

## CAPÍTULO 5

# *Tecnologías diagnósticas para la detección de SARS-CoV-2*

### **Cómo citar:**

Gastelbondo-Pastrana B., Contreras H., Torres K., Arosemena A., Echeverri-De la Hoz D., et al. Tecnologías diagnósticas para la detección de SARS-CoV-2. En: Máttar S., Gastelbondo-Pastrana B., editores. Lecciones aprendidas del COVID-19: Una mirada interdisciplinaria. Sincelejo (Colombia): Editorial CECAR, 2023. p. 85-122. DOI: <https://doi.org/10.21892/9786287515376.5>

# Tecnologías diagnósticas para la detección de SARS-CoV-2

Bertha Gastelbondo-Pastrana; Héctor Contreras; Karina Torres; Alejandra Arosemena; Daniel Echeverri-De la Hoz, Evelin Garay; Esteban Paternina; Luis Flórez; Germán Arrieta; Eimi Brango; Camilo Guzmán

La pandemia por COVID-19 se ha manifestado como un desafío para los gobiernos de todo el mundo debido a la transmisibilidad del virus, su impacto en los sistemas de salud, la economía y la sociedad (1). Esta enfermedad reveló la inminente necesidad de realizar diagnósticos a gran escala en periodos de tiempo relativamente cortos, basados en aspectos clínicos y en pruebas de laboratorio (2). Sin embargo, la sintomatología en algunos pacientes infectados se caracterizó por ser altamente atípica y en otros casos, suele presentar de manera asintomática; por esta razón, las técnicas basadas en biología molecular e inmunología se convirtieron en herramientas indispensables para la detección y estudio de la COVID-19 (3).

Para el diagnóstico del SARS-CoV-2, se utilizan de manera rutinaria, principalmente dos técnicas: la detección del ARN viral y la reacción inmunológica como se puede evidenciar en la Figura 1(4). El ARN viral generalmente se detecta por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o haciendo uso de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos; por su parte, los anticuerpos (Acs) contra el virus, pueden detectarse mediante ensayos inmunológicos y serológicos como la prueba de ELISA (2). Cabe señalar que ambas metodologías son importantes y se complementan; no obstante, la detección del ARN viral conduce a un diagnóstico del virus en su etapa activa, mientras que los ensayos serológicos ayudan a identificar a las personas cuyo sistema inmunológico desarrolló acs para combatir la infección (1,4).

El progreso de la pandemia despertó el interés de investigadores en implementar, desarrollar e innovar técnicas y diferentes tecnologías que facilitaran la detección del SARS-CoV-2. Actualmente, el diagnóstico de COVID-19 está enfocado en la RT-qPCR considerada prueba *gold standard*; y por otra parte, el diagnóstico basado en acs. Sin embargo, las tecnologías alternativas como Secuenciación de Próxima Generación (NGS), LAMP, RT-LAMP, CRISPR-CAS, entre otras, han alcanzado gran potencial; llegando a ser incluidas en los planes de estudio y el mercado de diagnóstico para SARS-CoV-2 (5,6). Además, es importante destacar que, parámetros como la sensibilidad, la reproducibilidad y la confiabilidad de todas estas nuevas tecnologías diagnósticas de COVID-19, aún se encuentran en fase de validación y comparación. Por esto, los siguientes años (durante y pos pandémicos), han sido enfocados en las ventajas y desventajas de estas tecnologías, y de su precisión diagnóstica para la discriminación masiva y oportuna entre pacientes sanos y sospechosos; además de la importancia de su aplicación y uso adecuado durante el seguimiento y control de futuros brotes emergentes (6,7).

Aunque los procedimientos actuales han permitido manejar y analizar el curso de la pandemia, se esperarían metodologías más sencillas y accesibles en el futuro. Esto, con el fin de dotar y disponer de más laboratorios capacitados para dar respuesta a esta y las próximas emergencias sanitarias; además de cubrir, las necesidades de los sistemas de salud nacionales e internacionales (7).

El presente capítulo tiene como objetivo detallar cada una de las tecnologías diagnósticas que han sido clave para la detección de SARS-CoV-2. Se dan a conocer los diferentes tipos de muestra y el rendimiento de cada una, los principios de las principales técnicas, sus parámetros analíticos y las posibles limitaciones según la línea de tiempo de la enfermedad. Adicionalmente, se detallan algunas perspectivas futuras o métodos alternativos de diagnóstico de SARS-CoV-2, teniendo en cuenta la presión genética evolutiva de este último.

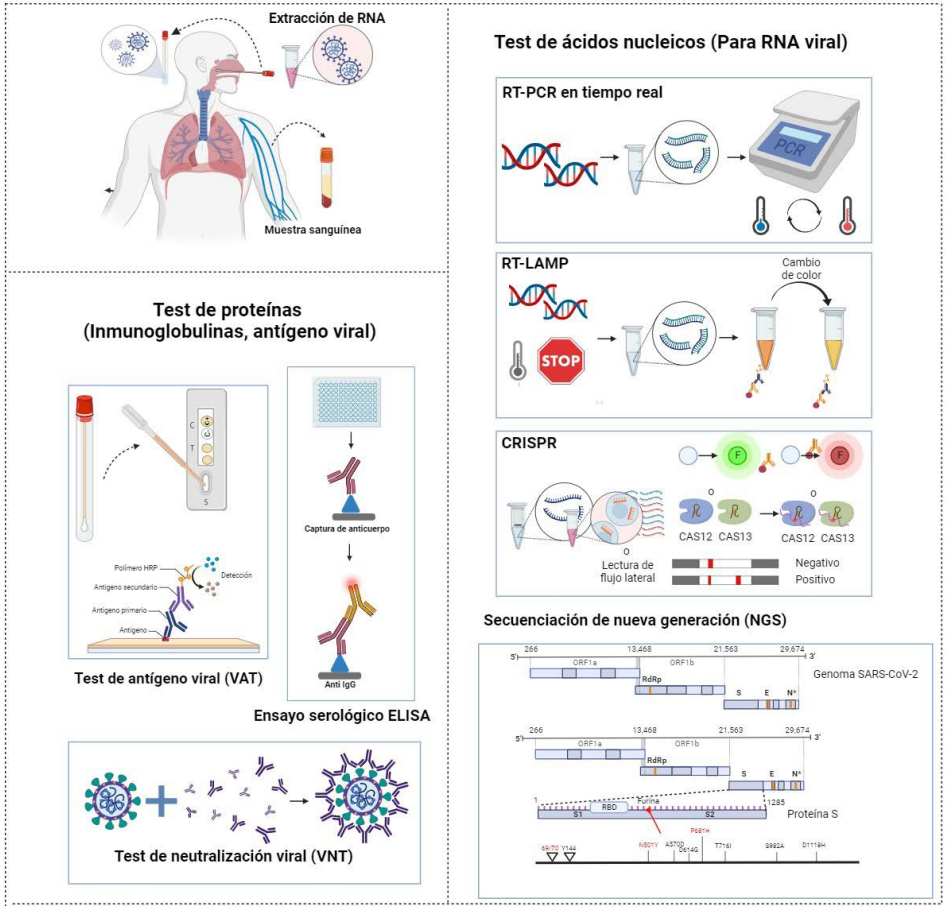


Figura 1. Tecnologías diagnósticas inmunológicas y moleculares para la detección de SARS-CoV-2.

## Tipos y procesamiento de muestras

El éxito de la técnica utilizada para el diagnóstico de COVID-19 depende entre otros de una buena toma de la muestra. Esta podrá ser tomada a partir de diferentes sitios anatómicos, en las diferentes fases de la infección

y/o curso de la enfermedad. Aparte del uso de muestras humanas o animales, también será posible analizar analitos ambientales como de superficie o de aguas residuales.

## **Muestras clínicas para el diagnóstico de COVID-19**

Generalmente, el diagnóstico por laboratorio de la infección respiratoria aguda (IRA) por SARS-CoV-2 es realizado en muestras de tracto respiratorio superior e inferior durante la infección; usando muestras como, hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo, aspirado endotraqueal, lavado broncoalveolar y esputo. Sin embargo, el uso de muestras como heces, sangre total, suero y plasma también han permitido la identificación de SARS-CoV-2, en individuos con sospecha de infección (8). El hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo son las muestras más usadas para la detección de SARS-CoV-2; ya que, para su toma, no se requieren condiciones especiales para el paciente, y esta es de fácil manipulación (9–11). De igual manera, la saliva es utilizada como alternativa de muestra para la detección viral; puesto que, es una muestra no invasiva que incluso resulta ser más efectiva que el hisopado orofaríngeo, con una sensibilidad del 96.7%, en las primeras etapas de la infección (12–14)

Asimismo, el uso de heces también ha permitido detectar casos positivos. Tal es el caso de estudios realizados en niños sospechosos para SARS-CoV-2 a través de hisopados rectales, los cuales al ser comparados con los hisopados nasofaríngeos, permiten la detección de SARS-CoV-2; incluso en casos en los que los hisopados nasofaríngeo y orofaríngeo tenían un resultado negativo. Estos resultados, evaluados con la carga viral, indican una persistencia del virus en el tracto gastrointestinal por mucho más tiempo que en el tracto respiratorio; lo cual lo convierte en una ayuda diagnóstica clave, en pacientes sospechosos de COVID-19. Lo anterior sugiere, que hay una eliminación del virus por el tracto gastrointestinal; conllevando a algunos investigadores a sugerir que esto podría incidir en una posible transmisión oro-fecal de SARS-CoV-2 (15–17).

Adicionalmente, la toma de muestras en animales domésticos como perros y gatos para la detección de SARS-CoV-2 a través de hisopados nasal u oral, heces o hisopados rectales y muestras de sangre (suero); han permitido la confirmación y la detección por primera vez de la enfermedad por la sintomatología presentada de sus dueños quienes también presentaban infección por COVID-19 en Colombia (18–20). Adicionalmente, a través de la secuenciación del genoma de SARS CoV-2 a partir de hisopados nasofaríngeos, fue posible confirmar la transmisión de SARS CoV-2 del humano al perro (21).

### **Muestras ambientales para la vigilancia epidemiológica de SARS-CoV-2**

Por otro lado, en aras de implementar políticas de salud pública para controlar y evitar la transmisión del SARS-CoV-2, se empezó a evaluar la detección de este virus en muestras de aguas residuales basada en el protocolo del CDC; aplicando este a muestras no-humanas. Un primer estudio realizado con muestras obtenidas de campo mostró resultados eficientes en la detección del virus, en otras muestras ambientales con resultados positivos para ARN de SARS-CoV-2 por ensayo RT-qPCR; demostrando las ventajas de la vigilancia ambiental, a través del monitoreo de las aguas residuales para la evaluación de los virus que circulan en una comunidad determinada. En resumen, vigilancia epidemiológica basada en la detección viral en aguas residuales (22–24).

La toma de hisopados ambientales a partir de superficies del laboratorio, así como también de otros sitios como clínicas, empresas e incluso en el hogar, han sido útiles para el monitoreo de la presencia de SARS-CoV-2. El protocolo estandarizado para la toma de este tipo de muestra utiliza un hisopo ya sea de algodón, más económico, o poliestireno al cual se le retira una de las puntas y se le aplica 100 µl del medio (solución que contiene 0.5% Tritón X-100 con 0.05 mm EDTA); y se debe frotar la superficie rotando el hisopo en 4 direcciones. Una vez tomada la muestra se coloca el hisopo en un tubo que posteriormente será inactivado con calor, luego centrifugado, y a partir del pellet recuperado se realizará la detección por RT-qPCR de SARS-CoV-2, tal como se detalla en la Figura 2 (25).

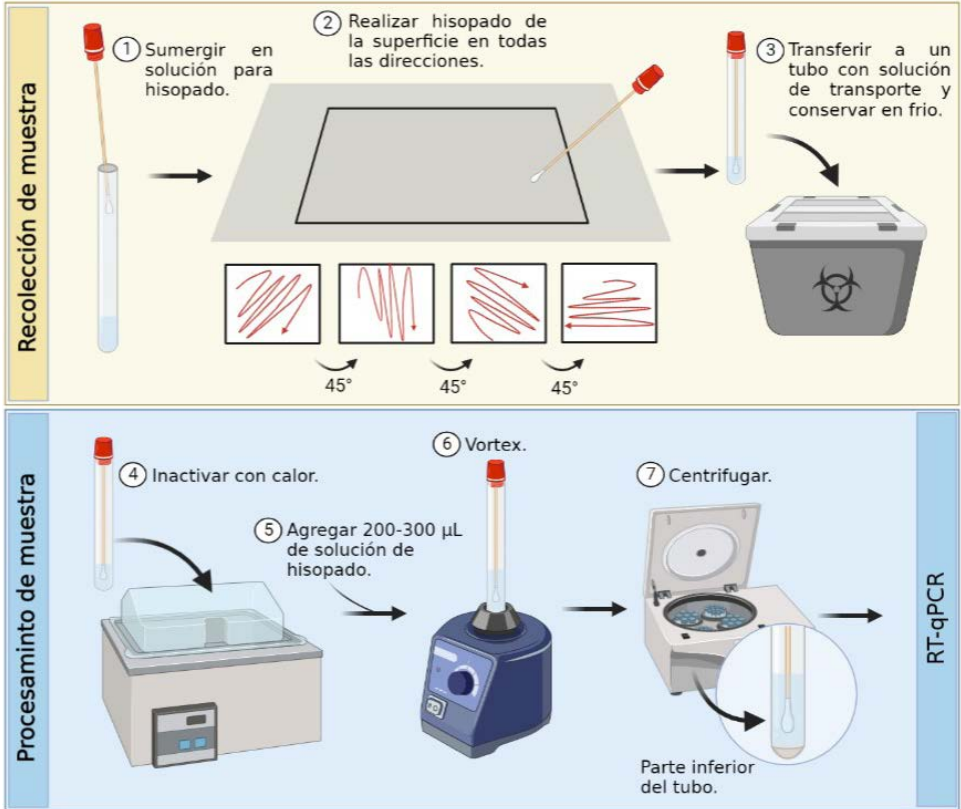


Figura 2. Protocolo para la detección de SARS-CoV-2 a partir de muestras de superficies. Tomado de Mascuch et al 2020. (25).

## Procesamiento de muestras para el diagnóstico de COVID-19

Para el montaje de cualquiera de las técnicas de diagnóstico de SARS-CoV-2, los especímenes biológicos deben ser procesados en muestras compatibles para la técnica de elección. Para el caso de ensayos serológicos, muestras como sangre total, suero o plasma podrán ser utilizadas de manera directa en la prueba. Por su parte, para los métodos moleculares, en el que se realiza la detección de ácidos nucleicos, a las muestras se les realizará la extracción de ARN presente (26). Este aislamiento podrá ser realizado con

métodos manuales o automatizados que permitirán la recuperación del material genético del virus del SARS-CoV-2 presente en el espécimen; realizando de esta manera el diagnóstico molecular de COVID-19.

Principalmente, encontramos tres tipos de extracción de ARN viral desde distintos tipos de muestras. El primero y más antiguo, pero aún vigente, hace referencia a la extracción orgánica, la cual es considerada el método gold standard para aislar el ARN viral. Este método está basado en una solución de fenol-cloroformo, que con una fase de centrifugación permite la separación de la fase orgánica (proteínas, lípidos y ADN) de la fase acuosa (ARN). Otra técnica de extracción más moderna consiste en el aislamiento de ARN a con perlas magnéticas que permiten la captura del material genético en la muestra y ofrece una alta eficiencia en la captura y concentración del ARN; esta técnica ha sido adaptada a robots que permiten procesar de manera automatizada una mayor cantidad de muestras al mismo tiempo. Por último, el aislamiento a través de columnas con membranas de sílice constituye la técnica que utiliza la propiedad de este, para atrapar el ARN viral; el cual será recuperado a través de múltiples centrifugaciones y lavados, en menos tiempo que con una extracción orgánica (26).

## **Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2**

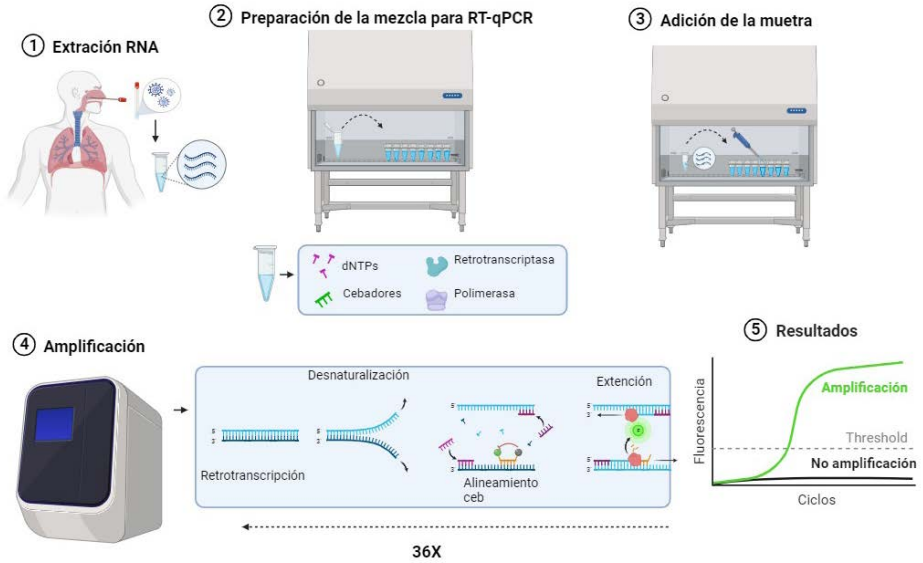
Debido a la rápida expansión a nivel mundial del SARS-CoV-2 y a la gravedad que la enfermedad generaba en humanos a finales del año 2019, fue necesario desarrollar métodos de diagnóstico rápido y precisos, que apoyaran a la toma de decisiones clínicas y de salud pública. En razón de esto, fueron desarrollados diversos ensayos de diagnóstico molecular por PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR), para detectar casos de COVID-19. Sin embargo, no está claro para muchos laboratorios clínicos, de investigación y de salud pública qué técnica deben adoptar o si los datos son comparables. Entre los primeros ensayos para diagnóstico por RT-qPCR, para detección de fragmentos génicos específicos de SARS-CoV-2, se destacan los desarrollados por el Centro de Control de Enfermedades de China (CDC de China), CDC de Estados Unidos (CDC de EE. UU.), Charité Institute of Virology,



Universitätsmedizin Berlin (Charité) y Hong Kong University (HKU). Estos protocolos han sido los referentes para el desarrollo de diversos ensayos a nivel mundial, manufacturados por múltiples casas comerciales (28-32).

### **RT-qPCR para detección de SARS-CoV-2**

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se ha convertido en una técnica definitiva para cuantificar las diferencias en los niveles de expresión génica entre muestras. En los últimos 20 años, la popularidad de este método ha aumentado exponencialmente, con la publicación de miles de artículos de diversos campos de la ciencia, incluida la investigación agrícola, ambiental, industrial y médica, haciendo referencia a datos de RT – qPCR. Uno de los principales factores que ha estimulado el crecimiento de su uso, es la mayor demanda de los paneles de revisión de revistas para el uso de RT-qPCR como respaldo a las observaciones fenotípicas con datos moleculares cuantitativos. Además, el análisis de expresión génica se está utilizando ahora para complementar y respaldar los datos de expresión de proteínas de ensayos basados en proteómica. En este contexto, la prueba de RT-qPCR, fue la primera prueba de diagnóstico validada para la detección de SARS-CoV-2 a nivel mundial; y está basada en la amplificación de fragmentos genómicos que codifican diversas proteínas tanto estructurales como no estructurales, como puede observarse en la Figura 3.



**Figura 3.** Protocolo para la detección de SARS-CoV-2 a través de RT-qPCR a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos.

## Marcadores moleculares para diagnóstico de SARS-CoV-2

El virus de SARS-CoV-2 cuenta con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo (ARNss+) de aproximadamente 30.000 pares de bases, asemejándose estructuralmente al ARN mensajero (ARNm) de células eucarióticas, presenta un capuchón metilado (cap) en 5' y una cola poliadenilada (poli-A) en 3', característica que le otorga gran parecido al ARNm de la célula huésped, pero se diferencian, en que el genoma viral contiene al menos diez marcos de lectura abiertos (ORF) (28–30).

El genoma de SARS-CoV-2 se puede dividir de la siguiente manera; dos marcos de lectura abierta (ORF1ab y ORF 1b) que codifican para la replicasa vira y que presenta un tamaño de aproximadamente 21289 pb (31). Estos genes, en el comienzo de la infección serán traducidos en las poliproteínas pp1a y pp1ab, las cuales será procesadas por proteólisis para generar 16 proteínas no estructurales (nsps), que estarán implicadas en la replicación del

genoma y en la transcripción de ARNm subgenómicos (sgARNs) (32–35). Hacia el extremo 3' del genoma viral se codifican los genes de las 4 principales proteínas estructurales (proteína (S), proteína (M), proteína (E) y proteína (N)) y de proteínas accesorias (proteína (HE), 3, 7a, entre otras) (28). Los genes RdRp, E, N y S, son las dianas más utilizadas para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Por ejemplo, la PCR denominada “Corman” (Versión 1), en referencia al investigador que estandarizó este método, se dirige a una combinación del gen E y el gen RdRp. En esta configuración, el conjunto de cebadores / sondas de E-gene es específico para betacoronavirus (relacionados con murciélagos) y, por lo tanto, detecta tanto el SARS-CoV-1 como el SARS-CoV-2. Además, mientras que los cebadores del gen RdRp también son específicos para los betacoronavirus, se utilizan dos sondas: una específica para los betacoronavirus y otra específica para el SARS-CoV-2. Por su parte, el protocolo del National Institute for Viral Disease Control and Prevention, recomienda seleccionar los primers y sondas para la región marco de lectura abierto 1ab (ORF1ab), y la nucleoproteína (N) (36).

## Sensibilidad y especificidad

Estudios han demostrado que la eficiencia media en muestras clínicas es de alrededor del 90%, con una diferencia de umbral (Ct), media de 3.5 ciclos, en series de diluciones de hasta diez veces mayor de la concentración original; al probar diferentes grupos de cebadores y sondas para detección de SARS-CoV-2. Estos datos coinciden con los criterios para una RT- qPCR eficiente. Se demostró también que, en cuanto a la sensibilidad medida (valores de Ct de intersección con el eje y) es similar entre la mayoría de los conjuntos de cebador-sonda; excepto para el conjunto RdRp-SARSr (Charité). Se encontró que los valores de Ct del conjunto RdRp-SARSr (utilizando solo RdRp\_SARSr-P2 (sonda 2)), es generalmente 6-10 Ct más altos (menor detección de virus) que en otros conjuntos de cebador-sonda. Sin embargo, de igual manera que RdRp-SARSr (Charité), al probar 100 y 101 copias  $\mu\text{L}^{-1}$ , el grupo de cebadores-sondas 2019 nCoV\_N2 (Protocolo CDC), no es capaz de detectar pacientes SARS-CoV-2 con Ct <40, a partir de una muestra clínica. En tanto, a 102 copias de ARN viral  $\mu\text{L}^{-1}$ , se puede detectar ARN con diversos conjuntos

de sondas-cebadores, excepto para el conjunto RdRp-SARSr (Charité), que fue negativo ( $Ct > 40$ ) en concentraciones de 100–102 copias de ARN viral  $\mu\text{l}^{-1}$ . Los diferentes grupos de cebadores contienen primers degenerados que aumentan la sensibilidad de estos. El problema de sensibilidad de RdRp-SARSr (Charité), puede ser resuelto con un ajuste del cebador ( $S \rightarrow A$ ) (37).

## Diagnóstico serológico de la infección por SARS-CoV-2

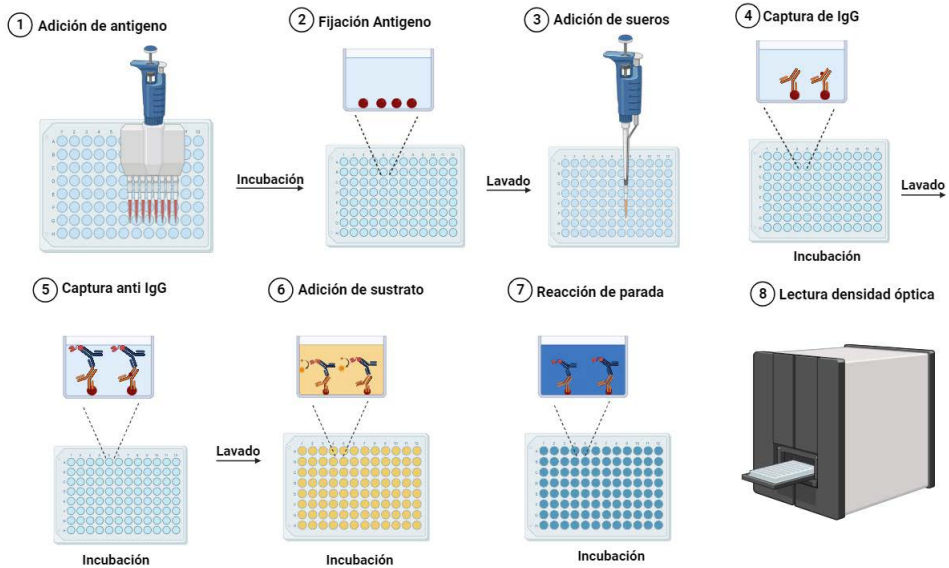
Las pruebas serológicas, también llamadas inmunoensayos, son rápidas y sencillas alternativas para la detección de personas que han estado expuestas a SARS-CoV-2 basados en la detección cualitativa o cuantitativa de antígenos (Ags) de SARSCoV-2 y/o acs anti-SARS-CoV-2. Hay varios tipos de pruebas serológicas disponibles, que incluyen: **ELISA** (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), **IFI** (prueba de inmunofluorescencia indirecta), inmunoensayos de flujo lateral o las denominadas pruebas rápidas y ensayos de neutralización.

Los inmunoensayos son muy útiles pues permiten evaluar la respuesta inmune al SARS-CoV-2, mediante la detección de anticuerpos específicos contra el virus(38). Desde inicios de la pandemia por COVID-19, varias pruebas serológicas dirigidas al SARS-CoV-2, fueron fabricadas y estuvieron disponibles comercialmente para afrontar la emergencia por este virus (39). La utilidad de los inmunoensayos se fundamenta en que son rápidos y sencillos, con una óptima sensibilidad y especificidad, pueden emplearse en distintas condiciones ambientales, y funciona como un método de detección primaria de la infección, para un oportuno tratamiento en pacientes diagnosticados (40). Sin embargo, tienen una desventaja crítica; dado que los acs dirigidos específicamente al virus normalmente aparecerían después de 6 días o más después del inicio de la enfermedad (41). Las pruebas basadas en este principio tienen un período de seropositividad de IgM a partir de la primera semana post-infección (41). Adicionalmente, es importante destacar que las pruebas serológicas dependen de la capacidad de cada organismo para producir acs, las diferencias inmunológicas intrínsecas entre individuos, pueden afectar significativamente el resultado de estas pruebas (42,43).

## **Ensayo serológico ELISA**

La detección cuantitativa de acs en personas infectadas o expuestas al algún momento por el SARS-CoV-2 ha sido uno de los ensayos serológicos claves no solo para el seguimiento de la enfermedad COVID-19 sino también para el seguimiento de individuos vacunados a través de la seroconversión. Por lo general, se utilizan muestras de suero o plasma, sin embargo, también se han adaptado estos kits de ELISA para acs como la IgG en saliva en pacientes sospechosos de COVID-19 demostrando tener una sensibilidad del 84.2% y especificidad del 100% (44).

Ese ensayo de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) detecta acs de tipo IgM, IgA o IgG, de una manera semicuantitativa basado en el inmunoensayo de sándwich de doble antígeno. Para la detección de acs totales IgM, se utilizan antígenos recombinantes que contienen el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína Spike de SARS CoV-2, que es inmovilizada en el plato y luego capturada con el antígeno conjugado a la peroxidasa de rábano picante tal como se detalla en la Figura 4. En el caso de la IgG se usa una ELISA indirecta basado en la nucleoproteína recombinante. Se ha reportado una especificidad para la ELISA de acs totales de 99.1%, para IgM de 98.6% y para IgG 99.0% (45). La detección de la IgM será solamente en los primeros 5 días; mientras que, la IgG si puede ser detectada a partir del día 14 del inicio de síntomas en las infecciones confirmadas por RT-qPCR; por lo que es importante tener en cuenta el tiempo de infección primaria para la interpretación de los resultados (46,47).



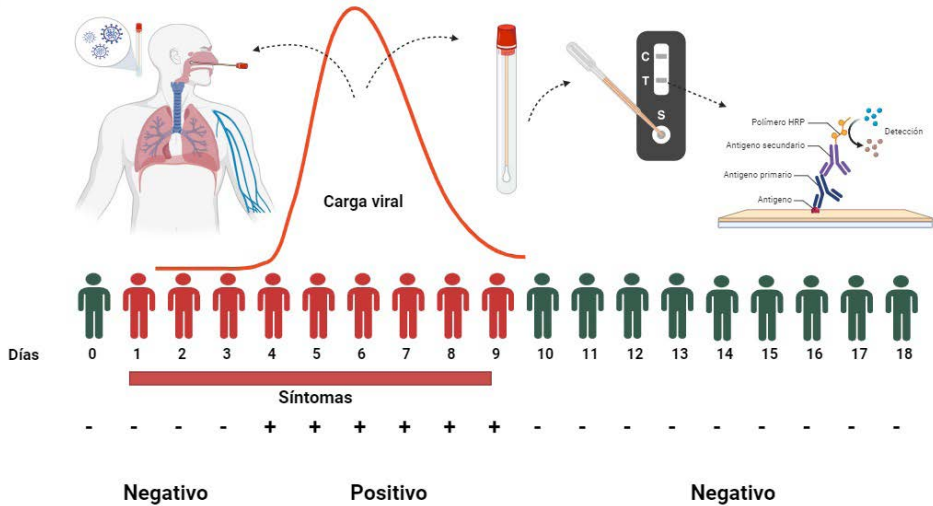
**Figura 4.** Protocolo para la detección de anticuerpos contra SARS-CoV-2 a través de Ensayo serológico ELISA.

Estos ensayos poseen un valor diagnóstico clave, adicional al de la detección de ARN de SARS-CoV-2; en el caso de los pacientes sospechosos que no ha sido confirmados por RT-qPCR. También para aquellos que han tenido contacto estrecho con personas infectadas, pero son sanos, y considerados positivos o probables portadores. Así mismo, para mirar la seropositividad de los pacientes que han sido confirmados con RT-qPCR. Epidemiológicamente, estos inmunoensayos brindan una visión general de la población en los casos de estudio de posibles brotes en determinadas poblaciones (45).

### Test de antígeno viral

Ante la emergencia sanitaria ocasionada por SARS CoV-2 era importante tener resultados rápidos que ayudaran en el diagnóstico y control de COVID-19. Es así como las pruebas rápidas, que detectan antígeno del SARS CoV-2, se convirtieron en una solución para aquellos laboratorios que no contaban con los equipos y reactivos necesarios para el diagnóstico

molecular de SARS CoV-2 por RT-qPCR. El procedimiento para el montaje de la prueba rápida de antígeno es muy sencillo, basta con adicionar 50  $\mu$ L de la muestra nasofaríngea en el cassette y luego adicionar 2 gotas del buffer a temperatura ambiente de acuerdo con las instrucciones de cada fabricante, y luego de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se procede a hacer la lectura teniendo como referencia la banda del control. Este procedimiento se encuentra detallado en la Figura 5.



**Figura 5.** Test para la detección de antígeno viral de SARS-CoV-2 a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos.

Una de las pruebas rápidas que ha demostrado tener una buena sensibilidad (71.8%) para especímenes con alta carga viral (Ct <25) y con una especificidad del 100% es la de Abbott® Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test, que fue altamente usada como ayuda diagnóstica durante la pandemia de COVID-19 (48). En general, estas pruebas son rápidas, con una oportunidad del resultado de 20-30 min, y de fácil uso sin requerimientos especiales para los laboratorios. Podemos encontrar disponibles una variedad de pruebas de detección cualitativa de antígeno de distintos proveedores comerciales de laboratorio. De acuerdo con esto, la sensibilidad y especificidad varía según

la establecida por el fabricante y por el tipo de muestra utilizada, siendo muy común el hisopado nasofaríngeo (48,49). En general la detección de antígeno viral se dirige principalmente para la proteína de la nucleocápside el cual permite un diagnóstico temprano de la infección por SARS-CoV-2 (50).

Estas pruebas de antígeno son inmunocromatográficas y su sensibilidad dependerá de los Acs monoclonales que se usen para detectar el antígeno en cada una de ellas. De igual forma los componentes del buffer de lisis utilizado en el kit previo al montaje de esta prueba rápida, la proporción del espécimen en el analito y el método utilizado para visualizar, como el uso de partículas de color, fosfatasa alcalina y su sustrato, látex de color y nanopartículas de oro coloidal para visualizar los complejos inmunes de Ag-Ac, también afectará la sensibilidad. Por ejemplo, la visualización de los resultados que se hace a través del ojo humano, se realiza a los 15-30, 30, 15, y 15 minutos respectivamente (49). Otro aspecto a tener en cuenta concierne a el hecho de que la sensibilidad analítica de las pruebas para la detección de variantes de SARS CoV-2 como por ejemplo la B1.1.7 para los cuales es baja (51). Esto quiere decir que al momento de utilizar las pruebas rápidas para la detección de Ag de SARS CoV-2 es necesario tener todos esos aspectos en cuenta antes de realizar un diagnóstico definitivo a partir del resultado de esta prueba en los casos en que el paciente tenga sintomatología característica de la enfermedad, pero los resultados no sean contundentes.

Adicionalmente, estos resultados de las pruebas de antígeno han sido comparados evaluando la sensibilidad analítica con la RT-qPCR. Los hallazgos de estas investigaciones, en las que comparan 6 pruebas rápidas, evidenciaron que la sensibilidad de 4 pruebas rápidas (Espline SARS-CoV-2, Standard Q COVID-19 Ag, ImmunoAce SARS-CoV-2, and QuickNavi COVID19 Ag) era menor que la RT-qPCR a partir de muestras biológicas y similar cuando hicieron ensayos con los aislamientos virales realizados por el laboratorio. Las pruebas que tuvieron mejor sensibilidad fueron Espline SARS-CoV-2 y la Standard Q COVID-19 Ag, mientras que las pruebas ImmunoAce SARS-CoV-2; QuickNavi -COVID19 Ag fueron las de sensibilidades bajas (49).



Estas pruebas, aunque bastante útiles para el diagnóstico de SARS CoV-2 gracias a un resultado rápido están lejos de tener la sensibilidad diagnóstica de RT-qPCR incluso en los individuos que cursan asintomáticos (52–54).

### **Ensayo de neutralización viral**

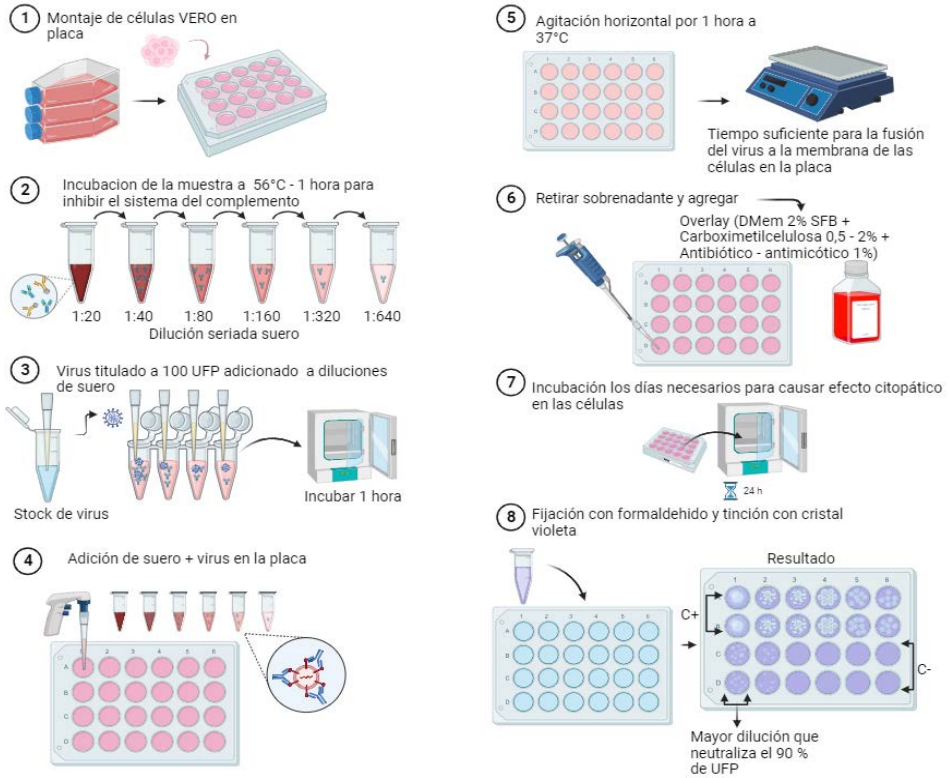
Durante el diagnóstico y seguimiento de pacientes con COVID-19 es necesario evidenciar si los acs detectados en cada uno de ellos son funcionales, es decir, capaces de neutralizar o impedir la entrada del virus a la célula y como consiguiente evitar que se inicie el proceso de replicación viral dentro de la célula. Para este fin el gold standard es el ensayo de neutralización viral. Este ensayo suple las limitaciones de ensayos como la ELISA para identificar la funcionalidad de los acs o inmunoglobulinas contra SARS-CoV-2. De esta manera, el ensayo de neutralización será útil no solo en la evaluación de la respuesta humoral en los individuos posterior a una infección natural sino también posterior a la vacunación, como por ejemplo para las vacunas de ARNm BNT162b2 (Pfizer) y ARNm-1273 (Moderna) sobre todo ante el auge de nuevas variantes producto de mutaciones en la proteína Spike de SARS CoV-2 (55–57).

La prueba de seroneutralización por reducción en placa es de los ensayos serológicos más específicos y sensibles para medir acs neutralizantes (Nab) contra un agente infeccioso, en ella se detecta y cuantifica la neutralización de acs en muestras de suero mediante el cálculo del porcentaje de reducción de la actividad del virus por conteo y comparación de número de placas (área localizada de infección debido al efecto citopático) con una cantidad estándar de virus) (58) .

Las reacciones de neutralización tienen como principio la interacción entre inmunoglobulinas que se dirigen contra antígenos superficiales de los virus (glicoproteínas de envoltura o antígenos de la cápside) bloqueando la ligación entre estas y el receptor celular ACE2 lo que impide la unión del virus a la célula. Este efecto se evalúa al colocar en una placa, una mezcla de virus y suero sanguíneo en células susceptibles al virus específico. Para ello es necesario incubar el suero a usar para inactivar el sistema del

complemento, para garantizar que el virus se esté neutralizando por función de las inmunoglobulinas y no por la cascada bioquímica que producen estas proteínas que componen el sistema del complemento (59).

El objetivo de la técnica es descubrir en que dilución del suero testeado, tiene la capacidad de inhibir la formación de efecto citopático, reduciendo el número de unidades formadoras de placas (UFP) en 50% siendo llamado PRNT 50. A partir de una dilución de virus ya titulado, que produzca una media de 100 UFP y diluciones seriadas de los sueros a testar. Las células finalmente se superponen con un medio semisólido OVERLAY, compuesto por carboximetilcelulosa 3% y medio MEM 2% SFB para restringir la propagación del virus y limitar una expansión exagerada a células vecinas. Estos ensayos se realizan en células VERO-E6 montadas en placas de 12, 24, 48 y 96 pozos, incubadas a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por el periodo de incubación del virus hasta formar efecto citopático, para realizar fijación con formalina 10% y tinción con cristal violeta; como se encuentra detallado en la Figura 6 (60).



**Figura 6.** Ensayo de neutralización viral para la detección de SARS-CoV-2.

Como esta técnica ha sido considerada el estándar de oro para determinar la protección inmunológica NAb anti-SARS-CoV-2, ha sido implementada en estudios con sueros de individuos vacunados para comprobar la inducción de acs neutralizantes que deberían producir las vacunas para SARS-CoV-2. Esto teniendo en cuenta el periodo y dosis para determinar respuesta humoral a la vacuna por medio de la actividad débil o alta de neutralización por los que se ha establecido que la protección inmunológica contra el SARS-CoV-2 relacionada con la neutralización viral mediada por acs (59).

En SARS-CoV2 por medio de estas pruebas se ha atribuido una eficacia de hasta el 92 % a una dosis única de la vacuna Comirnaty/BNT162b2 y Moderna después de 14 días desde el inóculo, sin embargo, los resultados destacan que 12 días después de la primera dosis la producción de Nab es débil, pero la respuesta mejora después de la segunda dosis (61).

Cuando estos ensayos evaluados en laboratorio *in vitro* se realizan a pequeña escala, se les denomina ensayos de microneutralización. A la fecha existen muchos protocolos de microneutralización dependiendo del número de células que se utilicen, condiciones de cultivo, la cantidad de virus para el paso de la infección, el tiempo de incubación virus-suero-células y el tiempo de lectura. Estos ensayos fueron creados en 1990 con la capacidad de detectar acs con actividad neutralizante que previene la infección viral en las distintas líneas celulares. La actividad de neutralización se mide como la capacidad del suero de reducir el efecto citopático (ECP) debido a la inhibición de la entrada viral y por consiguiente replicación. Esto convierte a la micro neutralización en un método más preciso de evaluar la protección *in vitro* mediada por acs (55).

Este ensayo ha permitido evidenciar acs neutralizantes ante la infección de SARS CoV-2 tanto en humanos como en animales. En un estudio realizado encontró que el 94% de los participantes generaron acs neutralizantes capaces de neutralizar del 42-99% de pseudovirus en los ensayos de neutralización 14 días después de la exposición, en otros estudios se evidenciaron a los 21 días de exposición. En un estudio de caso-control el 79% de los individuos tenía títulos bajos de acs (<1:1000) luego de 39 días del inicio de los síntomas mientras que solo el 3% mostraron títulos >1:5000. En general estos acs son detectados entre los 7-15 días después del inicio de síntomas, incrementando en los días 14-22 después decayendo por un periodo de 6 meses (62).

La mayoría de los estudios en los que fueron evaluados los acs neutralizantes se correlacionan con la IgG virus-específica, ya sea con IgG anti-Spike o IgG anti-RBD. En otro estudio se aislaron acs específicos para la proteína N y su potencial de unirse a los sitios de clivaje de la proteasa como alternativa para la RBD aislada de plasma convaleciente. De hecho, esta

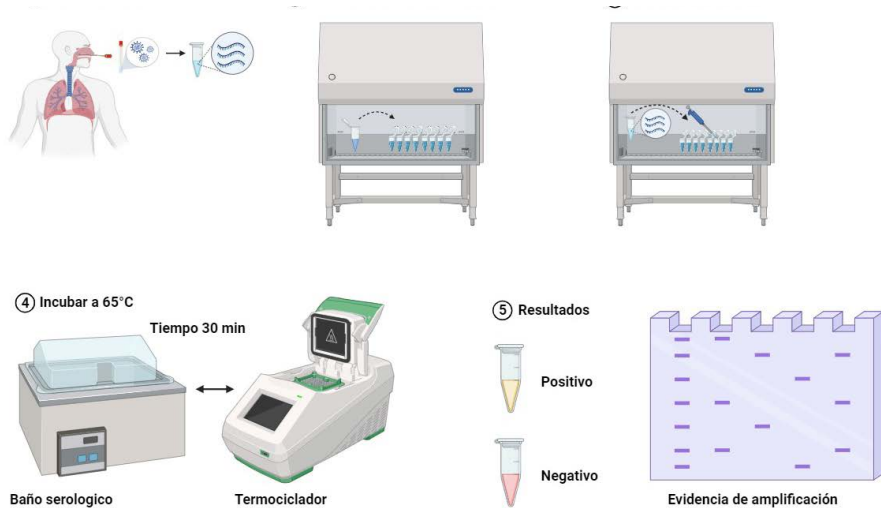
IgG anti-N tuvo una correlación significativa con la reducción de la carga viral, medida a través del Ct (cycle threshold) (62). La IgG que demostró una correlación muy fuerte entre los títulos de acs fue la IgG-anti-S1 (63).

## **Métodos alternativos de detección de SARS-CoV-2**

La emergencia sanitaria de COVID-19 exigió a la comunidad científica una rápida detección de SARS CoV-2. Esto permitió no solo estandarizar en tiempo récord su diagnóstico por RT-qPCR, sino también el desarrollo de otros métodos alternativos de diagnóstico molecular de SARS CoV-2 con alta sensibilidad y especificidad.

### **PCR isotérmica LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle)**

Debido a la rápida diseminación del virus, la OMS recalcó la importancia en tener a la mano un método rápido y simple de diagnóstico de SARS CoV-2. Fue así como se empezó a aplicar una retrotranscripción a una amplificación isotérmica, obteniendo de esta manera un método de detección de SARS-CoV-2 en 30 minutos. La tecnología Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), por sus siglas en inglés, es una tecnología de amplificación de DNA que ya había sido aplicada previamente para virus, bacterias y parásitos. Esta reacción se caracteriza porque se da a una temperatura constante (65°C), y el ADN diana puede ser amplificado en tan solo 30 minutos, como puede observarse en la Figura 7. Todo esto permite no solo realizar el procedimiento de detección más rápido, sino que no requiere de equipos especializados como termocicladores en tiempo real o equipos especializados sino un equipo sencillo como un termociclador de punto final ni tampoco personal especializado para su montaje (64,65).



**Figura 7.** PCR isotérmica LAMP para la detección de SARS-CoV-2 a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos.

Para la ejecución de este método, se utilizan cuatro cebadores o primers para amplificar seis regiones distintas en el gen diana; y este luego, es detectado colorimétricamente o fluorométricamente. Todo esto aumenta la especificidad de la prueba; de esta manera los cambios en el color, niveles de fluorescencia o turbidez indican la presencia de ARN de SARS-CoV-2. Sumado, a un par adicional de “cebadores de bucle” para acelerar la reacción (66).

Ahora bien, las reacciones de la Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) utilizadas para la detección de SARS-CoV-2 incluye entonces una transcripción reversa y una ADN polimerasa con una alta actividad de desplazamiento en la hebra y tolerancia a altas temperaturas. En este paso, las muestras son incubadas de 20 a 60 minutos a una temperatura constante (65°C), los oligonucleótidos servirán de primers para la transcripción reversa, y finalmente, son asignados oligonucleótidos adicionales para la ADN polimerasa. Luego este producto de la transcripción inversa servirá de plantilla para la ADN polimerasa que con la adición de deoxinucleótidos trifosfatos, realizará la reacción de extensión. Una vez finalizada la reacción y el tiempo transcurrido para la lectura de los resultados,

la amplificación de ácidos nucleicos libera pirofosfatos e iones hidrógeno que disminuyen el pH de la solución de la reacción, esto se revela con un indicador sensible al pH para evidenciar un resultado positivo o negativo de RT-LAMP, en donde por ejemplo el rojo de fenol el cual es de un color rosado a pH 8.2-8.6, cambia a un color amarillo cuando el pH baja (67).

*Sensibilidad y especificidad.* La RT-LAMP para SARS-CoV-2 ha demostrado tener una sensibilidad alta al detectar ARN viral en los 30 minutos de reacción y es de 2 copias en 25 µl de reacción (80 copias de ARN viral por ml) si se usan primers específicos para el gen N, S y ORF1ab. Incluso si el número de copias de ARN es 200 por reacción, el resultado de la amplificación podrá ser evidenciada a los 15 minutos. Esta tecnología se encuentra evaluada para el diagnóstico de COVID-19 (65). La RT-LAMP adaptada para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 a partir de hisopados nasofaríngeos y muestras de esputo con la detección de gen diana el gen S de SARS CoV-2, ha demostrado poseer una sensibilidad del 88.89% vs la sensibilidad de la RT-qPCR de 81.48% y una especificidad del 99.00% en un estudio realizado en el 2020. Así mismo el rendimiento de la RT-LAMP, a partir de hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos, al ser comparada con la RT-qPCR para la detección de SARS CoV-2 con genes diana ORF1a/b y gen N, se evidenció con una sensibilidad del 97.5% y una especificidad del 99.7%. Estos datos han permitido demostrar que esta prueba diagnóstica, la cual no requiere equipos especiales, y que simplemente requiere de una temperatura constante y una inspección visual; se considera una prueba simple, rápida y muy sensible que facilita a todos los laboratorios la detección de SARS-CoV-2(65,67,68).

### **Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas)**

A partir del ARN extraído de hisopados nasofaríngeos también es posible detectar el SARS-CoV-2 mediante el ensayo basado en la detección de la búsqueda de la endonucleasa o enzima CRISPR obteniendo un resultado rápido (<40min) y fácil de implementar en los laboratorios. Esta tecnología fue desarrollada por Gootenberg *et al* en el 2018 a partir de la denominada, por el término en inglés, tecnología SHERLOCK (Specific High-sensitivity

Enzymatic Reporter unLOCKing) que permitía la detección de ADN o ARN entre muestras que diferían por un solo nucleótido; esto a partir de una señal fluorescente emitida por un reportero que emite fluorescencia cuando es clivado por este tipo de enzimas (69). Esta detección es posible incluso en muestras con bajas concentraciones de material genético (67). Así mismo, esta tecnología revolucionó el campo de diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas en tanto se utilizó para la detección de virus como Dengue (DENV), Zika (ZIKV) y Virus del Papiloma Humano (VPH) u otras aplicaciones como la mutación de genes en ADN circulante libre en las células a partir de pacientes con cáncer de pulmón (70).

Es así que, se utiliza la tecnología SHERLOCK en combinación con una pre-amplificación isotérmica con el clivaje preferencial de las enzimas Cas como tecnología diagnóstica viral de enfermedades infecciosas, dando origen a uno de los métodos basados en Cas: DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter). En este método el clivaje es realizado por un tipo de endonucleasa tipo V la Cas12a o también la Cas12b, que degrada completamente las cadenas sencillas de ADN; aunque algunas enzimas Cas tienen como target la molécula de ADN, las RNAsas como la Cas13a que utiliza ARN, puede ser reprogramada con ARNs CRISP (crARNs) y de esta manera convertirla en una plataforma específica para sensar el ARN (71,72). En los primeros ensayos, los investigadores utilizaron las enzimas que bioquímicamente eran compatibles luego de caracterizar 13 miembros de la familia CRISPR-Cas13a y 14 miembros de la familia CRISPR-Cas13b. Estas nucleasas hacen parte del grupo de nucleasas CRISPR-Cas guiadas por ARN (Cas 13a-d), también existe otro grupo que es el guiado por ADN (Cas12 y Cas14) ambos grupos con capacidad de clivaje colateral, es decir, en la hebra sentido o antisentido (73). De esta manera, se pudo detectar ARN de cadena sencilla de Zika virus (ZIKV) en el canal HEX y el ARN de cadena sencilla de virus Dengue (DENV) en el canal FAM en la misma reacción con el sistema basado en la enzima Cas12a (Cpf1). Incluso es posible lograr una amplificación de la señal si se adiciona la acción de la endonucleasa efectora CRISPR tipo III Csm6 (69,74).



Este sistema basado en CRISPR/Cas13 para el diagnóstico de SARS CoV-2 fue desarrollado por un grupo de investigación en China utilizando 2 ARN guías (ARNg) para identificar los genes *S* y *ORF1ab* del genoma de SARS-CoV-2. Si en la muestra está presente SARS-CoV-2, cada uno de los ARNg reconocerá el gen asociado a este ya sea *S* o *ORF1ab*, y es aquí donde guiarán a la Cas13 para clivar los dos targets (75). Las últimas investigaciones realizadas con esta tecnología en SARS CoV-2 han demostrado que la aplicación de CRISPR permite detectar SARS CoV-2 de una manera rápida, eficiente y además con alta especificidad y sensibilidad en condiciones isotérmicas (72).

La detección de SARS CoV-2 mediante la tecnología que utiliza CRISPR es comúnmente realizada con CRISPR-Cas12a, y CRISPR-Cas13a, en algunos casos se utilizan Cas9 a partir de diferentes organismos (Tabla1). Los métodos de detección basados en este grupo de enzimas han utilizado como muestras hisopado nasofaríngeos, esputo, lavado broncoalveolar, saliva e hisopado nasal. A parte del DETECTR, encontramos otros métodos basados en Cas12 y Cas13: opvCRISPR, iSCAN, CRISPR-ENHANCE, ITP-CRISPR, VaNGuard, STOPCovid, STOPCovid.v2, RCSMS, CLAP, WS-CRISPR, dWS-CRISPR, Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 y DISCOVER. Usualmente los genes diana del SARS-CoV-2 que se utilizan para amplificar el genoma del virus corresponden al gen N y E más que el gen ORF1ab y S(76).

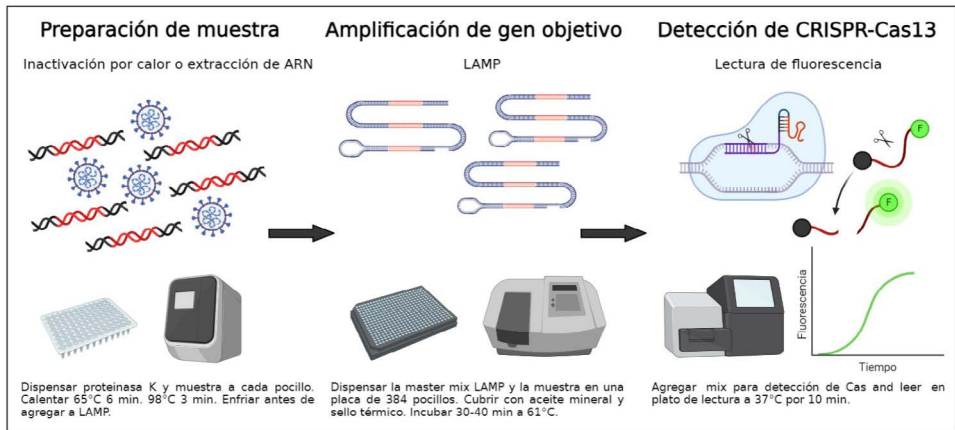
**Tabla 1.** Proteínas Cas usadas en el diagnóstico CRISPR.

Variante Cas	Enzima	Organismo
Cas12	LbCas12a (o LbaCas12a)	Lachnospiraceae bacterium
	AaCas12b (o AapCas12b)	Alicyclobacillus acidiphilus
Cas13	LbuCas13a	Leptotrichia buccalis
	LwaCas13a	Leptotrichia wadei
Cas9	FnCas9	Francisella novicida

*Modificado de Khan et al 2021(77).*

El ensayo utiliza un equipo básico de biología molecular como lo es termocicladores convencionales y transiluminadores para la detección cualitativa o un lector de fluorescencia para la detección cuantitativa, lo que garantiza el bajo costo y la rapidez del montaje de la técnica para su uso en

diagnóstico. (78). En cuanto al protocolo del montaje, es sencillo y consta de 3 pasos básicos (Figura 8). El primer paso corresponde a la preparación de la muestra ya sea con inactivación por calor o extracción del ARN. Posterior a esto se realizará la amplificación de los genes seleccionados como genes diana de SARS CoV-2 en condiciones isotérmicas a través de una RT-LAMP y por último la detección de CRISPR-Cas13 o la enzima utilizada de acuerdo al método de preferencia para el diagnóstico de SARS COV-2.



**Figura 8.** Paso a paso del protocolo utilizado para la detección de SARS Cov-2 utilizando RT-PCR mediada por la amplificación y visualización basada en CRISPR/Cas. Modificado de Manning et al, 2022.

Límite de detección (LOD), sensibilidad y especificidad. El LOD, definido como el número mínimo de copias virales que pueden ser detectadas en una muestra diferirá entre los métodos basados en CRISPR-Cas 12/13, el LOD más bajo es el del STOPCovid.v2 con 0.033 copias/ $\mu$ L. La sensibilidad clínica de estos métodos de detección está alrededor de 75-100% y una especificidad de 95.5%-100%, en donde los métodos Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 y el opvCRISPR con una sensibilidad y especificidad del 100% (76).

Estos métodos son claves para la detección de SARS-CoV-2 ya sea únicamente este virus o en montajes simultáneos con otros virus respiratorios como lo son influenza A, influenza B y virus sincitial respiratorio que permitirán su diferenciación diagnóstica ante la sintomatología similar presentada (79,80)

. Adicionalmente este método permite adaptarlo para detectar las variantes de preocupación (VOCs) de SARS CoV-2 con el diseño de distintos crARNs para los genes diana N y S y de esta manera detectar en función de las mutaciones de esos genes las distintas VOCs (81).

## Secuenciación genómica

La metagenómica con la secuenciación de nueva generación (mNGS) se ha convertido en uno de los métodos más importantes para detectar SARS-CoV-2. En el año 2001, se dio un gran avance con la publicación histórica del borrador de los resultados del proyecto del Genoma Humano por secuenciación de Sanger, desarrollada en 1977 por Fred Sanger. Esta tecnología está basada en el método de terminación en la síntesis de cadena a través de un primer iniciador en donde luego la polimerasa sintetiza la cadena de ADN complementaria a la plantilla y esta secuencia resultante será determinada. Esta primera secuenciación se le denominó secuenciación de primera generación, la detección. Más tarde, la secuenciación de la eucromatina en el 2004 abrió muchas puertas para las distintas tecnologías de secuenciación que servirían como paso clave en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas convirtiéndose en la más completa hasta el momento para estos fines (82).

La **secuenciación de Sanger** solo permitía la secuenciación de una única secuencia de un fragmento de ADN por reacción, esto se convirtió en una limitación de tiempo. Es así como se crearon los métodos de secuenciación basados en Chip, los denominados microarrays, que, aunque no permitía la secuenciación de ADN si permitía la secuenciación de variantes y ARNm al tiempo, siendo útil para describir el proteoma de SARS CoV-2 a partir de muestras de suero de pacientes con COVID-19 (83).

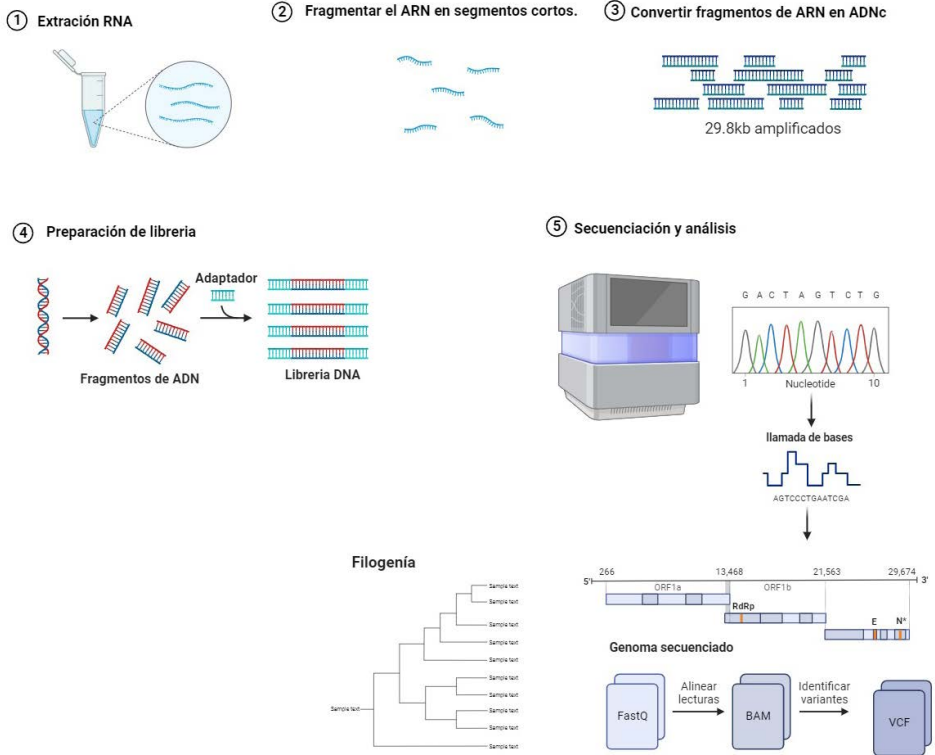
La secuenciación de **tercera generación** o de nueva generación (Secuenciadores por nanoporos) y la que se encuentra vigente se caracteriza por dos aspectos: el primero es que no se necesita PCR antes de la secuenciación con tiempos cortos de preparación del ADN y lo segundo es que la señal es capturada en tiempo real lo que significa que no importa si es fluorescente (Pacific Biosciences Pacbio) o corriente eléctrica (Nanopore), es

monitoreada durante la reacción enzimática por la adición de nucleótidos a la cadena complementaria. Pacific Biosciences introdujo la tecnología de una molécula en tiempo real o *single-molecule* real time (SMRT) con una longitud de lectura de 10 kilobases (kb). Luego en el 2014 nació MinION, con tan solo 10x3x2 cm y un peso de 90g, el primer secuenciador comercial con tecnología nanopore, desarrollado por Oxford Nanopore Technologies (ONT), y funciona identificando las bases en el ADN por la medida en el cambio de conductividad eléctrica que se genera al pasar las cadenas sencillas a través de un poro biológico. Esta tecnología ha resultado de gran utilidad para el diagnóstico de diferentes variantes de SARS CoV-2 a través de la secuenciación de genoma completo identificando las mutaciones en la proteína Spike (84). El procedimiento general de la secuenciación genómica de SARS-CoV-2 se observa en la Figura 8.

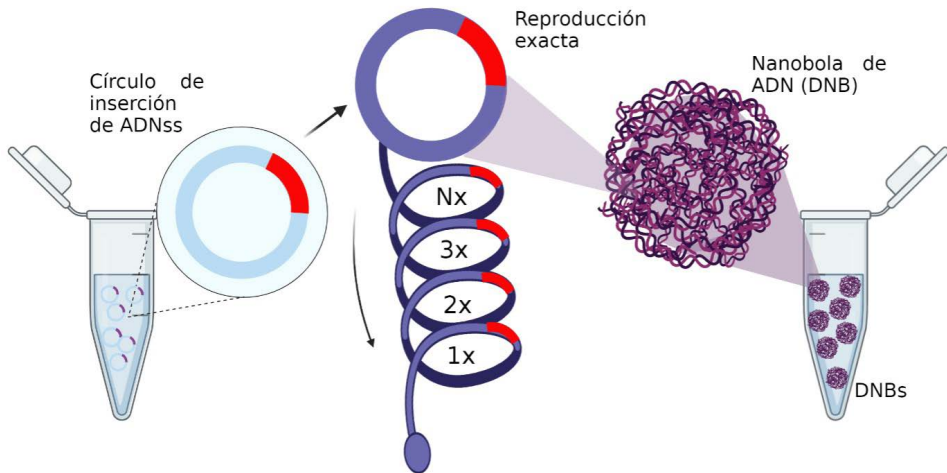
Recientemente en la secuenciación de tercera generación ha tomado auge una nueva plataforma para la secuenciación a partir de las nanoesferas que genera un incremento en la precisión y disminuye duplicados. Estas plataformas las manejan los instrumentos de secuenciación de ADN de MGI que utilizan la tecnología central de última generación denominada DNBSEQ™. Esta tecnología de secuenciación de próxima generación, consiste en que a partir de la circularización de los fragmentos de librería se generan múltiples copias clonales que aumentan la señal para robustecer la detección de la secuencia (Figura 10). Estas nanoesferas o nanobolas de ADN (DNB) son impulsados por el sistema de fluidos del secuenciador desde el tubo de muestras y cargados en una celda de flujo que contiene la matriz específica de unión de DNB, luego se le agrega el cebador de secuenciación y se hibrida con la región adaptadora del DNB (85).

Lo que hace el instrumento para lograr una secuenciación precisa, luego de adicionar sondas de dNTP marcadas con fluorescencia y ADN polimerasa, es tomar las imágenes después de que las sondas marcadas con fluorescencia en el DNS se excitan con los distintos láseres y luego esta imagen se convertirá

en una señal digital a través del software de MGI(85). Esta tecnología se ha vuelto más popular en las distintas aplicaciones de secuenciación y ha demostrado tener alta calidad en los datos como la de Illumina (86).



**Figura 9.** Protocolo general de secuenciación de Nueva Generación (NGS) por la tecnología de MGI. Modificado de brochure de equipos MGI Gencell Pharma, tecnología patentada MGI DNBSEQ (85).



**Figura 10.** Secuenciación de Nueva Generación (NGS) a través de Nanobolas de ADN. Adaptado de brochure de equipos MGI Gencell Pharma, tecnología patentada MGI DNBSEQ (85).

Finalmente, ya es posible hablar de la secuenciación de **cuarta generación**, pero aun es un método muy experimental. Se refiere a la realización de un experimento de secuenciación en contexto, es decir, del ADN de células individuales en una sección histológica por ende de su contexto. Sus aplicaciones, en vez de generar secuencias completas a partir de cada célula, estarían relacionadas con la búsqueda de secuencias de ADN definidas como por ejemplo aquellas que ya hayan sufrido una mutación somática (87). Esto podría ser útil para el diagnóstico de COVID-19 a partir de tejidos.

## Limitaciones

Las limitaciones que acarrearán las distintas tecnologías diagnósticas de SARS CoV-2 serán evaluadas a través de la sensibilidad diagnóstica. Esta sensibilidad dependerá no solo de la calidad de la toma de las muestras y tiempo transcurrido desde el contacto con SARS-CoV-2, sino también de los métodos utilizados para la extracción del material genético, esto influirá directamente en la calidad del resultado. La carga viral disminuye luego de la

fase de la enfermedad; después del séptimo día, y cerca al día catorce luego del inicio de los síntomas, pueden encontrarse falsos negativos. Así mismo es necesario tener una interpretación correcta de un resultado negativo, es decir, un resultado negativo deberá interpretarse como la ausencia del virus SARS-CoV-2 o que este virus podría estar presente, pero éste se encuentra por debajo del límite de detección de la prueba. También en este caso, es necesario tener en cuenta que, si la calidad de la muestra es baja, es decir con baja celularidad por la utilización de una técnica inadecuada, un resultado negativo no reflejará la carga viral presente en la muestra de manera que no reflejará con exactitud la carga viral presente lo cual estará relacionado con la sensibilidad analítica de la prueba utilizada (Tabla 2)(26).

**Tabla 2.** Comparación de las diferentes tecnologías diagnósticas para la detección de SARS CoV-2. Modificado de (88).

Uso	Método	Descripción	Temperatura de operación	Sensibilidad analítica	Especificidad	Tiempo
Detección de ARN viral (N,E, Orflab) Diagnóstico molecular de COVID-19 en la fase inicial	RT-qPCR	PCR regular Gold estándar	Ciclos térmicos	0.14 copias/ μL	96%-100%	2-4h
	RT-LAMP	Isotérmica Utiliza recombinasa	37°C-42°C	0.2 copias/ μL	99%	15-60 min
	DETECTR	RT-LAMP (amplificación) CRISPR/Cas12 (detección)	62°C para RT-LAMP 37°C para LbCas12a	10 copias/μL	PPV: 95% NPV: 100%	30min
Detección de Ag viral Para triage o tamizaje de pacientes.	ELISA	Inmunoensayo para virus Baja sensibilidad que la PCR	Ambiente	100 pg/mL	99.3%	3-5h

Uso	Método	Descripción	Temperatura de operación	Sensibilidad analítica	Especificidad	Tiempo
Detectar acs desarrollados por el hospedero	Prueba rápidas	Inmunoensayos para IgG y IgM	Ambiente	Cualitativo	84.2%–100%	<15 min
	ELISA	Placa de micropozos Fluorescente o cromogénico	Ambiente	100 pg/mL	67%-98.6%	3-5h
	Ensayo de neutralización	Detectar acs en fase aguda Evidenciar seroconversión	Ambiente	0.22 copias/ $\mu$ L	100%	2-3 días

PPV: Valor predictivo positivo; NPV: Valor predictivo negativo.

La carga viral también tiene un impacto directo en la precisión del diagnóstico ya que en algunos casos se podrían presentar resultados negativos en individuos positivos para COVID-19 (89,90). Se considera que los resultados positivos a partir de muestras nasofaríngeas para RT-qPCR para SARS CoV-2 disminuyen a medida que progresa la enfermedad debido a una disminución en la carga viral. En estos casos se considera que es mejor el uso de muestras como el esputo, lavado broncoalveolar o heces a partir de hisopado rectal (91). Es aquí en este punto la recomendación del uso de las pruebas de diagnóstico serológico para evaluar la respuesta inmune del hospedero a la infección. (92)

Por su parte otra limitante en el diagnóstico de COVID-19 lo constituye la secuenciación. Esta debido a su alto costo no es utilizado de rutina dentro de los laboratorios para la detección de SARS-CoV-2. Además, sus ciclos largos hacen que sea una técnica demorada. Adicionalmente, los métodos de secuenciación son susceptibles a la sustitución de nucleótidos lo que podría afectar la eficiencia de hibridación de los oligonucleótidos y obtener resultados falsos negativos(75).

En resumen, a pesar de estas limitaciones de detección como es el caso principal de la prueba *gold estándar* de la RT-qPCR, se hace necesario combinar estas pruebas moleculares con pruebas serológicas, para la detección de acs IgM/IgG; estas últimas, como pruebas complementarias ante la confirmación



de un caso sospechoso. Se debe tener en cuenta que, en las etapas iniciales de la infección, a excepción de la IgM que se detecta en los primeros días de la infección, no podrían ser útiles si permiten evidenciar la seroconversión entre los días 5-7 y 14 días después del desarrollo de los síntomas(75).

## Referencias

1. Walsh KA, Jordan K, Clyne B, Rohde D, Drummond L, Byrne P, et al. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. Vol. 81, *Journal of Infection*. 2020.
2. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. Vol. 94, *International Journal of Infectious Diseases*. 2020.
3. Peeling RW, Heymann DL, Teo YY, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. Vol. 399, *The Lancet*. 2022.
4. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. Vol. 30, *Reviews in Medical Virology*. 2020.
5. Sheikhzadeh E, Eissa S, Ismail A, Zourob M. Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. Vol. 220, *Talanta*. 2020.
6. Jalandra R, Yadav AK, Verma D, Dalal N, Sharma M, Singh R, et al. Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. Vol. 129, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2020.
7. Oishee MJ, Ali T, Jahan N, Khandker SS, Haq MA, Khondoker MU, et al. Covid-19 pandemic: Review of contemporary and forthcoming detection tools. Vol. 14, *Infection and Drug Resistance*. 2021.
8. Pan American Health Organization (PAHO). World Health Organization (WHO). 2020. *Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis of COVID-19 Virus Infection* .
9. Bland J, Kavanaugh A, Hong LK, Perez O, Kadkol SS. A Multiplex One-Step RT-qPCR Protocol to Detect SARS-CoV-2 in NP/OP Swabs and Saliva. *Curr Protoc*. 2021;1(5).
10. Berenger BM, Conly JM, Fonseca K, Hu J, Louie T, Schneider AR, et al. Saliva collected in universal transport media is an effective, simple and high-volume amenable method to detect SARS-CoV-2. Vol. 27, *Clinical Microbiology and Infection*. 2021.
11. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *Journal of Infection*. 2020;81(1).
12. Barra GB, Rita THS, Mesquita PG, Jácomo RH, Nery LFA. Analytical sensitivity and specificity of two RT-qPCR protocols for SARS-CoV-2 detection performed in an automated workflow. *Genes (Basel)*. 2020;11(10).

13. Barat B, Das S, de Giorgi V, Henderson DK, Kopka S, Lau AF, et al. Pooled saliva specimens for SARS-CoV-2 testing. *J Clin Microbiol.* 2021;59(3).
14. Babady NE, McMillen T, Jani K, Viale A, Robilotti E v., Aslam A, et al. Performance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Real-Time RT-PCR Tests on Oral Rinses and Saliva Samples. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2021;23(1).
15. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta.* 2020;505.
16. Yuan C, Zhu H, Yang Y, Cai X, Xiang F, Wu H, et al. Viral loads in throat and anal swabs in children infected with SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1).
17. Xu Y, Li X, Zhu B, Liang H, Fang C, Gong Y, et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat Med.* 2020;26(4).
18. Sit THC, Brackman CJ, Ip SM, Tam KWS, Law PYT, To EMW, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature.* 2020 Oct 29;586(7831):776–8.
19. Medkour H, Catheland S, Boucraut-Baralon C, Laidoudi Y, Sereme Y, Pingret JL, et al. First evidence of human-to-dog transmission of SARS-CoV-2 B.1.160 variant in France. *Transbound Emerg Dis.* 2022 Jul 1;69(4):e823–30.
20. Sit THC, Brackman CJ, Ip SM, Tam KWS, Law PYT, To EMW, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;586(7831).
21. Rivero R, Garay E, Botero Y, Serrano-Coll H, Gastelbondo B, Muñoz M, et al. Human-to-dog transmission of SARS-CoV-2, Colombia. *Sci Rep.* 2022 Dec 1;12(1).
22. Rojas MI, Giles SS, Little M, Baron R, Livingston I, Dagenais TRT, et al. Swabbing the urban environment—A pipeline for sampling and detection of SARS-CoV-2 from environmental reservoirs. *Journal of Visualized Experiments.* 2021;2021(170).
23. la Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment.* 2020;736.
24. Hata A, Hara-Yamamura H, Meuchi Y, Imai S, Honda R. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Science of the Total Environment.* 2021;758.
25. Mascuch SJ, Fakhretaha-Aval S, Bowman JC, Ma MTH, Thomas G, Bommarium B, et al. A blueprint for academic laboratories to produce SARS-cov-2 quantitative RT-PCR test kits. *Journal of Biological Chemistry.* 2020;295(46).
26. Ravi N, Cortade DL, Ng E, Wang SX. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosens Bioelectron.* 2020;165.

27. van Kasteren PB, van der Veer B, van Den Brink S, Wijsman L, De jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol.* 2020;128:104412.
28. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2020;
29. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview. *Infez Med.* 2020;28(2):174–84.
30. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal.* 2020;10(2):102–8.
31. Rivera Forero C, Yáñez Dukon LA, Herrera Khenayzir C, Arias JC, Niño Vargas J, Rodríguez Becerra P, et al. Integración de herramientas bioinformáticas y métodos en biología molecular para el diseño de un kit diagnóstico del COVID-19: un ejemplo de aprendizaje significativo. *Revista Mutis [Internet].* 2019 Dec;9(2):62–80. Available from: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1599>
32. Rokni M, Ghasemi V, 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.
33. Ahn DG, Shin HJ, Kim MH, Lee S, Kim HS, Myoung J, et al. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Microbiol Biotechnol.* 2020;30(3):313–24.
34. Han Q, Lin Q, Jin S, You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *Journal of Infection.* 2020;80(4):373–7.
35. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418–23.
36. National Institute for Viral Disease Control and Prevention. Specific primers and probes for detection of 2019 novel coronavirus. 2020.
37. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR assays. *medRxiv.* 2020;
38. Leuzinger K, Osthoff M, Dräger S, Pargger H, Siegemund M, Bassetti S, et al. Comparing immunoassays for sars-cov-2 antibody detection in patients with and without laboratory-confirmed sars-cov-2 infection. *Journal of Clinical Microbiology.* 2021;59(12):1–14.
39. Mercado M, Malagón-Rojas J, Delgado G, Rubio VV, Galindo LM, Parra Barrera EL, et al. Evaluation of nine serological rapid tests for the detection of SARS-CoV-2. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health.* 2020;44:1–9.
40. Wang D, Chen Y, Xiang S, Hu H, Zhan Y, Yu Y, et al. Recent advances in immunoassay technologies for the detection of human coronavirus infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2023;12(January):1–26.

41. Chansaenroj J, Yorsaeng R, Posuwan N, Puenpa J, Sudhinaraset N, Chirathaworn C, et al. Detection of SARS-CoV-2-specific antibodies via rapid diagnostic immunoassays in COVID-19 patients. *Virology Journal*. 2021;18(1):1–7.
42. Adamczuk J, Czupryna P, Dunaj-Malyszko J, Kruszewska E, Pancewicz S, Kamiński K, et al. Analysis of Clinical Course and Vaccination Influence on Serological Response in COVID-19 Convalescents. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(2):1–8.
43. Kong WH, Zhao R, Zhou JB, Wang F, Kong DG, Sun J Bin, et al. Serologic Response to SARS-CoV-2 in COVID-19 Patients with Different Severity. *Virologica Sinica*. 2020;35(6):752–7.
44. MacMullan MA, Ibrayeva A, Trettner K, Deming L, Das S, Tran F, et al. ELISA detection of SARS-CoV-2 antibodies in saliva. *Sci Rep*. 2020;10(1).
45. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(16).
46. Oliveira BA, de Oliveira LC, Sabino EC, Okay TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: A mini review on diagnostic methods. Vol. 62, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2020.
47. Beavis KG, Matushek SM, Abeleda APF, Bethel C, Hunt C, Gillen S, et al. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *Journal of Clinical Virology*. 2020;129.
48. Nordgren J, Sharma S, Olsson H, Jämtberg M, Falkeborn T, Svensson L, et al. SARS-CoV-2 rapid antigen test: High sensitivity to detect infectious virus. *Journal of Clinical Virology*. 2021;140.
49. Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Koga M, Akasaka O, Nakachi I, Koh H, et al. Comparison of rapid antigen tests for covid-19. *Viruses*. 2020;12(12).
50. 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. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(2).
51. van Ogtrop ML, van de Laar TJW, Eggink D, Vanhommerig JW, van der Reijden WA. Comparison of the Performance of the PanBio COVID-19 Antigen Test in SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Alpha) Variants versus non-B.1.1.7 Variants. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3).
52. Eshghifar N, Busheri A, Shrestha R, Beqaj S. Evaluation of analytical performance of seven rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus. *Int J Gen Med*. 2021;14:435–40.
53. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *Journal of Clinical Virology*. 2020;129.

54. Torres I, Poujois S, Albert E, Colomina J, Navarro D. Evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic close contacts of COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(4).
55. Manenti A, Molesti E, Maggetti M, Torelli A, Lapini G, Montomoli E. The theory and practice of the viral dose in neutralization assay: Insights on SARS-CoV-2 “doublethink” effect. *J Virol Methods*. 2021;297.
56. Lu L, Mok BWY, Chen LL, Chan JMC, Tsang OTY, Lam BHS, et al. Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2022 Aug 24;75(1):e822–6.
57. Fernandes Q, Inchakalody VP, Merhi M, Mestiri S, Taib N, Moustafa Abo El-Ella D, et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. Vol. 54, *Annals of Medicine*. 2022.
58. Zannoli S, Morotti M, Denicolò A, Tassinari M, Chiesa C, Pierro A, et al. Diagnostics and laboratory techniques. In: *Chikungunya and Zika Viruses: Global Emerging Health Threats*. 2018.
59. Zou J, Xia H, Xie X, Kurhade C, Machado RRG, Weaver SC, et al. Neutralization against Omicron SARS-CoV-2 from previous non-Omicron infection. *Nat Commun*. 2022;13(1).
60. Díaz FJ, Aguilar-Jiménez W, Flórez-Álvarez L, Valencia G, Laiton-Donato K, Franco-Muñoz C, et al. Aislamiento y caracterización de una cepa temprana de SARS-CoV-2 durante la epidemia de 2020 en Medellín, Colombia. *Biomédica*. 2020 Oct 30;40(Supl. 2):148–58.
61. Padoan A, Cosma C, Bonfante F, Rocca F della, Barbaro F, Santarossa C, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies after one or two doses of Comirnaty (BNT162b2, BioNTech/Pfizer): Kinetics and comparison with chemiluminescent assays. *Clinica Chimica Acta*. 2021;523.
62. Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One*. 2020;15(12).
63. Dolscheid-Pommerich R, Bartok E, Renn M, Kümmerer BM, Schulte B, Schmithausen RM, et al. Correlation between a quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and neutralization activity. *J Med Virol*. 2022;94(1).
64. Klein S, Müller TG, Khalid D, Sonntag-Buck V, Heuser AM, Glass B, et al. SARS-CoV-2 RNA extraction using magnetic beads for rapid large-scale testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses*. 2020;12(8).

65. Huang WE, Lim B, Hsu CC, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol.* 2020;13(4).
66. Yoo HM, Kim IH, Kim S. Nucleic acid testing of sars-cov-2. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* 2021.
67. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LPM, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med.* 2020;12(556).
68. Hu X, Deng Q, Li J, Chen J, Wang Z, Zhang X, et al. Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *mSphere.* 2020 Aug 26;5(4).
69. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science (1979).* 2018;360(6387).
70. Chertow DS. Next-generation diagnostics with CRISPR. *Science (1979).* 2018;360(6387).
71. Chen JS, Ma E, Harrington LB, da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science (1979).* 2018;360(6387).
72. Zhang W, Liu K, Zhang P, Cheng W, Li L, Zhang F, et al. CRISPR-Based Approaches for Efficient and Accurate Detection of SARS-CoV-2. Vol. 52, *Laboratory medicine.* 2021.
73. Wang R, Qian C, Pang Y, Li M, Yang Y, Ma H, et al. opvCRISPR: One-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection. *Biosens Bioelectron.* 2021;172.
74. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science (1979).* 2018;360(6387).
75. Jing R, Kudinha T, Zhou ML, Xiao M, Wang H, Yang WH, et al. Laboratory diagnosis of COVID-19 in China: A review of challenging cases and analysis. Vol. 54, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2021.
76. Selvam K, Najib MA, Khalid MF, Mohamad S, Palaz F, Ozsoz M, et al. Rt-lamp crispr-cas12/13-based sars-cov-2 detection methods. Vol. 11, *Diagnostics.* 2021.
77. Khan KA, Duceppe MO. Cross-reactivity and inclusivity analysis of CRISPR-based diagnostic assays of coronavirus SARS-CoV-2. *PeerJ.* 2021;9.
78. Alcántara R, Peñaranda K, Mendoza-Rojas G, Nakamoto JA, Dueñas E, Alvarez D, et al. UnCovid: A versatile, low-cost, and open-source protocol for SARS-CoV-2 RNA detection. *STAR Protoc.* 2021;2(4).
79. Zhou H, Tsou JH, Chinthalapally M, Liu H, Jiang F. Detection and differentiation of SARS-CoV-2, influenza, and respiratory syncytial viruses by crispr. *Diagnostics.* 2021;11(5).

80. Wang Y, Zhang Y, Chen J, Wang M, Zhang T, Luo W, et al. Detection of SARS-CoV-2 and Its Mutated Variants via CRISPR-Cas13-Based Transcription Amplification. *Anal Chem.* 2021;93(7).
81. Liang Y, Lin H, Zou L, Zhao J, Li B, Wang H, et al. CRISPR-Cas12a-Based Detection for the Major SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Microbiol Spectr.* 2021;9(3).
82. Levy SE, Boone BE. Next-generation sequencing strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(7).
83. Lai D yun, Jiang H wei, Li Y, Zhang H nan, Tao S ce. SARS-CoV-2 proteome microarray for COVID-19 patient sera profiling. *STAR Protoc.* 2022;3(2).
84. Kim H, Chung SH, Kim HS, Kim HS, Song W, Hong KH, et al. Investigation of SARS-CoV-2 lineages and mutations circulating in a university-affiliated hospital in South Korea analyzed using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Osong Public Health Res Perspect.* 2022 Oct 1;13(5):360–9.
85. GENCELLPHARMA GENÉTICA AVANZADA. [www.gencellpharma.com](http://www.gencellpharma.com). [cited 2022 Sep 25]. SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN NGS. Available from: [https://gencellpharma.com/?r=%2Fwp-content%2Fuploads%2F2021%2F08%2FM-GI\\_GencellPharma.pdf](https://gencellpharma.com/?r=%2Fwp-content%2Fuploads%2F2021%2F08%2FM-GI_GencellPharma.pdf)
86. Lang J, Zhu R, Sun X, Zhu S, Li T, Shi X, et al. Evaluation of the MGISEQ-2000 Sequencing Platform for Illumina Target Capture Sequencing Libraries. *Front Genet.* 2021;12.
87. McGinn S, Gut IG. DNA sequencing—spanning the generations. *N Biotechnol.* 2013;30(4).
88. Kilic T, Weissleder R, Lee H. Molecular and Immunological Diagnostic Tests of COVID-19: Current Status and Challenges. Vol. 23, *iScience.* 2020.
89. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction–based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *Ann Intern Med.* 2020;173(4).
90. Wikramaratna PS, Paton RS, Ghafari M, Lourenço J. Estimating the false-negative test probability of SARSCoV- 2 by RT-PCR. *Eurosurveillance.* 2020;25(50).
91. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. Vol. 323, *JAMA—Journal of the American Medical Association.* 2020.
92. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases.* 2020;71(15).