doi: 10.1002/pro.3909
 64. Ran, S. (2021). IRF1 gobierna las respuestas genéticas diferenciales estimuladas por interferón en monocitos y macrófagos humanos regulando la accesibilidad a la cromatina. *Revista Cell reports*. Volume 34, Issue 12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108891>
 65. RanSong, YajingGao, IgorDozmorov, VenkatMalladi, IreneSaha, Margaret M.(2021). IRF1 governs the differential interferon-stimulated gene responses

- in human monocytes and macrophages by regulating chromatin accessibility. *Cell Reports* Volume 34, Issue 12, 108891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108891>
66. Reina, J. El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica que amenaza al mundo. *Vacunas*. 2020; 2 1(1):17–22. <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2020.03.001>
67. Ricardo Criado, P, Pincelli, TPH, Criado, RFJ, Abdalla, BMZ, Belda Junior, W. Potential interactions of SARS-CoV-2 with human cell receptors in the skin: Understanding the enigma for a lower frequency of skin lesions compared to other tissues. *Exp Dermatol*. 2020; 29: 936– 944. <https://doi.org/10.1111/exd.14186>
68. Rodríguez, R. (2015). El rol del IFN- γ , IL-12, IL-18 y sus receptores en la periodontitis. *Revista mexicana de perinatología*. Vol. VI, Núm. 1 pp 33-39. <https://www.medigraphic.com/pdfs/periodontologia/mp-2015/mp151g.pdf>
69. Romano, Maria; Ruggiero, Alessia; Squeglia, Flavia; Maga, Giovanni; Berisio, Rita. 2020. "A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping" *Cells* 9, no. 5: 1267. <https://doi.org/10.3390/cells9051267>
70. Rosas-Lemus, M., Minasov, G., Shuvalova, L., Inniss, N. L., Kiryukhina, O., Wiersum, G., Kim, Y., Jedrzejczak, R., Maltseva, N. I., Endres, M., Jaroszewski, L., Godzik, A., Joachimiak, A., & Satchell, K. (2020). The crystal structure of nsp10-nsp16 heterodimer from SARS-CoV-2 in complex with S-adenosylmethionine. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2020.04.17.047498. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.047498>
71. Salzberger, B., Buder, F., Lampl, B., Ehrenstein, B., Hitzentbichler, F., Holzmann, T., Schmidt, B., & Hanses, F. (2021). Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection*, 49(2), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01531-3>
72. Schaecher, S. R., Touchette, E., Schriewer, J., Buller, R. M., & Pekosz, A. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis. *Journal of virology*, 81(20), 11054–11068. <https://doi.org/10.1128/JVI.01266-07>
73. Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Osamu Takeuchi.(2016). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Revista CELL*. Review volume 124, issue 4, p783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
74. Sidiq, Z., Hanif, M., Dwivedi, K. K., & Chopra, K. K. (2020). Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection. *The Indian journal of tuberculosis*, 67(4S), S163–S166. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.07.034>
75. Singh Tomar, P. P., & Arkin, I. T. (2020). SARS-CoV-2 E protein is a potential ion channel that can be inhibited by Gliclazide and Memantine. *Biochemical and biophysical research communications*, 530(1), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.206>
76. So Yat Wu, Hoi Shan Yau, Man Yee Yu, Hin Fung Tsang, Lawrence Wing Chi Chan, William Chi Shing Cho, Allen Chi Shing Yu, Aldrin Kay Yuen Yim, Marco J W Li, Yin Kwan Evelyn Wong, Xiao Meng Pei & Sze Chuen Cesar Wong (2020) The diagnostic methods in the COVID-19 pandemic, today and

- in the future, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20:9, 985-993, DOI: 10.1080/14737159.2020.1816171
77. Sule, W. F., & Oluwayelu, D. O. (2020). Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *The Pan African medical journal*, 35(Suppl 2), 121. <https://doi.org/10.11604/pamj.supp.2020.35.24258>
78. Tabibzadeh, A., Esghaei, M., Soltani, S., Yousefi, P., Taherizadeh, M., Safarnezhad Tameshkel, F., Golahdooz, M., Panahi, M., Ajdarkosh, H., Zamani, F., & Karbalaie Niya, M. H. (2021). Evolutionary study of COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as an emerging coronavirus: Phylogenetic analysis and literature review. *Veterinary medicine and science*, 7(2), 559–571. <https://doi.org/10.1002/vms3.394>
79. Tamay, L. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Rev. Investigación y discapacidad* Vol. 2, Núm. 2 Mayo-Agosto 2013 pp 70-78.
80. Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., & Daniel, S. (2020). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral research*, 178, 104792. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
81. Taylor, J. K., Coleman, C. M., Postel, S., Sisk, J. M., Bernbaum, J. G., Venkataraman, T., Sundberg, E. J., & Frieman, M. B. (2015). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF7a Inhibits Bone Marrow Stromal Antigen 2 Virion Tethering through a Novel Mechanism of Glycosylation Interference. *Journal of virology*, 89(23), 11820–11833. <https://doi.org/10.1128/JVI.02274-15>
82. Theresa Klemm, Gregor Ebert, Dale J Calleja, Cody C Allison, Lachlan W Richardson, Jonathan P Bernardini, Bernadine GC Lu, Nathan W Kuchel, Christoph Grohmann, Yuri Shibata, Zhong Yan Gan, James P Cooney, Marcel Doerflinger, Amanda E Au, Timothy R Blackmore, Gerbrand J van der Heden van Noort, Paul P Geurink, Huib Ovaa, Janet Newman, Alan Riboldi-Tunncliffe, Peter E Czabotar, Jeffrey P Mitchell, Rebecca Feltham, Bernhard C Lechtenberg, Kym N Lowes, Grant Dewson. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO J.* 2020 Sep 15; 39(18): e106275. doi: 10.15252/embj.2020106275
83. Torregroza, E. (2021). Pruebas diagnósticas: Fundamentos de los estudios diagnósticos, evaluación de la validez e interpretación clínica de sus resultados. *Rev Colomb Cir*; 36:193-204 <https://doi.org/10.30944/20117582.716>
84. Trougakos IP, Stamatelopoulos K, Terpos E, Tsitsilonis OE, Aivalioti E, Paraskevis D, Kastritis E, Pavlakis GN, Dimopoulos MA. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *J Biomed Sci.* 2021 Jan 12;28(1):9. doi: 10.1186/s12929-020-00703-5. PMID: 33435929; PMCID: PMC7801873.
85. Troyano-Hernández, P., Reinosá, R., & Holguín, Á. (2021). Evolution of SARS-CoV-2 Envelope, Membrane, Nucleocapsid, and Spike Structural Proteins from the Beginning of the Pandemic to September 2020: A Global and

- Regional Approach by Epidemiological Week. *Viruses*, 13(2), 243. <https://doi.org/10.3390/v13020243>
86. Ueffing, M., Bayyoud, T., Schindler, M., & Ziemssen, F. (2020). Grundlagen der Replikation und der Immunologie von SARS-CoV-2 [Basic principles of replication and immunology of SARS-CoV-2]. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 117(7), 609–614. <https://doi.org/10.1007/s00347-020-01155-w>
87. V. Abaira. (2001). El índice kappa. *Notas estadísticas. Volumen 27, Número 5*, pp.247-49.
88. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
89. Van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeule, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine*, 10(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
90. Van, S., Mögling, R., Li, W., Godeke, G. J., Swart, A., Bergmans, B., Brandenburg, A., Kremer, K., Murk, J. L., van Beek, J., Wintermans, B., Reimerink, J., Bosch, B. J., Reusken, C. (2020). Accurate serology for SARS-CoV-2 and common human coronaviruses using a multiplex approach. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1965–1973. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1813636>
91. Wang M, Jiang A, Gong L, Luo L, Guo W, Li C, Zheng J, Li C, Yang B, Zeng J. Cambio significativo de temperatura Transmisión de COVID-19 en 429 ciudades. *MedRxiv*. 2020 doi: 10.1101 / 2020.02.22.20025791
92. Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., Liu, J. (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(9), 1629–1635. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4>
93. Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 587269. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
94. West, R., Kobokovich, A., Connell, N., & Gronvall, G. K. (2021). COVID-19 Antibody Tests: A Valuable Public Health Tool with Limited Relevance to Individuals. *Trends in microbiology*, 29(3), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.002>
95. WHO. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard 2021 [citado 18/05/2022]. Available from: <https://covid19.who.int/>
96. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y., Yuen, K.-Y. (2009). Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
97. Xie, J., Ding, C., Li, J., Wang, Y., Guo, H., Lu, Z., Wang, J., Zheng, C., Jin, T., Gao, Y., & He, H. (2020). Characteristics of patients with coronavirus disease (COVID-19) confirmed using an IgM-IgG antibody test. *Journal of medical virology*, 92(10), 2004–2010. <https://doi.org/10.1002/jmv.25930>

98. Xie, X., Nielsen, M. C., Muruato, A. E., Fontes-Garfias, C. R., & Ren, P. (2021). Evaluation of a SARS-CoV-2 lateral flow assay using the plaque reduction neutralization test. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 99(2), 115248. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115248>
99. Yanhui, Zhua; Yong Shaob; Xinyan Quc; Jing GuobJing; YangbZhe. Sodium ferulate protects against influenza virus infection by activation of the TLR7/9-MyD88-IRF7 signaling pathway and inhibition of the NF- κ B signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications Volume* 512, Issue 4, 2019, Pages 793-798. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.113>
100. Yoshimoto, F.K. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J* 39, 198–216 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>
101. Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis - A review of current methods. *Biosensors & bioelectronics*, 172, 112752. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>
102. Yuen, C. K., Lam, J. Y., Wong, W. M., Mak, L. F., Wang, X., Chu, H., Cai, J. P., Jin, D. Y., To, K. K., Chan, J. F., Yuen, K. Y., & Kok, K. H. (2020). SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1418–1428. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780953>
103. Yujie Ren, Ting Shu, Di Wu, Jingfang Mu, Chong Wang, Muhan Huang, Yang Han, Xue-Yi Zhang, Wei Zhou. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cell Mol Immunol*. 2020 Aug; 17(8): 881–883 doi: 10.1038/s41423-020-0485-9
104. Zepeda F., Guillermo, Tapia F., Lorena, & Ortiz F., Paula. (2020). Infección por SARS-CoV-2 y enfermedad por coronavirus-2019 en pediatría. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 36(2), 122-132. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482020000200122>
105. Zheng, Z., Yao, Z., Wu, K., & Zheng, J. (2020). The diagnosis of SARS-CoV2 pneumonia: A review of laboratory and radiological testing results. *Journal of medical virology*, 92(11), 2420–2428. <https://doi.org/10.1002/jmv.26081>