



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNOSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Desempeño clínico de estuches comerciales para la detección de antígenos SARS-CoV-2

Tesis para optar por el Título de Máster en Virología

Autor: Lic. Maydelis Aguila Pinillos

La Habana

2024



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNOSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Desempeño clínico de estuches comerciales para la detección de antígenos SARS-CoV-2

Tesis para optar por el Título de Máster en Virología

Autor: Lic. Maydelis Aguila Pinillos

Tutor: Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, DrC

Asesor: Lic. José Luis Pelegrino, MsC

La Habana

2024

La ciencia no conoce de países porque el conocimiento le pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina al mundo.

Louis Pasteur

A mis padres

A mis abuelos

Agradecimientos

Le agradezco en primer lugar a la profesora Odalys por confiar en mí, para desarrollar este tema de investigación. A la profe Mayra, por guiarme, apoyarme y estar siempre ahí en los momentos que pensé que no podía. En mi tutora Licel y en el claustro de profesores tan maravillosos que tuve el placer de conocer durante el transcurso de la maestría en el IPK. A todas las personas del departamento de Virología que aportaron a mi formación profesional, especialmente a mi amiga Dianelvys. Le agradezco a mis compañeros de maestría, Héctor, Karla, Lissi, Aliana, Darién, Celine, Liri, Yuna y Luis Ja, con los que pasé momentos inolvidables y aprendí de cada uno. En especial Yuna y Luis Ja, gracias por siempre estar conmigo.

Otro gran y merecido agradecimiento a todas las personas de mi centro de trabajo AICA, que confiaron y sin su ayuda no hubiese alcanzado mis objetivos. Al departamento de Gestión y Control de la Calidad, a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología, en especial a: Yara, Yane, Joa y Vilmita.

Muchas gracias a mi familia, mi hermana, a mis abuelos y mis padres que han sido y siempre serán mi mayor inspiración y motor impulsor para seguir creando, innovando, creyendo en que un mundo mejor puede ser posible. Gracias a todas aquellas personas que confiaron en mí, solo hoy sé que lo importante es invisible a los ojos, y que para lograr todo aquello que se anhela, solamente se obtiene a base de perseverancia y sacrificio infinito.

Resumen

La detección rápida y precisa del SARS-CoV-2, agente etiológico de la COVID-19, es determinante en el manejo de esta enfermedad. En este sentido, los ensayos de detección rápida de Ag SARS-CoV-2 presentan ventajas como la rapidez, el costo y la poca instrumentación. En el presente trabajo se muestran los resultados de la evaluación de quince estuches para la detección de Ag SARS-CoV-2 (catorce ensayos inmunocromatográficos y uno basado en inmunofluorescencia). Se analizaron 1033 muestras, de las cuales 177 eran procedentes de un panel de muestras positivas y negativas de exudados nasofaríngeos y 946 eran muestras de pacientes sospechosos de presentar una infección respiratoria aguda. La técnica de referencia fue la RCP-TR. Se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos e índice de Kappa de cada ensayo evaluado bajo diferentes criterios clínico-epidemiológicos y de laboratorio. La mayoría de los ensayos inmunocromatográficos evaluados presentaron valores de sensibilidad que oscilaron entre el 67-100% y de especificidad entre un 56-100%. En cuanto a la concordancia según el índice K los ensayos oscilaron entre 0.27 y 0.89. En algunos ensayos la sensibilidad aumentó cuando se evaluaron con muestras colectados en los primeros 5 días de inicio de los síntomas y aquellas con Ct <30. Las auto-pruebas y el ensayo basado en inmunofluorescencia arrojaron resultados muy satisfactorios. Los ensayos inmunocromatográficos evaluados tienen un desempeño clínico aceptable según los requerimientos de la OMS, excepto 5 de ellos, en tanto, el ensayo de inmunofluorescencia tiene muy buen desempeño clínico y buena utilidad para el diagnóstico del SARS-CoV-2.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
IRA	Infección respiratoria aguda
MTO	Manual técnico de operación
IFA	Inmunofluorescencia
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
μL	Microlitros
CECMED	Centro para el control estatal de medicamentos, equipos y dispositivos médicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
CoV	Coronavirus
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
MERS	Síndrome respiratorio del Medio Oriente
RCP-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
MINSAP	Ministerio de Salud Pública
ECLIA	Electroquimioluminiscente
RdRp	ARN polimerasa ARN dependiente
ARN	Ácido ribonucleico
LNRVR	Laboratorio nacional de referencia de virus respiratorios
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
PDR-Ag	Estuches comerciales de antígenos
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
Se	Sensibilidad
Es	Especificidad
Conc	Concordancia

Índice

I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	4
III. Revisión bibliográfica.....	6
III.1 Antecedentes y origen de la COVID-19.....	7
III.1.1Emergencia del SARS-CoV-2.....	8
III.1.2SARS-CoV-2, agente etiológico de la COVID-19.....	8
III.1.2.2Estructura genética.....	9
III.1.2.3Filogenia.....	10
III.2 Morfología y estructuras moleculares.....	11
III.2.1Patogénesis y tropismo celular.....	13
III.2.2Características, manifestaciones clínicas y epidemiología de la enfermedad.....	16
III.3 Respuesta inmune.....	17
III.3.1Respuesta Innata.....	17
III.3.2Respuesta Adaptativa.....	18
III.4Diagnóstico virológico.....	19
III.4.1Diagnóstico molecular.....	20
III.4.2Diagnóstico serológico.....	22
III.5Evaluación de los diagnosticadores.....	23
III.5.1Diagnóstico mediante detección de Ag.....	24
III.5.2Utilidad y limitaciones de los ensayos rápidos para el diagnóstico de la COVID-19.....	26
III.6Emergencia del SARS-CoV-2 en Cuba.....	28
IV. Materiales y Métodos.....	29
IV.1Universo de estudio.....	30
IV.2Muestras.....	30
IV.2.1Definición útil.....	31
IV.3Diagnóstico molecular. RCP-TR.....	32
IV.3.1Condiciones de colección y procesamiento de las muestras.....	32
IV.4Ensayos inmunocromatográficos.....	34
IV.4.1Fundamento de los ensayos inmunocromatográficos para la detección de Ag SARS-CoV-2.....	34
IV.4.1.1Procedimiento técnico e interpretación de los resultados.....	34
IV.5Ensayo de inmunofluorescencia.....	35
IV.5.1Fundamento del ensayo Standard F para detectar SARS-CoV-2 (IFA).....	36
IV.5.1.1Procedimiento técnico e interpretación de los resultados.....	36
IV.6Análisis estadístico.....	38
IV.7Aspectos éticos de la investigación.....	41
IV.8Diagrama de flujo.....	42
V. Resultados y discusión.....	43
V.1Discusión general.....	59
VI. Conclusiones.....	62
VII. Recomendaciones.....	64
VIII. Referencias bibliográficas.....	66

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción

Las infecciones virales emergentes y reemergentes constituyen una amenaza constante para la salud humana a nivel mundial. En las últimas décadas se han producido numerosas epidemias y pandemias como: influenza H1N1 en el año 2009, la enfermedad por virus Ébola en África Occidental en el año 2013, el Zika en América Latina en 2015, así como 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 (1).

En el año 2019 se identificó un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) en Wuhan, provincia de Hubei en China, el cual provocó un brote de neumonía viral inusual, altamente transmisible que condujo a una emergencia sanitaria mundial sin precedente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) denominó en febrero de 2020, la enfermedad causada por el SARS-CoV-2 como la COVID-19. El 11 de marzo de 2020, se declaró como pandemia a esta enfermedad (2).

El SARS-CoV-2 es un virus ARN envuelto, de simple cadena positiva que pertenece a la familia *Coronaviridae*, agrupado en el género *Betacoronavirus* al igual que SARS-CoV y MERS-CoV. Este agente viral es zoonótico, existen estudios previos que demuestran que proviene de los murciélagos, aunque se sigue investigando el hospedero intermediario, con una gran controversia entre el pangolín y otros (3).

La vía de transmisión entre humanos es similar a la descrita para otros tipos de coronavirus, a partir de secreciones respiratorias y el contacto directo con personas infectadas. El período de incubación medio para el SARS-CoV-2, 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 del inicio de los síntomas, desde 1-2 días antes hasta 5-6 días después. Los síntomas y signos más frecuentes incluyen: fiebre, tos seca, astenia, pérdida del gusto y el olfato, expectoración, disnea, dolor de garganta, cefalea, mialgia o artralgia, escalofríos, náuseas o vómitos, congestión nasal, diarrea, hemoptisis y congestión conjuntival, entre otros menos frecuentes (4).

El SARS-CoV-2 ha demostrado ser un virus de alta infectividad y mutagenicidad, por lo que se hace necesario un diagnóstico temprano del agente causal de esta enfermedad, para disminuir los riesgos de propagación. Para eliminar la cadena de contagios, utilizar el diagnóstico virológico temprano como herramienta, fue fundamental para el manejo de la pandemia y la enfermedad individual en la comunidad. La prueba de referencia y de elección para el diagnóstico de la infección por COVID-19 es la RCP en tiempo real (del inglés *reverse transcription – polymerase chain reaction*) (6) la que amplifica varios genes del virus, como el gen de la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp), el gen que codifica para la proteína de envoltura (E) o el de la proteína de la nucleocápside (N) (5); además es necesario disponer de pruebas rápidas, simples y lo suficientemente sensibles y específicas, que se puedan realizar a gran escala. El diagnóstico precoz permite implementar medidas de prevención y control de la expansión de la enfermedad conjuntamente con la vigilancia epidemiológica.

Las proyecciones inmediatas en el diagnóstico de la COVID-19 se han apoyado en desarrollar pruebas rápidas de detección de antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac), basados en diferentes principios como la inmunocromatografía en formato de ensayo de flujo lateral, la inmunofluorescencia, los ensayos electroquimioluminiscentes (ECLIA) y los ensayos inmunoenzimáticos.

Existen las pruebas rápidas para la detección de Ag SARS-CoV-2 (PRD-Ag) que detectan componentes estructurales del virus tales como proteína de espícula (S), proteína de la nucleocápside (N), presentes durante etapas tempranas de la infección en muestras de secreciones nasofaríngeas (7). Teóricamente el Ag viral es un marcador específico del virus y precede a la aparición de los Ac en pacientes infectados, por lo que la detección del Ag viral puede servir como una prueba rápida y menos costosa para diagnosticar tempranamente a personas infectadas (8). Teniendo en cuenta la media del período de incubación del SARS-CoV-2 se ha podido observar que en la fase muy inicial del cuadro clínico (unos días antes de aparecer la clínica y hasta unos 5-7 días después) los nuevos ensayos de detección de Ag tienen utilidad para detectar la infección, con una fiabilidad muy aceptable en la actualidad. Sin embargo,

presentan como limitación importante que son menos precisos que la RCP-TR al requerir de mayor carga viral para resultar positiva. Como principales ventajas, se citan, que se obtiene un resultado inmediato y a un coste mucho más reducido (9). Los estuches comerciales de detección del antígeno viral han utilizado no solo en muestras nasales o nasofaríngeas también en muestras de saliva. En los últimos tiempos se han desarrollado autopruebas que son muy oportunas para el diagnóstico de la enfermedad.

En la actualidad el Laboratorio Nacional de Referencia del Departamento de Virología (LNRV) del IPK, posee capacidad de diagnóstico molecular y de secuenciación nucleotídica, y han empleado las mismas para el enfrentamiento de emergencias sanitarias previas (10). En febrero de 2020, el IPK, siguiendo las recomendaciones y guías para el laboratorio de la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) introdujo en el país el diagnóstico virológico del SARS-CoV-2 (11). Además, se mantiene la vigilancia en la detección de diecisiete virus respiratorios causantes de infecciones respiratorias agudas (IRA).

Una vez detectados en Cuba, los primeros casos de COVID-19, las autoridades pertinentes como el grupo empresarial BioCubafarma, comenzaron la investigación para el desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección de antígenos y anticuerpos de SARS-CoV-2. Contar en nuestro país con métodos de diagnóstico más rápidos y económicos es una gran ventaja, el IPK como centro de referencia, se ha encargado de la evaluación minuciosa de ensayos de detección rápida; cumpliendo con los criterios expresados en la Regulación No. 47-2007: Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores, del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), del Ministerio de Salud Pública de Cuba (12).

En el presente trabajo nos propusimos comparar diferentes métodos de detección de Ag del SARS-CoV-2 (métodos de diagnóstico rápido) lo que permitirá seleccionar el método más adecuado (más sensible) para la detección temprana del agente viral, lo que contribuye a un mejor manejo clínico del paciente.

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

II. 1.Objetivo general

Evaluar el desempeño clínico de los estuches comerciales para la detección de Ag SARS-CoV-2.

II. 2. Objetivos específicos

- Determinar las características clínicas de los ensayos inmunocromatográficos de detección rápida de Ag SARS-CoV-2.
- Evaluar las características clínicas del ensayo de inmunofluorescencia para la detección rápida de Ag SARS-CoV-2.

III.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1 Antecedentes y origen de la COVID-19

Hasta finales de 2019, se reconocían seis especies de virus pertenecientes a la familia *Coronaviridae* responsables de infecciones en humanos (13) . Las especies tipificadas como CoVH 229E y CoVH NL63, pertenecientes a los *Alphacoronavirus*; CoVH OC43 y CoVH-HKU1, pertenecientes al linaje A de los *Betacoronavirus*, causantes de resfriados y rara vez de infecciones; el SARS-CoV y el MERS-CoV, los que se incluyen dentro de los linajes B y C de los *Betacoronavirus*, respectivamente, con gran capacidad para causar infecciones del tracto respiratorio inferior, incluyendo neumonía atípica grave que puede evolucionar a insuficiencia respiratoria y síndrome respiratorio agudo potencialmente mortal (14). En este último grupo se incluye, además, el recién emergido coronavirus (SARS-CoV-2) causante de la enfermedad conocida como COVID-19 (15).

La epidemia del SARS-CoV comenzó a finales del 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 (16). 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% de mortalidad. 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 (17). A diferencia del SARS-CoV, el MERS-CoV sigue circulando en la actualidad y presenta una tasa de letalidad cercana al 35% y un índice de contagiosidad (R_0) no superior a 1, por ello no ha mostrado una capacidad de difusión excesiva, estando confinado a la zona geográfica de origen (18).

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 sobre un grupo de 27 casos de neumonía de etiología desconocida, de rápida propagación con una exposición común a un mercado mayorista de marisco, pescado y animales vivos en la ciudad de Wuhan, incluyendo siete casos graves. El inicio de los síntomas del primer caso fue el 8 de diciembre de 2019. El 7 de enero de 2020, las autoridades chinas identificaron como agente causante del brote un nuevo tipo de 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 (19).

El 11 de marzo la OMS declaró la pandemia por SARS-CoV-2 y la enfermedad ocasionada por este agente etiológico como COVID-19. Desde el inicio de la pandemia hasta mayo del 2023 se reportan 768 millones 237 mil 788 de casos confirmados en el mundo, 6 millones 951 mil 677 fallecidos. En la región de las Américas, hasta esta fecha se reportan 193 millones 210 mil 684 casos confirmados y 2 millones 958 mil 886 fallecidos (20). A partir del 5 de mayo la OMS declaró el fin de la pandemia, y se han registrado en las diferentes regiones del mundo durante el último periodo una disminución en cuanto a las muertes y casos positivos a esta enfermedad. Hasta el presente, varias investigaciones han revelado evidencias de las características virológicas y epidemiológicas de este agente.

III.1.2 SARS-COV-2, agente etiológico de la COVID-19.

III.1.2.1 Taxonomía

Los coronavirus pertenecen al orden *Nidovirales*, suborden *Cornidovirineae*, miembros de la familia *Coronaviridae* pertenecientes a la subfamilia *Orthocoronavirinae*. Esta subfamilia se divide en 4 géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (21). 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 (22). El SARS-CoV-2 es un virus zoonótico emergente que, basado en las relaciones filogenéticas y estructuras genómicas,

pertenece al género *Betacoronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus* (beta-coronavirus, beta-2b) (18).

III.1.2.2 Estructura genética

El genoma del SARS-CoV-2, al igual que el resto de los coronavirus, lo conforma una sola cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva (+ssARN), de 30,000 nucleótidos aproximadamente. Esta cadena de ARN se asemeja, estructuralmente a un ARN mensajero (ARNm) de células eucarióticas, ya que, presenta un capucha metilada (cap) en el extremo 5' y una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3', lo que le da un gran parecido a los ARNm de la célula hospedera. Sin embargo, a diferencia de los ARNm eucarióticos, este genoma viral contiene al menos seis marcos abiertos de lectura (ORF, siglas del inglés *open reading frames*) que codifican para dos proteínas no estructurales: replicasa y proteasa (ORF1a/ORF1b); cuatro proteínas no estructurales: espícula (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (23), aunque contiene siete marcos abiertos putativos, que codifican para las proteínas accesorias. La mayoría de estos genes solo presentan una homología del 80% con el SARS-CoV; sin embargo, los genes implicados en la replicación (ORF1ab) presentan una homología del 94% con este virus (24). El gen de la replicasa y proteasa (ORF1ab) cubre dos tercios del extremo 5' del genoma viral, la cual codifica para una poliproteína (pp1ab) que es cortada proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales, las cuales están involucradas en la replicación y transcripción del virus. La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del genoma del SARS-CoV-2 (25).

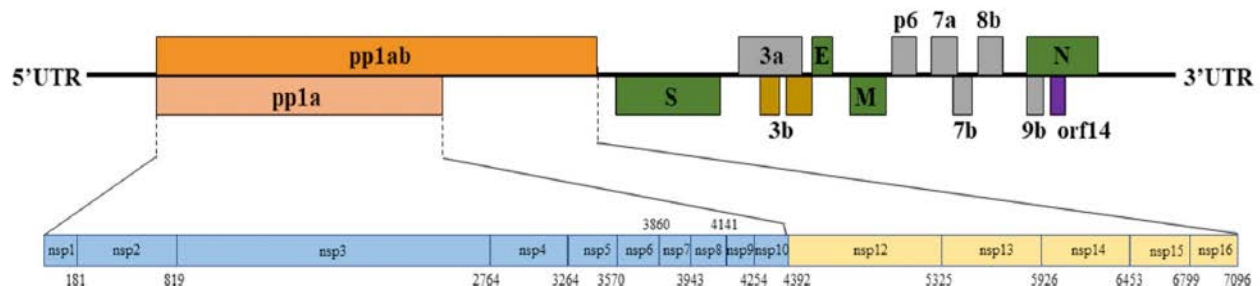


Figura 1. Diagrama esquemático del genoma del SARS-CoV-2 (25).

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.

A pesar de ello, la secuenciación completa de los genomas de los coronavirus detectados en pacientes, y especialmente el gen de la RpRd y el gen S, muestran que las cepas humanas constituyen un linaje distinto del SARS-CoV, pero muy cercano al linaje detectado en algunos murciélagos (BatCoV RaTG) (18). 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 del murciélago. Estas semejanzas genéticas parecen confirmar el origen del SARS-CoV-2, que sería algún murciélago salvaje de la zona (26). Otros hallazgos en el genoma del SARS-CoV-2 es la inserción de cuatro residuos aminoacídicos (PRRA) en la unión a la subunidad 1 y 2 de la proteína S. Esta inserción genera un sitio de corte polibásico, el cual permite la acción de proteínas como la furina y otras proteasas. Los estudios estructurales de este sitio de corte han demostrado que el mismo reduce la estabilidad de la proteína S del agente viral, además facilita su adaptación conformacional para unirse al receptor de la célula hospedera. Sin embargo, aún no se ha demostrado que este sitio de corte este asociado a la alta transmisibilidad del SARS-CoV-2 (27).

III.1.2.3 Filogenia

Las mutaciones son parte natural del ciclo replicativo de los virus ARN, lo que conlleva a la diversificación de los linajes virales unido a la transmisión. La vigilancia genómica ha generado la creación de bases de datos para conocer la propagación del virus, pues es una manera de apreciar la evolución del SARS-CoV-2 e identificar nuevas variantes. Además, se ha podido constatar la transmisibilidad y patogenicidad, así como la susceptibilidad de agentes terapéuticos (28).

A partir de enero 2021, aproximadamente 25000 sitios publicaron la lectura completa del genoma del SARS-CoV-2. Se ha estimado que aproximadamente ocurren dos mutaciones en el genoma de este virus mensualmente. El sistema de clasificación llamado *NextStrain* desarrollado por la OMS, designó una clasificación de las variantes del SARS-CoV-2, en la figura 2 se muestran las variantes existentes hasta septiembre del 2022 (29).

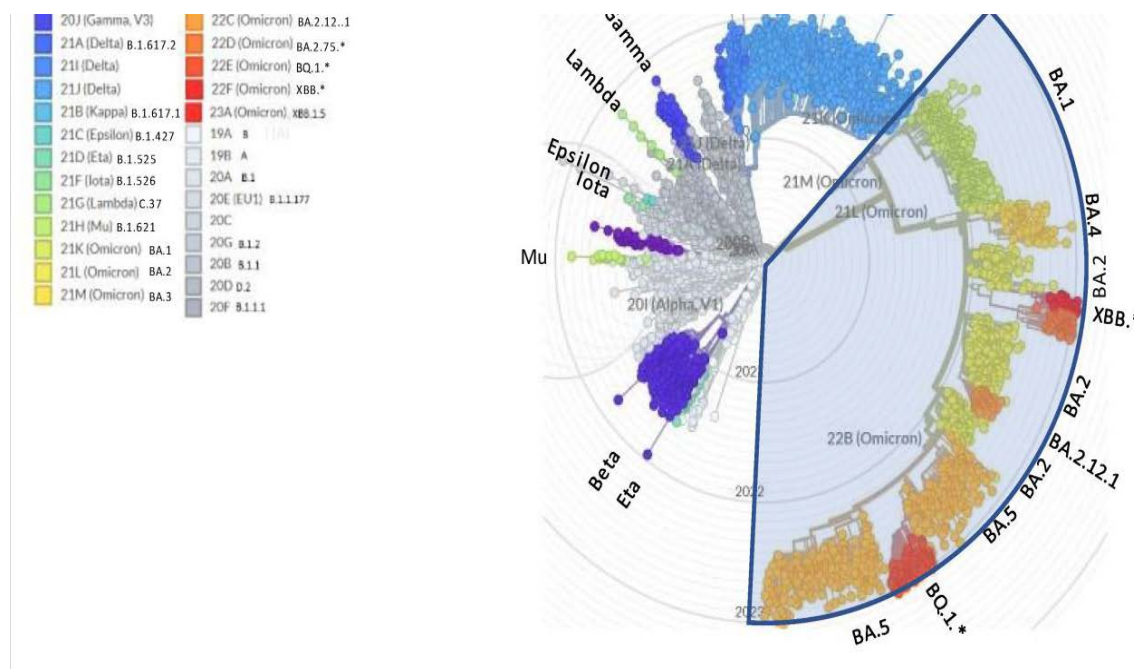


Figure 2. Vista radial del árbol filogenético NextStrain del SARS-CoV-2. La leyenda señala las variantes declaradas por la OMS correspondientes a las denominaciones VOC y Pangolin. El * indica el sublinaje que se incluye dentro de las variantes.

III.2 Morfología y estructuras moleculares

Mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión, la apariencia que tiene la partícula vírica o virión del SARS-CoV-2 es la de una corona solar (de allí el nombre de coronavirus). Esta partícula vírica presenta una morfología esférica de un diámetro que está alrededor de los 100 [nm] junto con espigas de 8 a 12 [nm] de longitud aproximadamente, compuesto por un denso viroplasma (30). La estructura del virión consiste principalmente en una nucleocápside (que protege al material genético viral) y en una envoltura externa. El genoma del SARS-CoV-2 codifica cuatro proteínas estructurales: proteínas S, E, N y M además de proteínas accesorias, tales como la proteína hemaglutinina esterasa (HE), proteína 3, proteína

7a, entre otras (31). La Fig. 3 muestra una microfotografía y un esquema del SARS-CoV-2 con los diferentes componentes estructurales del virión (32).

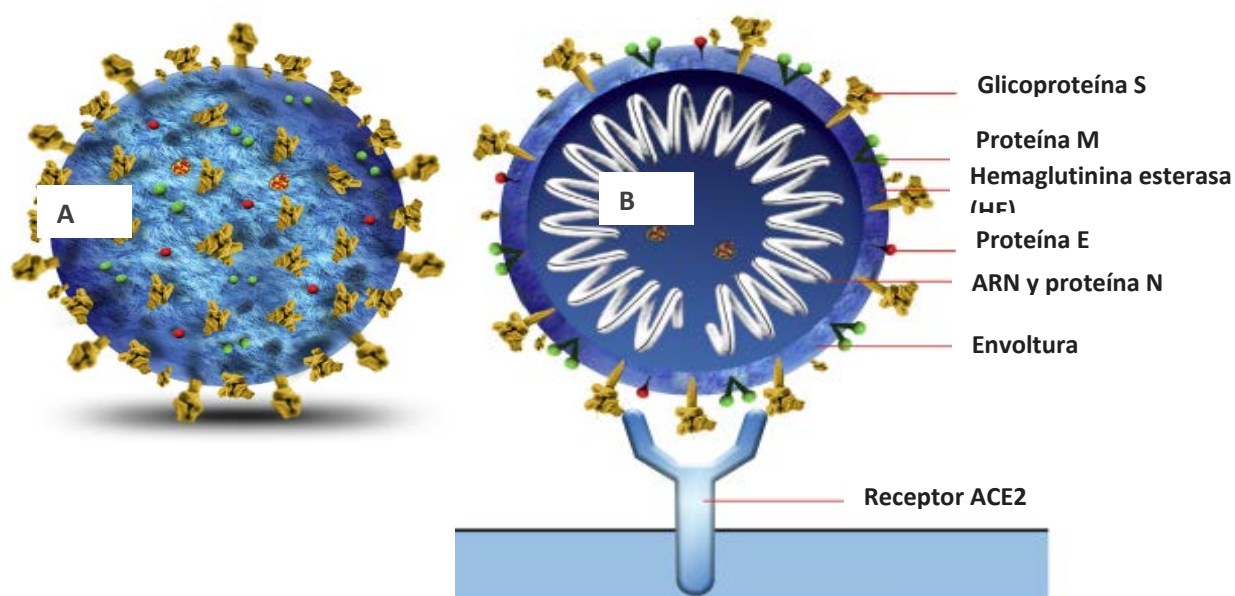


Figura 3. A: Estructura tridimensional (3D) del nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). **B:** Diagrama esquemático de la estructura del SARS-CoV-2 que representa las proteínas estructurales del virus. La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) en la superficie de las células humanas es el receptor que interactúa con la glicoproteína S del virus (32).

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 (33). Esta proteína trimérica facilita la unión del virus al receptor celular ACE-2 (siglas del inglés *angiotensin converting enzyme II*) y es la encargada del proceso de fusión con el mismo, determinando con ello el tropismo y la capacidad de transmisión en un nuevo hospedero (34). Además, es el Ag inmunodominante y el más reconocido por el sistema inmune del hospedero. 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 (14).

La proteína M (25-30 kDa) se encuentra en abundancia en el virión y tiene tres dominios transmembrana (35). Esta proteína da forma al virión y tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal. 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 (36).

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. La misma tiene dentro de sus funciones el ensamblaje y liberación del virus y la de actuar como una viroporina en la membrana de la célula hospedera como canal iónico, necesario para la patogénesis del SARS-CoV y probablemente del SARS-CoV-2 (37).

La proteína N a través de sus aproximadamente 140 aminoácidos, tiene un dominio de unión al ARN. Esta proteína juega un rol importante en el empaquetamiento del ARN viral, y en cuanto al SARS-CoV-2 está altamente conservada y tiene un 90% de similitud con el SARS-CoV. La poliproteína replicasa no estructural es una proteína multifactorial que contribuye a la patogénesis del virus, aunque su papel principal es potenciar la replicación y transcripción del ARN viral. El ORF1ab contiene un dominio específico RdRp que actúa como pivote en la transcripción y replicación del SARS-CoV-2(38).

III.2.1 Patogénesis y tropismo celular

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 (39). El primer paso de la infección celular por el SARS-CoV-2 es la unión de la glicoproteína S al receptor celular ACE-2, que es utilizado por este virus para unirse a las células e iniciar el proceso infeccioso (40). La estructura de la proteína S y su interacción con el receptor se han analizado en detalle. La ACE-2 es también el receptor para SARS-CoV, por lo que se cree que la fisiopatología del nuevo coronavirus a nivel pulmonar es muy parecida a la de este virus, con un predominio evidente de IRAG como la neumonía (41). 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, la gran afinidad de este virus

por los tejidos nasofaríngeos y orofaríngeos, puede explicar la mayor y rápida contagiosidad del nuevo coronavirus (42).

La interacción de la subunidad S1 con el receptor promueve la endocitosis del virión. El pH ácido y las proteasas endosomiales catalizan la escisión de las dos subunidades de S, y modifican S2 para que actúe como proteína de fusión, que facilita la fusión de las dos bicapas lipídicas, la envoltura del virión y la membrana de vesícula endocítica, liberando la nucleocápside en el citoplasma de la célula infectada. La proteasa de serina TMPRSS2 es una enzima crucial en la activación de S2 para la fusión y entrada de SARS-CoV-2 en el citoplasma, por lo que los agentes inhibidores de TMPRSS2 son capaces de bloquear la infección y podrían tener aplicación terapéutica (43).

Una vez en el citoplasma y tras la descapsidación, se inicia la traducción del ARN genómico, que al ser de polaridad positiva actúa como un ARNm. Se traducen los ORF 1a y 1b, próximos al extremo 5', con lo que la célula fabrica las poliproteínas pp1a (4.382 aminoácidos) y pp1ab (7.073 aminoácidos) (14). Dos de los componentes de las poliproteínas tienen actividad proteasa y catalizan la escisión de las propias poliproteínas en proteínas individuales, entre ellas la replicasa del virus, que es una RdRp, y otras proteínas accesorias(44). La replicasa genera la molécula complementaria completa (ARN genómico de polaridad negativa), tomando como molde el ARN genómico, que a su vez es el molde para sintetizar las copias numerosas de genomas destinados a la progenie viral; y también los ARN subgenómicos, que se tomarán como moldes para los ARNm correspondientes a los genes que codifican para las cuatro proteínas estructurales, de las cuales S y M son glicosiladas en el aparato de Golgi (14).

La distribución subcelular correcta de las proteínas estructurales es necesaria para el ensamblaje de los componentes de los viriones hijos, que incluye la encapsidación selectiva de las copias de ARN genómico (los ARN de polaridad negativa que se han sintetizado para actuar como moldes no son encapsidados); y los viriones hijos emergen del retículo endoplasmático en el interior de vesículas que se fusionan con la membrana citoplasmática, liberando la progenie viral (45). La

infección conduce finalmente a la muerte de la célula, posiblemente por apoptosis; en cultivos celulares pueden observarse efectos citopáticos: redondeamiento de las células, que mueren y se

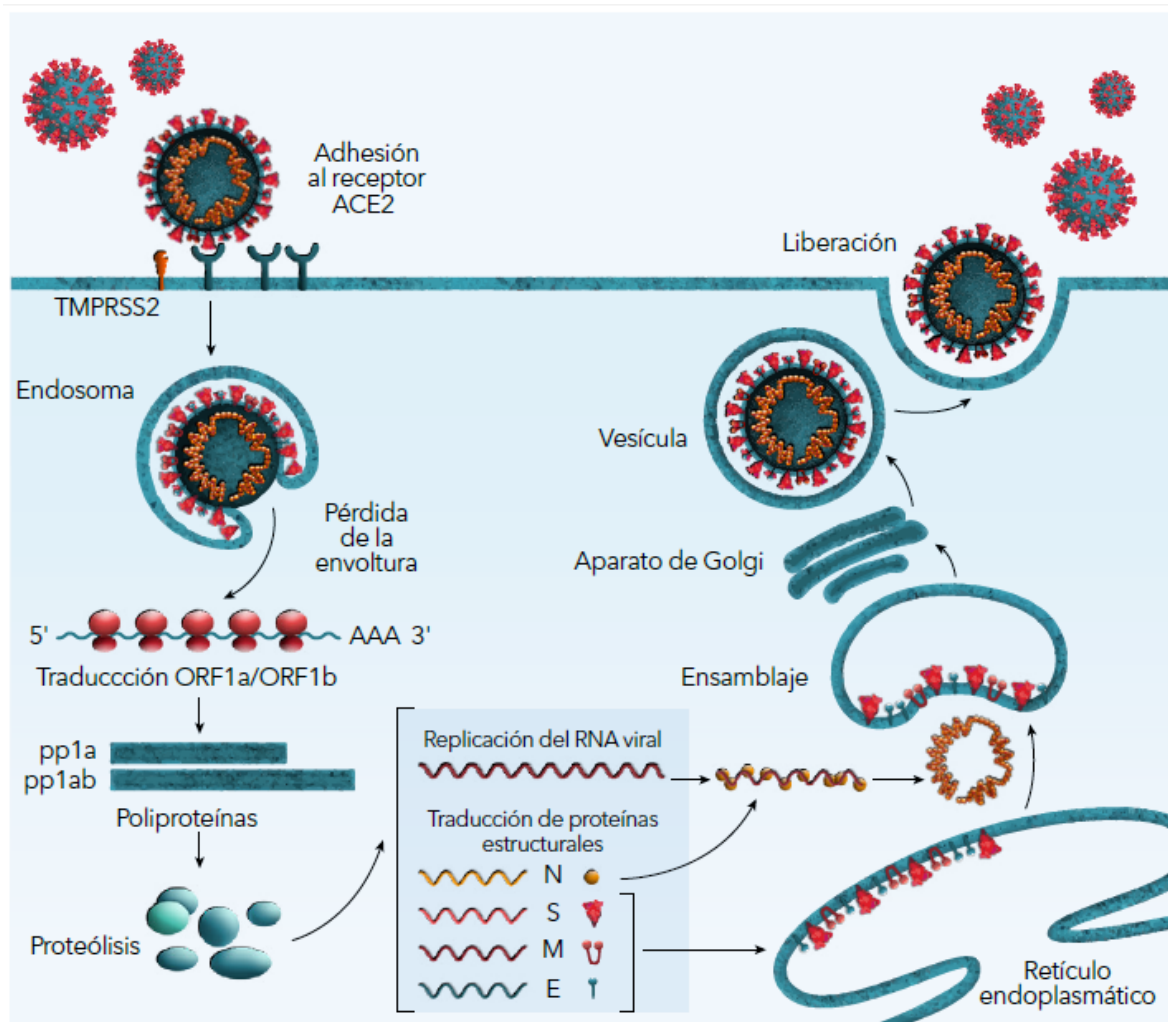


Figura 4. Ciclo replicativo de SARS-CoV-2 (47)

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*).

III.2.2 Características, manifestaciones clínicas y epidemiología de la enfermedad.

Mientras que en el SARS-CoV el período de transmisibilidad solo se producía desde el inicio de la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad asociada a este coronavirus, 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 (48)

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 en varones con edad superior a los 65 años y con comorbilidades como diabetes, patologías pulmonares, cardíacas e hipertensión (49).

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 (50). 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 (51). Estos síntomas digestivos se correlacionan con mayor frecuencia de detección y mayor carga viral en materia fecal (52).

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 sobreinfecciones bacterianas, frecuentemente 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 (50).

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 hospedador intermediario, donde ha surgido controversia entre el pangolín y otros (53). 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 5 micras (capaces de transmitirse a distancias de hasta 2 metros) y las manos o los fómites contaminados con estas secreciones seguido del contacto con la mucosa de la boca, nariz u ojos (54). El SARS-CoV-2 se ha detectado en las heces y la orina, ya que, una de las vías de transmisión es la fecal-oral, sin embargo no es una vía muy considerada por la baja carga viral que se ha encontrado, comparado con los exudados nasofaríngeos (55). 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 (50,27).

III.3 Respuesta Inmune

III.3.1 Respuesta Innata

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 (INF1) 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 negativo y los +ssARN son reconocidos por receptores intracelulares: TLR3 y TLR7, en el endosoma, y RIG-I/MDA5 (56). 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 inmune, 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” (57). Además las citosinas proinflamatorias, son un quimioatrayente para los macrófagos, las células T y las células *natural killer* que son inducidas mayoritariamente por las infecciones ocasionadas por el SARS-CoV, que por el SARS-CoV-2, de ahí la alta mortalidad de este agente infeccioso (58).

La activación excesiva del sistema inmune innato que causa tormentas de citocinas ocasionando 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 conllevan a un fallo multiorgánico (59).

III.3.2 Respuesta Adaptativa

Las respuestas de inmunidad específica se producen por los linfocitos B (respuesta de Ac) y T (inmunidad celular). No todos los Ac 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 COVID-19 y se ha relacionado con la desregulación de las respuestas (60).

Aunque aún es muy limitado el conocimiento sobre la respuesta humoral en SARS-CoV-2, la evidencia muestra que las respuestas específicas de los linfocitos T son importantes para el reconocimiento del virus y a su vez, en la destrucción de las células infectadas, particularmente, en los pulmones de los individuos infectados (58). Los resultados de un estudio con 128 casos

mostraron que el número y función de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) fueron mayores que las respuestas de los linfocitos *T helper* (CD4+) (61). Respecto a los anticuerpos producidos por los linfocitos B, la IgM se produce cuando la infección es más incipiente, mientras que, la IgG se produce en etapas más tardías. Se han reportado limitados detalles serológicos de los Ac frente a la infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, en un estudio preliminar, se mostró, que después del inicio de la enfermedad, se obtuvo un pico para IgA después de cinco días de aparecidos los síntomas, IgM al noveno día, mientras que, para IgG se obtuvo esta respuesta en la segunda semana (61,58). Además, se ha reportado que el SARS-CoV-2 induce producción de IgG contra la proteína (N), la que puede ser detectada en el suero a los 14 días después del inicio de la enfermedad (58).

III.4 Diagnóstico virológico

La evidencia científica demuestra que el 80% de los pacientes con COVID-19 son asintomáticos, y existe la posibilidad de que este grupo de personas infectadas con SARS-CoV-2 eliminen y transmitan el virus, lo que indica que el diagnóstico temprano para el tratamiento y control de la infección por coronavirus es crucial (62). 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 (63). 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.

En este sentido, al inicio del brote epidémico se utilizó la secuenciación del genoma viral como método diagnóstico, pero esta técnica es costosa y poco práctica para el procesamiento de grandes cantidades de muestras (2). 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 (63).

III.4.1 Diagnóstico molecular

Actualmente, 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 RCP-TR (64), 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 Fig. 5 (65). La eficiencia analítica de la RT-PCR para el diagnóstico de COVID-19 es $\geq 96\%$ (66). 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 de segmento común a otro Betacoronavirus) y otro de alta especificidad para SARS-CoV-2 (67). Las ventajas de la RCP-TR como técnica de diagnóstico son: la elevada sensibilidad, especificidad y rapidez en la obtención de un resultado (68); considerada así, la técnica estándar de oro para el diagnóstico de la COVID-19.

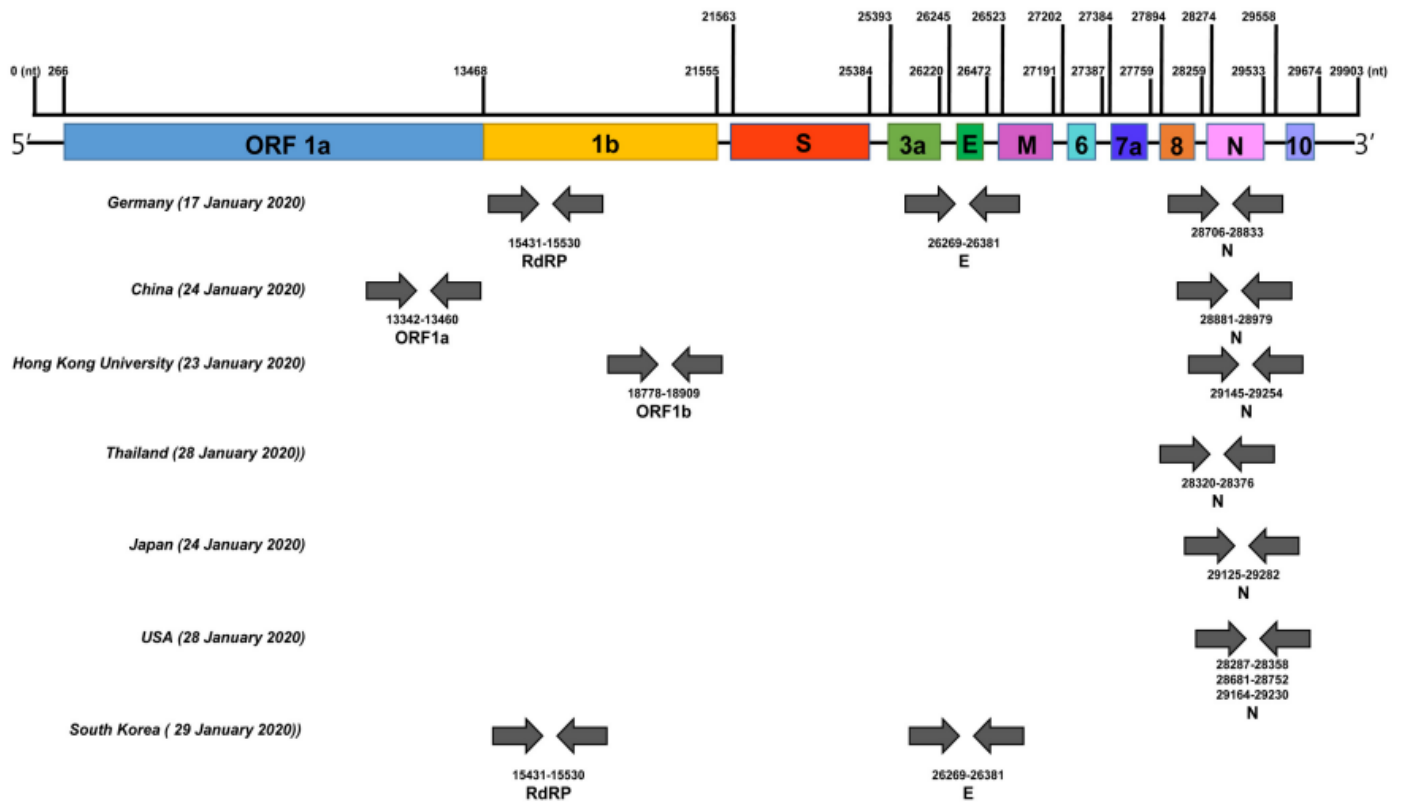


Figura 5. Diagrama representativo que muestra los conjuntos de cebadores de diagnóstico actualmente disponibles en el genoma del SARS-CoV-2 (65).

Leyenda: Los números representan posiciones del genoma de acuerdo con el aislado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1. Cada juego de cebadores, para el diagnóstico, fue indicado por flechas grises.

Hoy día se han desarrollado otras técnicas para el diagnóstico de los SARS-CoV-2, incluidos otros *Betacoronavirus*. La amplificación isotérmica (LAMP) que presenta una alta eficiencia, ya que, amplifica con alta especificidad y sensibilidad el ARN. Es un ensayo muy rápido y no se necesitan reactivos y equipos de alto costo. También se cuenta con la detección de ácidos nucleicos a través de CRISPR-Cas13a/C2c2, que ha permitido identificar amplicones dianas con probes fluorescentes, luego de la amplificación por la RCP-TR o LAMP, con gran exactitud y sensibilidad en el diagnóstico de la COVID-19.

III.4.2 Diagnóstico serológico

Los ensayos serológicos que detectan los 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 (69). 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 utilizarse con cautela y no deben utilizarse por sí solas como medio de diagnóstico para identificar casos agudos en la atención clínica o con fines de localización de contactos (70).

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 (71).

Ya se dispone de pruebas comerciales y no comerciales que miden los Ac aglutinantes (inmunoglobulinas totales (Ig), IgG, IgM, y/o IgA en diferentes combinaciones) utilizando diversas técnicas, entre ellas el inmunoensayo de flujo lateral, el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y el inmunoensayo de quimioluminiscencia (ECLIA). Se han publicado varias validaciones y revisiones sistemáticas de estos ensayos (72).

III.5 Evaluación de los diagnosticadores

Contar con diagnosticadores con alta sensibilidad y exactitud es un requisito indispensable en cualquier sistema de salud. Para su empleo se necesita demostrar que los mismos responden al propósito por el cual fue diseñado. Para ello no basta solamente evaluar las características funcionales en las propias instalaciones, sino que es necesario que un laboratorio no comprometido con el mismo realice una adecuada evaluación de desempeño del diagnosticador. Es indispensable comprobar las características descritas para el diagnosticador y emitir un informe donde se exponga los resultados del estudio (12).

Actualmente la base reguladora para los diagnosticadores no contiene ningún documento específico para llevar a cabo la evaluación de desempeño. En cuanto a los requisitos específicos según los diferentes tipos de diagnosticadores no están descritos. En la regulación 47/2007 dictaminada por el CECMED se hace referencia a una serie de definiciones, requisitos y procedimientos que guían tanto al fabricante como al laboratorio clínico para evaluar el desempeño de los diagnosticadores que se utilizan en el Sistema Nacional de Salud, ya sean de producción nacional o de importación. Además debe ser utilizada por el fabricante durante la etapa de diseño y desarrollo del diagnosticador (12).

Para evaluar el desempeño de los diagnosticadores se deben cumplir una serie de requisitos generales como:

1-El diagnosticador se evaluará bajo las condiciones en que será utilizado. Se tendrá en cuenta diversos factores (muestras biológicas, analistas, equipos, condiciones ambientales e instalaciones).

2-La evaluación del funcionamiento o desempeño se realizaran teniendo en cuenta muestras de la población. Se debe considerar en qué tipo de muestra biológica se realiza la determinación (orina, saliva, sangre, suero, plasma, heces entre otras).

3- Para la toma de muestras se tendrán en cuenta las variables biológicas o fisiológicas que son componentes de la variabilidad.

4- Las características del desempeño que se evaluarán durante el estudio, serán aquellas que se consideren de utilidad para evaluar el desempeño del diagnosticador, por lo que se debe considerar el tipo de ensayo (cualitativo o cuantitativo) y la aplicación del producto.

5- Si se identifican resultados discrepantes de un ensayo durante una evaluación, deberán resolverse hasta donde sea posible.

6-Los resultados de los estudios de la evaluación del desempeño deberán ser analizados utilizando métodos estadísticos apropiados. También el personal que lleve a cabo la evaluación deberá tener conocimiento y cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio clínico.

En cuanto al desempeño diagnóstico o clínico, se evalúan características de desempeño que implican un número de muestras biológicas estadísticamente significativas. Este tipo de estudio es necesario para demostrar la relación entre el resultado y la condición clínica del paciente. Durante la epidemia de COVID-19 en Cuba, se introdujo al país una serie de diagnosticadores para detectar la presencia del SARS-CoV-2 causante de esta enfermedad.

III.5.1 Diagnóstico mediante detección de Ag

Las PRD-Ag detectan componentes estructurales del virus (tales como proteína S, proteína N), presentes durante etapas tempranas de la infección en muestras de secreciones nasofaríngeas (7). Teóricamente el Ag viral es un marcador específico del virus y precede a la aparición de los Ac en pacientes infectados, por lo que la detección del Ag viral puede servir como una prueba rápida y menos costosa para diagnosticar tempranamente a personas infectadas (73,8).

La OMS ha publicado recomendaciones sobre el uso de PRD-Ag durante la pandemia de COVID-19 y ha revertido recomendaciones anteriores que instaban a los países a no usar pruebas de inmunodiagnóstico, que incluían pruebas de Ag y Ac. En septiembre de 2020, la OMS recomendó una sensibilidad mínima del 80% y una especificidad del 97% para las pruebas de Ag, en comparación con una prueba molecular. En este sentido se han publicado varios informes con respecto al rendimiento de los ensayos rápidos de Ag disponibles comercialmente en Alemania (74), India (75), Italia (76), España (77), Tailandia (78) y Estados Unidos (79). Todos los resultados indicaron que la sensibilidad de las pruebas era apropiada (70,6% -100%) y la especificidad alta (96% -100%).

Los resultados de un metanálisis de artículos publicados mostró que la sensibilidad y especificidad promedio fue del 56,2% (95% IC: 29,5% a 79,8%) y 99,5% (IC 95%: 98,1% a 99,9%) respectivamente (80). Es por ello que en su guía provisional más reciente, la OMS reconoce que a pesar de tener una sensibilidad menor que las pruebas moleculares, las pruebas de Ag ofrecen la posibilidad de una detección rápida y económica del SARS-CoV-2 en individuos que tienen cargas virales elevadas y, por lo tanto, tienen un alto riesgo de transmitir la infección a otras personas (11,81).

Estudios clínicos referentes al período infeccioso de los pacientes con COVID-19, han reportado que el virus se puede multiplicar en los pacientes dentro de los primeros 8 días después de la aparición de los síntomas. Este hallazgo corresponde a las recomendaciones de los fabricantes de que las PRD-Ag se pueden utilizar dentro de los primeros 5-7 días después de la aparición de los síntomas. La amplia disponibilidad de PRD-Ag y el tiempo de resultado rápido ofrecen la promesa de realizar pruebas de manera eficiente a un gran número de personas en entornos comunitarios para garantizar ambientes seguros para la reanudación de actividades, que son importantes por razones sociales, educativas y económicas. La consideración cuidadosa de los valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN respectivamente), así como la especificidad y sensibilidad calculados a partir del desempeño de la prueba y la prevalencia estimada de la infección, son cruciales para sopesar los riesgos y las consecuencias de los resultados: falsos positivos y falsos negativos (81).

Organizaciones comerciales y de investigación de todo el mundo han desarrollado nuevos inmunoensayos de Ag virales como pruebas de diagnóstico para la infección por SARS-CoV-2. Desde los inmunoensayos con dispositivo de flujo lateral, los ensayos ELISA, hasta los ensayos basados en inmunofluorescencia (IFA), se encuentran en el mercado con el objetivo de ofrecer una alternativa viable, rápida y barata para el diagnóstico de la COVID-19.

III.5.2 Utilidad y limitaciones de los ensayos rápidos para el diagnóstico de la COVID-19

Las pruebas rápidas de diagnóstico de la COVID-19 constituyen en la actualidad uno de los grandes retos en relación a esta pandemia y su objetivo fundamental es proporcionar un diagnóstico fiable y seguro de esta enfermedad. Para cumplir dicho objetivo, la optimización de los nuevos ensayos, así como una mejor comprensión de su utilidad y limitaciones, constituyen retos esenciales. La Fig. 6 representa un gráfico en el que se expresan las probabilidades de detección en función de los diferentes tipos de pruebas y del tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas asociados a la enfermedad (82). Mediante este podemos analizar el momento idóneo para el empleo de un método diagnóstico u otro.

En la Fig. 6 se puede observar que en la fase muy inicial del cuadro (unos días antes de aparecer la clínica y hasta unos 5-7 días después) los nuevos ensayos de Ag tienen utilidad para detectar la infección, haciéndolo con una fiabilidad muy aceptable en la actualidad. Sin embargo, presentan como limitación importante que son menos precisas que la RCP-TR al requerir de mayor cantidad de carga viral para positivarse. Como principales ventajas se citan el que se obtiene un resultado inmediato y a un coste mucho más reducido (83).

En relación a las pruebas serológicas o de Ac, al medir proteínas asociadas a la respuesta inmune frente al virus requieren de cierto tiempo para positivarse (sobre todo a partir del día 14 de la aparición de signos) como muestra la Fig. 6, por lo tanto, no tienen utilidad para el diagnóstico de la enfermedad activa. Los resultados de los ensayos serológicos varían ampliamente entre unos y otros grupos de pruebas (como entre pacientes con enfermedad leve y pacientes con enfermedad moderada a grave, o en pacientes jóvenes frente a pacientes de edad), el momento en que se realiza la prueba y la proteína viral objetivo.

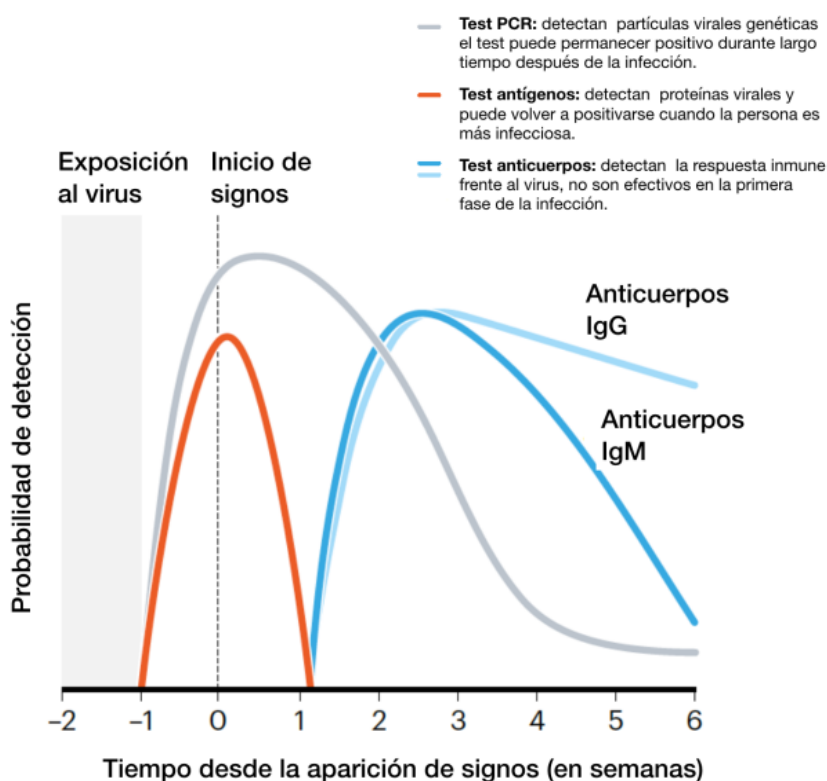


Figura 6. Representación gráfica de las probabilidades de detección en función de los diferentes tipos de ensayos y del tiempo transcurrido desde la aparición de síntomas (82).

En las pruebas de detección de anticuerpos para el coronavirus también pueden producirse reacciones cruzadas con otros agentes patógenos, entre ellos otros coronavirus humanos (84), o con afecciones preexistentes (por ejemplo, embarazo, enfermedades autoinmunes) y así obtenerse resultados falsos positivos. Esta constituye una de las mayores limitaciones del uso de estas pruebas.

Dentro de las limitaciones que presenta la RCP-TR se encuentra el elevado costo de la técnica, el requerimiento de personal calificado para el desarrollo de los ensayos, así como que la colecta de las muestras debe realizarse en la forma y momento apropiados, lo que influye en la carga viral (68). Otra restricción muy importante es la relacionada con las propiedades de los ensayos diagnósticos COVID-19 actuales, en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos

positivo y negativo. Desgraciadamente, en la actualidad aún no se dispone de suficiente información de calidad para muchas de estas pruebas. Especialmente relevante es el hecho de que mucha de la información disponible sobre los valores de fiabilidad de las mismas se ha obtenido en un contexto determinado, habitualmente hospitalario o de Atención Primaria (85).

III.6 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. Hasta mayo de 2023 se han reportado en Cuba, 1 millón 113 mil 400 y 8530 fallecidos (86). Analizando el impacto de estas acciones en cifras, se advierte que Cuba ha registrado inferiores cifras de casos diagnosticados por millón de habitantes y de tasas de fallecidos por millón de habitantes 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, entre otras ha sido esencial para la confección, implementación y actualización 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, y el desarrollo de investigaciones dirigidas a fortalecer el diagnóstico y a ofrecer un mayor conocimiento de la enfermedad y la epidemia en el país (87-89).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo con componentes analíticos para proporcionar evidencias científicas sobre la efectividad del empleo de estuches de detección rápida de Ag SARS-CoV-2 como método de diagnóstico de esta enfermedad. Debemos destacar que cada estuche a evaluar se realizó en diferentes condiciones y en distintos momentos de la pandemia en Cuba.

IV.1 Universo de estudio

El universo de estudio estuvo conformado por muestras de individuos sospechosos de una IRA y contactos directos de casos confirmados con SARS-CoV-2, que asistieron a las consultas habilitadas para la detección primaria a pacientes COVID-19 en las siguientes instalaciones de salud pública: Hospital del IPK, Policlínicos Elpidio Berovides, Cristóbal Labra y Aleida Hernández todos pertenecientes al municipio de La Lisa. Además, de los Policlínicos Ramón González Coro y Carlos Manuel Portuondo del municipio Marianao, así como en el Centro de aislamiento Vocacional Lenin. Se incluyeron un grupo de trabajadores del IPK sin síntomas ni signos de IRA como controles negativos. Esta evaluación fue ejecutada en el período comprendido de julio a octubre de 2021 y en los meses de enero a febrero de 2022.

IV.2 Muestras

Para evaluar los Estuches de Detección Rápida de Ag SARS-CoV-2, utilizaron muestras de exudado nasofaríngeo, nasal y orofaríngeo en el lugar donde se ubicó el paciente, utilizando los insumos de cada estuche y además se colectaron muestras de exudado nasofaríngeo en medios de transporte viral para realizar la RCP-TR. Estas últimas se procesaron en 24 horas después de su colección para realizar la prueba confirmatoria. La evaluación se realizó en las consultas médicas primarias de las diferentes entidades de Salud Pública, luego de que el médico a cargo realice un diagnóstico presuntivo. Los locales destinados para llevar a cabo el estudio estuvieron ventilados y con excelente iluminación. El personal que realizó la toma de muestra, mantuvo una higiene adecuada, además del uso de los equipos de protección. Los desechos fueron colectados en bolsas para uso de material biológico.

El estudio se llevó a cabo en diferentes sitios de Salud: Hospital del IPK (n=450), Policlínico Elpidio Berovides (n=114), Cristóbal Labra (n=324) y Aleida Hernández (n=137) todos pertenecientes al municipio de La Lisa. Además, de los Policlínicos Ramón González Coro (n=20) y Carlos Manuel Portuondo (n=49) del municipio Marianao, así como en el Centro de aislamiento Vocacional Lenin (n=29). Para un total de 1123 muestras independientemente del día de inicio de los síntomas y 811 colectadas en los primeros cinco días de aparición de los síntomas.

Según el total de muestras analizadas por cada prueba rápida evaluada se dividen en: *COVID-19 Antigen Rapid Test (Colloidal Gold)*, *JoinStar* (n=106), *COVID-19 ANTIGEN RAPID TESTING KIT (Colloidal Gold)* (n=73), *ONE Step Rapid Test COVID-19 Antigen Rapid Test Kit (Swab)* (n=76), *COVID-19 Antigen Test Gmate* (n=69), *Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Rapid Test Kit Jinwofu* (n=86), *Rapid SARS-CoV-2 Antigen Test Card, MP* (n=78), *Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Test Kit, REALY TECH* (n=62), *SARS-CoV-2 Antigen Self-Test Nasal (ROCHE)* (n=57), *SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Nasal (ROCHE)* (n=58), *Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Detection Kit, AVIOQ* (n=72), *Oralwell COVID-19 Antigen Rapid Saliva Test Device* (n=68), *Novel Coronavirus (SARAS-CoV-2) Antigen Detection Kit, CORE TEST* (n=82), *Novel Coronavirus (SARAS-CoV-2) Antigen Detection Kit y Rapid Response* (n=59).

Dos de los Estuches de Detección Rápida de Ag SARS-CoV-2 (Standard Q y F), se evaluaron a partir de muestras con resultados negativos y positivos por RCP en tiempo real.

- Panel de muestras de exudado nasofaríngeo negativas al SARS-CoV-2 mediante RCP-TR por los estuches SENTINEL y RIDA. Se emplearon 68 muestras de pacientes pertenecientes a diferentes criterios clínico-epidemiológicos y de laboratorio diagnosticados por la RCP-TR procedentes del diagnóstico del SARS-CoV-2 que realiza el IPK.

- Panel de muestras de exudado nasofaríngeo positivas al SARS-CoV-2 mediante RCP-TR por los estuches SENTINEL y RIDA. Se emplearon 109 muestras de pacientes pertenecientes a diferentes criterios clínico-epidemiológicos y de laboratorio diagnosticados por la RCP-TR procedentes del diagnóstico del SARS-CoV-2 que realiza el IPK.

IV.2.1 Definición útil

Sospechosos: Persona que cumple los criterios clínicos y epidemiológicos de estar infectados por SARS-CoV-2. 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. Dentro de los criterios epidemiológicos se encuentran: haber residido o trabajado en una zona de alto riesgo de transmisión del virus en algún momento del período de 14 días anterior a la aparición de los síntomas; haber residido en una zona en la que haya transmisión comunitaria o haber viajado a ella en algún momento del período de 14 días anterior a la aparición de los síntomas.

IV.3 Diagnóstico molecular. RCP-TR

Se analizaron las muestras a partir de la RCP-TR STAT-NAT COVID-19 MULTI de la casa comercial SENTINEL DIAGNOSTICS, Milán, Italia. Este ensayo amplifica simultáneamente dos genes del SARS-CoV-2: RdRP y Orf1b. Los cebadores son específicos además el gen RNAasa P Humana, el que se utiliza como control interno. La RCP-TR STAT-NAT COVID-19 MULTI cuenta con 10 ciclos silentes, en donde la detección de fluorescencia está apagada, de ahí que al Ct (ciclo de la RCP al cual se comienza a detectar la señal fluorescente por encima de la señal de fondo, *cycle threshold* por sus siglas en inglés) resultante se le debe añadir 10 ciclos de amplificación más con el propósito de comparación con otros ensayos de RCP-TR.

Así mismo se realizó el diagnóstico del gen de la envoltura (E) de SARS-CoV-2 mediante el empleo del estuche RIDA®GENE SARS-CoV-2 (R-Biopharm, Alemania), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este método utilizó la tecnología de sondas *TaqMan* y está basado en el protocolo desarrollado por la universidad *Charité* de Alemania, recomendado por la OMS (64). Se utilizaron los controles positivo, negativo e interno incluidos en el estuche. El límite de detección del ensayo RIDA®GENE, utilizando *LightCycler*® 480II, es > 50 copias / reacción. Las muestras con un valor de CT de > 35 están dentro del límite de detección. Es de

señalar que el límite de detección de la RCP-TR depende de la matriz de la muestra, el termociclador y la extracción de ARN y puede variar en consecuencia (90).

IV.3.1 Condiciones de la colección y procesamiento de las muestras

Todas las muestras que se utilizaron provenientes de medio de transporte viral, se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización. Las mismas se procesaron en condiciones de Bioseguridad Nivel II, utilizando cabina de seguridad biológica Clase II para realizar el paso de adición y dilución de las muestras en los tubos que contienen la solución de extracción viral. Para los ensayos donde la colección de las muestras se realizó en los Centros de Aislamientos, el personal encargado de la colección y realización del ensayo contó con toda la protección necesaria, como trajes impermeables, caretas, máscaras y guantes adecuados para esta tarea. En la tabla 1 se describen los ensayos inmunocromatográficos para detectar antígenos del SARS-CoV-2.

Tabla 1. Descripción de los ensayos inmunocromatográficos evaluados

Producto/Nombre	Casa Comercial	País
<i>Antigen Rapid Test (Colloidal Gold) JOINSTAR</i>	<i>Beijing Lepu Medical Technology</i>	China
<i>Oralwell COVID-19 Ag Rapid Saliva Test Device.</i>	<i>Jiangsu Well Biotech</i>	China
<i>Antigen Rapid Testing KIT</i>	<i>Zhongshan Bio-tech,</i>	China
<i>ONE Step Rapid Test (4 lotes)</i>	<i>Safecare Biotech</i>	China
<i>Antigen Rapid Test Kit</i>	<i>Beijing Jinwofu Bioengineering Technology</i>	China
<i>Rapid SARS-CoV-2 Antigen Test Card, MP</i>	<i>Jiangsu Hanheng Medical Technology</i>	China
CASETE DE PRUEBA RAPIDA DE ANTIGENO DE NUEVO CORONAVIRUS (SARS-COV-2) HISOPO REALY TECH	REALY TECH	China
<i>SARS-CoV-2 Antigen Self Test Nasal</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH</i>	Alemania
<i>SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Nasal</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH</i>	Alemania
<i>Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Detection Kit (Colloidal Gold)</i>	<i>Avioq Bio-tech</i>	China
CORE TEST	CORE TECHNOLOGY	China
RAPID RESPONSE	BTNX Inc	Canadá
<i>Gmate</i>	<i>Philosys, Co</i>	República de Corea
STANDARD Q COVID-19 AG TEST	SD BIOSENSOR	República de Corea

V.4 Ensayos inmunocromatográficos

IV 4.1 Fundamento de los ensayos inmunocromatográficos para la detección de Ag SARS-CoV-2.

Los estuches inmunocromatográficos de detección rápida de Ag SARS-CoV-2 evaluados, presentan dos líneas prerecubiertas: la línea de control interno (C) y la línea de ensayos (T) en la superficie de una membrana de nitrocelulosa. Ni la línea de control ni la línea de ensayos son visibles en la ventana de resultados antes de aplicar las muestras. Dicha membrana estará recubierta por anticuerpos monoclonales, el Ac monoclonal anti-SARS-CoV-2 estará revestido en la región de la línea de ensayos y el Ac monoclonal anti-control está revestido en la región de la línea de control. Durante el ensayo, el Ag SARS-CoV-2 correspondiente a la proteína N de la muestra, interactuara con el Ac monoclonal anti-SARS-CoV-2 conjugado con partículas de color para formar un complejo Ag-Ac con partículas de color. Este complejo migrara en la membrana a través de la acción capilar hasta la línea de ensayos, se une al Ac monoclonal anti-SARS-CoV-2. La línea de ensayos de color resulta visible en la ventana de resultados cuando se detecta la presencia de Ag específicos de SARS-CoV-2 en la muestra. La intensidad de la línea de ensayos de color dependerá de la cantidad de antígeno específico de SARS-CoV-2 presente en la muestra (91, 92).

IV.4.1.1 Procedimiento técnico e interpretación de los resultados

- 1.- Preparación del tubo de extracción.** Se añadió la solución de extracción en el tubo de extracción suministrado por cada ensayo.
- 2.- Toma de la muestra de exudado nasofaríngeo.** Se insertó un hisopo estéril en la fosa nasal del paciente hasta alcanzar la parte posterior de la nasofaringe. Se girará la torunda suavemente, de 3-a 4 veces contra la superficie nasofaríngea.
- 3.- Extracción de la muestra (ácido nucleico).** Se introdujo el hisopo conteniendo la muestra de exudado nasofaríngeo en la solución del tubo de extracción, y se agitará al menos 10 veces, rotando el hisopo en las paredes interior del tubo, hasta que la muestra se disuelva lo más posible. En el caso en el que se emplearon los medios de transporte virológicos se

añadirá un volumen de medio determinado, en dependencia de las recomendaciones del fabricante para cada ensayo, en la solución del tubo de extracción.

4.- Aplicación de la solución que contiene la muestra. Se colocó la tira reactiva en una superficie plana y se aplicaron de 1 a 3 gotas, en dependencia de las instrucciones del ensayo, de muestra extraída en un ángulo de 90° grados al pocillo de la muestra de la tira reactiva.

5.- Lectura e interpretación de los resultados. La lectura de los resultados se realizó al cabo de 15-30 minutos. Para la interpretación de los resultados, la lectura siempre se realizó por 2 observadores teniendo en cuenta la subjetividad de la prueba sobre todo cuando la positividad es muy tenue, pueden existir muestras con baja carga viral por lo que es importante el criterio de los dos observadores (Figura 7).

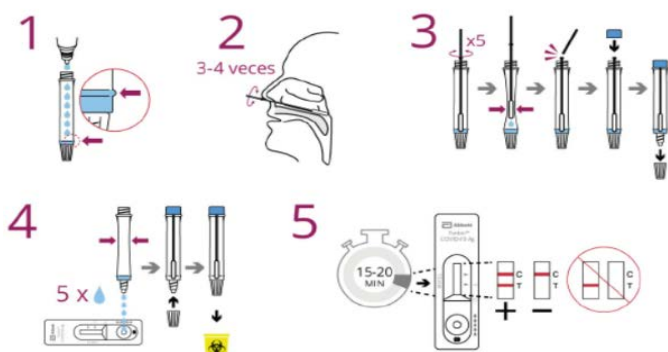


Figura 7. Procedimiento técnico de los ensayos inmunocromatográficos de detección rápida de Ag del SARS-CoV-2 e interpretación de los resultados (91).

RESULTADO NEGATIVO: Si la zona de control (C) muestra una línea de color rojo, mientras que la zona de prueba (T) no evidencia ningún color, significa que no existe presencia antigénica para SARS-CoV-2 y el resultado es negativo.

RESULTADO POSITIVO: Tanto la zona de prueba (T) como la zona de control (C) muestran líneas de color rojo, indicando positividad para el Ag de SARS-CoV-2.

RESULTADO NO VÁLIDO: Si la línea de control (C) no aparece (parcialmente roja), el resultado se considerará no válido, aunque en la zona de prueba (T) se evidencie una línea de

color rojo. Estos resultados no válidos pudiera deberse a un volumen de muestra insuficiente o técnicas de procedimiento incorrectas.

Para el diagnosticador de saliva (autoprueba) en la detección del SARS-CoV-2, el paciente debe lavarse las manos previamente, no debe comer, tomar ni fumar diez minutos antes de aplicarse la prueba. En la colecta de la muestra se debe colocar la parte superior del dispositivo en la boca, suavemente apretar contra la lengua alrededor de 1-2 minutos haciéndolo girar aproximadamente 10 veces. Siempre verificar que la línea estuvo presente en la zona C, si no se divisa, volver a repetir el mismo procedimiento. La lectura de los resultados se realizará entre 10 y 15 minutos (93). Para la autoprueba nasal, el paciente debe lavarse las manos, girar el hisopo de 3-4 veces en ambas fosas nasales y descargar el hisopo en el tubo de extracción hasta que se disuelva la muestra totalmente. Luego se aplican de 1-3 gotas en el casete, se espera de 15-30 min para la interpretación de los resultados (94).

IV.5 Ensayo de inmunofluorescencia

Descripción del *STANDARD F COVID-19 AG(IFA)* para detectar antígenos del virus SARS-CoV 2 en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción del ensayo de inmunofluorescencia evaluado

Producto/Nombre	Casa Comercial	País
-----------------	----------------	------

<i>STANDARD F COVID-19 AG (IFA)</i>	<i>SD Biosensor Inc., Gyeonggi-do</i>	República de Corea
-------------------------------------	---------------------------------------	--------------------

IV.5.1 Fundamento del ensayo Standard F para detectar SARS-CoV-2 (IFA)

La PRD-Ag *Standard F SARS-CoV-2 (IFA)*, emplea tecnología de IFA diseño o tipo sándwich. Este ensayo de diagnóstico rápido por IFA es un método de inmunodetección, donde el Ac monoclonal (Ac: anti-SARS-CoV-2/anti-proteína N) conjugado con reactivos de detección en el tampón, se une al Ag (Ag: proteína N) en la muestra de exudado nasofaríngeo, lo que forma un

complejo Ag-Ac, que se transfiere a la matriz de nitrocelulosa para capturarse por el otro Ac monoclonal anti-SARS-CoV-2 (anti-proteína N) inmovilizado en la tira de prueba. Una mayor concentración de Ag en la muestra, mayor es el complejo Ag-Ac que se forma, dando lugar a una mayor intensidad de la señal de fluorescencia en el Ac de detección. El lector valora unos niveles de corte preestablecidos para ofrecer un resultado cualitativo. Por tanto, la IFA es un inmunoensayo que permite la detección cualitativa (positivo/negativo) del Ag N del SARS-CoV-2 (95).

IV.5.1.1 Procedimiento técnico e interpretación de los resultados

1.- **Preparación del analizador RTR-FS100.** Se encendió y preparó el analizador de inmunoensayo de fluorescencia RTR-FS100.

2.- **Extracción de la muestra.** Se agregaron al tubo de reacción que contiene el Ac conjugado liofilizado, 80µL del medio de transporte viral (BIOCEN, Cuba) que contenía la muestra del paciente más 20µL del Buffer de Extracción. Se mezcló completamente agitando con vórtex y se esperó un tiempo de 5 minutos para añadir el preparado en el casete de prueba.

3.- **Aplicación de la solución que contiene la muestra en el casete.** Se añadieron lentamente, 70µL de lisado de muestra del Tubo de reacción en el pocillo de muestra del casete de prueba y espero un tiempo estimado de 15 minutos antes de comenzar la lectura.

4.- **Lectura e interpretación de los resultados.** Se insertó el casete en la ranura del analizador de inmunoensayo de fluorescencia RTR-FS100 y se presionará "Leer" para medir la señal fluorescente (Tabla 3).

Tabla 3. Interpretación de los resultados del *STANDARD F COVID-19 AG (IFA)* según las orientaciones del fabricante.

<i>Lectura del Monitor</i>	<i>Interpretación</i>
POSITIVO	Resultado presunto positivo
NEGATIVO	Resultado presunto negativo
INVÁLIDO	Error, volver a realizar la prueba.

IV.6 Análisis estadístico

Análisis del desempeño: para hacer la evaluación se utilizaron métodos estadísticos según la REGULACION No. 47-2007 REQUISITOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS DIAGNOSTICADORES del CECMED (12). Este análisis se realizó para cada ensayo, utilizando todas las muestras y estratificándolas según criterios clínico-epidemiológicos y de laboratorio (casos sospechosos).

Sensibilidad clínica: Es el porciento 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: Es el porciento 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.

Especificidad analítica: Se refiere al número de muestras conocidas que contengan componentes comúnmente encontrados en muestras de pacientes y que tengan semejanza con el analito objeto de análisis (Reactividad cruzada).

Prueba de concordancia: En este caso se expresarán los datos como porciento de exactitud. Se definirá para este tipo de producto en específico el término Sistema exacto o Exactitud diagnóstica, el cual se utilizará para caracterizar el desempeño total del sistema de medición en términos de que se obtengan resultados exactos, pues solo se necesita una simple característica funcional: la comparación de la utilidad clínica del diagnosticador. Esta exactitud se determinará de la siguiente forma: $(\text{verdaderos positivos} + \text{verdaderos negativos} / \text{total (positivos} + \text{negativos)})$ y es la única característica funcional que generalmente se incluye en el rotulado del diagnosticador.

Índice Kappa. Los índices de concordancia esperados y observados. Para ello se emplearán los resultados de todas las muestras analizadas en los estudios de sensibilidad clínica y especificidad clínica y analítica. Se calcula de la siguiente forma:

$$K = (po - pe) / (1 - pe)$$

Donde po y pe , el porcentaje total de concordancias y el de concordancia esperado por azar, respectivamente tienen la siguiente forma:

$$po = (a + d) / n$$

$$pe = (P + N) / n$$

P , que es la concordancia en el caso de positivos se define como:

$$P = \left[\frac{(a + b)}{n} * \frac{a + c}{n} \right] * n$$

Y N que es la concordancia en el caso de negativos se calcularía como:

$$N = (c + d) - [(a + c) - P]$$

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

KAPPA	GRADO DE ACUERDO
<i>< 0</i>	<i>Sin acuerdo</i>
<i>0 – 0.2</i>	<i>Insignificante</i>
<i>0.2 – 0.4</i>	<i>Bajo</i>
<i>0.4 – 0.6</i>	<i>Moderado</i>
<i>0.6 – 0.8</i>	<i>Bueno</i>
<i>0.8 - 1</i>	<i>Muy bueno</i>

Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad que tiene un individuo de estar infectado o enfermo, cuando el resultado del ensayo ha sido positivo o reactivo. Es la proporción de individuos con resultados positivos o reactivos correctamente diagnosticados por el ensayo. Tiene en cuenta la sensibilidad y especificidad clínica de un diagnosticador y además varía en dependencia de la prevalencia de la infección en el área donde se usará y en un tiempo determinado.

Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad de no estar infectado o enfermo que tiene un individuo, cuando el resultado del ensayo ha sido negativo o no reactivo. Es la proporción de individuos con resultados negativos o no reactivos correctamente diagnosticados por el ensayo. Tiene en cuenta la sensibilidad y especificidad clínica de un diagnosticador y además varía en dependencia de la prevalencia de la infección en el área donde se usará y en un tiempo determinado.

Para el cálculo de estos parámetros se realizaron bases de datos en Microsoft Excel y se utilizara la aplicación LabCal v1.0.1 (96). A todos estos parámetros se les calculara el intervalo de confianza al 95% (IC 95%), considerándose estadísticamente significativo a la $p < 0.05$.

IV.7 Aspectos éticos de la investigación.

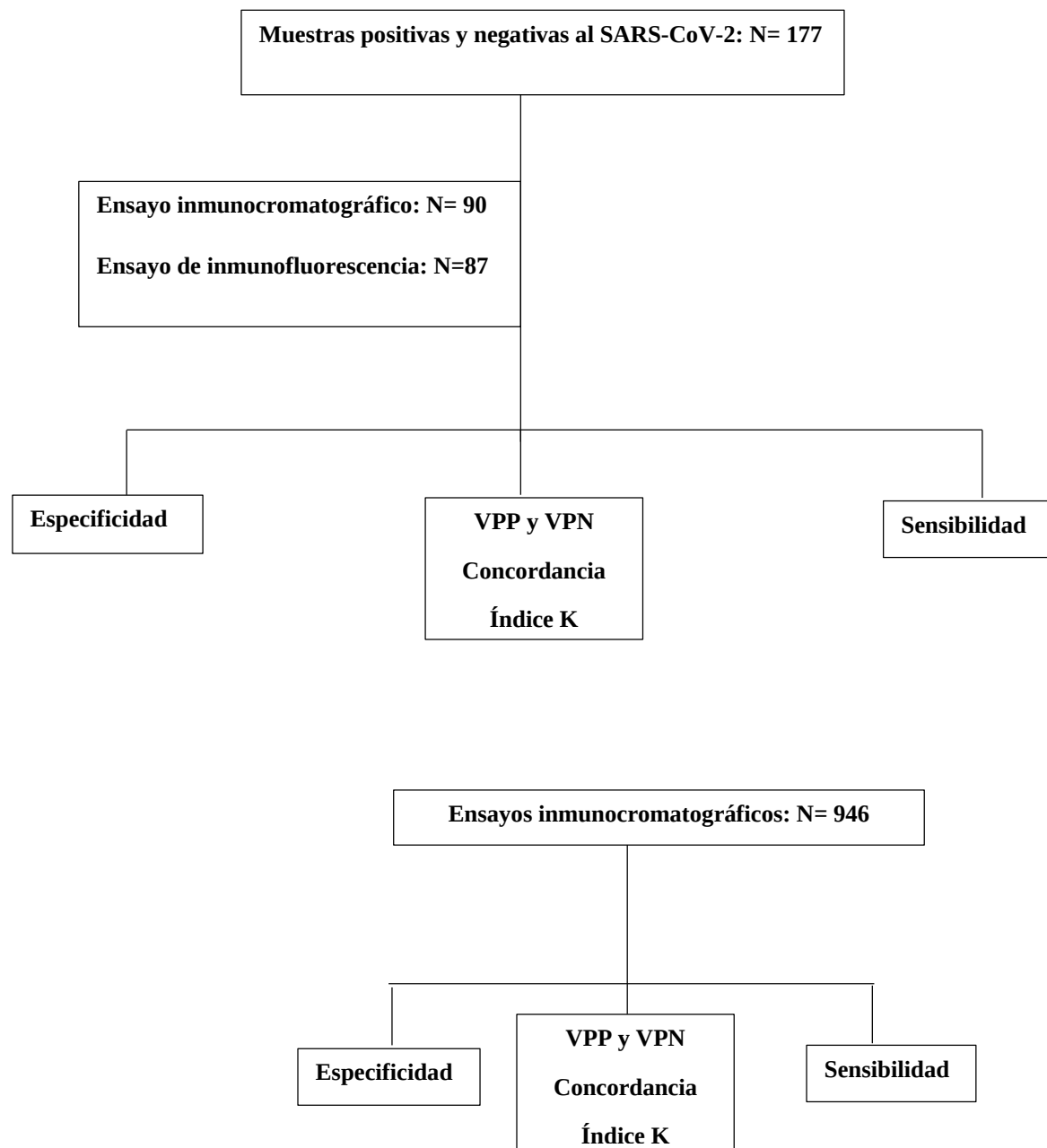
El presente estudio se desarrolló según las normas de la Declaración de Helsinki y las Guías Éticas Internacionales para estudios biomédicos en sujetos humanos (CIOMS, del inglés, *Council for International Organizations of Medical Sciences*).

Todos los participantes tendrán el compromiso de salvaguardar la confidencialidad de los individuos positivos al SARS-CoV-2, cuyas muestras fueron incluidas en la evaluación. Las buenas prácticas se cumplieron 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. La información y resultados de los pacientes fueron guardados en una base de datos codificados, donde solo tendrán acceso el jefe del Laboratorio de Vigilancia de virus respiratorios y la jefa del proyecto en estudio. A los pacientes incorporados se les enviaron los resultados de la técnica de referencia dentro de las 24-48 horas de colectada la muestra.

Una vez culminada la investigación se conservó la información en formato digital e impreso. Los resultados que se obtuvieron fueron informados a las instancias pertinentes del MINSAP, por lo que contribuyó a la toma de decisiones en la compra de diagnosticadores comerciales para el diagnóstico del SARS-CoV-2.

IV.8 Diagrama de Flujo

Para una mejor comprensión se muestra un diagrama de flujo que resume la estrategia seguida en cada ensayo.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. Resultados y discusión

La pandemia de COVID-19 causada por el SARS-CoV-2, ha representado una amenaza para la salud pública a nivel mundial (15). Cuba ha transitado por varios rebrotes de COVID-19 desde el diagnóstico de los primeros casos, reportados el 11 de marzo de 2020 (97). Cada uno de estos rebrotes ha sido más severo y con un aumento considerable de las tasas de morbi-mortalidad dentro del contexto de la enfermedad a nivel global. El aumento exponencial de estas tasas demuestra la importancia de contar con un diagnóstico temprano del agente etiológico de la COVID-19 como una herramienta imprescindible para el manejo de la enfermedad, no solo a nivel individual, sino como fuente de información útil para la conducción de la pandemia.

Los virus son los agentes causales de más del 70% de los casos de IRA, constituyen la primera causa de muerte en niños menores de cinco años. El presente siglo se presenta como una era de enfermedades emergentes y reemergentes con un riesgo para los seres humanos, las IRA presentan un potencial alto de transmisión de persona a persona de ahí su importancia desde el punto de vista clínico. Son la primera causa de muerte dentro de las enfermedades infecciosas y primera causa de consulta a los servicios de salud y de hospitalización en menores de cinco años.

La prueba de referencia para el diagnóstico de la COVID-19 es la RCP-TR, técnica que permite la amplificación de varios genes del SARS-CoV-2. Esta prueba contiene una eficiencia analítica para el diagnóstico de COVID-19 $\geq 96\%$. Dentro de dicha eficiencia se incluyen los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba (26, 66). Sin embargo este método de diagnóstico es muy costoso, requiere laboratorios con equipamientos y personal especializado, y demanda mayor tiempo para la obtención de un resultado, si la comparamos con otros métodos de diagnóstico como son las pruebas de diagnóstico rápido (68).

En este sentido el desarrollo de los nuevos ensayos de detección rápida de Ag o Ac de SARS-CoV-2 constituyen, en el contexto de una pandemia, una prioridad para el diagnóstico y para los estudios epidemiológicos. Específicamente los ensayos de detección rápida de Ag de SARS-CoV-2 proporcionan una alternativa promisorio para el diagnóstico rápido y preciso de la COVID-19. Varios reportes acerca de la efectividad analítica de estas pruebas han informado

valores de sensibilidad que varían entre un 70,6% y 100%, y una especificidad muy elevada que oscila entre un 96% y un 100% (80) .

Estos ensayos de detección rápida, permiten determinar la presencia de la proteína viral N (nucleocápside) o la S (espícula). Basándose en estudios previos la proteína N ha sido la más utilizada para el desarrollo de estos ensayos, aplicados en muestras nasales, nasofaríngeas y de saliva. La metodología de estos ensayos está basada principalmente en los inmunoensayos cromatográficos rápidos.

Los ensayos con control de calidad deben contar con documentación de certificación técnica y datos de evaluación externa. En Cuba, el CECMED establece una serie de definiciones, requisitos y procedimientos que guían tanto al fabricante como al Laboratorio clínico, en la realización de la evaluación del desempeño de aquellos métodos de diagnóstico que se utilicen en el Sistema Nacional de Salud, ya sean de producción nacional o de importación. Para que un producto de este tipo sea inscrito en el Registro Sanitario de los Diagnosticadores, es necesario que un laboratorio no comprometido con el fabricante realice una adecuada evaluación del desempeño del mismo, y que corrobore así las características del sistema diagnóstico y emita un informe con los resultados de este estudio, el cual será presentado a la Autoridad Nacional Reguladora en el Expediente de Registro correspondiente (12).

En el presente estudio, presentamos los resultados del desempeño clínico para el diagnóstico de COVID-19 de quince estuches de detección rápida de antígenos SARS-CoV-2 basados en dos principios diferentes: inmunocromatografía e inmunofluorescencia. En el mismo se empleó como técnica de referencia y confirmatoria la RCP-TR, la cual se utiliza como método diagnóstico establecido para esta enfermedad.

Para establecer el rendimiento clínico y la utilidad de los quince estuches inmunocromatográficos de detección rápida de antígenos del SARS-CoV-2 en la situación epidemiológica cubana, se llevó a cabo la evaluación de los mismos en el LNRVR del IPK. Se evaluó el PRD-Ag Standard Q a partir de un panel de muestras positivas o negativas por RCP-TR. Los otros estuches comerciales se evaluaron a partir de muestras de exudado nasofaríngeo y de saliva, utilizando los insumos y reactivos de cada estuche y colectadas directamente en diferentes policlínicos, hospitales y centros de aislamientos. Paralelamente se tomó una segunda muestra a cada paciente para el diagnóstico mediante RCP-TR. De esta forma se hizo la comparación, mediante una tabla de contingencia, entre los resultados de los ensayos rápidos y los resultados de la RCP-TR. La tabla 5 muestra los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, concordancia y coeficiente de Kappa, calculados para los ensayos inmunocromatográficos de detección rápida de Ag SARS-CoV-2 en comparación con la técnica de referencia.

Resultados y Discusión

Tabla 5. Valores de sensibilidad clínica, especificidad, VPP, VPN, concordancia e índice K para los ensayos inmunocromatográficos de Ag SARS-CoV-2 en comparación con la técnica de referencia.

PRD-Ag	N (Total)	Se% (IC 95%)	Es% (IC 95%)	VPP% (IC 95%)	VPN% (IC 95%)	Conc% (IC 95%)	Kappa (IC 95%)
<i>COVID-19 Antigen Rapid Test (Colloidal Gold), JoinStar</i>	106	72 (53-86)	97 (90-100)	92 (73-99)	89 (79-94)	90 (82-94)	0.74(0.6-0.9)
<i>COVID-19 ANTIGEN RAPID TESTING KIT (Colloidal Gold)</i>	73	82 (56-95)	98 (89-100)	93 (66-100)	95 (85-99)	95 (86-98)	0.84 (0.7-1)
<i>ONE Step RapidTest COVID-19 Antigen Rapid Test Kit (Swab)</i>	76	70 (46-87)	100 (92-100)	100 (73-99)	90 (79-96)	92 (83-97)	0.78 (0.6-0.9)
<i>COVID-19 Antigen Test Gmate</i>	69	82 (59-94)	98 (87-100)	95 (72-100)	92 (80-97)	93 (83-97)	0.83 (0.7-1)
<i>Novel Coronavirus (SARS-CoV-2)Antigen Rapid Test Kit Jinwofu</i>	86	83 (64-93)	98 (89-100)	96 (78-100)	92 (81-97)	93 (85-97)	0.84 (0.7-1)
<i>Rapid SARS-CoV-2 Antigen Test Card, MP</i>	78	68 (49-83)	94 (81-98)	88 (67-97)	81 (68-90)	83 (73-90)	0.64 (0.5-0.8)
<i>Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Test Kit, REALY TECH</i>	62	95 (74-100)	95 (82-99)	91 (69-98)	98 (85-100)	95 (86-99)	0.89 (0.8-1)
<i>SARS-CoV-2 Antigen Self Test Nasal (ROCHE)</i>	57	79 (49-94)	98 (86-100)	92 (60-100)	93 (81-98)	93 (82-98)	0.80 (0.6-1)
<i>SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Nasal (ROCHE)</i>	58	70 (47-86)	94 (79-99)	89 (64-98)	83 (67-92)	84 (72-92)	0.66 (0.46-0.87)
<i>Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Antigen Detection Kit, AVIOQ</i>	72	71 (48-88)	78 (64-88)	58 (37-76)	87 (73-95)	76 (65-85)	0.47 (0.46-0.87)
<i>Oralwell COVID-19 Antigen Rapid Saliva Test Device</i>	68	86 (56-97)	96 (86-99)	86 (56-97)	96 (86-99)	94 (85-98)	0.82 (0.65-1)
<i>Novel Coronavirus (SARAS-Cov-2) Antigen Detection Kit, CORE TEST</i>	82	78 (56-92)	56 (42-69)	41 (27-57)	87 (71-95)	62 (51-72)	0.27 (0.06-0.47)
<i>Novel Coronavirus (SARAS-Cov-2) Antigen Detection Kit, Rapid Response</i>	59	72 (53-86)	96 (79-100)	96 (77-100)	74 (56-87)	83 (71-91)	0.67 (0.48-0.86)
<i>Standard Q COVID-19 Antigen Test</i>	90	93 (83-98)	94 (77-99)	96 (87-99)	88 (71-96)	93 (86-97)	0.86 (0.74-0.97)

Leyenda: Se: Sensibilidad; Es: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; Conc: Concordancia

Al analizar el total de muestras de los catorce ensayos inmunocromatográficos evaluados, comparado con la RCP-TR del SARS-CoV-2, se obtuvo valores de sensibilidad que oscilaban en el rango entre 68 y 95%, siendo más bajo para el ensayo *MP* (68% (IC 95% 49-83)) y el de mayor sensibilidad fue el ensayo *Realy Tech* con un 95% (IC 95% 74-100). Los valores de especificidad obtenidos estuvieron entre el 56 y 100 % para estas pruebas. La prueba rápida de menor valor fue el *Core Test* y el de mejor resultado fue el *One Step*. En el presente estudio, el rango de VPP osciló entre 41 y 100%, siendo el ensayo *One Step* el de mejor resultado con un 100% (IC 95% 73-99) de probabilidad de que las muestras que dieron positivas por el método en evaluación sean verdaderamente positivas en comparación con la prueba de referencia. El de menor por ciento en cuanto a VPP fue el ensayo *Core Test* con un 41% (IC 95% 27-57%), mientras que el VPN estuvo entre los 74 y 98%, siendo más bajo para el ensayo *Rapid Response* (74% (IC 95% 56-87)). En este sentido el valor más elevado que se obtuvo fue de un 98% (IC 95% 85-100) de probabilidad de que las muestras que dieron un resultado negativo por el ensayo *Realy Tech* sean realmente negativas en comparación con la RCP-TR.

Con el propósito de analizar el grado de concordancia entre los estuches inmunocromatográficos y la técnica de referencia RCP-TR comparados en el presente estudio, se calculó el índice de Kappa. Para interpretar los resultados obtenidos nos apoyamos en la escala de valoración del índice de Kappa que se muestra en la tabla 4. Según la escala de valoración los ensayos: *Oralwell*, *Coloidal Gold*, *Gmate*, *Jinwofu*, *Realy Tech*, *Self test Nasal (ROCHE)* y el *Standard Q* tienen una concordancia muy buena, mientras que los ensayos de *JoinStar*, *MP*, *One Step*, *Rapid Antigen Test Nasal (ROCHE)* y *Rapid Response* presentaron una concordancia buena, sin embargo, el ensayo *Avioq* presentó una concordancia moderada y el *Core test* bastante débil.

En cuanto al tipo de muestra, se obtuvo valores muy buenos en la autoprueba de saliva, sin embargo en la autoprueba nasal el valor de sensibilidad fue bajo (79%). De forma general la muestra por excelencia para la detección de Ag SARS-CoV-2 es la nasofaríngea, ya que, es la faringe el sitio primario de replicación de este virus.

Los sistemas de detección rápida de Ag se diseñaron para emplearse en pacientes sintomáticos en los primeros cinco días del inicio de los síntomas. La OMS declaró que para la aceptación de un ensayo rápido en la detección de antígenos del SARS-CoV-2 durante la pandemia de COVID-19, debían obtenerse valores $\geq 80\%$ en cuanto a sensibilidad clínica y $\geq 97\%$ para la especificidad en comparación a la técnica de referencia (67). En los ensayos *Standard Q* y *Oralwell*, los valores de sensibilidad analítica sí se encontraron por encima del valor mínimo recomendado por la OMS ($\geq 80\%$) (67), no siendo así para los ensayos *Rapid Response*, *Rapid Test Nasal (Roche)*, *Avioq* y *MP* pues arrojaron valores por debajo del establecido por la OMS. Esto puede estar influenciado por el hecho de que había pacientes sintomáticos con una baja carga viral, así como casos evolutivos en los que se desconocían la fecha de inicio de los síntomas (en el caso de ser sintomáticos).

En la determinación de la especificidad analítica, las pruebas con valores más bajo fueron los ensayos *Avioq* (78%) y *Core Test* (56%). Sin embargo las demás pruebas en sentido general cumplen con el criterio establecido por la OMS.

Estas pruebas rápidas evaluadas en nuestro estudio, son aceptables para la detección del SARS-CoV-2. Las muestras son parte importante a la hora de realizar un diagnóstico de cualquier enfermedad viral, hemos obtenido valores excelentes en la evaluación de estuches donde utilizan muestras de saliva. Sin embargo hay autores que describen que este tipo de muestras no es ideal para el diagnóstico precoz de la COVID-19. También al evaluar la autoprueba nasal de la casa comercial (ROCHE), la sensibilidad obtenida en nuestro estudio no fue la esperada y existen estudios previos que hacen referencia a que este tipo de muestra no es factible para el diagnóstico de este agente viral.

En cuanto al ensayo *MP* nuestros resultados fueron más bajos que lo planteado por sus fabricantes, los cuales obtuvieron una sensibilidad clínica del 96,49% (IC del 95%: 93,11% - 99,87%) en comparación con la RCP-TR, la especificidad clínica fue del 99,07% (IC del 95%: 98,26% - 99,98%) y la concordancia fue del 98,62% (97,73% - 99,52%) (98). La evaluación del ensayo *Rapid Test Nasal (Roche)* tuvo una sensibilidad de 67%, menor que el valor obtenido por

el fabricante (89.6%), con una especificidad de 95% en comparación al 99.1% declarado por el mismo (99). Cuando evaluamos la sensibilidad de la prueba *Core test* se obtuvo un valor de 78% y un valor de especificidad de 56%, mucho más bajo que los obtenidos por el fabricante del estuche (98.1% y 99.6% respectivamente) (100).

La prueba rápida *Avioq* en nuestra evaluación arrojó valores de sensibilidad, especificidad y concordancia muy por debajo de los declarados por el fabricante (101). En el estuche *Rapid Response* se obtuvo resultados de concordancia del 83%, con un valor de sensibilidad clínica de 72% y de especificidad del 96%, valores inferiores a los obtenidos por el fabricante de 97.6%, 95.6% y 100% respectivamente (102). En el caso particular de las pruebas rápidas con muestras de saliva como el ensayo evaluado *Oralwell*, se obtuvieron valores de sensibilidad, especificidad y concordancia muy similares a los obtenidos por la casa comercial creadora de este estuche (93). En cuanto al ensayo *Standard Q* se exhibieron valores de 93% de sensibilidad contra 96.52%, y especificidad de 94% en comparación con 99.68%, descritos por el fabricante (103).

De manera general, nuestros resultados están en línea con informes anteriores sobre el rendimiento clínico de la PRD-Ag SARS-CoV-2. Se desarrolló un protocolo de validación por la sociedad microbiológica suiza, con el objetivo de evaluar 30 pruebas rápidas para detectar antígenos del SARS-CoV-2. Dentro de los ensayos evaluados se encontraba el *MP*, del cual reportaron un valor de sensibilidad de 86.3%, mayor a la obtenida en nuestra evaluación de 68% y especificidad similar en ambos estudios (104).

Para el ensayo *Rapid Test Nasal (Roche)* los autores de un estudio en Suiza obtuvieron una sensibilidad general de 85.2% y una especificidad de 100%, aunque refieren que en otros estudios la sensibilidad de esta prueba va desde 68.8% hasta 92.9%, y la especificidad de 92% hasta un 100%, concordando con los resultados obtenidos en nuestro estudio (105). En la evaluación de esta prueba rápida, un estudio realizado en Japón por Akashi et al, arrojó una sensibilidad de 72.7% (CI 95% 63-81); el valor predictivo negativo fue de 95,8%. (IC 95% 94-97) y el valor predictivo positivo y la especificidad fue de 100% (IC 95% 96-100) (IC 95% 99.5-100), respectivamente. Nuestros valores no tienen similitud con los encontrados por estos autores (106).

Resultados y Discusión

Un estudio realizado en los EUA, en el cual se evaluaron veinte estuches comerciales inmunocromatográficos para la detección rápida del SARS-CoV-2. Uno de los ensayos evaluados fue el *Oralwell*, obteniéndose valores de sensibilidad (100%, IC95% 93.8–100 vs 86%, IC95% 56-97) y especificidad (94.8%, IC95% 88.5–97.8 vs 96%, IC95% 86-99), coincidiendo con nuestros resultados en cuanto a especificidad, no así en cuanto al valor de sensibilidad. En esta evaluación se hace referencia a los resultados obtenidos por este estuche, ya que, los individuos desde sus hogares pueden realizarse la prueba obteniéndose altos porcentajes de resultados válidos. Esto incrementa la accesibilidad a las pruebas para detectar el SARS-CoV-2, y así disminuir la propagación de la COVID-19. Sin embargo, la mayor debilidad de este ensayo radica en la interpretación de los resultados por el paciente y en la apropiada toma de muestra (107).

Un estudio conducido en Bélgica, en el cual se evaluó el estuche *Avioq*, se obtuvo valores de sensibilidad de 68.8% y especificidad de 95.8%, discrepando con los resultados obtenidos en nuestro análisis. Estos autores reportaron que en el estudio se escogieron tanto individuos sintomáticos como asintomáticos (108).

McAulay et al. en EUA, al evaluar la prueba *Rapid Response*, reportó valores de sensibilidad de 95% y especificidad de 98%, en pacientes sintomáticos en los primeros 14 días de inicio de los síntomas, mientras que nosotros al evaluar el estuche en individuos sintomáticos con inicio de los síntomas en los primeros cinco días, el valor de sensibilidad fue más bajo (79%) (109).

En el caso del ensayo *Standard Q*, obtuvimos resultados muy similares a un estudio realizado en Finlandia en cuanto a la sensibilidad clínica, mientras que en cuanto a la especificidad nuestros resultados fueron inferiores (110). Otro estudio conducido en Uganda por Nalumansi et al, reportaron que el valor de sensibilidad fue de un 70% y de especificidad 92% en pacientes sospechosos que asistieron a las entidades de salud (111). Sin embargo, en un estudio realizado en Tailandia al evaluar esta prueba rápida en las mismas condiciones, obtuvieron resultados de sensibilidad de 98.33% y especificidad de 98.73% comparado con la técnica de referencia (112). Otro estudio realizado por Rahman et al, en Bangladesh obtuvieron resultados de sensibilidad

Resultados y Discusión

de 85% (IC95% 81-89), especificidad de 100% (IC95% 99-100), VPP de 100% y VPN de 92.8%, con una concordancia de 95% específicamente en pacientes sintomáticos con alrededor de cinco días de inicio de los síntomas, muy similares a los obtenidos en nuestra evaluación (113).

Se analizó el desempeño clínico de dos ensayos inmunocromatográficos evaluados, de acuerdo al Ct de las muestras obtenido en la RCP-TR. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Desempeño clínico de dos ensayos inmunocromatográficos de acuerdo al Ct de las muestras							
PRD-Ag	Grupos de estudio	Se% (IC95%)	Es% (IC95%)	VPP% (IC 95%)	VPN (IC95%)	Conc% (IC95%)	Kappa (IC95%)
COVID-19 Antigen Rapid Test (Colloidal Gold), JoinStar	Muestras con Ct<30	83 (65-94)	99 (92-100)	96 (78-100)	94 (85-98)	95 (88-98)	0.86 (0.7-1)
	Sospechosos	78 (57-91)	98 (87-100)	95 (89-100)	88 (75-95)	90 (80-96)	0.79 (0.6-0.9)
COVID-19 Antigen Test Gmate	Muestras con Ct<30	82 (59-94)	98 (87-100)	95 (72-100)	92 (80-97)	93 (83-97)	0.83 (0.7-1)
	Sospechosos	81 (57-94)	98 (86-100)	94 (71-100)	91 (78-97)	92 (82-97)	0.82 (0.7-1)

Leyenda: Se: Sensibilidad; Es: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; Conc: Concordancia

En el ensayo *JoinStar* la sensibilidad obtenida fue de 78% (IC 95%57-91) y 83% (IC 95% 65-94), en muestras con Ct<30. En el caso del ensayo *Gmate* los porcentos de sensibilidad fueron ligeramente similares por ambos criterios. De igual forma los valores de especificidad fueron de 98% (IC95% 87-100) y 99% (IC 95% 92-100) para el ensayo *JoinStar*, mientras que para el *Gmate* fue de 81% y 82%. Los resultados en cuanto a los VPP para ambos ensayos se comportaron de forma homogénea.

Los porcentos del VPN para el ensayo *JoinStar* fue de 88% y luego aumentó a un 94%, en muestras con Ct<30. Para la prueba rápida *Gmate* se obtuvieron resultados del VPN entre 91% y 92%. Por último, la concordancia establecida para el ensayo *JoinStar* cuando se analizaron las muestras de pacientes sospechosos según el índice K se considera como buena, no obstante, cuando se determinó el índice K para las muestras con Ct<30 fue muy buena. La concordancia calculada para el ensayo *Gmate*, en ambas condiciones fue muy buena.

Ambos ensayos cumplieron con los límites de sensibilidad y especificidad clínica establecidos por la OMS, pues es de esperarse, que en muestras con menores valores de $Ct < 30$, la carga viral es mucho mayor y por tanto la prueba de Ag es más sensible.

En la prueba rápida *JoinStar*, nuestros resultados fueron más bajos que aquellos descritos por el fabricante en cuanto a la sensibilidad (95% vs 83% en muestras positivas por RCP-TR con $Ct < 30$) y los resultados al evaluar la especificidad fue de 99.2% vs 98% (114). Al comparar los resultados de especificidad del ensayo *Gmate* con los declarados por el fabricante fueron muy similares, sin embargo, la sensibilidad difiere, pues nuestro valor fue de 82% en comparación al 91% obtenido por la casa comercial (115).

Krenn et al, en Italia, al evaluar la prueba *Joinstar*, reportó un 100% de especificidad y 64% de sensibilidad. En este estudio, al igual que en nuestra investigación, se observó un aumento progresivo en el rendimiento analítico del ensayo a medida que disminuyeron los valores de Ct de las muestras empleadas (116). Así mismo, De Marinis et al en Suecia reportó para esta prueba, valores de sensibilidad de 89% cuando se restringieron los análisis a los participantes con valores de Ct por debajo de 30, en individuos sintomáticos con menos de 10 días del inicio de los síntomas.(117).

En un estudio realizado en la República de Corea, se evaluó la prueba rápida *Gmate* con valores de sensibilidad de 97.8% y especificidad de 100%, que aumentaron en muestras con valores de $Ct < 30$, en paralelo a lo encontrado durante nuestros análisis (118).

En la tabla 7 se muestran los resultados del desempeño clínico de los ensayos inmunocromatográficos evaluados de acuerdo a la fecha del inicio de los síntomas (FIS).

Resultados y Discusión

Tabla 7. Desempeño clínico de los ensayos inmunocromatográficos de acuerdo a la fecha del inicio de los síntomas

PRD-Ag	Grupos de estudio	Se% (IC95%)	Es% (IC95%)	VPP% (IC 95%)	VPN (IC95%)	Conc% (IC95%)	Kappa (IC95%)
COVID-19 ANTIGEN RAPID TESTING KIT (Colloidal Gold)	Sospechosos (independientemente de la FIS)	82 (56-95)	98 (89-100)	93 (66-100)	95 (85-99)	95 (86-98)	0.84 (0.7-1)
	Sospechosos (en los primeros 5 días de la FIS)	79 (49-94)	98 (88-100)	92 (60-100)	94 (83-98)	94 (84-98)	0.81 (0.6-1)
ONE Step Rapid Test COVID-19 Antigen Rapid Test Kit (Swab)	Sospechosos (independientemente de la FIS)	70 (46-87)	100 (92-100)	100 (73-99)	90 (79-96)	92 (83-97)	0.78 (0.6-0.9)
	Sospechosos (en los primeros 5 días de la FIS)	71 (42-90)	100 (90-100)	100 (66-99)	92 (80-97)	93 (83-98)	0.79 (0.6-1)
Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Rapid Test Kit Jinwofu	Sospechosos (independientemente de la FIS)	83 (64-93)	98 (89-100)	96 (78-100)	92 (81-97)	93 (85-97)	0.84 (0.7-1)
	Sospechosos (en los primeros 5 días de la FIS)	82 (59-94)	98 (87-100)	95 (72-100)	93 (82-98)	93 (84-98)	0.83 (0.7-1)
Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Test Kit, REALY TECH	Sospechosos (independientemente de la FIS)	95 (74-100)	95 (82-99)	91 (69-98)	98 (85-100)	95 (86-99)	0.89 (0.8-1)
	Sospechosos (en los primeros 5 días de la FIS)	100 (78-99)	95 (82-99)	90 (67-98)	100 (89-100)	97 (87-99)	0.92 (0.8-1)
SARS-CoV-2 Antigen Self Test Nasal (ROCHE)	Sospechosos (independientemente de la FIS)	79 (49-94)	98 (86-100)	92 (60-100)	93 (81-98)	93 (82-98)	0.80 (0.6-1)
	Sospechosos (en los primeros 5 días de la FIS)	82 (48-97)	97 (83-100)	90 (54-99)	94 (79-99)	93 (81-98)	0.81 (0.6-1)

Leyenda: Se: Sensibilidad; Es: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; Conc: Concordancia, **FIS:** Fecha inicio síntomas

Resultados y Discusión

En el caso del ensayo *Realy Tech*, se obtuvo valores de sensibilidad de 95% (IC 95% 74-100) y 100% (IC 95%78-99), logrando el valor más elevado cuando solamente se evaluó las muestras de individuos sospechosos en los primeros 5 días de la FIS. Como resultado del análisis del ensayo *Self Test Nasal (Roche)* la sensibilidad fue de 82% (IC 95% 48-97) en muestras de pacientes en los primeros 5 días de inicio de los síntomas, siendo mayor en comparación con las muestras del grupo de sospechosos independientemente del inicio de los síntomas. Estos pacientes sospechosos son los que acuden a las áreas de Salud con síntomas asociados a la COVID-19, estos individuos por lo general, se encuentran en la fase sintomática de la infección aguda, que coincide con el máximo de replicación viral, y que por tanto poseen una carga viral elevada, de ahí la alta sensibilidad obtenida.

El valor de especificidad osciló entre el 95 y 100%, siendo el de mejor especificidad el ensayo *One Step* (100%) y el de más bajo valor el *Realy Tech* (95%). Los VPP y VPN para los dos grupos de estudio evaluados, fueron bastante homogéneos. El grado de concordancia, según la escala de valoración del índice K para el ensayo *One Step* fue buena para ambos grupos en evaluación, sin embargo, para los ensayos *Rapid Testing Kit (Colloidal Gold)*, *Jinwofu*, *Realy Tech* y *Self Test Nasal (Roche)* fue muy buena, para los dos grupos evaluados.

Los valores de sensibilidad y especificidad clínica obtenida en nuestro estudio cumplen con los parámetros declarados por la OMS, excepto el ensayo *One Step* que presentó una sensibilidad muy baja. Al comparar nuestros resultados con las indicaciones de los fabricantes de cada ensayo evaluado en el presente estudio, tenemos que para el *Rapid Testing Kit (Colloidal Gold)* la sensibilidad fue inferior al valor indicado por el fabricante (95.65%) (119). Para el ensayo *One Step*, la sensibilidad de nuestro resultado fue bastante inferior a los declarados por el fabricante (97%), no siendo así en cuanto a la especificidad, pues fueron resultados muy similares (120).

En cuanto al ensayo *Jinwofu*, se obtuvieron resultados de especificidad con alta similitud a los publicados por el fabricante, y la sensibilidad fue de un 83%, no concordando con los resultados declarados por esta casa comercial (92.58%) (121). La prueba *Realy Tech* arrojó valores de sensibilidad de 95% y especificidad de 95%, en contradicción a lo declarado por el fabricante de 96% y 100% respectivamente (122). Con el *Self Test Nasal* (Roche) se obtuvo un valor de sensibilidad de 79% en nuestros análisis, mucho menor que el declarado por el fabricante, ambos estudios con valores de especificidad similares (94).

Nuestros resultados están en concordancia con evaluaciones anteriores sobre el rendimiento clínico de la PRD-Ag SARS-CoV-2, como la autopueba *Self Test Nasal* (Roche). En un estudio holandés, el valor de sensibilidad obtenido fue de 80.1% y especificidad de 99.9% en pacientes sintomáticos de 5-7 días de inicio de los síntomas, similares a los nuestros (123). Así mismo Lindner et al, en Alemania reportó valores similares de sensibilidad (82.5%) y especificidad de (100%) (124).

En China se llevó a cabo un estudio del ensayo *Rapid Testing Kit (Colloidal Gold)*, en donde obtuvieron valores de sensibilidad de 75% y especificidad de 100% en los primeros 6 días del inicio de los síntomas, muy similares a los obtenidos durante nuestra evaluación (125).

Un estudio español, en el cual se evaluó el rendimiento clínico del ensayo *Realy Tech*, que incluyó los resultados de 98 personas, encontró una sensibilidad general de 62% y especificidad de 97% para esta prueba. Sin embargo, nuestros resultados fueron excelentes, el porcentaje de sensibilidad en pacientes sospechosos en los primeros 5 días de inicio de los síntomas fue de 100% y de especificidad de un 95%, para un criterio de concordancia muy buena según el índice K (126).

Otros ensayos, bajo el mismo principio inmunocromatográfico, no evaluados en el presente trabajo también han arrojado resultados similares a los descritos por nosotros. En este sentido, Lambert-Niclot et al, al evaluar el ensayo *Respi-Strip Ag* en Francia, reportaron valores de especificidad 100% y sensibilidad 50% comparado con los resultados por la RCP-TR. Aunque el fabricante describió un aumento de la sensibilidad al evaluar muestras con Ct <30, en pocos días del inicio de los síntomas (127).

Resultados y Discusión

En un estudio desarrollado en Japón por Nagura-Ikeda et al, en el cual evaluaron la prueba *Spline SARS-CoV-2* (muestra de saliva), encontraron valores muy bajos de sensibilidad, recomendaron el uso de estas pruebas rápidas acompañados de los resultados de la RCP-TR, ya que, las muestras de saliva no son tan buenas como las nasofaríngeas en la detección del SARS-CoV-2 (128). Por su parte, Landaas et al, describieron para el ensayo *Panbio* una sensibilidad general de 74% y una especificidad de 99,9%. En este estudio los autores reportaron un aumento de la sensibilidad a 83.3% cuando examinaron solo muestras con valores de Ct por debajo del umbral estimado de infectividad ($Ct < 30$) (129).

Así mismo para el ensayo *COVID-VIRO^R*, Cassuto et al, en Francia revelaron una sensibilidad y especificidad significativamente similares comparadas con estudios previos, con valores de 96.8% (IC95% 83,78-99,92) y 100% (IC95% 98,19-100) respectivamente. La sensibilidad y la especificidad clínicas fueron significativamente altas para las muestras con valores de $Ct < 30$ en los primeros 5 días del inicio de los síntomas, lo que justifica su dependencia de la carga viral. Por lo tanto, se asume que esto puede ayudar con el diagnóstico preciso y el aislamiento y tratamiento oportunos de los pacientes con COVID-19, contribuyendo a un mejor control de la pandemia global (130).

Para la evaluación del ensayo Standard F (IFA) se utilizaron muestras de exudado nasofaríngeo en medio de transporte viral de muestras positivas y negativas de la RCP-TR. Se obtuvieron los valores de sensibilidad, especificidad, VPN, VPP, concordancia e índice de Kappa que se muestran en la Tabla 8.

Resultados y Discusión

Tabla 8. Desempeño clínico del ensayo Standard F (IFA)						
N total	Se% (IC 95%)	Es% (IC 95%)	VPP% (IC 95%)	VPN% (IC 95%)	Conc% (IC 95%)	Kappa (IC 95%)
-Total de muestras (N=87)	96 (85-99)	100 (88-100)	100 (91-100)	95 (81-99)	98 (91-100)	0.95 (0.89-1)

Leyenda: Se: Sensibilidad; Es: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; Conc: Concordancia

Para el panel de muestras totales analizadas, tenemos que 48/87 muestras resultaron positivas, para una sensibilidad del 96% (IC95% 85-99). Por otra parte, la especificidad alcanzada fue de 100% (IC95% 88-100). Con respecto al resto de los parámetros, el VPP fue de 100%, mientras que el VPN se encontró en un 95%. Por último, la concordancia establecida para esta prueba según el índice de Kappa se considera como muy buena, con un valor de 95%. En el presente estudio se obtuvo un desempeño favorable cuando se evaluó el panel de muestras totales con el ensayo *Standard F (IFA)*. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos están por encima de los recomendados por la OMS. Nuestros resultados fueron inferiores a los descritos por los fabricantes en cuanto a la sensibilidad (96% vs 100%) y para la especificidad en ambos estudios se obtuvieron valores de 100% (95).

Un estudio en España, en donde evaluaron el desempeño del ensayo *Standard F* en comparación con los resultados por la RCP-TR, revelaron una sensibilidad de 84% (IC95% 76.1-89.7), una especificidad de 99.6% (IC95% 98.5-99.9), el VPP fue de 98,1% (IC95% 92.7-99.7) y el VPN de 96,4% (IC95% 94.4-97.7), el valor de la concordancia según el índice K fue de 0.89 (131). Por otra parte, un estudio desarrollado en Chile arrojó resultados de sensibilidad y especificidad muy similares a los nuestros (132). Así mismo una evaluación de 3 pruebas rápidas, incluida el *Standard F* en Italia, reportaron un valor de sensibilidad muy inferior (35.7%), aunque la especificidad fue de 100% (133).

V.5.1 Discusión general

Las limitaciones derivadas del uso de técnicas moleculares para los fines epidemiológicos y clínicos del diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 han llevado a explorar recientemente otras alternativas. Las PRD-Ag son métodos de diagnóstico rápido, basados en la inmunocromatografía lateral, inmunofluorescencia y técnicas inmunoenzimáticas, que ya se emplean para otros agentes etiológicos de enfermedades infecciosas. La capacidad diagnóstica mediante PRD-Ag en otros procesos virales respiratorio es limitada, debido a la escasa carga viral en su fase aguda, no ocurriendo así en el caso del SARS-CoV-2, donde la carga viral es alta en la nasofaringe de los pacientes infectado.

La sensibilidad de los primeros ensayos antigénicos era significativamente menor en comparación con las técnicas moleculares (56,2% (IC 95%: 29,5-79,8) con una especificidad relativamente comparable (99,5% (IC 95%: 98,1-99,9) (134). Sin embargo, la nueva generación de pruebas de detección de antígenos presenta, durante los primeros cinco días del inicio de los síntomas, valores de sensibilidad y especificidad elevadas (135,136). Se ha demostrado que los siguientes factores relacionados con la carga viral, pueden usarse como marcadores subrogados de la validez de los ensayos de antígenos: i) tiempo de infección: durante la primera semana de síntomas la sensibilidad de la prueba de antígenos es de 93,9% (IC 95%: 86,5-97,4); ii) índice Ct: la sensibilidad de la prueba de antígenos es de 98% (IC 95%: 90-100) para muestras con $Ct \leq 25$, y de 57% (IC 95%: 48-65) para muestras con un $Ct \geq 30$ (137).

Disponer de una prueba con buena sensibilidad y especificidad son condiciones necesarias, pero no suficientes para un diagnóstico individual certero en entornos como el de la COVID-19 con prevalencias cambiantes según el lugar y el tiempo. En escenarios en los que la probabilidad de infección por SARS-CoV-2 sea alta, como en entornos de transmisión comunitaria, alta prevalencia de COVID-19 o pacientes con clínica compatible o previamente expuestos al virus, un resultado positivo en la PDR-Ag probablemente indique infección aguda.

Sin embargo, en ese mismo escenario, no puede interpretarse con igual certeza un resultado negativo, por lo que sería necesaria una segunda prueba, bien otra PDR-Ag unos días después o una prueba molecular. Por el contrario, en entornos de baja prevalencia o cuando haya poca sospecha de infección por SARS-CoV-2 las PDR-Ag se asocian con un alto valor predictivo negativo, por lo que descartan con fiabilidad la infección.

Las pruebas antigénicas no serían idóneas en el estudio de casos asintomáticos, puesto que en general en este contexto clínico los niveles de carga viral son bajos. Sin embargo, la sencillez y bajo coste de esta prueba permiten repetirlas con frecuencia (138). Las PRD-Ag no son tan precisas como las pruebas moleculares, pero son más accesible en términos de disponibilidad y facilidad de uso, y se pueden utilizar como un diagnóstico primario en el punto de atención médica (los llamados *point of care*) fuera del laboratorio (81). La disponibilidad de resultados en un corto período de tiempo (15-20 min) y la frecuencia con la que se pueden realizar estas pruebas, han demostrado ser características más importantes que la sensibilidad de las mismas. En este sentido, los ensayos inmunocromatográficos evaluados en el presente trabajo (*Joinstar*, *Oralwell*, *Rapid Testig Kit*, *Gmate*, *Jinwofu*, *MP*, *One Step*, *Realy Tech*, *Self Test Nasal* y *Rapid Antigen Test Nasal* ambos de la firma *Roche*, el *Rapid Response* y *Standard Q*) demostraron ser una herramienta útil para un diagnóstico precoz del SARS-CoV-2 en pacientes sintomáticos en los primeros cinco días de inicio de los síntomas (sospechosos).

En el caso del *Oralwell*, aplicado en muestras de saliva y el *Self Test Nasal (ROCHE)* en muestras nasales se observó que permiten detectar la presencia del agente viral hasta los primeros cinco días del inicio de los síntomas, igualmente en individuos sospechosos. Esto permite que dichos pacientes puedan recibir la atención adecuada por el sistema de salud y a la vez seguir medidas orientadas por las autoridades sanitarias como el autoaislamiento y el rastreo de contactos. Aunque en varios estudios se informa que estos tipos de muestra no son ideales para el diagnóstico del SARS-CoV-2, pues las muestras de exudado nasofaríngeos son más fehacientes, ya que, es la faringe el sitio primario de replicación de este virus. En nuestra evaluación se obtuvo excelentes resultados con la prueba *Oralwell*. Estas autopruebas

Resultados y Discusión

contribuyen a que la población acceda a las pruebas rápidas, y en un mínimo tiempo conozcan si son positivos a la COVID-19 y de esta manera disminuir la transmisibilidad. Por supuesto tiene como limitantes la interpretación de los resultados y la toma de muestra por el propio individuo.

Por otra parte, el *Standard F (IFA)* Ag evaluado en esta investigación, no cuentan con la solidez de un diagnóstico primario en el punto de atención médica, pues precisan de instrumental y personal de laboratorio especializado. Esto constituye una desventaja en el escenario clínico-epidemiológico frente a cualquier pandemia. Sin embargo, esta prueba mostró mejores resultados con respecto a los ensayos inmunocromatográficos evaluados. Esto puede deberse a que permite la obtención de una señal amplificada, es decir, cuanta más concentración de Ag hay en una muestra (muestras con menor Ct/ pacientes sospechosos) mayor es el complejo Ag-Ac que se forma, dando lugar a una mayor intensidad de la señal de fluorescencia en el Ac de detección.

A nivel poblacional, los objetivos fundamentales de los ensayos de detección de Ag SARS-CoV-2 son: diagnosticar aquellos pacientes que son infecciosos y están en riesgo de transmisión, para tomar las medidas pertinentes y que los individuos puedan viajar, regresar a la escuela, trabajar y asistir a reuniones masivas. Así, una amplia disponibilidad de estas pruebas ofrece la promesa de diagnosticar tempranamente gran cantidad de personas en la comunidad, para garantizar entornos seguros para la reanudación de actividades sociales, educativas y económicas (81). Sin embargo, ninguna prueba es perfecta cuando se trata de los atributos de precisión, accesibilidad, asequibilidad y puntualidad de los resultados. Para la elección de un ensayo diagnóstico se deben tener en cuenta dichos atributos, así como la prevalencia de la enfermedad (COVID-19) en la población sometida a prueba. Aún se necesita seguir evaluando estas pruebas rápidas para comprender mejor su utilidad, cómo interpretar y actuar sobre los resultados obtenidos.

VI. CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

- Los ensayos inmunocromatográficos evaluados tienen un desempeño clínico aceptable para el diagnóstico rápido de la COVID-19 según los requerimientos de la OMS, excepto los ensayos *Rapid Test Nasal (Roche)*, *One Step, MP*, *Avioq* y *Core test*.
- El ensayo de IFA *Standard F COVID-19 Ag* tiene muy buen desempeño clínico y buena utilidad para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en los individuos.

VII. RECOMENDACIONES

VII. Recomendaciones

- Informar a las autoridades del MINSAP los resultados obtenidos en la evaluación de los ensayos de detección de antígeno SARS-CoV-2.
- Realizar la evaluación de los ensayos *Standard F COVID-19 Ag (IFA)* y el *Standard Q COVID-19 Ag* utilizando muestras colectadas de pacientes sospechosos.
- Teniendo en cuenta los resultados de la evaluación del ensayo *Standard F COVID-19 Ag*, desarrollar un análisis a partir de otros criterios clínicos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. Referencias bibliográficas

1. Majumder J y Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **The AAPS J.** 2021.23:14.
2. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, Liu J. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. **Europ J Clin Microbiol & Infec Dis.** 2020.39:1629–1635.
3. Han G. Pangolins Harbor SARS-CoV-2-Related Coronaviruses. **Trends in Microbiol.** 2020. Vol.28, No. 7.
4. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cal Y, Cheung C, Xia Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **J Gen Int Med.** 2020. 35(5):1545–9.
5. Lam T, Shum M, Zhu C, Tong Y, Ni B, Liao Y y Li L. Identification of 2019-ncov related coronaviruses in Malayan pangolins in southern China. **Biorxiv 2020.** Google Scholar.
6. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA.** 2020; 323 (22):2249-5.
7. Vashist S. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. **Diagnostics** 2020,10,202.
8. Tang Y, W Schmitz, Persing DH y Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. **J Clin Microbiol.** 2020. 58(6): 10.1128.
9. **FIABILIDAD, U y LIMITACIONES, Y.** 2020.COVID-19.
10. Acosta B, Piñón A, Valdés O, Savón C, Arencibía A., Guilarte E y Hernández B. Rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 in Cuba. **Eme infect dis.** 2012.18(2):336.
11. OMS. 2020a. COVID-19 diagnostic testing in the context of international travel: scientific brief, 16 December 2020. Citado el 20 de octubre 2023 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf.
12. **CECMED. 2020. REGULACION No. 47-2007. REQUISITOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS DIAGNOSTICADORES.**

Referencias bibliográficas

13. Pyrc K, Dijkman R, Deng L, Jebbink M. F, Ross H. A, Berkhout B y Van der Hoek L. Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution.**J Molecular Biol.** 2006. 364(5):964-973.
14. Lim YX, Ng YL, Tam JP y Liu DX. Human coronaviruses: a review of virus–host interactions.**Diseases.** 2016. 4(3):26.
15. Shi Y, Wang G, Cai, X, Deng, J, Zheng L, Zhu H, et al. An overview of COVID-19. **J Zhejiang University-SCIENCE B.** 2020.21(5): 343-360.
16. Graham R. L, Donaldson E. F y Baric R. S. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses.**Nat Rev Microbiol.**2013.11(12): 836848.
17. Chan-Yeung M. XU RH.**Sars: epidemiology. Respirol.**2003. 8: S9-14.
18. Reina J. El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica que amenaza al mundo. **Vacunas.** 2020. 21(1): 17-22.
19. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H y Tan, W. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.**Lancet.** 2020. 395(10224): 30305-30306.
20. OMS (2023). Datos de casos confirmados y fallecidos de COVID-19 a nivel mundial, hasta el primero de mayo de 2023. Citado el 01 de noviembre 2023. <https://www.covid19.who.int/data>.
21. Park S. E. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19).**Clin Exp Pediatr.** 2020. 63(4): 125-132.
22. Ozma M. A , Maroufi P, Khodadadi E, Köse Ş, Esposito I, Ganbarov K y Zeinalzadeh, E. Clinical manifestation, diagnosis, prevention and control of SARS-CoV-2 (COVID-19) during the outbreak period.**Infez Med.** 2020. 28(2): 153-165.

Referencias bibliográficas

23. Mousavizadeh L y Ghasemi, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis.**J Microbiol, Immunol Infect.** 2020.
24. Kaur N, Singh R, Dar Z, Bijarnia R. K, Dhingra, N y Kaur, T. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2.**Infec, Gene Evol.** 2020. 104490.
25. Yang Y, Peng F, Wang R, Guan K, Jiang T, Xu G, et al. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. **J Autoimm.** 2020.109: 10243.
26. Boni M, Lemey P, Jiang X, Lam T, Perry B, Castoe, T y Robertson, D. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic.**Nat Microbiol.** 2020.
27. Hu B, Guo H, Zhou P y Shi Z.L.Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19.**Nat Microbiol.** 2021.Volumen 19.
28. Li J, Lai S, Gao G y Shi, W. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2.**Nat.** 2021.Volumen 600.
29. Focosi D y Maggi F. How SARS-CoV-2 Big data are challenging viral taxonomy rules.**MDPI Viruses.** 2023.15: 715.
30. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A y Li, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2.**Proc Nat Academy of Sciences.** 2020. 117(21):11727-11734.
31. Rabaan A, Al-Ahmed S. H, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik, Y. S y Rodríguez-Morales, A. J. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview. **Infez Med.** 2020. 28(2):174-184.

Referencias bibliográficas

32. Abbasi-Oshaghi E, Mirzaei F, Farahani F, Khodadadi I y Tayebinia, H. Diagnosis and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): Laboratory, PCR, and chest CT imaging findings.**Int J Surgery**. 2020.
33. Zhou Y, Jiang S y Du L. Prospects for a MERS-CoV spike vaccine.**Expert review of vaccines**. 2018. 17(8):677-686.
34. Zakhartchouk A. N, Sharon C, Satkunarajah M, Auperin T, Viswanathan S, Mutwiri G, et al . Immunogenicity of a receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein in mice: implications for a subunit vaccine.**Vaccine**. 2007.25(1):136-143.
35. Pallesen J, Wang N, Corbett K. S, Wrapp D, Kirchdoerfer R. N, Turner, H. L y Shi, W. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen.**Proc Nat Academy of Sciences**. 2017. 114(35) E7348-E7357.
36. Muthumani K, Falzarano D, Reuschel E. L, Tingey C, Flingai S, Villarreal D. O y Aljuaid, A. 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): 301ra132-301ra132.
37. Lan J, Yao Y, Deng Y, Chen H, Lu G, Wang W y Gao, G. F. Recombinant receptor binding domain protein induces partial protective immunity in rhesus macaques against Middle East respiratory syndrome coronavirus challenge.**EBioMedicine**.2015.2(10): 1438-1446.
38. Naqvi A, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh I, Singh A, et al. Insight into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach.**Mol Bas Dis**.2020.1866:165878.
39. Dong N, Yang X, Ye L, Chen K, Chan E W.-C, Yang M. y Chen S. Genomic and protein structure modelling analysis depicts the origin and infectivity of 2019-nCoV, a new coronavirus which caused a pneumonia outbreak in Wuhan, China.**BioRxiv**. 2020.

Referencias bibliográficas

40. Adachi S, Koma T, Nomaguchi M y Adachi A. Commentary: origin and evolution of pathogenic coronaviruses.**Fron Immunol.** 2020.11: 811.
41. Fadaka A. O, Sibuyi N, Adewale O. B, Bakare O O, Akanbi M. O, Klein A y Meyer M. Understanding the epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management of SARS-CoV-2.**J Int Med Res.** 2020. 48(8): 0300060520949077.
42. Cao Y.-c, Deng Q.-x y Dai S.-x. Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: An evaluation of the evidence.**Travel Med Infect Dis.** 2020. 35:101647.
43. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen, S et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor.**Cell.** 2020. 181(2): 271-280. e278.
44. Chen Y.W, Yiu C.-PB y Wong K.-Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates.**F1000Research.** 2020. 9.
45. Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E.**J Gen Virol.** 2005. 86(5): 1423-1434.
46. Simabuco F M, Tamura R. E, Pavan I, Morale M. G y Ventura A. M. Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses.**Gen Mol Biol.** 2021. 44(1).
47. Díaz-Castrillón F. J y Toro-Montoya A. I. SARS-CoV-2/COVID-19: The virus, the disease and the pandemic.**Med Lab.** 2021. 24(3): 183-205.
48. Hui D. S, Azhar E. I., Madani T. A, Ntoumi F, Kock R, Dar O y Drosten C. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health—The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China.**Int J Inf Dis.** 2020.91:264-266.

Referencias bibliográficas

49. Da Rosa Mesquita R, Junior L, Santana F, de Oliveira T. F, Alcântara R. C, Arnozo G. M, et al. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review.**Wiener klinische Wochenschrift**. 2020: 1-6.
50. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China.**N Engl J Med**. 2020. 382(10): 929-936.
51. Borges do Nascimento I. J, Cacic N, Abdulazeem H. M, von Groote T. C, Jayarajah U, Weerasekara, et al. Novel Coronavirus Infection (COVID-19) in Humans: A Scoping Review and Meta-Analysis.**J Clin Med**. 2020. 9(4).
52. Cheung K. S, Hung I. F, Chan P. P, Lung K, Tso E, Liu R. y Leung W. K. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. **Gastroenter**. 2020. 159(1): 6-13.
53. Cyranoski D. Mystery deepens over animal source of coronavirus.**Nat**.2020. 579(7797): 18-20.
54. Hung L. S. The SARS epidemic in Hong Kong: what lessons have we learned?..**J Roy Soc Med**. 2003. 96(8): 374-378.
55. To KW, Tsang O, Leung W. S, Tam A. R, Wu T. C, Lung D. C, 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.**Lancet Infect Dis**. 2020.20(6): 657-658.
56. Tong D, Tang A, Li K. F, Li P, Wang H. L, Yi J. P, et al. Potential Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2, Zhejiang Province, China, 2020.**Emerg Infect Dis**. 2020. 26(6): 1320-1323.
57. Tindale L, Coombe M, Stockdale J. E, Garlock E, Lau W, Saraswat, M, et al. Transmission interval estimates suggest pre-symptomatic spread of COVID-19. **MedRxiv**. 2020.
58. Rokni M, Ghasemi V y Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS.**Rev Med Virol**. 2020.30(3): e2107.
59. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis.**Nat**. 2002. 420(6917):885-891.

Referencias bibliográficas

60. Jaume M, Yip M. S, Cheung C. Y, Leung H. L, Li P. H, Kien F, et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH-and cysteine protease-independent FcγR pathway.**J Virol.** 2011.85(20):10582-10597.
61. Prompetchara E, Ketloy C y Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic.**Asian Pac J Allergy Immunol.** 2020. 38(1):1-9.
62. Calvache J. M, Rodríguez A, Martínez C y Paucar V. Utilidad de Pruebas de cadena de polimerasa, pruebas rápidas y Tomografías en pacientes con Covid-19.**J America health.** 2020.3(2):32-39.
63. Kevadiya B. D, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov M. D, Blomberg W. R, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections.**Nat Materials.**2021:1-13.
64. Corman V. M, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D. K, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.**Euro Surveill.** 2020. 25.
65. Ahn D.-G, Shin H.-J, Kim M.-H, Lee S, Kim H.-S, Myoung J, et al. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). 2020.
66. Van Kasteren P. B, 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. **J Clin Virol.** 2020. 128: 104412.
67. OMS. 2020b. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: **interim guidance, 11 September 2020.**
68. Vogels C, Brito A. F, Wyllie A. L, Fauver J. R, Ott I. M, Kalinich C. C,et al. Analytical Sensitivity and Efficiency Comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR Primer-Probe Sets. **MedRxiv.**2020.
69. Studies T. U. 2020. Early Investigations Protocols. Citado 20 de diciembre 2023 <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/early-investigations>.

Referencias bibliográficas

70. Wölfel R, Corman V. M, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller M. A, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019.**Nat.**2020. 581(7809): 465-469.
71. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Steel K. J, Hemmings O, et al. Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection.**MedRxiv.** 2020.
72. 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 Surveill.** 2020. 25(23):1560-7917.
73. Diao B, Wen K, Zhang J, Chen J, Han C, Chen Y, et al. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection.**Clin Microbiol Infect.** 2021.27(2):258-263.
74. Krüttgen A, Cornelissen C. G, Dreher M, Hornef M. W, Imöhl M y Kleines M. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. **J Virol Methods.** 2021. 288:114024.
75. Gupta A, Khurana S, Das R, Srigyan D, Singh A, Mittal A, et al. Rapid chromatographic immunoassay-based evaluation of COVID-19: A cross-sectional, diagnostic test accuracy study & its implications for COVID-19 management in India.**J Medical Research.** 2021. 153(1-2):126.
76. Cerutti F, Burdino E, Milia M. G, Allice T, Gregori G, Bruzzone B y Ghisetti V. Urgent need of rapid tests for SARS CoV-2 antigen detection: Evaluation of the SD-Biosensor antigen test for SARS-CoV-2.**J Clinical Virol.** 2020.132:104654.
77. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, Romanyk J, Pérez-García F, Gómez-Herruz, P, et al. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms.**J Clinical Virol.** 2020.133:104659.

Referencias bibliográficas

78. Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R., Chayakulkeeree M, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand.**J Virol.** 2020.17(1): 1-7.
79. Young S, Taylor S. N, Cammarata C. L, Varnado K. G, Roger-Dalbert C, Montano A, et al Clinical evaluation of BD Veritor SARS-CoV-2 point-of-care test performance compared to PCR-based testing and versus the Sofia 2 SARS Antigen point-of-care test.**J Clinical Microbiol.** 2020. 59(1): e02338-02320.
80. Kyosei Y, Yamura S, Namba M, Yoshimura T, Watabe S e Ito E. Antigen tests for COVID-19.**Biophysics and physicobiology.** 2021. bppb-v18. 004.
81. Peeling R. W, Olliaro P. L, Boeras D. I y Fongwen N. Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges.**The Lancet Infect Dis.** 2021.
82. Guglielmi G. Fast coronavirus tests: what they can and can't do.**Nat.** 2020. 585(7826): 496-498. doi:10.1038/d41586-020-02661-2.
83. Weissleder R, Lee H, Ko J y Pittet M. J. COVID-19 diagnostics in context.**Science translational medicine.** 2020. 12(546).
84. Okba N. M, Müller M. A, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel C. H, Corman V. M, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2– specific antibody responses in coronavirus disease patients.**Eme infect dis.** 2020. 26(7): 1478-1488.
85. ESPAÑA C. G. D. D. D. 2020. TEST COVID-19 SU EVOLUCIÓN FIABILIDAD, UTILIDAD Y LIMITACIONES.
86. MINSAP.2023.**Reportes de casos de COVID-19 en Cuba.**Citado el 31 Mayo del 2023.
87. Montalvo M. C, Valdés O, Muné M, Arencibia A, Martinez J, González G, et al. Interferon gamma, TGF- β 1 and RANTES expression in upper airway samples from SARS-CoV-2 infected patients.**Clin Immunol.** 2020. 220(108588): 108588.
88. Peraza M, Perez N y Marquetti M. Capacitación para la COVID-19: Experiencias del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología.** 2020.57.

Referencias bibliográficas

89. Sierra B, Pérez A. B, 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 Infect Dis.** 2020. 7(11). 90. MTO, R. 2020. RIDA GENE SARS-CoV-2. Citado el 01 de noviembre 2023 https://clinical.rbiopharm.com/wpcontent/uploads/sites/3/2020/06/pg6815_ridagene_SARS-CoV_2_2020-07-27_esla_final.pdf
91. MTO, K. 2020. COVID-19 Antigen Rapid Test Kit.
92. MTO, C. 2021. ANTIGEN ONE SARS-COV-2. Kit de prueba rápida de antígenos SARS-CoV-2.
93. MTO, JWB. 2020. COVID-19 Ag Rapid Saliva Test Device.
94. MTO, R. 2020. SARS-CoV-2 Antigen Self Test Nasal.
95. MTO, SD. 2020. Standard F COVID-19 Ag IFA.
96. Guadis E. R, Montalvo M. C, Bello M., López D, Marrero B y Sanchez W. Android applications for viral hepatitis diagnosis, research and training. **Inter AIDS Society.** 2018.21: 44.
97. MINSAP. (2020). Nota informativa sobre el nuevo coronavirus en Cuba. Citado 01 de noviembre 2023. <https://salud.msp.gob.cu/nota-informativa-sobre-el-nuevo-coronavirus-en-cuba/>
98. MTO, MPBG. 2020. Rapid SARS-CoV-2 Antigen Test Card.
99. MTO, R. 2020. SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Nasal.
100. MTO, CT. 2020. Core tests COVID-19 Ag Test.
101. MTO, ABt. 2021. Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Detection Kit (Colloidal Gold).
102. MTO, BTNX. 2021. COVID-19 Antigen Rapid Test Device.
103. MTO, SD. 2020. Standard Q COVID-19 Ag.
104. Greub G, Caruana G, Schweitzer M, Imperiali M, Muig V, Rish M, et al. Multicenter Technical Validation of 30 Rapid Antigen Tests for the Detection of SARS-CoV-2 (VALIDATE). **Microorganisms.** 2021.9, 2589.

Referencias bibliográficas

105. Steilin-Shoper J, Barbani MT, Kamgan R, Zwhalen M, Suter-Riniker F y Dijkman R. Evaluation of the Roche antigen rapid test and a cell culture-based assay compared to rRT-PCR for the detection of SARS-CoV-2: A contribution to the discussion about SARS-CoV-2 diagnostic tests and contagiousness.**J Clinical Virol Plus** 1.2021.100020.
106. Akashi Y, Horie M, Takeuchi Y, Togashi K, Adachi Y, Ueda A, et al. A prospective clinical evaluation of the diagnostic accuracy of the SARS-CoV-2 rapid antigen test using anterior nasal samples.**J Infect Chemotherapy** 28.2022.780–785.
107. Ang GY, Chan KG, Yean GY y Yu CY. Lateral Flow Immunoassays for SARS-CoV-2.**Diagnostics**.2022, 12, 2854.
108. Cremer K, Frère J, Chatzis O, De Mendonca R, Minner F, Kabamba B et al. SARS-CoV-2 antibody seroprevalence in children and workers from Belgian French-speaking primary schools.**Research Square**.2022.
109. McAulay K, Bryan A, Greninger AL, Grill F, Lake D, Kaleta EJ y Grys TE. Retrospective Clinical Evaluation of Four Lateral Flow Assays for the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies.**MedRxiv**.2020.
110. Jaaskelainen AE, Ahava MJ, Jokela P, Szirovicza L, Pohjala S, Vaphalati O et al. Evaluation of three rapid lateral flow antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection.**J Clinical Virol** 137 .2021.1047852.
111. Nalumansi A, Lutalo T, Kayiwa J, Watera C, Balinandi S, Kiconco J, et al. Field evaluation of the performance of a SARS-CoV-2 antigen rapid diagnostic test in Uganda using nasopharyngeal samples.**Int J Infect Dis** 104.2021.282–286.
112. Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. **J Virol**. 2020. 17:177.

Referencias bibliográficas

113. Rahman M, Hoque AF, Karim Y, Kawser Z, Siddik AB, Sumiya MK et al. Clinical evaluation of SARS-CoV-2 antigen-based rapid diagnostic test kit for detection of COVID-19 cases in Bangladesh. **Heliyon** 7. 2021. e08455.
114. MTO, JBT.2021.COVID-19 Antigen Rapid Test (Colloidal Gold).
115. MTO, P.2021. Gmate COVID-19 Ag.
116. Krenn F, Dächert C, Badell I, Lupoli G, Öztan GN, Feng T, et al. Ten rapid antigen tests for SARS-CoV-2 widely differ in their ability to detect Omicron-BA.4 and -BA.5. **Med Microbiol Immunol**. 2023.212:323–337.
117. De Marinis Y, Pesola AK, Stand AS, Norman A, Pernow G, Aldén M, et al. Detection of SARS-CoV-2 by rapid antigen tests on saliva in hospitalized patients with COVID-19. **Inf Ecol Epidemiol**. 2021. 11, 1993535.
118. Kwon J, Ko E, Song SY, Lee YH, Jun S, Lee K, et al. Bean extract-based gargle for efficient diagnosing COVID-19 at early-stage using rapid antigen tests: a clinical, prospective, diagnostic study. **MedRxiv**.2021.
119. MTO, ZBt.2020.COVID-19 Antigen Rapid Testing Kit (Colloidal Gold).
120. MTO, SB.2021.SAFECARE One Step Rapid Test COVID-19.
121. MTO, BJB.2021.Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Antigen Rapid Test Kit.
122. MTO, HRt.2021.Casete de Prueba Rápida de Antígeno de Nuevo Coronavirus (SARS-CoV-2).
123. Sthor J,Zwart V,Goderski G,Meijer A, Nagel-Imming C, Kluytmans-van den Bergh, et al. Self-testing for the detection of SARS-CoV-2 infection with rapid antigen tests for people with suspected COVID-19 in the community. **Clin Microbiol Infect**. 2022;28:695.

Referencias bibliográficas

124. Lindner A, Nikolai O, Rohardt C, Kausch F, Wintel M, Gertler M, et al. Diagnostic accuracy and feasibility of patient self-testing with a SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid test. **J Clinical Virol.** 141.2021.104874.
125. Wang H, Li X, Li T, Wang L, Wang L, Lin J, et al. Development of a SARS-CoV-2 rapid antibody detection kit and study on dynamic changes in antibodies in infected patients. **J Clin Respir.** 2021.15:499–505.
126. Medrano S, Martínez-Rodríguez M, Vallejo L, Esther C y Delgado-Iribarren A. Valoración de dos pruebas inmunocromatográficas para la detección de anticuerpos frente a SARS-CoV-2. **Rev Esp Quimioter.** 2022.35(6):538-543.
127. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, Vauloup-Fellous C, Morand-Joubert L, Roque-Afonso AM, et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. **J Clinical Microbiol.** 2020.58,8.
128. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, et al. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19. **J Clinical Microbiol.** 2020.58, 9.
129. Landaas E. T, Storm M. L, Tollånes M. C, Barlinn R., Kran A.-M. B, Bragstad K, et al. Diagnostic performance of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in a large, Norwegian cohort. **J Clinical Virol.** 2021.137:104789.
130. Cassuto NG, Gravier A, Colin M, Theillay A, Pires-Roteira D, Pallay S, et al. Evaluation of a SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic test as a self-test: Diagnostic performance and usability. **J Med Virol.** 2021.93:6686–6692.
131. García-Fernandez S, Pablo-Marcos D, Velasco de la Fuente S, Rodríguez MJR, Gozalo M, Rodríguez-Lozano J, et al. Evaluation of the rapid antigen detection test STANDARD F COVID-19 Ag FIA for diagnosing SARS-CoV-2: experience from an Emergency Department. **Diag Microbiol Infec Dis** 103.2022.115683.
132. Porte L, Legarraga P, Iruretagoyena M, Vollrath V, Pizarro G, Munita J, et al. Evaluation of two fluorescence immunoassays for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigen—new tool to detect infective COVID-19 patients. **Peer J.** 2021.

Referencias bibliográficas

133. Baccani I, Morecchiato F, Chilleri C, Cervini C, Gori E, Matarrese D, et al. Evaluation of three immunoassays for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigens. **Diag Microbiol Infect Dis** **101**.2021.115434.
134. Dinnes J, Deeks J, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Status and date: New, published in 2020.**
135. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, et al. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. **Int J Infect Dis**. 2020.99: 397-402.
136. Lorena P, Paulette L, Valeska V y Ximena A. Munita José M, Araos Rafael, Pizarro Gabriel, Vial Pablo, Iruretagoyena Mirentxu, Dittrich Sabine, Weitzel Thomas. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. **Int J Infect Dis**.2020. 99:328-333.
137. Larremore D. B, Wilder B, Lester E, Shehata S, Burke J. M, Hay J. A, et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. **Science advances**. 2021.7(1): eabd5393.
138. Candel F. J, Barreiro P, San Román J, Abanades J. C, Barba R, Barberán J, et al. Recomendaciones sobre el uso de pruebas antigénicas en el diagnóstico de la infección aguda por SARS-CoV-2 en la segunda onda pandémica: actitud en distintos contextos clínicos. **Rev. esp. Quimioter**.2020.466-484.