



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

***Evaluación del desempeño analítico y
clínico de cinco estuches comerciales para
el diagnóstico de SARS-CoV-2***

“Tesis presentada en opción al Título de Máster en Virología”

Autora: Lic. Dianelvys Rosell Simón

La Habana

2022



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Evaluación del desempeño analítico y clínico de cinco estuches comerciales para el diagnóstico de SARS-CoV-2

“Tesis presentada en opción al Título de Máster en Virología”

Autora: Lic. Dianelvys Rosell Simón

Tutores: Dra. María Caridad Montalvo Villalba, Dr.C
Lic. Mayra C. Muné Jiménez, Dr.C

Asesor: Lic. Clara E. Savón Valdés, Dr.C

La Habana

2022

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros, ¿pero qué hay de eso?
Debemos tener constancia y sobre todo confianza en nosotros mismos.
Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser
alcanzado”.

Marie Curie (1867-1934)

*A mis amigos, familia
y en especial a mi **MADRE***

Agradecimientos

Primero que todo quiero darles las gracias a mi colectivo de trabajo, sin ustedes no hubiera sido posible continuar ésta Tarea: Amely, Javier, Rosme, Anaísa, Guelsys, Puchy, Brenda, la profe Mayra y no por ser la última a la profe Oda, una persona muy importante en mi desarrollo profesional; que a pesar de estar lejos siempre estuvo preocupada por el desarrollo de este trabajo. También a Mary y a Cynthia por su ayuda durante el trabajo experimental. A mis madres adoptivas, la profe Mayra, Clarita y la Dra Cary que fue más que una asesora, las tres muchas gracias por su apoyo y paciencia.

A todo el Departamento de Virología por su apoyo y preocupación por el desarrollo de la tesis, en especial a la profe Mayling, por dedicar un tiempo de su trabajo en trabajar en el desarrollo experimental de uno de los objetivos de la Tesis, a la profe Rosita, a la profe Yudira, a Liri y a la profe Magy. También al colectivo del BSL3, a mi oponente Grehetel por su paciencia y dedicación de leer la Tesis, a todos los nuevos y viejos integrantes de mi grupo preferido de guardia de COVID grupo 4, por los buenos y malos momentos que pasamos juntos. A mis maestrantes favoritos: Mandy, Cele, Marialys, Teresa, Nankyu y Cynthia, chicos muchas gracias. Todos los grupos de la guardia por su apoyo y preocupación. Muchas gracias Claudina y Mario por dedicarme un espacio de su tiempo en la organización del documento, a Delmita y a Julio, el administrador de redes, por buscar solución a mis enredos de la computadora. Yenis muchas gracias por todo tu apoyo incondicional y preocupación por la continuidad del presente trabajo, Maydelis, muchísimas gracias por ser la buena persona que eres, sin ti amiga, no hubiera sido posible escribir la tesis y desarrollar otros trabajos de la maestría.

En el último lugar y no menos importante a mi familia y amigos, por estar siempre ahí para mí, dándome consejos y fuerzas para seguir hacia adelante en un proceso muy duro de mi vida, principalmente a Dayro, por existir y mantenerte a mi lado, mi hermano y mi papá. Y con mucho amor y cariño esta Tesis está dedicada a la mujer más importante de mi vida, mi MADRE, donde quiera que estés, todo el esfuerzo y sacrificio es por ti, por enseñarme que la vida se gana con sacrificio y a crecer entre las adversidades que la vida nos pone en el camino.

A todos muchas **GRACIAS...**

SÍNTESIS

Uno de los retos de los laboratorios en el contexto de la pandemia de COVID-19 ha sido contar con pruebas de RT-PCR sensibles y específicas, capaces de detectar el virus SARS-CoV-2 en individuos pre-sintomáticos, con carga viral baja. Se realizó un estudio observacional con componente analítico, con el objetivo de evaluar los indicadores de desempeño de cinco estuches de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2. Primeramente, se determinó la sensibilidad analítica de cada prueba, utilizando las cepas D614G ($4,7 \times 10^6$ UFP/mL) y Delta ($2,1 \times 10^6$ UFP/mL) del SARS-CoV-2, con diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Esto permitió seleccionar la prueba de referencia, para identificar el desempeño clínico de los cuatro estuches comerciales restantes. El estuche STAT NAT SARS-CoV-2 tuvo una sensibilidad analítica y eficiencia optima al compararlo con los otros diagnosticadores, por lo que se seleccionó como prueba de referencia. En cuanto al desempeño clínico, las pruebas RT-PCR STAT-NAT COVID-19 MULTI, RIDA®GENE, GÉNESIG y SARS-CoV-2 (COVID-19 RdRp) mostraron una concordancia buena con el diagnosticador de referencia, identificándose una mayor especificidad para las pruebas que utilizan la RdRp como gen diana. Los resultados sugieren que el estuche STAT-NAT SARS-CoV-2 puede utilizarse como referencia, para la evaluación de futuros estuches comerciales, que se incluyan en el algoritmo diagnóstico del SARS-CoV-2 en el Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y otros Virus Respiratorio.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACE-2: Enzima convertidora de Angiotensina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico.

BSL2: Laboratorios Nivel de Bioseguridad 2, del inglés *Biosafety Laboratory 2*

BSL3: Laboratorios Nivel de Bioseguridad 3, del inglés *Biosafety Laboratory 3*

CECMED: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

CoV: Coronavirus

COVID - 19: Enfermedad causada por coronavirus de 2019.

IgG, IgA, IgM: Inmunoglobina G, A y M respectivamente

IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

LNRVR: Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios

MERS-COV: Coronavirus del síndrome de Oriente Medio.

MINSAP: Ministerio de salud pública.

mRNAs: Ácido ribonucleico mensajero subgenómico

Nsp: Proteínas no estructurales, del inglés *non-structural protein*

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: Marco de lectura abierto, del inglés *Open Reading Frame*

RBD: Dominio de unión al receptor, del inglés *Receptor Binding Domine*

RdRP: ARN dependiente ARN polimerasa, del inglés *RNA dependent RNA polymerase*

RT -RCP: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SARS- COV- 2: Coronavirus del tipo 2 causante del síndrome respiratorio severo.

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo, del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SDRA: Síndrome de dificultad respiratoria del adulto

UMELISAs: Ensayos inmunoenzimáticos ultramicroanalítico

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	4
II.1 Objetivo general:	4
II.2 Objetivos específicos:	4
CAPÍTULO III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
III.1 Antecedentes y origen de la COVID-19	5
III.2. Sars-cov-2 agente etiológico de la COVID-19	6
III.2.1. Taxonomía	6
III.2.2. Organización Genética	7
III. 2.3. Proteínas estructurales y no estructurales	11
III.3 Sitios diana de la infección y Replicación viral	13
III.4. Manifestaciones clínicas y epidemiológica de la enfermedad	15
III. 5. Carga viral y excreción viral	17
III.6. Respuesta inmune	18
III. 7. Diagnóstico de la COVID-19	19
III.7.1 Diagnóstico virológico	19
III.7.2. Diagnóstico molecular	20
III.7 3. Diagnóstico serológico	20
III.8 Variantes del SARS-COV-2	21
III. 8 .1. Variante bajo monitoreo (VBM)	22
III. 8.2 Variantes de interés (VOI)	22
III .8.3 Variantes de preocupación (VOC)	22
III.8.4 Características generales de las variantes de SARS-CoV-2 (D614G y Delta (B.1.617.2)	24
III.9. Emergencia del SARS-CoV-2 en Cuba	25
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	26
IV.1. Diseño del estudio	26
IV.2. Material Biológico	26
IV.2.1. Cepas de SARS-CoV-2	26
IV.3. Universo de estudio de muestras clínicas	27
IV.3.1. Muestras	27
IV.4. Detección de SARS-CoV-2 por RT-PCR	28

IV.4.1. Extracción del ARN.....	28
IV.4.2. RT-PCR	28
IV.4.3. Interpretación de los resultados	31
IV.5. Evaluación de los indicadores de desempeño analítico y clínico de las cinco pruebas de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2.....	31
IV. 5.1. Indicadores del desempeño evaluados:.....	31
IV.6. Análisis estadístico	33
IV.7. Aspectos éticos de la investigación.	33
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
V .1. Sensibilidad analítica de cinco estuches de RT-PCR con las cepas <i>D614G</i> y <i>Delta (B.1.617.2)</i> , para la detección del SARS-CoV-2.....	37
V. 2. Determinar las características del desempeño clínico de los estuches de RT-PCR evaluados para la detección del SARS-CoV-2.....	45
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	48
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	49
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III. 1: Imagen de microscopía electrónica del SARS-CoV-2 en la que se observan las espículas de la envoltura que le dan un aspecto de corona.	7
Figura III.2: Diagrama esquemático del genoma del SARS-CoV-2	8
Figura III.3: Análisis filogenético de genomas completos de 2019-nCoV y virus representativos del género Betacoronavirus 2019-nCoV	9
Figura III.4: Estructura tridimensional (3D) del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2).	11
Figura III.5: Ciclo replicativo de SARS-CoV-2.	15
Figura IV.1: Flujograma de trabajo, para una mejor comprensión de la presente investigación.....	35
Figura V.1: Distribución de los valores de Ct según las diluciones de las cepas estudiadas y los resultados de la RT-PCR de los ensayos empleados.....	39
Figura V.2: Comparación de las medianas de los Ct según las cepas y los genes amplificados por las pruebas empleadas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla III.1: Clasificación de las variantes. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC)	23
Tabla IV. 1: Estuches comerciales de RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2, incluidos en este estudio.	26
Tabla IV.2: Título viral de las cepas de SARS-CoV-2 empleadas para evaluar el desempeño analítico de las pruebas a evaluar.	27
Tabla IV. 3: Características de los cinco estuches comerciales evaluados en la presente investigación.	29
Tabla IV.4: Márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice K.	33
Tabla IV. 5: Operacionalización de las variables.	35
Tabla V.1: Distribución de las medias y la desviación estándar de los Ct según los genes que se detectan por cada estuche y las cepas de SARS-CoV-2 estudiadas.	41
Tabla V.2: Desempeño clínico de los estuches comerciales estudiados tomando como referencia la prueba STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics, Italy).	46

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales emergentes y reemergentes constituyen amenazas continuas para la salud humana a nivel global. La última década ha sido testigo de numerosas epidemias y pandemias, que produjeron enfermedades como: el Ébola en África Occidental (1), el Zika en América Latina (2) y las producidas por dos coronavirus (CoV) altamente patógenos de origen zoonótico, en los años 2002 y 2012, respectivamente. El CoV del Síndrome Respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el CoV del Síndrome Respiratorio del Oriente Medio (MERS-CoV), ambos con alta mortalidad (3).

A finales de 2019 un nuevo CoV (SARS-CoV-2) se identificó en Wuhan, provincia de Hubei en China, provocó un brote de neumonía viral inusual, altamente transmisible que condujo a una emergencia sanitaria mundial sin precedente (4). La Organización Mundial de la Salud (OMS) nombró en febrero de 2020, la enfermedad causada por el SARS-CoV-2 como la COVID-19 (5). El 11 de marzo de 2020, se declaró el carácter pandémico de esta enfermedad, y desde entonces se desarrollaron pruebas diagnósticas para detectar tempranamente las infecciones y contener los brotes (5-7). En Cuba, se identificaron los primeros casos en marzo de 2020, correspondientes a tres turistas italianos con sintomatología respiratoria. Este diagnóstico se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios (LNRVR), del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK).

En la actualidad existen tres tipos de métodos de diagnóstico virológico de la COVID-19. El método recomendado es la detección molecular del ARN viral en muestras respiratorias (8, 9). Por tanto, la técnica de referencia y de elección para el diagnóstico de la infección por COVID-19 es la RT-PCR (del inglés, *Real time-PCR*)(10). Otro método de diagnóstico rápido, es la detección de antígenos del virus en muestras respiratorias. Esta prueba rápida tiene como inconveniente, que no detecta niveles bajos del virus y pueden producir resultados "falsos negativos". Por último, los métodos de diagnóstico serológicos permiten detectar la respuesta de anticuerpos de tipo IgM, IgA, IgG o totales, que el hospedero produce para eliminar el virus durante la infección

por el SARS-CoV-2, los que también se producen en respuesta a la vacunación (11).

En Cuba desde que se detectaron los primeros casos de COVID-19, la industria biofarmacéutica se enfrascó en la búsqueda de diagnosticadores, los estuches de UMELISAs; para la detección del antígeno de SARS-CoV-2, otros diseñados para la detección de anticuerpos IgG, IgM y totales contra el virus; constituyen un ejemplo de ello. En este camino se produjeron candidatos vacunales cubanos contra la COVID-19, a los cuales se les evaluó su eficacia mediante estos estuches (12). Actualmente, se trabaja en la producción de una RT-PCR para detectar SARS-CoV-2, con el propósito de sustituir importaciones, lograr sostenibilidad y reducir los costos del diagnóstico.

En estos tiempos de pandemia disponer de pruebas que permitan un diagnóstico precoz y certero, e incluso que tenga la capacidad de detectar pacientes asintomáticos es una de las claves fundamentales para disminuir los contagios y evitar la propagación de la enfermedad. La falta de un estándar de oro, el uso de diferentes métodos de recolección y preparación de muestras, la comprensión aun incompleta de la dinámica viral en el curso de la infección; conspira con la precisión diagnóstica de los innumerables ensayos de COVID-19 introducidos para detectar el virus (13).

Es importante dilucidar en los ensayos de RT-PCR disponibles para la detección del SARS-CoV-2, su capacidad diagnóstica. Los ensayos de RT-PCR que se emplean deben tener una sensibilidad y especificidad analítica buena, para garantizar el diagnóstico oportuno y en consecuencia la intervención, especialmente para la prevención y el control de las infecciones (14).

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado múltiples estuches para el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2(15). En general, la RT-PCR en tiempo real detecta dianas específicas de SARS-CoV-2 incluidas en regiones codificantes de tres de las cuatro proteínas estructurales del virus: espícula (S), envoltura (E) y nucleocápside (N); así como en regiones que codifican proteínas no estructurales como la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRP, del inglés *RNA dependent RNA polymerase*), y/o marco abierto de lectura ab

(ORF1ab, del inglés Open Reading Frame 1ab). Las distintas plataformas aprobadas están diseñadas para detectar 1 o más de estas dianas, en diferentes combinaciones según los fabricantes (16). La aparición de las variantes del SARS-CoV-2 en el curso de la pandemia, se produjo por la aparición de mutaciones en la cepa salvaje de Wuhan, las que podrían comprometer la sensibilidad del diagnóstico molecular (17).

Desde el inicio de la pandemia en el LNRVR del IPK se han procesado un número elevado de muestras utilizando diferentes estuches de RT-PCR, para la detección de SARS-CoV-2. Dada la disponibilidad de los mismos, se emplearon estuches de diagnóstico tomando como datos de desempeño de los mismos, los proporcionados por el fabricante. El propósito de esta investigación fue evaluar el desempeño de cinco estuches de diagnóstico de SARS-CoV-2: SARS-CoV-2 (RdRP)(18), RIDA®GENE SARS-CoV-2 (19), GENESIG® (20), STAT-NAT COVID-19 MULTI (Sentinel HK Diagnostics) (21) y STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics) (22). Uno de los retos de los laboratorios es identificar la prueba de mejor funcionabilidad, y suficientemente sensible para detectar el virus antes que aparezcan los síntomas, ya que en esta etapa la carga viral es menor. Además, contar con un diagnosticador de mejores prestaciones permite contar con un estuche que pueda emplearse como referencia de otras pruebas que se desarrollen a nivel nacional e internacional.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

II.1 Objetivo general:

- Evaluar el desempeño analítico y clínico de cinco estuches de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2.

II.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la sensibilidad analítica de cinco estuches de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2.
2. Determinar las características del desempeño clínico de los estuches de RT-PCR evaluados, para la detección del SARS-CoV-2.

CAPÍTULO III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1 Antecedentes y origen de la COVID-19

Los Coronavirus causan infecciones respiratorias e intestinales en animales y humanos. Hasta el momento se conoce seis especies de Coronavirus que pertenecen a la familia *Coronaviridae* responsables de infecciones respiratorias en humanos (4).

No se consideró que fueran altamente patógenos para los humanos hasta el brote del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en los años 2002 y 2003 en la provincia de Guangdong, China (23-25) y diez años más tarde surgió otro coronavirus altamente patógeno, el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS CoV) en los países de Oriente Medio (26). Los restantes cuatro, CoVH 229E y CoVH NL63, pertenecientes a los *Alphacoronavirus*; CoVH OC43 y CoVH-HKU1, pertenecientes al linaje A de los *Betacoronavirus*, inducen solo enfermedades leves de las vías respiratorias superiores en huéspedes inmunocompetentes, aunque algunos de ellos pueden causar infecciones graves en lactantes, niños pequeños y ancianos (27, 28). El SARS-CoV y el MERS-CoV, se incluyen dentro de los linajes B y C de los *Betacoronavirus*, respectivamente. Estos dos últimos con gran capacidad para causar infecciones del tracto respiratorio inferior, incluyen neumonía atípica grave con una gran capacidad de evolucionar a una enfermedad potencialmente mortal (29). En este último grupo se incluye, además, el recién emergido Coronavirus (SARS-CoV-2) causante de la enfermedad conocida como COVID-19 (30).

La pandemia del SARS-CoV comenzó a finales de 2002 y se extendió a 29 países. La OMS registró 8096 casos, con 774 fallecidos (9.6%) del 1 de noviembre de 2002 al 31 de julio de 2003. Un esfuerzo global de contención consiguió detener la propagación de este virus (29). Así mismo los registros de la OMS sobre los casos por el MERS-CoV, iniciado en septiembre de 2012, recogían a final de enero de 2020 un total de 2519, con 866 fallecidos, lo que supone un 34.4%. Desde su inicio, la enfermedad se ha extendido por los países de Oriente Medio, además de casos registrados en China, Tailandia, Inglaterra y Estados Unidos (31). A diferencia del SARS-CoV, el MERS-CoV

sigue circulando en la actualidad y presenta una elevada tasa de letalidad cercana al 35% y un índice de contagiosidad que no rebasa el 1%, por ello no ha mostrado una capacidad de difusión excesiva, estando confinado a la zona geográfica de su origen (32).

III.1.1 Emergencia del SARS-CoV-2.

El 31 de diciembre de 2019, la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan (provincia de Hubei, China) informó acerca de un grupo de 27 pacientes con neumonía de etiología desconocida, con una exposición común a un mercado mayorista de marisco, pescado y animales vivos donde se incluían los murciélagos en la ciudad de Wuhan, incluyendo siete casos graves. Los síntomas iniciales del primer caso se registran el 8 de diciembre de 2019. El 7 de enero de 2020, las autoridades chinas lo identificaron como el agente causante del brote de un nuevo virus de la familia *Coronaviridae* que posteriormente se denominó SARS-CoV-2, cuya secuencia genética se informó por las autoridades chinas el 12 de enero de 2020 (33).

El 11 de marzo la OMS declaró la pandemia por SARS-CoV-2. Desde el inicio hasta el 29 de noviembre de 2022, se informó un total acumulado de aproximadamente 637,9 millones de casos de COVID-19 incluidas alrededor de 6,6 millones de muertes, en todo el mundo. En la región de las Américas, hasta esta fecha se reportan 175 millones 701 mil 207 casos confirmados, el 29,3% del total de casos reportados y 2 millones 819 mil 798 fallecidos ;43,5% de las muertes, en todo el mundo (Fuente: Boletín informativo de OPS/OMS e informe N° 81, agosto de 2022 de OPS/OMS, respectivamente). En la actualidad, varias investigaciones han revelado evidencias de las características virológicas y epidemiológicas de este nuevo agente.

III.2. Sars-cov-2 agente etiológico de la COVID-19

III.2.1. Taxonomía

Los coronavirus son miembros de la subfamilia *Coronavirinae* perteneciente a la familia *Coronaviridae* y el orden *Nidovirales*. Esta subfamilia se divide en 4 géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (34). Los *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus* infectan a los mamíferos, mientras que, los *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* tienden a

infectar a las aves, aunque, también algunos de ellos pueden transmitirse a los mamíferos (32). El SARS-CoV-2 es un virus zoonótico emergente que, basado en las relaciones filogenéticas y estructuras genómicas, pertenece a la subfamilia *Orthocoronavirinae*, género *Betacoronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus* (beta-coronavirus, beta-2b) (35).

Son virus envueltos de ARN de simple cadena de polaridad positiva, con una talla de aproximadamente 27-32 kb (4). Se clasifican dentro de cuatro géneros, en relación a la secuencia de sus proteínas,: los coronavirus humano 229E (CoVH 229E) y Netherlands 63 (CoVH NL63) pertenecen a los Alphacoronavirus; los coronavirus humano OC43 (CoVH OC43) y HKU1 (CoVH-HKU1) al linaje A de los Betacoronavirus; mientras que el CoV-SARS y el CoV-MERS se incluyen dentro de los linajes B y C de los Betacoronavirus, respectivamente , en este último grupo se incluye además el recién emergido SARS-CoV-2 causante de la enfermedad conocida como COVID-19.(Figura III.1) Estos CoV son los causantes de epidemias y pandemias e infecciones respiratorias graves (36).

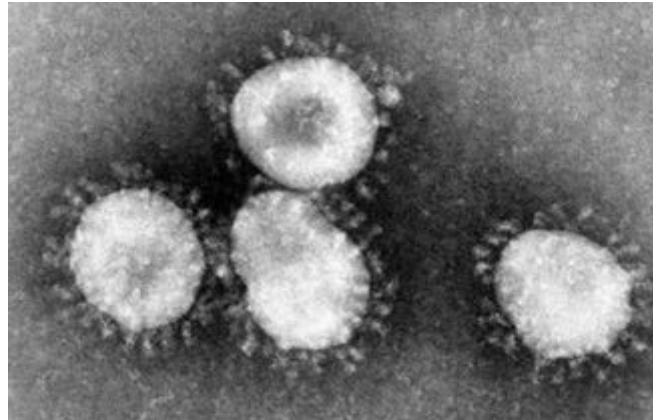


Figura III. 1: Imagen de microscopía electrónica del SARS-CoV-2 en la que se observan las espículas de la envoltura que le dan un aspecto de corona.

Fuente: Reina y cols (32).

III.2.2. Organización Genética

El SARS-CoV-2 comparte una identidad de secuencia genómica del 79,6% con SARS-CoV y del 50% con el MERS-CoV (37) . Tiene un ARN genómico monocatenario de sentido positivo (ssARN) con una longitud de

aproximadamente 30 Kb (30); además, presenta una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3' y un capuchón metilado en el extremo 5', teniendo una similitud estructural al ARN mensajero (ARNm) de células eucariotas (36).

Este ARN consta de 15 marcos abiertos de lectura (ORFs) que son secuencias de ARN comprendida entre un codón de inicio de la traducción y un codón de terminación (37). En SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 (37), a los dos tercios próximos al extremo 5'- terminal de su genoma se encuentran los ORF1a y ORF1b, que codifican las poliproteínas 1a (PP1a) y 1ab (PP1ab), respectivamente. El clivaje de estas poliproteínas origina a las proteínas no estructurales (Nsp1-16), que conforman el complejo viral replicasa-transcriptasa (37). Por otro lado, en el tercio próximo al extremo 3', se encuentran los ORFs, S, E, M y N; que codifican a las proteínas espícula (S), envoltura (E), nucleocápside (N) y membrana (M), respectivamente, y los ORFs 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b y 10 que codifican a las proteínas accesorias (37, 38) (Figura III.2)

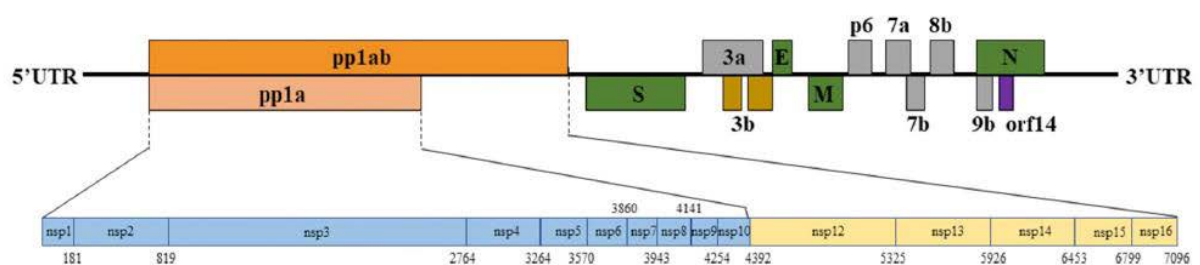


Figura III.2: Diagrama esquemático del genoma del SARS-CoV-2

Leyenda: UTR: (siglas del inglés *untranslated region*), S (espícula), E (envoltura), M (membrana), N (nucleocápside), nsp1-10 (proteínas no estructurales); pp1a y pp1ab (poliproteínas 1a y 1ab) **Fuente:** Yang y cols (39)

A pesar de ello, la secuenciación completa de los genomas de los coronavirus detectados en pacientes, y especialmente el gen de la ARN-polimerasa-ARN-dependiente (RpRd) y el gen S, muestran que las cepas humanas constituyen un linaje diferente del CoV-SARS, pero muy cercano al linaje detectado en algunos murciélagos (BatCoV-RaTG) como se observa en la Figura III.3.

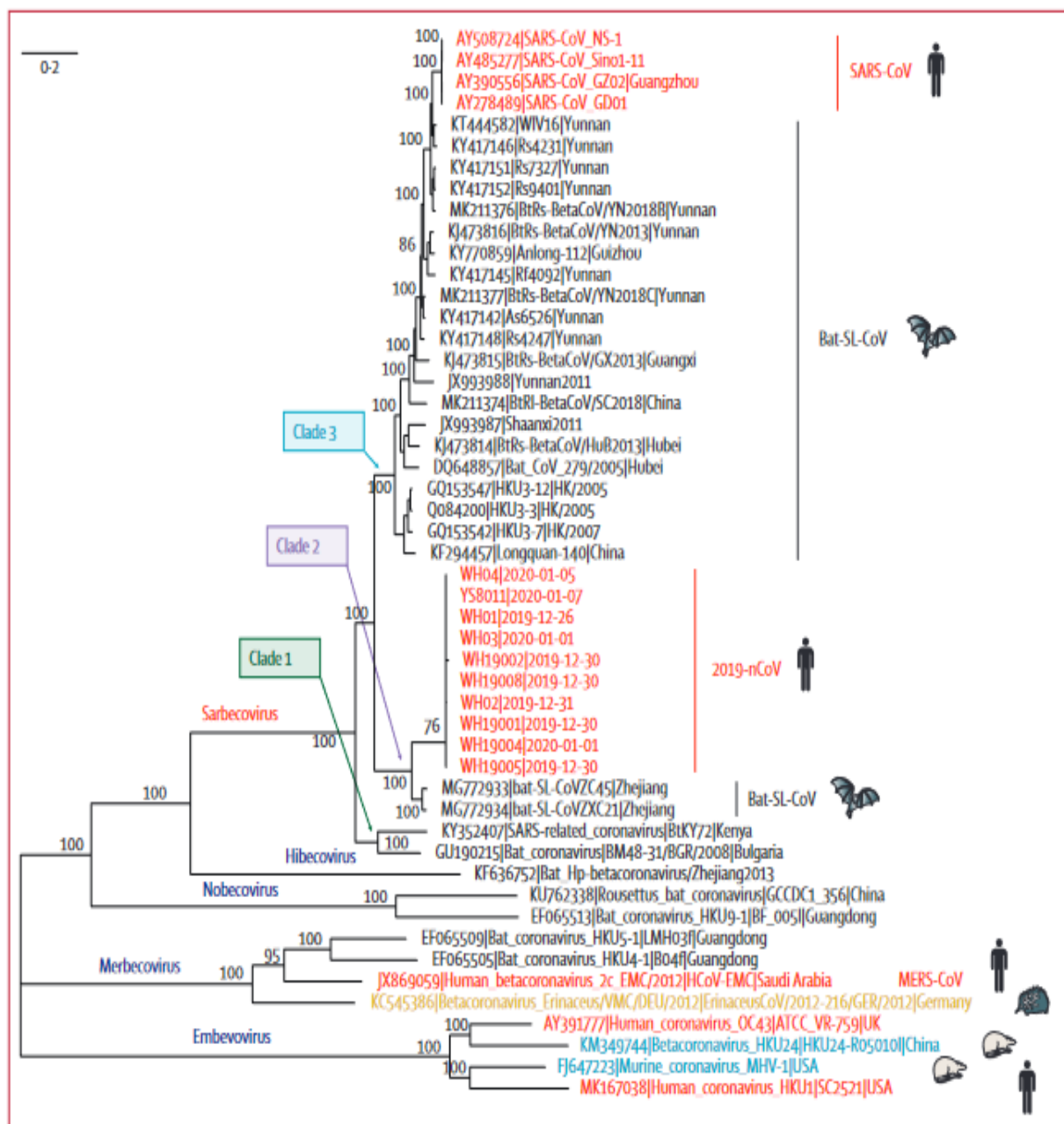


Figura III.3: Análisis filogenético de genomas completos de 2019-nCoV y virus representativos del género Betacoronavirus. 2019-nCoV: 2019 nuevo coronavirus. MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio. SARS-CoV: síndrome respiratorio agudo severo coronavirus.

Fuente: Adaptado de Lu y cols (40)

La proteína S del nuevo coronavirus presenta menos del 75% de semejanza con la de los otros coronavirus conocidos, pero una identidad del 93% con la procedente del coronavirus de murciélago. Estas semejanzas genéticas parecen confirmar el origen del SARS-CoV-2, que sería algún murciélago salvaje de la zona (40).

Según Zhou et al., este coronavirus sería un recombinante genético entre una cepa de murciélago (80-85%) y el de otra especie animal (quizás el de un hospedero intermediario) (39, 41). El análisis genómico comparativo basado principalmente en insertos de secuencia identificados en la proteína S de un coronavirus aislado del pangolín (Orden, Pholidota; Familia, Manidae) sugirió que estos mamíferos eran probablemente los hospederos intermediarios para la transmisión entre especies (42). Un análisis completo del genoma del SARS-CoV-2 junto con el del CoV-SARS reveló la presencia de casi treinta ORF y dos inserciones novedosas (42). Los análisis del genoma del CoV-SARS y los coronavirus de murciélago indican que las secuencias de ORF6, ORF8 y el gen S muestran un grado comparativamente bajo de conservación de secuencias entre los coronavirus en general. Sin embargo, los genomas de los virus bat-SL-CoVZC45 (GenBank ID: MG772933), bat-SL-CoVZXC21 (GenBank ID: MG772934) y RaTG13 (GenBank ID: MN996532) tiene un alto porcentaje de similitud con los del SARS-CoV-2, más notablemente con respecto a ORF8 (42) (4). En la actualidad varias variantes de ORF8 codificadas. Actualmente existen varias variantes de ORF8 por el genoma del SARSCoV-2 (43, 44).

III. 2.3. Proteínas estructurales y no estructurales

El genoma del coronavirus codifica de cuatro a cinco proteínas estructurales: proteínas de espícula (S), membrana (M), envoltura (E), nucleocápside (N) y hemaglutinina esterasa (HE). El genoma de SARS-CoV-2, CoV-SARS, CoVH 229E y CoVH NL63 tiene cuatro genes que expresan las proteínas estructurales S, M, N y E. Los coronavirus CoVH OC43 y CoVH-HKU1 tienen un gen adicional que expresa la proteína HE (37).

La proteína S (150 kDa) es una proteína altamente N-glicosilada y sus trímeros forman la estructura de espícula peculiar en la superficie del virus (44, 45). Esta proteína trimérica facilita la unión del virus al receptor celular ACE-2 (siglas del inglés angio tensin converting enzyme II) y es la encargada del proceso de fusión con el mismo, que determina el tropismo y la capacidad de transmisión en un nuevo hospedero (46). Además, es el antígeno inmunodominante y el más reconocido por el sistema inmune del hospedero (47, 48). Para que la proteína S pueda ejercer su función debe ser hidrolizada por las proteasas pulmonares dando lugar al fragmento S1, responsable de la unión al receptor, y al fragmento S2, responsable del proceso de fusión (49). La Figura III.4 muestra un esquema de la estructura del SARS-CoV-2 con los diferentes componentes estructurales del virión.

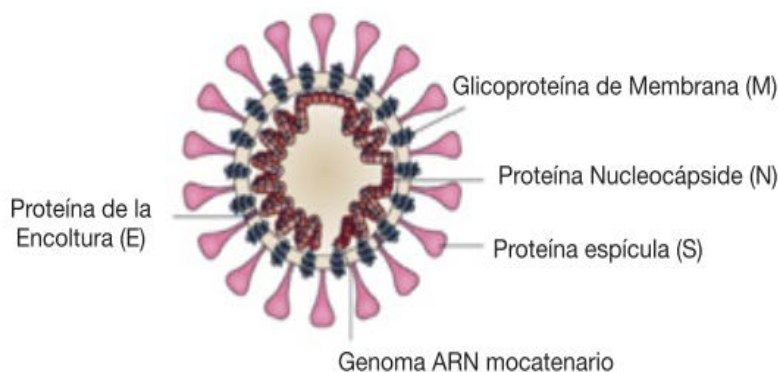


Figura III.4: Estructura tridimensional (3D) del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). **Fuente:** Cui y cols (4)

La proteína M (25-30 kDa) se encuentra en abundancia en el virión y tiene tres dominios transmembrana. Esta proteína da forma al virión y tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal (50). La proteína M se encuentra en el virión como un dímero y ayuda a mantener la curvatura de la membrana y la unión a la nucleocápside (51).

La proteína E es una proteína transmembrana de 8-12 kDa que se encuentra en el virión y tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal (52). La proteína E tiene dentro de sus funciones la del ensamblaje, liberación del virus y la de actuar como canal iónico, necesario para la patogénesis del CoV-SARS y probablemente del SARS-CoV-2 (53).

La proteína N, con un peso molecular aproximado de 50 kDa, es la proteína más abundante en el coronavirus y normalmente está muy conservada. Forma parte de la nucleocápside y tiene un dominio N-terminal y un dominio C-terminal que pueden unirse al ARN (54, 55). Esta proteína está altamente fosforilada, lo que aumenta su afinidad por el ARN viral y tiene dentro de sus funciones, la formación de nucleocápsides, la transducción de señales del virus, la replicación del ARN y la transcripción del ARNm (55).

La proteína hemaglutinina-esterasa (HE) solo se encuentra en algunos β -coronavirus. Su función es unirse a los ácidos siálicos presentes en las glicoproteínas en la superficie del virión, lo cual, junto a la actividad esterasa, facilita la entrada viral en la célula hospedero mediada por la proteína S (56). La proteína HE también ayuda en la propagación viral a través de la mucosa (57).

Además de estas proteínas estructurales el genoma codifica para 16 proteínas no estructurales (Nsp, por sus siglas en inglés) necesarias para la replicación viral e infección.

La proteína **Nsp1** se considera la proteína líder. Su papel fundamental es inactivar la traducción de los ARN celulares de manera selectiva mientras el virus permanece intacto. Esto lo hace interactuando con una región específica de la subunidad 40S del ribosoma.

La proteína **Nsp 2** actúa sobre proteínas que participan en el control del ciclo celular, en la migración y diferenciación y en la apoptosis celular, lo que ha sugerido que durante la replicación viral, ella altera el propio flujo del ciclo celular (37).

La proteína **Nsp 3** es la proteína más grande del SARS-CoV-2 y a partir del N-terminal y junto con Nsp 4 y Nsp 6, regula el sitio de replicación reclutando la proteína replicasa (37)).

La proteína **Nsp 4** es una proteína transmembrana que presenta múltiples sustituciones cerca de su región N-terminal. Tiene una región C-terminal bastante conservada. Ambas regiones son citosólicas. Además, al expresarse junto con la Nsp6 permiten una replicación óptima dentro de las células huésped (37). El resto de las proteínas se centran en el proceso de replicación viral o actúan como cofactores. Tal es el caso de la Nsp 5, 9, 12 y 13 que son necesarias para la replicación viral. En este caso la Nsp 9 desempeña un papel importante en la dimerización y unión del ARN viral. Por su parte Nsp 14, 15 y 16 funcionan como cofactores para las proteínas estructurales. Las Nsp 7, 8, 12 y 10 actúan como cofactores para otras proteínas no estructurales. La Nsp 11 sigue siendo un misterio para la ciencia (37)

III.3 Sitios diana de la infección y Replicación viral

El SARS-CoV-2 infecta y se replica de forma eficiente en los neumocitos, macrófagos y células dendríticas de las partes más profundas del parénquima pulmonar (58). El primer paso de la infección celular por SARS-CoV-2 es la unión de la glicoproteína S al receptor celular ACE-2 que se utiliza por este virus para unirse a las células e iniciar el proceso infeccioso (59-61). La ACE-2 es también el receptor para CoV-SARS, por lo que se cree que la fisiopatología del nuevo coronavirus a nivel pulmonar es muy parecida a la del SARS -CoV, con un predominio evidente de RAG como la neumonía (62, 63). Sin embargo, la afinidad con la que se une la proteína S del SARS-CoV-2 es de 10 a 20 veces mayor que la del SARS-CoV, lo que puede explicar la mayor contagiosidad del nuevo coronavirus (64)

Al detectar la célula diana, la proteína S se une al receptor en la célula, la enzima convertidora de angiotensina 2(ACE2). La proteína S es escindida por una proteasa celular (TMPRSS2), en dos subunidades, S1 y S2. La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD, del inglés, Receptor Binding Domain), en tanto que la subunidad S2 contiene el péptido para la fusión a la membrana celular (43, 65). Luego de su entrada a la célula, mediante la formación de un endosoma, el virus es desenvuelto y el RNA viral es liberado al citoplasma, para iniciarse en los ribosomas la traducción. De los genes ORF 1a y 1b en sus proteínas, las cuales realizan la replicación del genoma viral. Las proteínas estructurales codificadas hacia el extremo 3' son traducidas a partir de mRNAs transcritos desde la hebra de polaridad negativa que se forma durante la replicación del genoma viral. Estas proteínas estructurales son posteriormente ensambladas con el genoma viral, en las membranas celulares internas del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, formándose las nuevas partículas virales. Finalmente, las vesículas que contienen los nuevos viriones se fusionan con la membrana celular para liberar los virus al exterior de la célula, proceso llamado exocitosis (66, 67), como bien se observa en la Figura III.5.

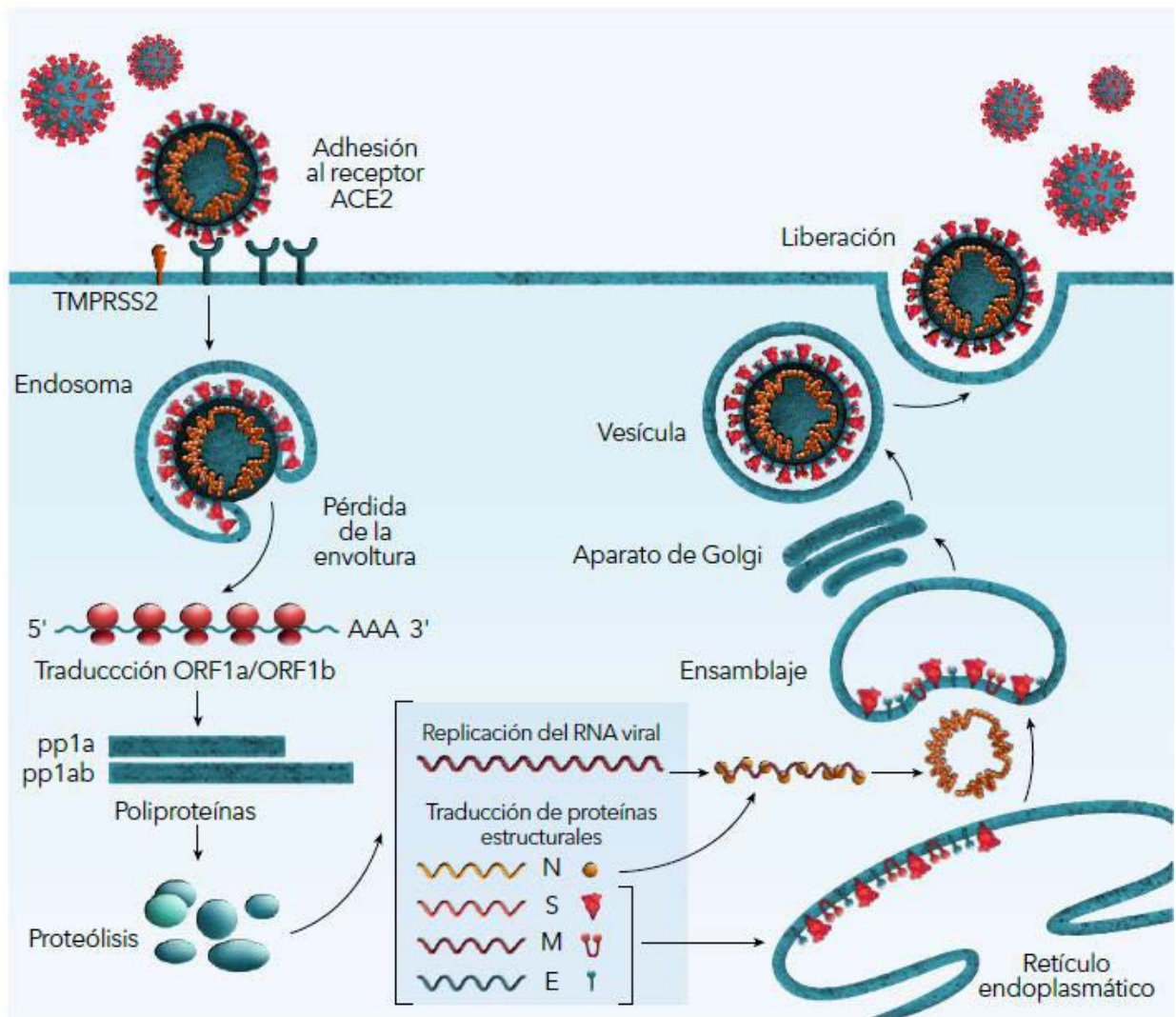


Figura III.5: Ciclo replicativo de SARS-CoV-2.

Leyenda: **ACE2:** (siglas del inglés angiotensin converting enzyme II) **S** (espícula), **E**(envoltura), **M** (membrana), **N** (nucleocápside), **pp1a** y **pp1ab**: poliproteínas 1a y 1ab; **ORF:** (siglas del inglés open reading frames).

Fuente: Adaptado de Díaz-Castrillón y cols (68)

III.4. Manifestaciones clínicas y epidemiológica de la enfermedad

La diferencia entre el SARS-CoV y el SARS-COV-2 se expresa en el período de transmisibilidad; se producía desde los primeros síntomas característicos hasta que se produzca la enfermedad y se ha demostrado que el SARS-CoV-2 puede hacerlo desde el período de incubación. Incluso, surge la posibilidad de que existan transmisores asintomáticos con un largo período de excreción, lo que facilita que su diseminación sea más eficiente (34, 69)

El curso de la COVID-19 es variable y se presenta con tres patrones clínicos, más allá de los casos asintomáticos: (a) una infección moderada del tracto respiratorio superior con síntomas leves; (b) una neumonía clínica y radiológicamente evidente; y (c) una neumonía grave asociada a un dolor agudo respiratorio que podría progresar hacia la insuficiencia respiratoria y fallecimiento del paciente. La neumonía grave se presenta preferentemente asociado a la edad superior a los 65 años y con comorbilidades como diabetes, patologías pulmonares y cardíacas (70, 71)

Los síntomas más comunes, fiebre y tos, están presentes en la mayoría de los pacientes, pero no en todos los casos sintomáticos. La fiebre puede ser alta y prolongada, lo que se asocia a un desenlace desfavorable (72). La tos puede ser seca o productiva con igual frecuencia, y a veces se acompaña de hemoptisis. Además, pueden desarrollarse otros síntomas como fatiga, cefalea, disnea, alteraciones de los sentidos del gusto (ageusia) y del olfato (anosmia), dolor de garganta, congestión nasal y rinorrea. Las manifestaciones gastrointestinales, como náuseas, vómitos, malestar abdominal y diarrea, son síntomas que por lo general, se presentan de forma temprana en algunos pacientes.(71, 73) Estos síntomas digestivos se correlacionan con mayor frecuencia de detección y mayor carga viral en materia fecal (74).Entre las complicaciones más comunes de la COVID-19 se menciona la neumonía, presente virtualmente en todos los casos graves, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), la miocarditis, el daño renal agudo y las sobre infecciones bacterianas, frecuente en la forma de choque séptico. El compromiso de múltiples órganos se expresa por la alteración de las pruebas bioquímicas, como la elevación de las aminotransferasas, deshidrogenasa láctica, creatinina, troponinas, proteína C reactiva y procalcitonina (75).

Desde el punto de vista epidemiológico, la fuente primaria más probable de la enfermedad producida por el SARS-CoV-2 es de origen animal. En este momento parece claro que el reservorio del virus es el murciélago, mientras que se sigue investigando acerca del animal hospedero intermediario, donde ha surgido controversia entre el pangolín y otros (30, 76). La vía de transmisión entre humanos se considera similar al descrito para otros coronavirus a través de las secreciones de personas infectadas, principalmente por contacto directo con gotas respiratorias de más de cinco micras (capaces de transmitirse a

distancias de hasta dos metros) y las manos o los fómites contaminados con estas secreciones seguido del contacto con la mucosa de la boca, nariz u ojos (77). El SARS-CoV-2 se ha detectado en secreciones nasofaríngeas, incluyendo la saliva (77). El período de incubación medio para este coronavirus, es de 5-6 días, con un amplio rango de 0 a 24 días y la transmisión de la infección ocurre fundamentalmente en la primera semana de la presentación de los síntomas, desde 1-2 días antes hasta 5-6 días después. En los casos más graves esta transmisión sería más intensa y más duradera (78).

III. 5. Carga viral y excreción viral

En términos de perfil de carga viral, el SARS-CoV-2 es similar al de la influenza, que alcanza su punto máximo alrededor del momento de la aparición de los síntomas, pero contrasta con el de CoV-SARS y Cov-MERS, que alcanzan su punto máximo en la segunda semana después de la aparición de los síntomas.(79) Durante el curso de la infección, se ha identificado ARN viral en muestras del tracto respiratorio hasta 1 o 2 días antes del inicio de los síntomas (80, 81). La edad avanzada y las infecciones más graves se han asociado con cargas virales más altas (77, 81). Se ha detectado ARN viral en las heces desde el día cinco después del inicio de los síntomas y hasta cuatro o cinco semanas en casos moderados, así como en sangre total (82, 83), suero (83, 84), saliva (77, 79) y orina (77, 85). Se ha informado de una liberación prolongada de ARN viral a partir de hisopados nasofaríngeos (hasta 37 días después del inicio de los síntomas en pacientes adultos) (86) y en las heces (más de un mes después de la infección en pacientes pediátricos) (87).

La carga viral puede ser un marcador potencialmente útil para evaluar la gravedad y el pronóstico de la enfermedad. Un estudio reciente indicó que la carga viral en los casos graves era hasta 60 veces mayor que en los casos leves, aunque en realidad se necesitan más estudios sobre el nivel y la duración de la diseminación viral en los diversos grupos de pacientes y en el contexto de infecciones asintomáticas y presintomáticas (81).

La diseminación de ARN viral de SARS-CoV-2 no equivale a infectividad, a menos que exista prueba de que el virus puede aislarse y cultivarse a partir de muestras particulares. Por otro lado, no se ha determinado la dosis infecciosa; por lo tanto, no está claro cuánto virus se necesita para infectar a los humanos (88).

En efecto, varios trabajos muestran que la excreción viral puede ser intermitente, ya sea por la persistencia del virus en órganos, una posible reinfección o por resultados falsos negativos en el PCR/TR (63, 89-91). Esto ha llevado a darse la recomendación de no dar de alta al paciente, a menos que sea negativo en dos muestras tomadas en diferentes días (88).

III.6. Respuesta inmune

La primera barrera defensiva frente a una infección viral es la inmunidad innata: los receptores celulares reconocen algunos componentes virales e inducen respuestas de producción de interferón de tipo I y de citosinas proinflamatorias. Los interferones son moléculas inespecíficas capaces de detener la replicación viral en células infectadas. En los coronavirus, el propio ARN del genoma viral y los complejos de ARN bicatenario formados con el intermediario de replicación (-) y los ARNs de polaridad (+) son reconocidos por receptores intracelulares: TLR3 y TLR7, en el endosoma, y RIG-I/MDA5 (64). La respuesta inflamatoria tiene valor defensivo, ya que promueve la salida de leucocitos de los vasos sanguíneos y su acumulación en los tejidos infectados; pero también conlleva una agresión al propio tejido, consecuencia de la liberación de radicales citotóxicos por las células inflamatorias. Por ello, es crucial la regulación de la respuesta, ya que una inflamación excesiva incrementará la gravedad del proceso; la situación extrema es la inflamación generalizada, que aparece como consecuencia de una liberación masiva de citosinas proinflamatorias (Interleucina 1, factor necrosante de tumores alfa, interleucina 6, interleucina 12, quimiocinas, entre otros), lo que se conoce como “tormenta de citocinas” (92).

La activación excesiva del sistema inmune innato que causa tormentas de citoquinas ocasiona daño del sistema microvascular y activa el sistema de coagulación e inhibición de la fibrinólisis. La coagulación intravascular

diseminada conduce a trastornos generalizados de la microcirculación que contribuyen a la situación de fallo multiorgánico (93).

Las respuestas de inmunidad específica se producen por los linfocitos B (respuesta de anticuerpos) y T (inmunidad celular). No todos los anticuerpos que se producen protegen frente a la infección; algunos son capaces de neutralizar la infectividad de los viriones y de acelerar su eliminación, pero otros carecen de eficacia e incluso algunos pueden facilitar la entrada del virus en células que carezcan de receptores para él, pero que posean receptores para la parte inespecífica de las inmunoglobulinas, como ocurre con los macrófagos, neutrófilos y algunas poblaciones linfocitarias. Este mecanismo, en el que determinados anticuerpos facilitan la infección de células inmunitarias, se ha descrito en enfermos de SARS y se ha relacionado con la desregulación de las respuestas (93)

III. 7. Diagnóstico de la COVID-19

III.7.1 Diagnóstico virológico

La evidencia científica demuestra que el 80% de los pacientes con COVID-19 son asintomáticos, y que este grupo de personas infectadas con SARS-CoV-2 eliminan y transmitan el virus, lo que indica que el diagnóstico temprano para el tratamiento y control de la infección por coronavirus es crucial. En la práctica diaria, la sospecha de infección respiratoria por SARS-CoV-2 está basada en la alta incidencia, los datos epidemiológicos, así como las manifestaciones clínicas y radiológicas (94). En la primicia de la pandemia, producto a la poca experiencia que se tenía con la COVID-19, surgieron muchas dudas respecto a cuáles eran las mejores técnicas para su diagnóstico (94).

En este sentido, al inicio del brote epidémico se utilizó la secuenciación del genoma viral como método diagnóstico, pero esta técnica es costosa y además poco práctica para el procesamiento de grandes cantidades de muestras (49). Actualmente el mundo cuenta con una gran variedad de ensayos ofrecidos en el mercado para este propósito y una gran cantidad de literatura médica que se va conociendo cada día, con resultados muy variables, respecto a la utilidad de los mismos, precisión e interpretación de estos. De manera general el diagnóstico para la confirmación de la infección viral está basado en el uso de

medios convencionales, del diagnóstico serológico y de las herramientas de biología molecular (94).

III.7.2. Diagnóstico molecular

En la actualidad, el diagnóstico específico de la infección por SARS-CoV-2 se realiza mediante la búsqueda del ARN viral en muestras de secreciones respiratorias, saliva e hisopado nasal o faríngeo, mediante la RT-PCR en tiempo real (siglas en inglés: real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR), (18) la que puede amplificar un segmento de los primeros ORF 1a y 1b, del gen de la RdRp, del gen que codifica para la proteína E o del de la proteína de N (95, 96). La eficiencia analítica de la RT-PCR para el diagnóstico de COVID-19 es $\geq 96\%$ (97). La OMS ha establecido que, para la confirmación de un caso, es necesaria la detección de fragmentos genéticos de al menos dos genes del SARS-CoV-2. De esta manera, es fundamental que el protocolo de amplificación de ácidos nucleicos implementado incluya al menos, dos genes blancos, uno de ellos de tamizaje (detección un segmento de segmento común a otro *Betacoronavirus*) y otro de alta especificidad para el SARS-CoV-2 (98) Las ventajas de la RT-PCR como técnica de diagnóstico son la elevada sensibilidad y especificidad considerada así, la técnica estándar de oro para el diagnóstico de la COVID-19 (99).

III.7 3. Diagnóstico serológico

Los ensayos serológicos que detectan los anticuerpos (Ac) producidos por el organismo humano en respuesta a la infección por el SARS-CoV-2 pueden ser útiles en diversas circunstancias. Por ejemplo, los estudios de serovigilancia pueden utilizarse para apoyar la investigación de un brote en curso y para respaldar la evaluación retrospectiva de la tasa de ataque o el tamaño de un brote (100). Dado que el SARS-CoV-2 es un patógeno nuevo, todavía no se conocen a fondo las respuestas inmunitarias a que da lugar, de modo que las pruebas de detección de Ac deben emplearse con cautela y no deben por sí solas como medio de diagnóstico para identificar casos agudos en la atención clínica o con fines de localización de contactos (80, 101).

En este sentido, las interpretaciones deben ser realizadas por un experto y dependen de varios factores, entre ellos el momento de la enfermedad, la morbilidad clínica, la epidemiología y la prevalencia en el entorno, el tipo de prueba utilizada, el método de validación y la fiabilidad de los resultados. Se ha observado que la seroconversión (aparición de una respuesta de Ac mensurable a raíz de la infección) es más fuerte y rápida en los pacientes graves que en los que tienen síntomas más leves o infecciones asintomáticas. Un diagnóstico fiable de la infección por el SARS-CoV-2 basado en la respuesta de Ac de los pacientes a menudo solo será posible en la fase de recuperación, cuando ya habrán pasado las oportunidades de intervención clínica o de interrupción de la transmisión de la enfermedad. Por lo tanto, las pruebas serológicas no son adecuadas como sustituto de los ensayos virológicos a la hora de orientar las actividades de localización de contactos o la gestión clínica. El tiempo de persistencia de los Ac generados en respuesta al SARS-CoV-2 sigue siendo objeto de estudio (77, 102)

Ya se dispone de pruebas comerciales y no comerciales que miden los Ac aglutinantes [(Ig), IgG, IgM, y/o IgA en diferentes combinaciones] utilizando diversas técnicas, entre ellas el inmunoensayo de flujo lateral, el ensayo de inmunoabsorción enzimática y el inmunoensayo de quimioluminiscencia. Se han publicado varias validaciones y revisiones sistemáticas de estos ensayos (103, 104)(Caini *et al.*, 2020;

III.8 Variantes del SARS-COV-2

Durante la pandemia provocada por el COVID-19 se han identificado cientos de secuencias genómicas asociadas al Síndrome Respiratorio Agudo, por lo que el Grupo Experto de Trabajo de la Evolución del Virus (VEWG) de la OMS, han revisado y clasificado a las variantes del virus de acuerdo a la severidad, transmisibilidad y capacidad para mutar (105). Han dado a conocer diversas variantes de preocupación (VOCs) – siglas del inglés, *Variants of concern* – a las variantes cuyo impacto epidemiológico es importante y Variantes de Interés (VOI) – siglas del inglés, *Variants of Interest*-, mientras que el Instituto de Salud Pública del Reino Unido utiliza su propia nomenclatura y denomina “variantes en estudio” (*Variants Under Investigation - VUI*), a aquellas variantes que tienen

el potencial de volverse VOC (106), como se observa en la tabla resumen (Tabla III.8).

III. 8 .1. Variante bajo monitoreo (VBM)

Las variantes que se encuentran catalogadas como VBM son aquellas que, gracias a los datos recolectados, se ha determinado que existe un impacto claro o potencial acerca de las médicas autorizadas o que en el momento en que las cepas fueron aisladas por primera vez, se detectaron casos de enfermedad más severas o a una mayor transmisión, pero esto ha cambiado puesto que las variantes están circulando a niveles muy bajos, en los Estados Unidos y a nivel mundial.(107)

III. 8.2 Variantes de interés (VOI)

Son aquellas donde se sospecha que alguna(s) de las mutaciones presentes podrían tener un efecto en la infección por estos virus, en la epidemiología, la antigenicidad, la virulencia o en cambios que impacten el éxito de su identificación por métodos diagnósticos, de su dominio a través de vacunación, tratamiento o cualquier otra medida de control de esta enfermedad. Variante con numerosos marcadores genéticos específicos, los cuales han sido asociados a cambios en la unión al receptor, presentan una menor neutralización por los anticuerpos generados ya sea por la vacuna o por una infección anterior.

III .8.3 Variantes de preocupación (VOC)

Aquellas variantes que son responsables del desarrollo de enfermedad grave o es mucho más contagiosa , provocando casos más severos de enfermedad (por ejemplo, mayor cantidad de hospitalizaciones, requerimiento de ventilación mecánica invasiva (VMI) o muertes), también presentan reducción significativa en la neutralización por los anticuerpos generados durante la vacuna o por una infección previa, menor efectividad de los tratamientos, o fallas de detección de diagnóstico.(107)

Tabla III.1: Clasificación de las variantes. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC)

VARIANTES DEL VIRUS SARS-CoV-2 IDENTIFICADAS POR LA OMS				
Dominación de la OMS	Linaje Pango	Primeras muestras documentadas	Fecha de designación	Principales características
VARIANTES DE PREOCUPACIÓN / VARIANTS OF CONCERN (VOC)				
Delta	B.1.617.2	Octubre 2020, India	11 de mayo 2021	Mayor transmisibilidad, cuadro clínico más grave Tratamientos con anticuerpos monoclonales son menos eficaces. Menor efectividad de las vacunas, o dificultades de detección.
Ómicron	B.1.1.529	9 de noviembre 2021, Sudáfrica	26 de noviembre 2021	
VARIANTES DE BAJO MONITOREO / VARIANT BEING MONITORED (VBM)				
Kappa	B.1.617.1	Octubre 2020, India	4 de abril	Menor neutralización de los anticuerpos generados durante Una anterior o por la vacunación. Infección
Beta	B.1.351	Mayo 2020, Sudáfrica	18 de diciembre,2020	
Alpha	B.1.1.7	Septiembre 2020, Reino Unido	18 de diciembre 2020	
Iota	B.1.53	Noviembre 2020, Estados Unidos	24 de marzo 2021	Menor eficacia de los tratamientos Aumento pronosticado en la transmisibilidad o gravedad de la enfermedad.
Gamma	P.1	Noviembre 2020, Brasil	11 de enero 2021	
Eta	B.1.52	Diciembre 2020, Nigeria y Reino Unido	17 de marzo 2021	
Lambda	C.37	Diciembre 2020, Perú	14 de junio 2021	
Mu	B.1.621	Enero 2021, Colombia	30 agosto 2021	

Fuente: Adaptado de Fajardo y cols. (107)

III.8.4 Características generales de las variantes de SARS-CoV-2 (D614G y Delta (B.1.617.2))

Variante D614G

Identificada en diciembre del 2020 en el Reino Unido, cuyo linaje es B.1.1.7,20I/501Y.V1. Las mutaciones de esta variante se acumulan en el Gen S (N501Y), el cuales el que modifica la espícula con mayor incidencia en el receptor RBD. Al igual que las variantes Beta y Gamma, tienen afinidad por la unión de la espícula con la enzima convertidora de angiotensina II (ECA II, la mutación E484K podría ser la responsable del inmunescape de las vacunas (108). En la proteína S existen deleciones en las posiciones 69 y 70 que evolucionan espontáneamente incrementando la transmisibilidad, también producen fallo del objetivo del Gen s (SGTF) en al menos un RT-PCR (109) .Se considera que la cadena de transmisión epidemiológica es tardía por lo que los síntomas podrían aparecer una semana posterior al tener contacto estrecho con un paciente que se le ha detectado por RT – PCR SARS-CoV-2 con la variante Alpha (110). Fue la primera variante que se detectó en Cuba en diciembre del año 2020 (111)

Variante Delta (B.1.617.2)

Se detectó en octubre del año 2020 en la India, rápidamente llegó a ser una variante dominante en muchos países (112). Fue considerada por la OMS como VOC por la OMS Durante el 2021, la OMS consideró a esta variante como la dominante por el aumento de transmisibilidad de este CoV, ya que tiene una especializada capacidad de inmunescape, por ende, se asoció con una mayor carga viral, mayor duración de la infección, con altas tasas de reinfección provocando en muchos países una cuarta ola debido a su expansión y letalidad (113). Es más transmisible con un estimado mayor que 60% comparado con otros previamente descrito en GISAID, el 90% de las secuencias a nivel mundial desde el mes de junio a septiembre fueron de Delta (114). En los meses junio-agosto del año 2021 causó mayor incidencia de casos positivos en la provincia de Matanzas, Cuba (111).

III.9. Emergencia del SARS-CoV-2 en Cuba

Desde los primeros reportes y alertas de la OMS, Cuba confeccionó e implementó el Plan Nacional de Enfrentamiento a la COVID-19, que ha permitido mantener controlada la situación epidemiológica. Desde el 30 de noviembre se han reportado 1 millón 111 mil 398 pacientes diagnosticados con la enfermedad. Se acumulan 8 mil 530 fallecidos, letalidad de 0,77% vs 1,03% en el mundo y 1,57% en las Américas (Consultado 01/12/2022, Reporte semanal del 30/11/2022 a las 12:00pm; MINSAP, Cuba) Analizando el impacto de estas acciones en cifras, se advierte que Cuba ha registrado cifras inferiores de casos diagnosticados por millón de habitantes y de tasas de fallecidos por millón de habitantes respectivamente. En comparación con el mundo, en general, y con América Latina, en particular. Los datos evidencian el impacto positivo de las estrategias y las acciones implementadas en el país en su enfrentamiento a la COVID-19. En este sentido, el desarrollo de varias investigaciones nacionales de las ciencias biomédicas, biotecnológicas, inmunológicas, así como como la vacunación masiva de la población cubana que incluye en los últimos meses a la población, recientemente la población pediátrica de 2 años en adelante (115) entre otras ha sido esencial para la confección, implementación y actualización el perfeccionamiento del Plan Nacional de Enfrentamiento a la COVID-19.

El IPK, institución nacional de referencia para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas se designó para la hospitalización y el diagnóstico confirmatorio de los primeros casos sospechosos de COVID-19. Inicialmente, el diagnóstico virológico se realizó en el departamento de Virología del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia de esta institución. Luego, se llevaron a cabo acciones de descentralización que permitieron la introducción y extensión del diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 a otros laboratorios en las diferentes provincias del país. Al mismo tiempo, se confeccionaron protocolos imprescindibles para la implementación de las pautas para la confirmación y el control de calidad de dicho diagnóstico. La evaluación de reactivos, insumos y equipamientos, el desarrollo de investigaciones dirigidas a fortalecer el diagnóstico y a ofrecer un mayor conocimiento de la enfermedad durante la pandemia (116, 117).

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Diseño del estudio

En esta investigación se realizó un estudio observacional con componente analítico, para evaluar los indicadores de desempeño de cinco estuches de RT-PCR; que estuvieron disponibles en el LNRVR y que permiten la amplificación y detección del ARN viral (Tabla IV.1).

Tabla IV. 1: Estuches comerciales de RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2, incluidos en este estudio.

Compañía	Nombre del Producto	País	Genes amplificados
R-Biopharm	RIDA®GENE	Alemania	E
Tib molbiol	SARS-CoV-2 RdRP	Alemania	RdRP
Sentinel HK Diagnostics	STAT-NAT COVID-19 MULTI	Italia	ORF1b, RdRP
Sentinel B Diagnostics	STAT-NAT SARS-CoV- 2	Italia	E, RdRP, N
Primerdesign LTD	GENESIG Real-Time PCR Coronavirus (COVID-19)	UK	ORF1ab

Fuente: Datos tomados del prospecto de los cinco estuches comerciales.

IV.2. Material Biológico

IV.2.1. Cepas de SARS-CoV-2

Para determinar los indicadores del desempeño analítico de cinco estuches de RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2, se utilizaron cepas de las variantes D614G y Delta. Que se aislaron, a partir de ENF, identificadas y secuenciadas por el método de *Sanger*, durante la vigilancia de la COVID-19 en el LNRVR del IPK. Las muestras se cultivaron en la línea celular Vero E6 (clon de la línea celular Vero 76, riñón de mono verde africano), con nivel 3 de bioseguridad (BSL 3) (del inglés, *Biosafety Laboratory 3*). Posterior a su aislamiento y propagación, las cepas se titularon (Tabla IV.2); y las alícuotas de

los sobrenadantes, se emplearon en el estudio se inactivaron a 56°C por 30 minutos en un bloque térmico (ThermoMixer®, Eppendorf, EU) y se conservaron en crioviales a - 80°C hasta su uso en el laboratorio con BLS2.

Tabla IV.2: Título viral de las cepas de SARS-CoV-2 empleadas para evaluar el desempeño analítico de las pruebas a evaluar.

Cepas	Título Viral
30654/21 D614G 1PVer0 E6	4,7 x 10 ⁶ UFP/mL
57383/21 Delta 1PVer0 E6	2,1x 10 ⁶ UFP/ mL

Fuente: Datos recopilados del BSL3

IV.3. Universo de estudio de muestras clínicas

El universo estuvo constituido por todos los exudados nasofaríngeos (ENF) recibidos en medio de transporte universal (BTV, BIOGEN, Cuba y MANTACC®, China), en el LNRVR del IPK como parte de la vigilancia de SARS-CoV-2. Se conformaron como positivos mediante RT-PCR, en el período Octubre-Noviembre/2021. Para la selección de los ENF se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- ✓ Muestras clínicas positivas con valores de Ct [ciclo del PCR al cual se comienza a detectar la señal fluorescente por encima de la señal de fondo (del inglés, *Cycle Threshold*)] ≤33-35 y negativas a SARS-CoV-2 Ct>33-35, según las instrucciones del fabricante por cada prueba empleada.
- ✓ Muestras clínicas con volúmenes suficientes para las determinaciones a realizar, y que estuvieran correctamente identificadas.

Criterios de exclusión

- ✓ Se excluyeron las muestras clínicas derramadas y contaminadas.

IV.3.1. Muestras

El tamaño muestral estuvo conformado por 339 ENF, de estas 110 positivas y 229 negativas a SARS-CoV-2, de estas, 18 fueron positivas por RT-PCR a otros virus respiratorios: virus Influenza (5), virus parainfluenza (3), CoV OC43 (5) y CoV 229E (5). Estos resultados se obtuvieron con el estuche comercial

RIDA®GENE SARS-CoV-2, ya que fue el estuche disponible en el periodo de estudio. Los ENF provenían de la vigilancia de SARS-CoV-2, contactos de casos confirmados, casos sospechosos y viajeros.

IV.4. Detección de SARS-CoV-2 por RT-PCR

IV.4.1. Extracción del ARN

Para evaluar la sensibilidad analítica de los cinco estuches a evaluar se realizó la extracción automática del ARN a partir de una alícuota de 200µL, de las cepas inactivadas de SARS-CoV-2, D614G y Delta. A la muestra pura se le realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-7} . El mismo proceso se aplicó al sobrenadante obtenido de las células no inoculadas, como control de calidad de la extracción. Para las muestras clínicas se siguió el mismo procedimiento, y se siguieron estrictamente las recomendaciones del fabricante. Para realizar este procedimiento se utilizarán los materiales gastables y reactivos contenidos en el estuche comercial para la extracción de ácidos nucleicos en dicho equipo: Viral NA Small Volume kit (Roche, Alemania). Se empleó el extractor automático MagNA Pure 96 DNA (Roche, Alemania), con un volumen de elusión final de 100µL.

IV.4.2. RT-PCR

Para la mezcla de RT- PCR se utilizaron los componentes de cada estuche comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El equipo de RT-PCR, real time RT-PCR LightCycler 96 (Roche), se utilizó siguiendo las condiciones de temperatura y ciclaje, proporcionado por el fabricante de cada estuche (Tabla IV.3). Todas las pruebas se realizaron según las pautas del fabricante. Para todos los estuches se utilizaron los controles Positivo, Negativo e interno, incluidos en cada prueba. Todos los estuches incluyeron un control interno para identificar una posible inhibición de la RT-PCR, para medir la pureza de la extracción y confirmar la integridad de la ejecución de la RT-PCR. Se analizaron por cada cepa (D614G; Delta) 5 réplicas pura y por cada dilución para obtener una mejor reproducibilidad y repetitividad de los resultados; los experimentos se montaron por duplicado.

Tabla IV. 3: Características de los cinco estuches comerciales evaluados en la presente investigación.

Estuches comerciales	SARS-CoV-2 RdRP (TibMOLBIOL)	RIDA®GENE SARS-CoV-2 (R-Biopharm)	STAT-NAT COVID-19 MULTI (Sentinel HK Diagnostics)	STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics)	Genesig Real-Time PCR Coronavirus (COVID-19) (Primerdesig n LTD)
Determinaciones	96	200	288	288	96
Sensibilidad analítica(copias/uL)	25-100	50	33 330	33 330	33
Especificidad analítica (%)	100	100	100	100	100
Genes (Detector)	RdRp (FAM)	E (FAM)	RdRP/Orf1b (FAM)	RdRP (HEX/VIC) N (FAM) E (Texas Red)	Orf1ab (FAM)
Control Interno (Detector)	RnasaP humana (Cy5)	RnasaP humana (HEX/VIC)	RnasaP humana (HEX/VIC)	RnasaP humana (Cy5)	RnasaP humana (HEX/VIC)
Programa de amplificación	55°C → 5min Desnaturalizac ión: (1): 95°C → 5min Ciclos (45): 95°C → 5 s 60°C *→ 15s 72°C → 15s	58°C → 10min Desnaturaliza ción: 95°C → 1min, Ciclos (45): 95°C → 10s 60°C* → 15s	50°C→10min Desnaturalizac ión: 95°C → 2min Ciclos (10): 95°C → 15s, 58°C → 30s Ciclos (35): 95°C → 15s, 58°C* → 30s	50°C→10min Desnaturalizac ión: 95°C → 2min Ciclos (10): 95°C → 15s, 58°C → 30s Ciclos (35): 95°C → 15s, 58°C* → 30s	55°C → 10min Desnaturalizac ión: 95°C → 2min Ciclos (45): 95°C → 10s 60°C *→ 60s
Volumen de ARN (µL)	5	5	10	10	8
Volumen final (µL)	20	20	25	25	20
Ct de muestras positivas	ct≤ 33	ct≤ 35	ct ≤ 35	ct ≤ 33	ct≤ 33

Ct (ciclo umbra) (23); *, paso donde se produce la adquisición.

Fuente: Tomados del prospecto de los estuches comerciales.

Las muestras se analizaron por los siguientes ensayos de RT-PCR (Tabla IV.3):

- STAT-NAT SARS-CoV-2 y STAT-NAT COVID-19 MULTI de la casa comercial SENTINEL DIAGNOSTICS (Milán, Italia); en estos ensayos se amplifica simultáneamente dos genes del SARS-CoV-2: RdRP y Orf1b con un límite de detección (LD) de 10 copias/ reacción (c/rcn) (STAT-NAT COVID-19 MULTI) y tres genes dianas: N, RdRP y E con 5 c/rcn de L.D para cada gen (STAT-NAT SARS-CoV-2). Los cebadores son específicos para el gen RNAasa P Humana, el que se utiliza como control interno. Ambos tienen la característica de tener 10 ciclos silentes, en donde la detección de fluorescencia está apagada, de ahí que al Ct resultante se le debe añadir 10 ciclos de amplificación más con el propósito de comparación con otros ensayos de RT-PCR (21).
- RIDA®GENE SARS-CoV-2 (R-Biopharm, Alemania): Este ensayo detecta el gen E de SARS-CoV-2, y está basado en el protocolo desarrollado por la universidad Charité de Alemania (Corman, V. et al., 2019). El L.D del ensayo, utilizando LightCycler® 480II, es > 50 c/rcn. Las muestras con un valor de Ct >35 están dentro del L.D. Cabe señalar que el límite de detección de la RT-PCR depende de la matriz de la muestra, el termociclador y la extracción de ARN y puede variar en consecuencia (18, 19).
- SARS-CoV-2 (COVID-19) RdRP (TibMOLBIOL, Alemania): En este ensayo el control positivo detecta tres genes dianas del SARS-CoV-2 el E, N y RdRP. La sensibilidad es de 10.6 c/rcn. Este método se basa en el protocolo desarrollado por Corman y cols (18)
- GÉNESIG Real-Time PCR Coronavirus (COVID-19) (Primerdesign LTD, UK): En este ensayo se detecta el gen ORf1ab, y contiene concentraciones estandarizadas de una secuencia específica de ARN del SARS-CoV-2, en una concentración de $1,67 \times 10^5$ copias por μL .

IV.4.3. Interpretación de los resultados

Como se refirió anteriormente, en todos los ensayos se incluyeron control positivo, negativo e interno. Solo cuando los controles cumplían con los requerimientos, se validaron los resultados. Los resultados se validaron cuando la detección del gen o genes diana fueron positivos, aunque los resultados del control interno fueran negativos; debidos a la competencia que se establece en el sistema por los reactivos. Se invalida el resultado si la detección del gen o genes diana fuera negativa, al igual el control interno. En este caso el resultado de la muestra es inválido y debe ser reanalizar. Al evaluar los Ct de las cepas y para homogenizar los datos, se asumió un valor de Ct=40, cuando se obtuvieron resultados no detectables (9).

IV.5. Evaluación de los indicadores de desempeño analítico y clínico de las cinco pruebas de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2

Como indicador de desempeño analítico se estimó la sensibilidad analítica. Para esto se emplearon las cepas de SARS-CoV-2 D614G y Delta, a las que se le realizó diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-7} con el medio de cultivo. Por tanto, para la cepa D614G se evaluaron desde el título viral $4,7 \times 10^6$ UFP/mL (puro) hasta 0,47 UFP/mL (10^{-7}), mientras que para la cepa Delta los títulos que se testaron fueron de $2,1 \times 10^6$ UFP/mL (puro) hasta 0,21 UFP/mL (10^{-7}). Este análisis permitió seleccionar el estuche comercial de mejor sensibilidad analítica, que constituyó la prueba de referencia en la evaluación de la sensibilidad y especificidad clínica de los 4 ensayos restantes. La especificidad analítica no se estimó ya que se tomaron los datos brindados por los fabricantes de cada prueba.

IV. 5.1. Indicadores del desempeño evaluados:

Sensibilidad analítica: Capacidad del procedimiento de prueba de registrar pequeñas variaciones de la concentración. La prueba de RT-PCR que mostró curvas de amplificación sigmoideal, detección del gen diana en todas las diluciones y la media de Ct más baja se seleccionó como ensayo de referencia la prueba de RT-PCR.

Sensibilidad clínica: Porcentaje de positividad en muestras donde el analito a determinar está presente. Es un número fraccionario calculado como los valores verdaderos positivos, divididos entre la suma de los verdaderos positivos más los valores falsos negativos.

Especificidad clínica: Porcentaje de negatividad en muestras donde el analito a determinar está ausente. Es un número fraccionario calculado como los valores verdaderos negativos divididos entre la suma de los verdaderos negativos más los valores falsos positivos.

Pruebas de concordancia: Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de positivos, de negativos y porcentaje de concordancia, con respecto al estuche de referencia.

Índice Kappa: Esta prueba se basa en la comparación de índices de concordancia esperados y observados. Para ello se emplearon los resultados de todas las muestras analizadas en los estudios de sensibilidad clínica y especificidad clínica y analítica. Se define el índice de concordancia kappa de la siguiente manera:

$$P = (P_o - P_e) / (1 - P_e) \quad (118)$$

Donde P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1, por lo que $1 - P_e$ representa el margen de acuerdo posible no atribuible al azar. De ese margen nosotros observamos probablemente sólo una parte $P_o - P_e$, salvo que exista acuerdo perfecto $P_o = 1$.

Así pues, en caso de concordancia perfecta el valor de kappa es 1; si la concordancia observada es igual a la esperada kappa vale 0; y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado la índice kappa es menor que cero (118)

Tabla IV.4: Márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice K.

Kappa	Grado de acuerdo
< 0	Sin acuerdo
0 – 0.2	Insignificante
0.2 – 0.4	Bajo
0.4 – 0.6	moderado
0.6 – 0.8	Bueno
0.8 - 1	Muy bueno

Fuente: (Molinero, 2001)(118)

IV.6. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables del desempeño se tuvo en cuenta la Regulación no. 47-2007, donde aparecen los Requisitos para la evaluación del desempeño de los Diagnosticadores del CECMED (119).

Para el procesamiento estadístico se empleó el programa estadístico Epidat 3.1 y GraphPad Prism V.6 (GraphPad, La Jolla, CA). Se calculó la media y la desviación estándar (D.E) de los Ct por cada estuche de PCR, según los genes dianas detectados. Además, se calculó la mediana y el rango del intercuartil (25-75) por cada gen diana/estuche, y las diferencias entre las medianas se estimaron por la prueba la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

IV.7. Aspectos éticos de la investigación.

El presente estudio se desarrolló según las normas de la Declaración de Helsinki y las Guías Éticas Internacionales para estudios biomédicos en sujetos humanos (CIOMS, del inglés, Council for International Organizations of Medical Sciences). En el presente estudio no se trabajará directamente con pacientes, sino con ENF que forman parte de la vigilancia nacional de SARS-CoV-2 y otros virus respiratorios del laboratorio. Se utilizaron los remanentes de muestras que quedaron después de obtener el resultado de la vigilancia, y se respetó la identidad de las mismas.

Las buenas prácticas se cumplirán estrictamente, junto con las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de muestras biológicas siguiendo la Resolución 38/2006 de la Comisión Nacional de Seguridad Biológica.

Una vez culminada la investigación se conservó la información en formato digital e impreso, y los resultados se informaron a todo el personal involucrado en la misma mediante actividades científicas. Está en curso informar a las instancias pertinentes del MINSAP, para que los datos contribuyan a la toma de decisiones, para la compra de estuches comerciales para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2. El documento se publicará en revistas de alto impacto.

Este trabajo pertenece al proyecto: Estudio clínico-virológico de COVID-19 y SARS-CoV-2, jefe del Proyecto: Dr.Cs María G. Guzmán, código del proyecto: 2105027 y código del Comité de Ética para el proyecto: CEI-IPK 52-20.

Figura IV.1: Flujograma de trabajo, para una mejor comprensión de la presente investigación.

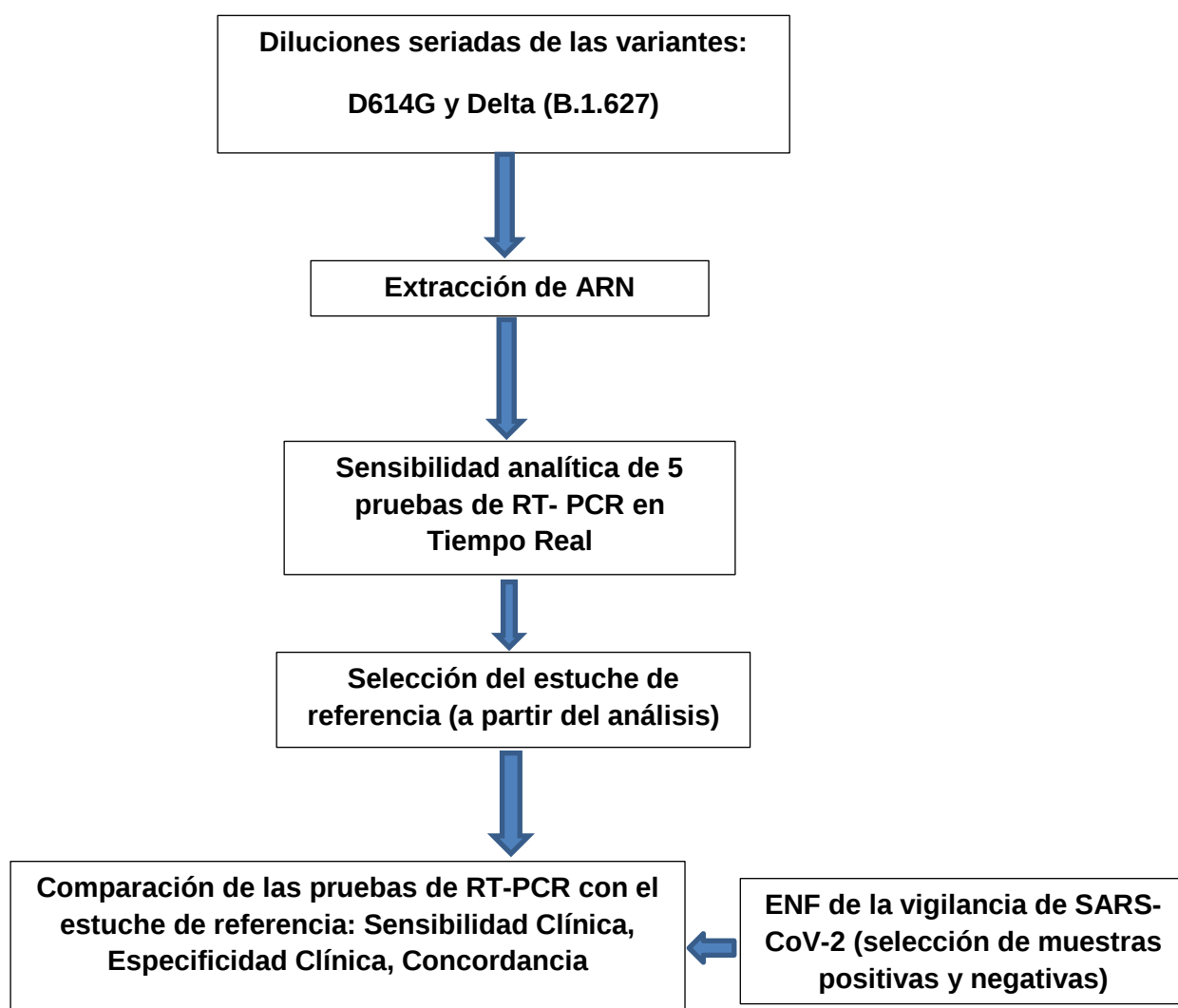


Tabla IV. 5: Operacionalización de las variables.

VARIABLES	TIPO	ESCALA	DESCRIPCIÓN
Sensibilidad analítica (%)	Cuantitativa continua	1-100	Capacidad del procedimiento de prueba de registrar pequeñas variaciones de la concentración
Especificidad analítica (%)	Cuantitativa continua	1-100	Posibilidad del procedimiento de medir el analito, en una forma que

			esté libre de interferencias por parte de otros componentes de la muestra que se está examinando (NC 376:2004, 3.1.36) (119)
Fecha de Diagnóstico	Cualitativo	Octubre Noviembre (Año 2021)	Mes del año identificado en el modelo de recogida de información
Grupo de estudio	Viajero Sospechoso Contacto		Contactos: Persona que entre dos días antes y 14 días después del inicio de los síntomas en un caso Probable o confirmado ha estado expuesta a una persona con diagnóstico positivo a la COVID-19. Sospechosos: Persona que cumple los criterios clínicos y epidemiológicos. Los primeros incluyen aparición súbita de fiebre y tos y otros síntomas como: debilidad general/fatiga, cefalea, mialgia, dolor de garganta, resfriado nasal, disnea, anorexia/náuseas/vómitos, diarrea, estado mental alterado. Viajero: persona que se desplaza entre dos lugares geográficos distintos por cualquier motivo y duración.

CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V .1. Sensibilidad analítica de cinco estuches de RT-PCR con las cepas D614G y Delta (B.1.617.2), para la detección del SARS-CoV-2

La segunda pandemia del siglo causada por el SARS-CoV-2, ha representado una amenaza para la Salud Pública Mundial (30). Cuba no fue la excepción, en cuanto al comportamiento y transmisibilidad de las diferentes variantes. En nuestro país se produjeron varios picos pandémicos del virus, algunos extremadamente severos, donde se identificó una tasa elevada de morbilidad y mortalidad (111). El aumento exponencial de la incidencia de la COVID-19, ha impuesto un nuevo paradigma sanitario, por lo que contar con métodos de diagnósticos sensibles, precisos y eficientes constituye el pilar fundamental de la vigilancia y control de esta entidad nosológica.

La actual pandemia de SARS-CoV-2, puso en evidencia la necesidad de implementar diferentes estrategias diagnósticas. Una vez secuenciado el genoma del nuevo Coronavirus, SARS-CoV-2, se dispone de diferentes dianas genéticas para el desarrollo de sistemas de amplificación los cuales se puede utilizar en el diagnóstico molecular del virus. La RT-PCR constituye la técnica de referencia y puede encontrarse en diferentes formatos comerciales. En general, la mayoría de ellas utilizan alguno de los tres genes siguientes: el gen E, RpRd y el N. Según la literatura, la sensibilidad o capacidad de detección del SARS-CoV-2 varía dependiendo del gen amplificado (18, 120, 121).

Otro reto importante para los diagnosticadores moleculares han sido las mutaciones que surgen en el virus como consecuencia de su ciclo evolutivo, lo que ha originado diferentes variantes genéticas, que se agrupan en categorías según la evolución de la pandemia: variantes de preocupación, variantes de interés y variantes bajo monitoreo. Estas tienen implicaciones clínicas, en la transmisibilidad, virulencia, y representan un serio desafío para el diagnóstico y la vacunación.

En este estudio se utilizaron los siguientes estuches comerciales o diagnosticadores STAT-NAT COVID-19 MULTI (Sentinel HK, Diagnostics,

Italia), STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics, Italia), RIDA®GENE (R-Biopharm, Alemania), GÉNESIG (Primerdesign LTD, UK) y SARS-CoV-2 (COVID-19 RdRp) (Tibmolbiol, Alemania) para la detección de SARS-CoV-2, mediante la técnica de RT-PCR. Cada uno de ellos amplifica genes dianas específicos del virus, algunos coinciden y otros incluyen más de un gen a amplificar.

Al evaluar los valores de Ct según las diluciones de las cepas estudiadas y los estuches de RT-PCR (Figura V.1), se obtuvo que los valores de Ct [11,47 (3,13-23,53) vs. 38,22 (24,13-40.00)] incrementaron desde la cepa D614G pura ($4,7 \times 10^6$ UFP/mL) hasta la dilución 10^{-7} (0,47 UFP/mL). Similar comportamiento tuvieron los valores de Ct [4,39 (2,95-27,98) vs. 40.00 (25,13-40.00)] para la cepa Delta, pura ($2,1 \times 10^6$ UFP/mL) a la dilución 10^{-7} (0,21 UFP/mL). No se observaron diferencias significativas entre las cepas por cada dilución ($p > 0,05$). Como se observa en la Figura V.1 la imprecisión en la detección de las cepas se presenta a partir de la dilución 10^{-6} , sin embargo para el estuche RIDA®GENE (gen E) y el STAT-NAT SARS-CoV-2 (gen N) la detección del SARS-CoV-2, se mantiene en más del 90% de las réplicas hasta la dilución 10^{-7} para ambas cepas.

Al evaluar los valores de Ct de la cepa D614G, se detectó que la muestra pura tenía un Ct mayor con relación a la diluida 10^{-1} [11,47 (3,13-23,53) vs. 6,65 (4,62-20,79)], lo cual no fue estadísticamente significativo ($p = 0,1924$). Esto ha sido referido previamente en la literatura, ya que el efecto de concentraciones altas de ARN viral produce incremento en los valores de Ct (122). Los Ct de los sobrenadantes de las células no inoculadas fueron no detectables para todos los ensayos evaluados, lo que confirma la especificidad analítica descrita por los fabricantes. Además, los resultados se validaron, ya que en todas las réplicas se obtuvo amplificación con el gen del control interno. Al analizar las curvas de amplificación de las diferentes diluciones evaluadas, se observó la característica sigmoidal de las mismas en presencia de altas concentraciones del ARN viral.

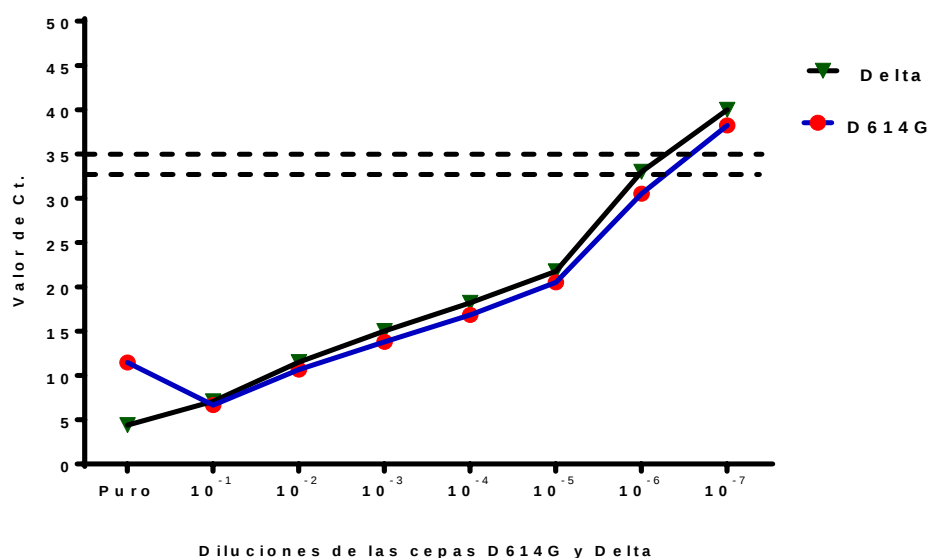


Figura V.1: Distribución de los valores de Ct según las diluciones de las cepas estudiadas y los resultados de la RT-PCR de los ensayos empleados.

En el gráfico se muestra la mediana de los resultados por dilución y las líneas discontinuas representan los valores de Ct definidos como positivos según los ensayos ($Ct \leq 33$ SARS-CoV-2 (COVID-19) RdRp, GÉNESIG, STAT-NAT SARS-CoV-2; y $Ct \leq 35$ RIDA®GENE, STAT-NAT COVID-19 MULTI).

A nivel mundial las pruebas de PCR han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, así en el contexto de la pandemia de COVID-19 las pruebas de un desempeño analítico y clínico elevado permitieron identificar tempranamente los pacientes infectados. En general los genes dianas no estructurales son los más utilizados para el diagnóstico molecular, tales como los genes más conservados o los más expresados como el de RpRd y el gen N (123)

En la Tabla V.1 se observa el comportamiento de los Ct por genes amplificados según los estuches y las cepas estudiadas, las medias de Ct más bajas se obtuvieron con el estuche STAT-NAT SARS-CoV-2 para los genes N, E y RpRd. Con la prueba STAT-NAT COVID-19 MULTI, que tiene como diana la región ORF1b-RdRp, igualmente se obtuvieron valores medios de Ct < 20 . No se observó diferencias entre los valores de Ct por genes amplificados, con respecto a las cepas.

Con relación a las variantes estudiadas, la primera mutación importante de la cepa salvaje de SARS-CoV-2 Wuhan se describió en marzo de 2020. Más tarde se informó que la variante DG14G, se convirtió en la forma dominante de la pandemia en ese momento. La mutación D614G se produjo en el gen S y condujo a un aumento de la transmisibilidad del virus, ya que los viriones que portaban este cambio entraban a la célula hospedera por el receptor ACE más eficientemente, que los viriones que no presentaban la mutación (124). Esta variante se acompaña generalmente de 3 mutaciones la C>T en la UTR (posición 241 de la secuencia de referencia de Wuhan), una mutación silente C>T en la posición 3,037; y la C>T en la posición 14,408 que provoca un cambio aminoácidico en la RdRp (RdRp P323L) (125).

Con respecto a la variante Delta (B.1.617) de SARS-CoV-2, esta incluye tres subtipos (B.1.617.1, B.1.617.2 and B.1.617.3) y se identificó inicialmente en la India en octubre del 2020, con cambios involucrados en la transmisibilidad, las mutaciones se produjeron en el dominio N-terminal y en el gen S con las sustituciones aminoacídicas T478K, P681R, y L452R (126). Por tanto, cabe esperar que no existan diferencias entre los valores de Ct de los genes dianas de los estuches de RT-PCR estudiados, según las variantes como lo demuestran estos resultados. Dado que según Rahman y cols., describieron que las mutaciones dentro del gen N (no presentes en las cepas estudiadas) son las que más afectan la sensibilidad de las pruebas de RT-PCR para SARS-CoV-2, como la mutación Q289H que reduce significativamente el desempeño de los estuches moleculares que poseen este gen diana (127).

A diferencia de la RT-PCR, en el caso de las tiras rápidas para la detección de antígenos del SARS-CoV-2, se recomienda re-evaluar frecuentemente el desempeño analítico de las mismas ante variantes de preocupación con cambios en el gen de la nucleocápside. Bayart y cols., demostraron que la sensibilidad de las pruebas rápidas fue superior para la cepas Delta (70,0%-92,9%, que no poseen mutaciones en el gen N), al comparar con la de Ómicron (BA.1 y BA.1.1) (69.6%-78.3%) (128).

Tabla V.1: Distribución de las medias y la desviación estándar de los Ct según los genes que se detectan por cada estuche y las cepas de SARS-CoV-2 estudiadas.

VARIABLES	VALOR CT MEDIA (DE)									
	RIDAGENE SARS-CoV2		STAT-NAT SARS-CoV-2		STAT-NAT COVID-19 MULTI		SARS-CoV-2 RdRP		Genesig Real- Time PCR Coronavirus)	
	D614G	Delta	D614G	Delta	D614G	Delta	D614G	Delta	D614G	Delta
Gen E	22,24 ($\pm$ 2,78)	23,34 ($\pm$ 2,87)	15,98 ($\pm$ 3,23)	16,88 ($\pm$ 4,22)						
RpRd			17,22 ($\pm$ 3,77)	18,22 ($\pm$ 4,47)			29,55 ($\pm$ 2,39)	32,00 ($\pm$ 2,74)		
ORF1ab									24,82 ($\pm$ 3,10)	25,74 ($\pm$ 2,79)
ORF1b- RdRp					18,91 ($\pm$ 4,99)	18,51 ($\pm$ 4,35)				
Gen N			15,18 ($\pm$ 2,44)	16,46 ($\pm$ 3,50)						

Leyenda: Las celdas de los estuches estudiados que no amplifiquen los mismos genes dianas se rellenaron con color amarillo.

Fuente: Datos calculados en el estudio

El diagnóstico molecular del SARS-CoV-2, ha evolucionado desde la detección de un solo gen diana (monoplex), hasta las RT-PCR múltiples donde se identifican más de un gen simultáneamente, lo cual disminuye el efecto de las variantes en la sensibilidad y especificidad de las pruebas moleculares. En la Figura V.2 se observa la comparación de las medias de los Ct según las cepas y los genes amplificados. Como se observa solo se identificó diferencia

significativa en el gen de la RpRd, amplificado por el estuche STAT-NAT SARS-CoV-2 que mostró niveles más bajo de Ct, al compararlo con el SARS-CoV-2 (COVID-19) RdRp para ambas cepas D614G ($p=0,0148$) y Delta ($p=0.0289$). En el resto de los genes amplificados por diferentes pruebas, no se identificó diferencias significativas.

En el panel A de la Figura V.2 no se detectó diferencias significativas entre los estuches; STAT-NAT SARS-CoV-2 con respecto al RIDA®GENE que tienen como diana el gen E. El RIDA®GENE tuvo el valor de Ct más elevado para la detección del gen E (Tabla V.1), lo que pudiera ser compatible con una eficiencia baja de su sonda y cebadores. Como se muestra en el panel B de la Figura V.2, el estuche STAT-NAT COVID-19 MULTI se obtuvo la media más baja de Ct con relación al GÉNESIG, y no se identificó diferencias estadísticamente significativas entre las cepas y los genes amplificados por estas pruebas. En tanto para el panel C, se detectó diferencias significativas entre los estuches y para las cepas estudiadas D614G y Delta, con valores de $p=0,0148$ y $p=0.0289$, respectivamente. Finalmente, en el panel D donde la prueba STAT-NAT SARS-CoV-2 amplifica el gen N, las comparaciones se hicieron entre las cepas y las cifras de Ct fueron similares.

La sensibilidad de los genes dianas amplificados en un estuche comercial de diagnóstico molecular depende de la región a amplificar, diseño de los cebadores y la optimización del ensayo (18). Corman y cols analizaron varias secuencias del genoma viral relacionadas con el SARS y describieron tres regiones que tenían secuencias conservadas: el gen RdRP, el gen E y el gen N; los genes RdRP y E tenían una sensibilidad analítica alta para la detección (3,6 y 3,9 copias por reacción), mientras que el gen N presentaba una sensibilidad analítica más baja (8,3 copias por reacción)(129). La ventaja de utilizar cebadores y sondas de la nucleoproteína radica, en que se emplean cebadores y sondas menos conservados pero más sensibles que los utilizados para otros genes; por lo que CHu y cols en un estudio recomiendan la detección del gen N para el diagnóstico y la confirmación conjuntamente con el gen Orf1ab (130).

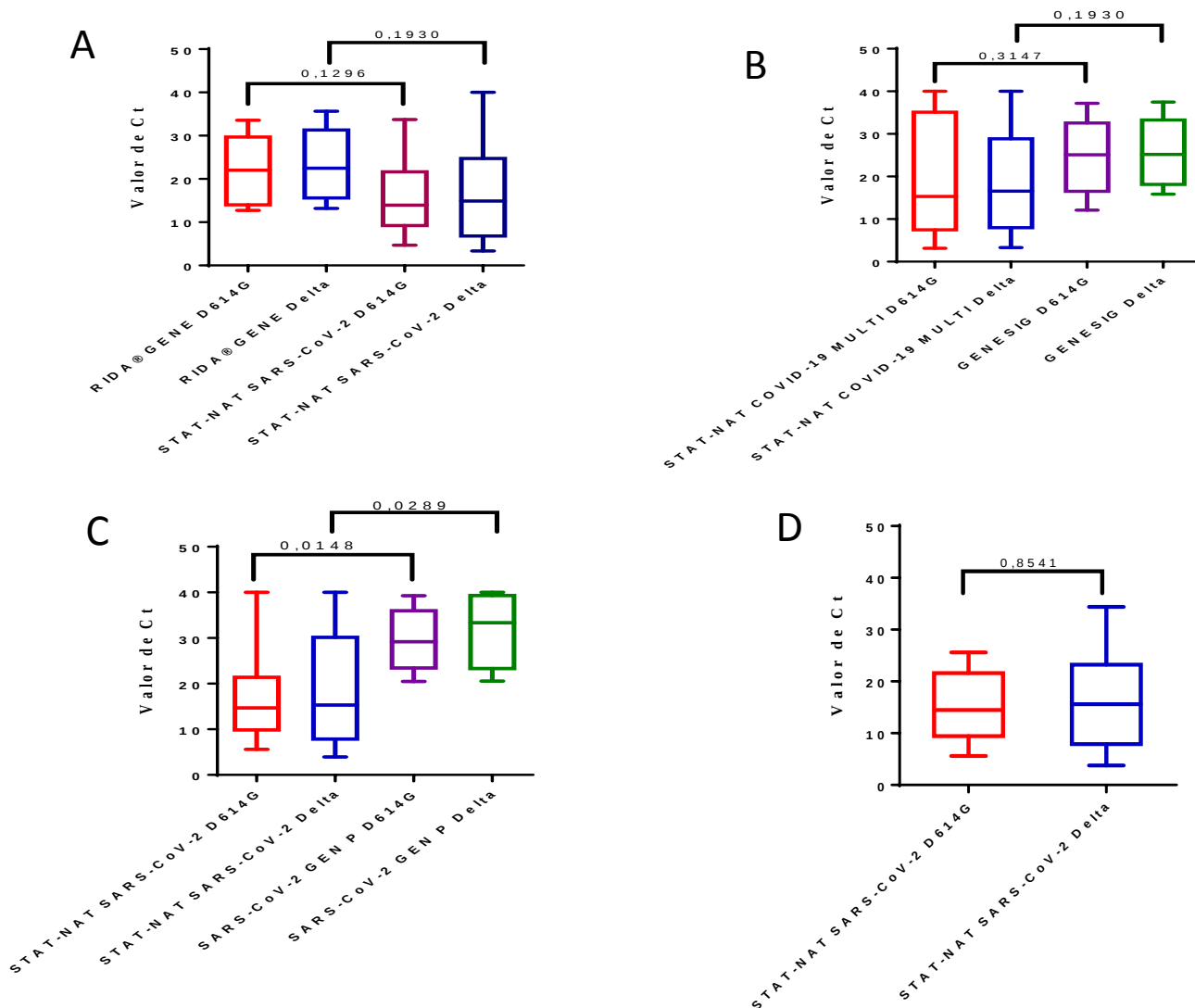


Figura V.2: Comparación de las medianas de los Ct según las cepas y los genes amplificados por las pruebas empleadas.

Leyenda: Los valores de p se obtuvieron por la prueba de Mann-Whitney. A: Gen E; B: Gen ORF1b+RdRp; ORF1ab; C: Gen RpRd; D: Gen N.

La tasa de mutación del virus también influye en la sensibilidad de los genes, debido al déficit de la actividad de correctora de errores de la polimerasa del virus (131). En el presente estudio el estuche STAT-NAT SARS-CoV-2 obtuvo mejor sensibilidad y los resultados concuerdan con el estudio realizado por Moré y cols. (132). Estos autores recomiendan utilizar estuches comerciales que amplifiquen más de un gen diana (multiplex) como estuche de referencia dado que, por posibles mutaciones de los CoVs en las regiones de unión de

cebadores y sondas, podrían no detectarse muestras positivas. El riesgo de falsos negativos es mayor en las pruebas que tienen como diana un solo gen viral, las que en ocasiones deben confirmarse por otro gen. Estos PCR independientes podrían retrasar el tiempo de diagnóstico, disminuyendo la entrega temprana de los resultados; lo que genera un mayor consumo de reactivos y consecuentemente el costo de la prueba.

No obstante, cabe destacar que el ensayo STAT-NAT SARS-CoV-2 es una RT-PCR múltiple, donde en un solo tubo de reacción se amplifican 3 genes virales. Por tanto, no podemos descartar que la sensibilidad de las sondas y cebadores en la amplificación de alguno de estos genes se comprometa, por la competencia que se establece por los reactivos de la RT-PCR. Contrariamente, Rua y cols. recomendaron que cuando existen concentraciones bajas del ARN viral, es aconsejable utilizar un gen específico, que presente mayor sensibilidad para obtener buenos resultados (122).

En algunos estudios realizados por Li y cols (133) concluyeron que el gen E es el más estable, para estandarizar pruebas moleculares de CoVs; y el N y RdRP es útil para confirmar los resultados. Estos autores plantearon que en el gen E, hay una zona altamente específica para el SARS-CoV-2; y un ensayo dirigido a una sola diana podría favorecer la sensibilidad del estuche comercial.

Otros autores identificaron que una prueba de RT-PCR que tenga como diana la región NSP14 del genoma del SARS-CoV-2, tuvo una sensibilidad y especificidad de 100 % (97.4–100.0) y 98.7% (92.1–100.0) respectivamente; al compararlo con un estuche de referencia que amplificaba los genes E y RdRp (134).

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se procedió a utilizar el estuche comercial STAT-NAT SARS-CoV-2 como prueba de referencia para determinar las características del desempeño clínico de los restantes diagnosticadores. Además, Min y cols. en una evaluación de tres estuches para la detección del SARS-CoV-2, en los que incluyó el Sansure (China), STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics, Italy), y el de la Roche Biochem (Switzerland), identificó que la prueba mostró los mejores indicadores de sensibilidad y especificidad clínica, con 150 muestras colectadas de pacientes

sospechosos de COVID-19 en Bangladesh, cuando la variante Delta era dominante (135).

V. 2. Determinar las características del desempeño clínico de los estuches de RT-PCR evaluados para la detección del SARS-CoV-2

Dada la disponibilidad de innumerables estuches comerciales en el mercado internacional, para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 y la necesidad de contar con una prueba sensible y específica se analizaron un total de 339 muestras clínicas provenientes de la vigilancia nacional de COVID-19, de las cuales 110 fueron positivas y 229 muestras negativas empleando el estuche de RT-PCR RIDA®GENE SARS-CoV-2. Estas muestras permitieron identificar las características del desempeño clínico de los estuches estudiados, tomando como referencia la prueba STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics, Italy). En cuanto a la especificidad de los estuches, no se obtuvo reactividad cruzada con las muestras positivas a otros virus respiratorios (Influenza, parainfluenza y otros CoV OC43 y 229E).

La concordancia en general entre los cinco estuches fue buena, aunque el estuche STAT-NAT COVID-19 MULTI presentó una concordancia y un índice Kappa mayor, con relación al resto de los estuches evaluados (Tabla V.2). Se obtuvo un porcentaje elevado de sensibilidad con la prueba RIDA®GENE (80,80%), una RT-PCR monoplex que amplifica en gen E viral. Mientras que, los valores más elevados de especificidad se detectaron con los ensayos STAT-NAT COVID-19 MULTI (94,69%) y SARS-CoV-2 (COVID19) RdRP (92,24%); cabe destacar que ambos RT-PCR tienen en común que amplifican el gen de RdRp.

Tabla V.2: Desempeño clínico de los estuches comerciales estudiados tomando como referencia la prueba STAT-NAT SARS-CoV-2 (Sentinel B Diagnostics, Italy).

Estuches Comerciales	Se (%) (IC 95%) (Pos./Pos.R)	Es (%) (IC 95%) (Neg./Neg.R)	Conc (%)	I. K (IC 95%)	F. C
STAT-NAT COVID-19 MULTI	76,60 (66,74-84,71) (72/94)	94,69 (91,10-97,14) (232/245)	89,67	0,72 (0,62-0,83)	Buena
RIDA®GENE	80,80 (71,44-88,24) (76/94)	86,12 (81,15-90,19) (211/245)	84,66	0,63 (0,53-0,74)	Buena
GÉNESIG	76,60 (66,74-84,71) (72/94)	87,35 (82,52-91,24) (214/245)	84,36	0,62 (0,51-0,72)	Buena
SARS-CoV-2 (COVID19) RdRP	72,34 (62,15-81,07) (68/94)	92,24 (88,15-95,27) (226/245)	86,72	0,66 (0,55-0,76)	Buena

Leyenda: Sensibilidad (**Se**), Especificidad (**Es**), Concordancia (**Conc.**), Muestras positivas por el estuche/ muestras positivas por la prueba de referencia (**Pos./Pos.R**), Muestras positivas por el estuche/muestras positivas por la prueba de referencia (**Pos./Pos.R**), Muestras negativas por el estuche/muestras negativas por la prueba de referencia (**Neg./Neg.R**), Índice Kappa (**I.K**), Fuerza de la Concordancia (**F.C.**), Intervalo al 95% de Confianza (**IC 95%**).

En general la comunidad científica ha informado que los estuches de RT-PCR difieren considerablemente en su desempeño y validación. Las concordancias de los estuches evaluados con el diagnosticador de referencia fueron similares a las identificadas en otras investigaciones, las que oscilaron de 0,55-0,72 con pruebas que amplifican el gen E, RdRp y N (136). Gdoura y cols., detectaron que el estuche que presenta como diana el gen E (Charité, Berlin), tuvo una

concordancia buena con el protocolo de RT-PCR que amplifica el gen de la RdRp (Berlin, Alemania) (coeficiente Kappa=0,73) de la Universidad Hong Kong; dirigido al gen N (coeficiente Kappa=0,71). Sin embargo, esta concordancia fue casi nula para la amplificación del gen N con el estuche DAAN Gene® (123, 137). Esto sugiere que el diseño de los cebadores y las sondas pudiera influir en la sensibilidad y especificidad de los estuches comerciales; aunque se amplifique el mismo gen. Resultados similares se obtuvieron con el diagnosticador GÉNESIG (Primerdesign LTD, UK), que amplifica el gen Orf1ab, el cual presentó mejor desempeño clínico al compararlo con otros estuches que amplificaban gen E y N (138)

Los resultados corroboran una mayor especificidad de las pruebas moleculares que amplifican el gen RdRp, que en varios laboratorios se utilizan como confirmatorias de los estuches que amplifican un solo gen del SARS-CoV-2. Durante esta pandemia producida por el SARS-CoV-2 y la concurrente aparición de las variantes del virus, jugó un papel incuestionable la validación de los métodos moleculares de RT-PCR. Estas pruebas deben ser sensibles y específicas, de forma tal que garantice un diagnóstico rápido y certero de la infección viral. Esto condiciona, un mejor manejo clínico del paciente y consecuentemente la aplicación de un tratamiento oportuno, lo cual evitaría el uso indiscriminado de antibióticos.

La importancia de la presente investigación radica en que permitió evaluar los indicadores de desempeño de diferentes estuches comerciales para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2, y de esta forma seleccionar entre estos un estuche de referencia para perfeccionar el diagnóstico y las investigaciones relacionadas con esta infección viral.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Las cepas D614G y Delta estudiadas pueden emplearse para la evaluación de los 5 cinco estuches comerciales de RT-PCR evaluados.
- La sensibilidad analítica y eficiencia del STAT-NAT SARS-CoV-2 para la amplificación del gen de la RdRp, es superior al estuche SARS-CoV-2 RdRp.
- El STAT-NAT SARS-CoV-2 presenta una sensibilidad analítica superior al resto de los estuches empleados, por lo que puede usarse como prueba de referencia para evaluar el desempeño clínico del resto de los estuches estudiados.
- Los estuches de RT-PCR STAT-NAT COVID-19 MULTI, RIDA®GENE, GÉNESIG y SARS-CoV-2 (COVID19) RdRP presenta una concordancia buena con la prueba de referencia, por lo que pudieran considerarse como alternativas para el diagnóstico del SARS-CoV-2.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Utilizar el estuche STAT-NAT SARS-CoV-2 como referencia para la evaluación de futuros estuches comerciales, que se incluyan en el algoritmo diagnóstico del LNRVR.
- Evaluar el desempeño analítico de las pruebas estudiadas con otras variantes de SARS-CoV-2.
- Proponer a la industria Biofarmacéutica que en las producciones de estuches nacionales para el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2, se incluyan genes que proporcionen mejor sensibilidad analítica, los cuales se identificaron en el presente estudio.

CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *The New England journal of medicine*. 2014;371(15):1418-25.
2. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(10):1885-6.
3. Schwartz DA. Prioritizing the Continuing Global Challenges to Emerging and Reemerging Viral Infections. *Frontiers in Virology*. 2021; 1(701054):1-4.
4. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews Microbiology*. 2019;17(3):181-92.
5. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of infection and public health*. 2020;13(5):667-73.
6. Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*. 2022;244:123409.
7. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2020;91(1):157-60.
8. Chams N, Chams S, Badran R, Shams A, Araji A, Raad M, et al. COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Frontiers in public health*. 2020;8:383.
9. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. 2020:1-10.
10. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *Jama*. 2020;323(22):2249-51.
11. López P, Ballesté R, Seija V. Diagnóstico de laboratorio de COVID-19. *Rev Méd Urug*. 2020;36(4):393-400.
12. CIE. PCR cubano para detección del SARS-CoV-2: Apuesta del Centro de InmunoEnsayo por el desarrollo de la biología molecular 2022 [
13. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet Infectious diseases*. 2020;20(6):656-7.
14. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International

Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio*. 2020;11(2).

15. Bruijns B, Folkertsma L, Tiggelaar R. FDA authorized molecular point-of-care SARS-CoV-2 tests: A critical review on principles, systems and clinical performances. *Biosensors & bioelectronics*: X. 2022;11:100158.

16. Yip CC, Sridhar S, Cheng AK, Leung KH, Choi GK, Chen JH, et al. Evaluation of the commercially available LightMix® Modular E-gene kit using clinical and proficiency testing specimens for SARS-CoV-2 detection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020;129:104476.

17. Liang H-Y, Wu Y, Yau V, Yin H-X, Lowe S, Bentley R, et al. SARS-CoV-2 Variants, Current Vaccines and Therapeutic Implications for COVID-19. *Vaccines*. 2022;10(1538):1-27.

18. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(3).

19. MTO, RIDA. RIDA®GENE SARS-CoV-2. In: BIOPHARM, editor. 2020. p. 1-15.

20. Z-Path-COVID-19-CE. genesig® Real-Time PCR Coronavirus (COVID-19) (CE). In: PrimerdesignTM, Ltd, editors. 2020. p. 1-18.

21. MTO S. STAT-NAT®COVID-19 MULTI. In: Diagnostics S, editor. 2020. p. 1-2.

22. MTO. STAT NAT SARS-CoV-2. In: Diagnostic S, editor. 2020.

23. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet (London, England)*. 2003;362(9393):1353-8.

24. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine*. 2003;348(20):1967-76.

25. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine*. 2003;348(20):1953-66.

26. Perlman S, Zumla A. MERS-CoV in Africa-an enigma with relevance to COVID-19. *The Lancet Infectious diseases*. 2021;21(3):303-5.
27. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in microbiology*. 2017;25(1):35-48.
28. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in microbiology*. 2016;24(6):490-502.
29. Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature*. 2013;11:836-48.
30. Shi Y, Wang G, Cai XP, Deng JW, Zheng L, Zhu HH, et al. An overview of COVID-19. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2020;21(5):343-60.
31. CHAN-YEUNG M, XU RH. SARS: epidemiology. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2003;8:S9-S14.
32. Reina J, Fraile P. Características virológicas y diagnóstico del SARS-CoV-2. *Medicina Balear*. 2020;35(4):62-8.
33. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of medical virology*. 2020;92(4):401-2.
34. Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020;12(2).
35. Reina J. El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica. 2020;21(1):17-22.
36. Byard RW, Hunsaker J, Tsokos M. Origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and COVID-19. *Forensic science, medicine, and pathology*. 2020;16(4):745.
37. Lam-Cabanillas E, López-Zavaleta R, León-Risco K, Mendoza-Blas A, Llamas-Hoyos G, León-Risco A, et al. BASES MOLECULARES DE LA PATOGÉNESIS DE COVID-19 Y ESTUDIOS IN SILICO DE POSIBLES TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS. *Facultad de Medicina Humana*. 2021;21(2):417-32.
38. V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews Microbiology*. 2021;19(3):155-70.

39. Yang Y, Peng F, Wang R, Yange M, Guan K, Jiang T, et al. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *Journal of autoimmunity*. 2020;109:102434.
40. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*. 2020;395(10224):565-74.
41. Lau SKP, Luk HKH, Wong ACP, Li KSM, Zhu L, He Z, et al. Possible Bat Origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*. 2020;26(7):1542-7.
42. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TT, Perry BW, Castoe TA, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nature microbiology*. 2020;5(11):1408-17.
43. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):221-36.
44. Ceraolo C, Giorgi FM. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of medical virology*. 2020;92(5):522-8.
45. Chen L, Liu W, Zhang Q, Xu K, Ye G, Wu W, et al. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):313-9.
46. Monto AS, Cowling BJ, Peiris JSM. Coronaviruses: Viral Infections of Humans. 2014 Feb 27:199-223. doi: 10.1007/978-1-4899-7448-8_10.
47. Zhou Y, Jiang S, Du L. Prospects for a MERS-CoV spike vaccine. *Expert review of vaccines*. 2018;17(8):677-86.
48. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene reports*. 2020;19:100682.
49. Melo-Vallès A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. Review of the Microbiological Diagnostic Approaches of COVID-19. *Frontiers in public health*. 2021;9:592500.
50. Coleman CM, Liu YV, Mu H, Taylor JK, Massare M, Flyer DC, et al. Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 2014;32(26):3169-74.

51. Muthumani K, Falzarano D, Reuschel EL, Tingey C, Flingai S, Villarreal DO, et al. A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates. *Science translational medicine*. 2015;7(301):301ra132.
52. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdía-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS pathogens*. 2014;10(5):e1004077.
53. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*. 2019;16(1):69.
54. Chang CK, Sue SC, Yu TH, Hsieh CM, Tsai CK, Chiang YC, et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of biomedical science*. 2006;13(1):59-72.
55. Hurst KR, Koetzner CA, Masters PS. Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of virology*. 2009;83(14):7221-34.
56. Palacios Cruz M, Santos E, Velázquez Cervantes MA, León Juárez M. COVID-19, a worldwide public health emergency. *Rev Clin Esp*. 2020;221(1):55-61.
57. Klausegger A, Strobl B, Regl G, Kaser A, Luytjes W, Vlasak R. Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. *Journal of virology*. 1999;73(5):3737-43.
58. Pfefferle S, Krähling V, Ditt V, Grywna K, Mühlberger E, Drosten C. Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo. *Virology journal*. 2009;6:131.
59. Muth D, Corman VM, Roth H, Binger T, Dijkman R, Gottula LT, et al. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Scientific reports*. 2018;8(1):15177.
60. Cagliani R, Forni D, Clerici M, Sironi M. Computational Inference of Selection Underlying the Evolution of the Novel Coronavirus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Journal of virology*. 2020;94(12).

61. Shi CS, Qi HY, Boularan C, Huang NN, Abu-Asab M, Shelhamer JH, et al. SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;193(6):3080-9.
62. Salzberger B, Buder F, Lampl B, Ehrenstein B, Hitzentbichler F, Holzmann T, et al. Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection*. 2021;49(2):233-9.
63. Xing Y, Mo P, Xiao Y, Zhao O, Zhang Y, Wang F. Post-discharge surveillance and positive virus detection in two medical staff recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19), China, January to February 2020. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(10).
64. Tong ZD, Tang A, Li KF, Li P, Wang HL, Yi JP, et al. Potential Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2, Zhejiang Province, China, 2020. *Emerging infectious diseases*. 2020;26(5):1052-4.
65. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*. 2020;7(1):11.
66. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1282:1-23.
67. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of advanced research*. 2020;24:91-8.
68. Díaz-Castrillón FJ, Toro-Montoya AI. SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Medicina & Laboratorio* 2020;24(3):183-205.
69. Hui DS, E IA, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2020;91:264-6.
70. da Rosa Mesquita R, Francelino Silva Junior LC, Santos Santana FM, Farias de Oliveira T, Campos Alcântara R, Monteiro Arnozo G, et al. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2021;133(7-8):377-82.

71. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* (London, England). 2020;395(10223):497-506.
72. Zhang X. Epidemiology of Covid-19. *The New England journal of medicine*. 2020;382(19):1869.
73. Borges do Nascimento IJ, von Groote TC, O'Mathúna DP, Abdulazeem HM, Henderson C, Jayarajah U, et al. Clinical, laboratory and radiological characteristics and outcomes of novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection in humans: A systematic review and series of meta-analyses. *PloS one*. 2020;15(9):e0239235.
74. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2020;159(1):81-95.
75. Guan WJ, Liang WH, He JX, Zhong NS. Cardiovascular comorbidity and its impact on patients with COVID-19. *The European respiratory journal*. 2020;55(6).
76. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology T. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) - China, 2020. *China CDC weekly*. 2020;2(8):113-22.
77. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious diseases*. 2020;20(5):565-74.
78. Ge H, Wang X, Yuan X, Xiao G, Wang C, Deng T, et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2020;39(6):1011-9.
79. Backer JA, Klinkenberg D, Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20-28 January 2020. *Euro surveillance* : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2020;25(5).

80. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-9.
81. Pan X, Chen D, Xia Y, Wu X, Li T, Ou X, et al. Asymptomatic cases in a family cluster with SARS-CoV-2 infection. *The Lancet Infectious diseases*. 2020;20(4):410-1.
82. Young BE, Ong SWX, Kalimuddin S, Low JG, Tan SY, Loh J, et al. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore. *Jama*. 2020;323(15):1488-94.
83. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *Jama*. 2020;323(18):1843-4.
84. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfusion medicine reviews*. 2020;34(2):75-80.
85. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *Journal of medical virology*. 2020;92(9):1676-80.
86. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England)*. 2020;395(10229):1054-62.
87. Jiehao C, Jin X, Daojiong L, Zhi Y, Lei X, Zhenghai Q, et al. A Case Series of Children With 2019 Novel Coronavirus Infection: Clinical and Epidemiological Features. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;71(6):1547-51.
88. European Centre for Disease Prevention and Control: Guidance for discharge and ending isolation in the context of widespread community transmission of COVID-19 – first update 8 April 2020.
89. Shi D, Wu W, Wang Q, Xu K, Xie J, Wu J, et al. Clinical Characteristics and Factors Associated With Long-Term Viral Excretion in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: a Single-Center 28-Day Study. *The Journal of infectious diseases*. 2020;222(6):910-8.
90. Xiao AT, Tong YX, Zhang S. False negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence. *Journal of medical virology*. 2020;92(10):1755-6.

91. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, et al. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. *Jama*. 2020;323(15):1502-3.
92. Massonnaud CR, Roux J, Colizza V, Crépey P. Evaluating COVID-19 Booster Vaccination Strategies in a Partially Vaccinated Population: A Modeling Study. *Vaccines*. 2022;10(3).
93. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
94. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature materials*. 2021;20(5):593-605.
95. Ahn DG, Shin HJ, Kim MH, Lee S, Kim HS, Myoung J, et al. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Journal of microbiology and biotechnology*. 2020;30(3):313-24.
96. Lam TT, Jia N, Zhang YW, Shum MH, Jiang JF, Zhu HC, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):282-5.
97. van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020;128:104412.
98. 2020c. O. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization. . 2020.
99. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature microbiology*. 2020;5(10):1299-305.
100. Studies TU. Early Investigations Protocols. . 2020.
101. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
102. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the

three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature microbiology*. 2020;5(12):1598-607.

103. Caini S, Bellerba F, Corso F, Díaz-Basabe A, Natoli G, Paget J, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(23).

104. GeurtsvanKessel CH, Okba NMA, Igloi Z, Bogers S, Embregts CWE, Laksono BM, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nature communications*. 2020;11(1):3436.

105. Parums V. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) Terminology for Variants of Concern and Variants of Interest of SARS-CoV-2. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2021;27:e933622.

106. GOV.UK. P. Investigation of SARS-CoV-2 variants of concern: technical briefings.

Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201> 2020

107. Fajardo Lucero PA, Navarrete Martínez JA, Marcillo Ypanaqué SA. Variantes del Sars-Cov-2: características genómicas. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, Ciudad de México, México

2022;6(1):1-20.

108. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature microbiology*. 2020;5(11):1403-7.

109. England PH. Variantes preocupantes del SARS-CoV-2 y variantes bajo investigación en Inglaterra. 2021.

110. Alessandrini F, Caucci S, Onofri V, Melchionda F, Tagliabracci A, Bagnarelli P, et al. Evaluation of the Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel by Massive Parallel Sequencing. *Genes*. 2020;11(8).

111. Guzmán MG, Pérez L, Tejero Y, Mederos D, Aguado ME, Pintos Y, et al. Emergence and evolution of SARS-CoV-2 genetic variants during the Cuban epidemic. *Journal of clinical virology plus*. 2022;2(4):100104.
112. Wise J. Covid-19: UK cases of variant from India rise by 160% in a week. *BMJ (Clinical research ed)*. 2021;373:n1315.
113. Hillus D, Schwarz T, Tober-Lau P, Vanshylla K, Hastor H, Thibeault C, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of homologous and heterologous prime-boost immunisation with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory medicine*. 2021;9(11):1255-65.
114. Shayan S, Nazanin A, Michael F, vishwanath V. Analysis of the delta variant B.1.617.2 COVID-19, . *Clin Pract*. 2021;11(4):778-84.
115. BOLETÍN ESPECIAL CORONAVIRUS: Vacunas contra el covid-19. 2020;14(8):1-3.
116. Montalvo Villalba MC, Valdés Ramírez O, Muné Jiménez M, Arencibia Garcia A, Martinez Alfonso J, González Baéz G, et al. Interferongamma,TGF- β 1andRANTESexpressioninupperairwaysamples fromSARS-CoV-2infectedpatients *Clinical Immunology* 2020;220:1-8.
117. Sierra B, Pérez AB, Aguirre E, Bracho C, Valdés O, Jimenez N, et al. Association of Early Nasopharyngeal Immune Markers With COVID-19 Clinical Outcome: Predictive Value of CCL2/MCP-1. *Open forum infectious diseases*. 2020;7(10):ofaa407.
118. Molinero LM. Medidas de concordancia para variables cualitativas. 2001:1-3.
119. CECMED. CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS (CECMED) REGULACION No. 47-2007 2007:1-36.
120. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. 2020:1-7.
121. Reina J, Suarez S. Evaluación de diferentes genes en la detección por RT-PCR. *Revista Española de Quimioterapia*. 2020;33(4):292-3.
122. Palacio Rua K, García Correa JF, Aguilar-Jiménez W, Afanador Ayala C, Rugeles MT, Zuluaga AF. Validación de una técnica de PCR dúplex usando el

gen E y RNasa P para el diagnóstico de SARS-CoV-2. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2022;40(8):428-35.

123. Gdoura M, Abouda I, Mrad M, Ben Dhifallah I, Belaiba Z, Fares W, et al. SARS-CoV2 RT-PCR assays: In vitro comparison of 4 WHO approved protocols on clinical specimens and its implications for real laboratory practice through variant emergence. *Virology*. 2022;19.

124. Arora S, Bhaukhandi KD, Mishra PK. Coronavirus lockdown helped the environment to bounce back. *The Science of the total environment*. 2020;742:140573.

125. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020;182(4):812-27.e19.

126. Santra D, Banerjee A, Maiti S. Better binding informatics of delta variants (B.1.617.2) with ACE2 than wild, D614G or N501Y CoV-2 is fully blocked by 84 amino-acid cut of wild spike. *Informatics in Medicine Unlocked*. 2022;29:100900.

127. Vanaerschot M, Mann SA, Webber JT, Kamm J, Bell SM, Bell J, et al. Identification of a Polymorphism in the N Gene of SARS-CoV-2 That Adversely Impacts Detection by Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2021;59(1).

128. Bayart JL, Degosserie J, Favresse J, Gillot C, Didembourg M, Djokoto HP, et al. Analytical Sensitivity of Six SARS-CoV-2 Rapid Antigen Tests for Omicron versus Delta Variant. *Viruses*. 2022;14(4).

129. Ayesa MF, Gómez NN, Varas SM. Pruebas moleculares diagnósticas de SARS-COV-2: fundamentos. *Revista Bioanálisis*. 2020:8-23.

130. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical chemistry*. 2020;66(4):549-55.

131. Saha I, Ghosh N, Pradhan A, Sharma N, Maity D, Mitra K. Whole genome analysis of more than 10 000 SARS-CoV-2 virus unveils global genetic diversity and target region of NSP6. *Brief Bioinform*.

132. Moré G, Tizzano MA, Rambeaud M, Panei CJ, Fuentealba N, Aspitia C, et al. Comparación de 3 kits de real time RT-PCR para detección de SARS-CoV-2. *FAVE*. 2021;20:3-8.

133. Dandan L., Zhang J., L. J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. 2020; 10(16):7150-62.
134. Pierri B, Mancusi A, Proroga YT, Capuano F, Cerino P, Girardi S, et al. SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swabs: Performance characteristics of a real-time RT-qPCR and a droplet digital RT-PCR assay based on the exonuclease region (ORF1b, nsp 14). J Virol Methods. 2022;300:114420.
135. Mim F, Reza MS, Rahman Khan MJ, Karim N, Rahman MA, Hossain MI, et al. Evaluation of Sensitivity and Specificity of Three Commercial Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Kits for Detecting SARS-CoV-2 in Bangladesh. Cureus.13(12).
136. Eberle U, Wimmer C, Huber I, Neubauer-Juric A, Valenza G, Ackermann N, et al. Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2021;40(6):1303-8.
137. Sisay A, Abera A, Dufera B, Endrias T, Tasew G, Tesfaye A, et al. Diagnostic accuracy of three commercially available one step RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 in resource limited settings. PLoS One. 2022;17(1).
138. Dundon WG, Settypalli TB, Spiegel K, Steinrigl A, Revilla-Fernández S, Schmoll F, et al. Comparison of eleven in vitro diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2 RNA. J Virol Methods. 2021;295:114200.